

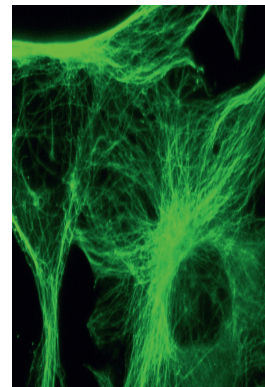
► Les microtubules sont des fibres du cytosquelette formées par l'assemblage d'hétérodimères d' $\alpha$ - et de  $\beta$ -tubuline. Ils contribuent à l'établissement de la forme des cellules et de leur polarité, ainsi qu'à leur mobilité. Ils jouent aussi un rôle important dans le transport intracellulaire et dans la division cellulaire. Le réseau microtubulaire s'adapte constamment aux besoins de la cellule. Il peut être constitué de microtubules très dynamiques ou d'autres plus stables. Pour moduler dans l'espace et le temps les différentes fonctions de ces fibres, de nombreuses modifications post-traductionnelles réversibles de la tubuline sont mises en jeu, à l'origine de ce qui est maintenant appelé le « code tubuline ». Dans cette revue, nous nous intéresserons au rôle de deux modifications caractéristiques des microtubules stables : l'acétylation et la détyrosination de l' $\alpha$ -tubuline. Nous discuterons également de l'implication de leur dérégulation dans certaines pathologies. ◀

Les microtubules sont des constituants importants du cytosquelette. Ce sont des tubes creux formés par l'association de dimères d' $\alpha$ -tubuline et de  $\beta$ -tubuline. Ces dimères sont assemblés en protofilaments. En règle générale, treize protofilaments s'alignent latéralement pour constituer la paroi des microtubules. Les microtubules sont des polymères orientés, avec une extrémité présentant la sous-unité  $\beta$  de la tubuline, appelée « extrémité plus », et une extrémité qui se termine par la sous-unité  $\alpha$ , appelée « extrémité moins » (Figure 1). Ils s'allongent ou se raccourcissent par l'incorporation ou la libération de dimères de tubuline, l'incorporation étant plus rapide du côté « plus » de la fibre. Les phases d'allongement, appelées phases de croissance, peuvent être suivies de pauses ou de phases de dépolymérisation rapides, appelées « catastrophes », parfois interrompues par un redémarrage de l'assemblage, dénommé « sauvetage ». L'ensemble de

## Déchiffrage du code tubuline

### Le voile se lève sur le rôle de l'acétylation et de la détyrosination

**Karin Sadoul, Clotilde Joubert, Sophie Michallet, Elsie Nolte, Lauralie Peronne, Sacnicté Ramirez-Rios, Anne-Sophie Ribba, Laurence Lafanechère**



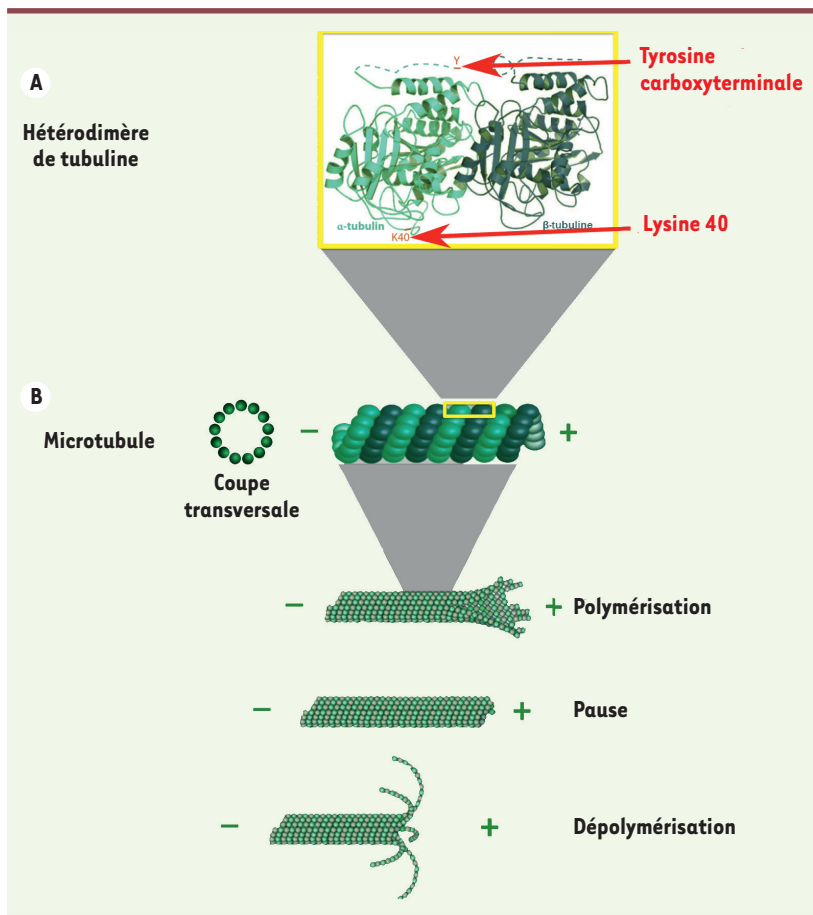
Régulation et pharmacologie du cytosquelette, Institut pour l'avancée des biosciences, Université Grenoble Alpes ; Inserm U 1209 ; CNRS 5309, Allée des Alpes, 38700 La Tronche, France.

[laurence.lafanechere@univ-grenoble-alpes.fr](mailto:laurence.lafanechere@univ-grenoble-alpes.fr)  
[karin.sadoul@univ-grenoble-alpes.fr](mailto:karin.sadoul@univ-grenoble-alpes.fr)

ces événements participe à l'instabilité dynamique des microtubules, une propriété intrinsèque de ces fibres (Figure 1).

Le diamètre large des microtubules (25 nm) leur confère une rigidité beaucoup plus importante que celle des filaments d'actine. Leurs propriétés structurales et mécaniques les destinent à des fonctions multiples dans la cellule (Figure 2). Ils forment le fuseau mitotique, qui permet de répartir équitablement les chromosomes dans les cellules filles à l'issue de la mitose ; ils contrôlent la forme des cellules et se réorganisent lors des modifications nécessaires à leur différenciation, leur polarisation ou leur migration. Les microtubules sont aussi des éléments essentiels des cils et des flagelles dans lesquels ils adoptent une organisation particulière en se répartissant en doublets et en triplets. Enfin, ils servent de rails pour acheminer des vésicules, des protéines ou des organelles au sein de la cellule.

Pour accomplir ces tâches multiples, le réseau microtubulaire est fortement diversifié. Cette diversité résulte d'une part de leur composition en isoformes de tubuline. Sept isoformes principales de la sous-unité  $\alpha$  et dix de la sous-unité  $\beta$  de la tubuline sont exprimées dans les cellules humaines (pour une comparaison de leurs séquences voir [1]). D'autre part, les dimères de tubuline, libres ou assemblés en microtubules, peuvent être soumis à plusieurs modifications post-traductionnelles à l'origine de ce qui est appelé le « code tubuline ». Cette appellation a été établie par analogie avec le « code histone » qui est déchiffré par des facteurs de transcription et d'autres protéines liant la chromatine. De manière similaire, le code tubuline est interprété par les protéines qui s'associent et interagissent avec les microtubules, souvent dénommées MAP (pour *microtubule-associated*



**Figure 1. Composition et dynamique des microtubules.** **A.** Représentation de l'hétérodimère d' $\alpha$ - et de  $\beta$ -tubuline, avec en rouge les sites d'acétylation et de détyrosination. **B.** Schéma d'un microtubule présentant les phases générant « l'instabilité dynamique ».

manière aléatoire, lorsqu'elle diffuse dans la lumière du microtubule : plus le microtubule sera stable, plus il accumulera cette modification. Le degré d'acétylation d'un microtubule peut ainsi être considéré comme une sorte d'horodatage de sa durée de vie [6]. L' $\alpha$ TAT1 accède à la lysine 40 de la tubuline par les deux extrémités du microtubule ainsi qu'au travers de brèches dans sa paroi [7]. L'accès de l'enzyme est aussi facilité lorsque les microtubules sont en contact avec la membrane cellulaire, dans les domaines recouverts de clathrine où l' $\alpha$ TAT1 est recrutée par AP-2 (*adaptor protein complex 2*), un adaptateur de la clathrine [8] (→).

(→) Voir la Nouvelle de G. Montagnac et P. Chavrier, m/s n° 2 février 2014, page 130

### Les tubuline déacétylases

L'HDAC6 (*histone deacetylase 6*) [9] et la Sirt2 (*silencing information regulator 2*) [10] assurent la réversibilité de l'acétylation de la tubuline (Figure 3A). HDAC6 est une déacétylase de classe II qui dépend du zinc. Sirt2 appartient à la famille des sirtuines, ou déacétylases de classe III, qui dépendent du cofacteur NAD<sup>+</sup> (nicotinamide adénine dinucléotide). L'activité de Sirt2 est donc fortement liée à l'état métabolique de la cellule : plus la glycolyse produit d'énergie, moins le NAD<sup>+</sup>, réduit en NADH, est disponible pour la déacétylation par Sirt2. L'équilibre énergétique de la cellule contrôle donc le taux d'acétylation de la tubuline, que ce soit lors de l'acétylation (disponibilité d'acétyl-CoA) ou lors de la déacétylation (disponibilité du NAD<sup>+</sup>).

Le substrat favori de l'HDAC6 est le dimère de tubuline, et non pas le polymère [11]. Bien que l'HDAC6 soit la tubuline déacétylase majeure, il existe une sous-population de microtubules périnucléaires plus spécifiquement déacétylés par Sirt2 dans les cellules en interphase [12]. Lors de la mitose, Sirt2 co-localise avec la protéine Furry (Fry), qui réprime son activité au niveau des microtubules fortement acétylés du fuseau mitotique puis du corps intermédiaire. Il est important de noter que la lysine 40 de la tubuline  $\alpha$  peut aussi être tri-méthylée par l'histone

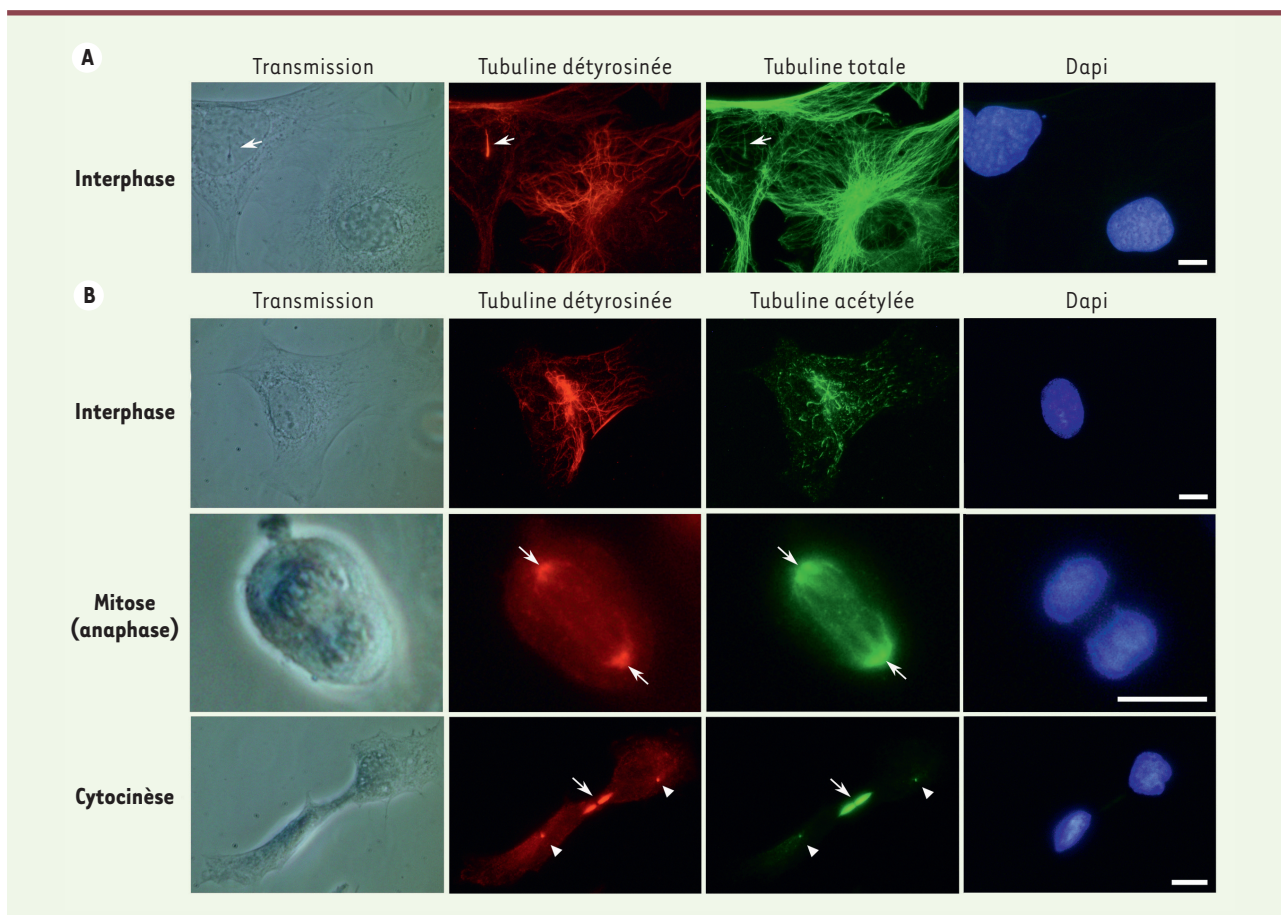
proteins). Les nombreux types de modifications post-traductionnelles de la tubuline ont été revus en détail récemment [2]. Le présent article porte plus particulièrement sur l'état des connaissances concernant deux modifications très étudiées de la tubuline  $\alpha$ , caractéristiques des microtubules stables : l'acétylation de la lysine 40 et la détyrosination de l'extrémité carboxyterminale (Figure 1-3).

### La (dé)acétylation et ses enzymes

L'acétylation d'une lysine est à l'origine une marque épigénétique décrite pour les histones. L'acétylation de l' $\alpha$ -tubuline sur sa lysine en position 40 a été le premier exemple de cette modification post-traductionnelle détecté sur une protéine cytoplasmique [3]. L'acétylation de plusieurs autres lysines des tubulines  $\alpha$  et  $\beta$  a ensuite été décrite, mais leurs fonctions restent encore mal connues (pour revue, voir [1]).

### La tubuline acétyltransférase

L'acétylation est catalysée par l' $\alpha$ TAT1 (*alpha tubulin acetyl transferase 1*) qui transfère le groupe acétyle du cofacteur acétyl-coenzyme A sur l'amine epsilon de la lysine en position 40 [4]. La conséquence directe de cette modification pour la protéine est la perte d'une charge négative et le gain d'une masse de 42 daltons (Figure 3A). Cette modification se fait à l'intérieur du cylindre microtubulaire, là où la lysine 40 est exposée [5]. L' $\alpha$ TAT1 acétyle les sous-unités  $\alpha$  de la tubuline de



**Figure 2.** L'organisation des microtubules dans les cellules. **A.** Détection par immunofluorescence des microtubules détyrosinés (rouge) et totaux (vert) dans les cellules MEF (*mouse embryonic fibroblasts*) en interphase. Seule une partie du réseau microtubulaire ainsi que le cil primaire (flèche) sont marqués par l'anticorps qui reconnaît spécifiquement l'extrémité C-terminale détyrosinée de l' $\alpha$ -tubuline. Remarque : le cil primaire est également acétylé [65], ce qui n'est pas illustré ici (barre, 10  $\mu$ m). **B.** Détection par immunofluorescence des microtubules détyrosinés (rouge) et acétylés (vert) dans les cellules MEF en interphase, en mitose et pendant la cytokinèse. À noter qu'en interphase, on n'observe pas toujours une superposition du marquage tubuline acétylée et tubuline détyrosinée. En revanche, les extrémités (-) du fuseau mitotique (flèches), le corps intermédiaire (flèches) et les centres organisateurs des microtubules (têtes de flèche) sont marqués par les deux anticorps (barre, 10  $\mu$ m).

méthyltransférase SETD2 (*SET domain containing 2*). Cette méthylation est observée dans le fuseau mitotique où elle est maintenue jusqu'à la formation du corps intermédiaire ; elle est essentielle pour une mitose et cytokinèse correctes [13]. Il reste à comprendre comment s'organisent ces événements, c'est-à-dire si la tri-méthylation et l'acétylation co-existent au sein des microtubules mitotiques ou si Sirt2 et Furry doivent se dissocier pour permettre la déacétylation de la lysine 40 par Sirt2 et ensuite sa tri-méthylation par SETD2.

### Rôles de l'acétylation

L'acétylation de la lysine 40 est en quelque sorte une marque du « code tubuline ». Existe-t-il des protéines capables de « lire » spécifiquement cette marque sur la tubuline, similairement au « code histone » où les lysines acétylées sont « lues » par des protéines nucléaires à bromodomaines ?

Une protéine cytoplasmique à bromodomaine, dénommée tcBDF3 (*Trypanosoma cruzi bromodomain factor 3*) [14], a été identifiée chez les trypanosomes. Elle se lie à l' $\alpha$ -tubuline acétylée, suggérant que les marques d'acétylation, qu'elles soient cytoplasmiques ou nucléaires, peuvent être lues par des protéines à bromodomaines spécifiques. L'acétylation des microtubules est plus une conséquence qu'une cause de leur stabilisation. Les souris déficientes en *HDAC6*, qui présentent une hyper-acétylation des microtubules dans tous les tissus, de même que les souris dépourvues d'expression d' $\alpha$ TAT1 (caractérisées par une absence presque complète de microtubules acétylés) sont viables et ne présentent que peu d'altérations physiologiques. Ceci indique que l'acétylation de la tubuline est plus particulièrement engagée dans la régulation fine des processus impliquant le cytosquelette. Par exemple,

le transport vésiculaire ainsi que le transport des mitochondries et du réticulum endoplasmique le long des microtubules est plus efficace quand les microtubules sont acétylés : les moteurs impliqués, de la famille des kinésines et des dynéines<sup>1</sup>, ont en effet plus d'affinité pour les microtubules acétylés. L'acétylation de la lysine 40 de la tubuline est par ailleurs à l'origine d'un affaiblissement des interactions latérales entre protofilaments [15]. Ceci pourrait donc expliquer l'influence du taux d'acétylation de la tubuline sur le nombre de protofilaments d'un microtubule [16]. Cette diminution de la force des interactions latérales augmente aussi la résistance des microtubules aux déformations mécaniques répétées, assurant ainsi la persistance des microtubules à longue durée de vie [15].

### Le cycle de détyrosination/retyrosination et ses enzymes

La tyrosine C-terminale de la tubuline  $\alpha$  peut être hydrolysée par la tubuline carboxypeptidase (TCP) et ré-additionnée par la tubuline tyrosine ligase (TTL). À la différence de l'acétylation, la réaction de tyrosination est spécifique de la tubuline, elle n'est observée pour aucune autre protéine connue. Le cycle enzymatique généré par l'action de la TCP et de la TTL est conservé chez les eucaryotes supérieurs. Découvert en 1972, le cycle de détyrosination/retyrosination (détyr/retyr) est la toute première description d'une modification post-translationnelle spécifique de la tubuline [17] (figure 3B).

Peu de temps après cette découverte, une forme de tubuline résistante *in vitro* à la retyrosination a été décrite. Cette tubuline non-tyrosinable représente près d'un tiers de la tubuline cérébrale chez le rat adulte [18, 19]. Sa nature moléculaire a été élucidée en 1991 [20]. Elle diffère de la sous-unité  $\alpha$  tyrosinée par la suppression des deux acides aminés C-terminaux sous l'action des carboxypeptidases cytosoliques (CCP). Cette modification du site d'action de la TTL explique pourquoi cette forme de tubuline ne peut pas être tyrosinée. Elle a été baptisée « tubuline  $\Delta 2$  » [20, 21]. Dans les tissus neuronaux, une forme supplémentaire de tubuline, la « tubuline  $\Delta 3$  », correspondant à l' $\alpha$ -tubuline dépourvue des 3 derniers acides aminés, a également été décrite ; elle est plus abondante dans le cerveau embryonnaire que dans le cerveau adulte, ce qui suggère qu'elle est importante au cours du développement [18].

### La tubuline tyrosine ligase

La tubuline tyrosine ligase (TTL) a été purifiée pour la première fois en 1985, grâce à un anticorps monoclonal spécifique de la protéine native. Chez la souris, l'inactivation du gène codant la TTL entraîne la mort périnatale des souriceaux, soulignant le rôle vital de cette protéine et du cycle de détyr/retyr [22]. La résolution de la structure 3D de la TTL a permis de comprendre pourquoi la réaction de tyrosination se fait sur les dimères de tubuline libres et non sur les microtubules. En effet, l'interaction entre la TTL et la tubuline met en jeu un site de la tubuline qui n'est plus exposé lorsqu'elle est assemblée en micro-

tubules [23]. Le fait que la TTL soit sélective de la tubuline s'expliquerait par son interaction simultanée avec les sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  du dimère. L'activité de la TTL apparaît être modulée par sa phosphorylation : des formes mutantes phospho-mimétiques suggèrent en effet que la phosphorylation de la sérine 152 bloque l'activité de l'enzyme [23]. Un anticorps monoclonal capable d'inhiber la TTL a été décrit [24] et des composés de la classe des sesterterpènes se sont révélés prometteurs pour le développement futur d'inhibiteurs pharmacologiques spécifiques de cette enzyme [25].

### La tubuline carboxypeptidase

Bien que de nombreux essais de purification aient été tentés, la nature de la TCP est restée inconnue jusqu'à récemment, lorsque deux équipes ont réussi à montrer simultanément, et avec deux approches différentes, qu'un complexe entre des tubuline carboxypeptidases, les vasohibines et les *small vasohibin-binding protein* (ou complexe VASH/SVBP) était responsable de l'activité carboxypeptidase de la tubuline [26, 27, 66] (→).

(→) Voir la Nouvelle de M.J. Moutin et al., page 1022 de ce numéro

Différents inhibiteurs pharmacologiques de l'activité TCP ont été décrits : un inhibiteur peptidomimétique covalent ainsi que le parthénolide<sup>2</sup> et le TPCK (tolylsulfonylphenylalanyl chloromethyl ketone) [26, 28, 29]. Ces deux derniers agents sont peu sélectifs de la TCP.

### Fonctions moléculaires du cycle de détyrosination/retyrosination

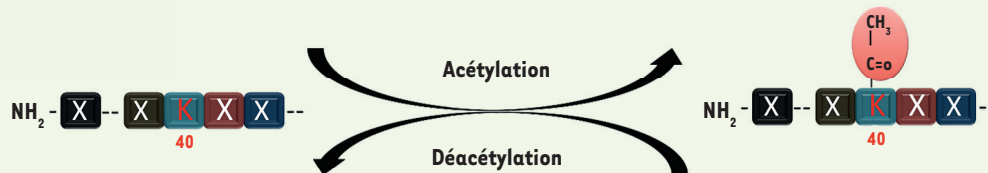
Au sein du microtubule, l'extrémité C-terminale de la tubuline  $\alpha$  n'est pas impliquée dans les interactions entre les sous-unités de tubuline, mais se déploie dans le cytoplasme à partir de la paroi des microtubules. C'est pourquoi il a été rapidement suspecté que cette extrémité de la protéine était impliquée dans des interactions avec des protéines régulatrices des microtubules. Effectivement, la présence de la tyrosine C-terminale conditionne la liaison de protéines de type CAP-Gly (*cytoskeleton-associated protein-glycine-rich domain*) à l'extrémité « plus » des microtubules [30]. Par ailleurs, elle est indispensable au fonctionnement efficace des moteurs dépolymérisants de la famille de la kinésine-13 [31]. En revanche, la tubuline sous sa forme détyrosinée favorise la liaison et l'activité processive de la kinésine 5C et de CENP-E (kinésine 7) [29, 32].

<sup>1</sup> Les kinésines et les dynéines sont des protéines motrices, qui se déplacent le long des microtubules. Les kinésines se déplacent vers l'extrémité plus et les dynéines vers l'extrémité moins.

<sup>2</sup> Une lactone sesquiterpénique.

A

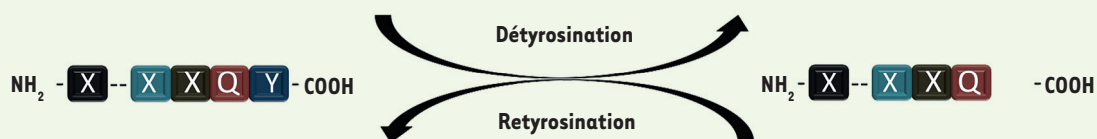
Enzyme	UniProt	Nom	Taille	Inhibiteur
Acétyltransférase	Q5SQ10	$\alpha$ TAT1 ( <i>alpha tubulin acetyltransferase 1</i> ) Mec-17 homologue	421 aa	/



Enzyme	UniProt	Nom	Taille	Inhibiteur
Déacétylase	Q9UBN7	HDAC6 ( <i>histone deacetylase 6</i> )	1215 aa	Trichostatine A MC 1568 Tubastatine A Tubacine
	Q8IXJ6	Sirt2 ( <i>Sirtuin 2</i> )	389 aa	Sirtinol Nicotinamide B2 AGK2 BML-266 AK-1

B

Enzyme	UniProt	Nom	Taille	Inhibiteur
Carboxypeptidase Sous-unité catalytique	Q7L8A9	VASH1 ( <i>vasohibine-1</i> )	365 aa	Epo $\gamma$ Parthénolide
	Q86V25	VASH2 ( <i>vasohibine-2</i> )	355 aa	
Sous-unité régulatrice	Q8N300	SVBP ( <i>small vasohibin-binding protein</i> )	66 aa	TPCK



Enzyme	UniProt	nom	Taille	Inhibiteur
Tyrosine ligase	Q8NG68	TTL ( <i>tubulin tyrosine ligase</i> )	377 aa	Sesterterpènes Anticorps bloquant

**Figure 3. Les acteurs de la (dé)acétylation et du cycle détyr/retyr.** A. La (dé)acétylation, ses enzymes et ses inhibiteurs. B. Le cycle de détyrosination/retyrosination, ses enzymes et ses inhibiteurs.

### Dérégulations de la (dé)acétylation ou du cycle de détyrosination/retyrosination des microtubules dans les pathologies

#### Acétylation et pathologies neuronales

La maladie de Charcot-Marie-Tooth est une pathologie héréditaire du système nerveux périphérique. Elle peut être accompagnée d'une

diminution de l'acétylation de la tubuline et d'une altération de l'influx nerveux axonal. Dans un modèle murin de la maladie, l'inhibition de la déacétylase HDAC6 rétablit le phénotype sauvage [33]. Par ailleurs, une diminution de l'acétylation des microtubules a été détectée dans les neurones des patients atteints de

la maladie d'Alzheimer. Cette observation corrèle avec un défaut de transport et une accumulation de protéines de conformation aberrante qui induit une dégénérescence synaptique [34]. Le peptide amyloïde A $\beta$  de l'APP (*amyloid precursor protein*) semble être responsable de cette baisse d'acétylation. Dans un modèle murin de la maladie d'Alzheimer, la réduction d'expression d'HDAC6, ou l'inhibition de son activité, peut ainsi améliorer les défauts cognitifs et de mémoire, en augmentant l'acétylation des microtubules. Le mécanisme moléculaire responsable pourrait être une amélioration du transport neuronal par les moteurs quand les microtubules sont acétylés, comme cela a été décrit pour la maladie de Huntington ; le défaut de transport vésiculaire dans la maladie de Huntington est en effet amélioré après inhibition de l'HDAC6 [35]. Néanmoins, ces résultats n'ont pas été confirmés *in vivo* dans un modèle murin de la maladie de Huntington dans lequel le gène codant HDAC6 a été invalidé.

Un rôle de l'acétylation des microtubules dans la maladie de Parkinson a aussi été décrit, mais des résultats contradictoires ont été obtenus selon les modèles utilisés. Ainsi, la kinase LRRK2 (*leucine-rich repeat kinase 2*) portant une mutation pathogénique observée dans la maladie de Parkinson interagit préférentiellement avec les microtubules non-acétylés pour bloquer le transport axonal, ce qui pourrait jouer un rôle dans l'établissement de la maladie. Ce phénomène peut être inversé par l'inhibition, ou la diminution d'expression, par *knock-down*, des déacétylases HDAC6 ou Sirt2 [36]. Dans un autre modèle, utilisant la 6-hydroxydopamine pour détruire sélectivement les neurones de la substance noire, une altération de la dynamique des microtubules, due à une diminution de l'activité de la déacétylase Sirt2, est observée. Ces défauts peuvent être corrigés par la restauration de l'activité de cette déacétylase [37].

### Cycle de détyrosination/retyrosination et pathologies neuronales

À l'heure actuelle, aucune pathologie neuronale résultant spécifiquement d'une dérégulation du cycle détyr/retyr n'a été décrite. Néanmoins, une désorganisation des réseaux neuronaux est observée chez des souriceaux invalidés pour le gène codant la TTL. Elle serait à l'origine de leur mort périnatale [22]. Une diminution de l'expression du complexe VASH/SVBP, qui induit une baisse de détyrosination, perturbe la différenciation et la migration des neurones [26]. Un défaut de migration du cône de croissance pourrait être impliqué. En effet, l'état tyrosiné de la tubuline est indispensable aux réarrangements des microtubules et des filaments d'actine nécessaires aux mouvements corrects du cône de croissance au cours du développement [38]. De plus, il a été montré que la tubuline tyrosinée agit comme un indicateur directionnel pour la kinésine-1 et que ce mécanisme est requis pour le maintien de la polarité neuronale [39]. Dans un modèle murin, dans lequel la kinase GSK3 (*glycogen synthase kinase 3*) est constitutivement active, la repousse des neurones après blessure du nerf sciatique est accélérée, ce qui conduit à une amélioration motrice et sensitive. Un des mécanismes sous-jacents mettrait en jeu une accélération de la dynamique des microtubules grâce à la phosphorylation de MAP1B (*microtubule-associated protein 1B*) et à la présence d'une plus grande proportion de microtubules tyrosinés. Une inhibition de la

détyrosination, par un traitement avec le parthénolide, accélérerait la régénération axonale chez les souris sauvages. L'inhibition de l'activité TCP pourrait donc représenter une piste thérapeutique pour le traitement des lésions nerveuses [40].

### Acétylation et cancer

La transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) est considérée comme une prémisse de la transformation des cellules différenciées vers une dédifférenciation et un état cancéreux. Une diminution de l'acétylation de l' $\alpha$ -tubuline est observée lors de la transition épithélio-mésenchymateuse induite par le TGF- $\beta$  (*transforming growth factor- $\beta$* ). Cette transition peut être bloquée par l'inhibition de l'HDAC6 [41]. Cependant, une augmentation de l'acétylation des microtubules est observée dans la plupart des tumeurs. Par exemple, l'acétylation de la tubuline est élevée dans les cancers du sein et fortement corrélée à un mauvais pronostic [42]. Une surexpression d' $\alpha$ TAT1 et l'hyper-acétylation de l' $\alpha$ -tubuline qui en résulte sont également décrites dans les cancers du côlon. L'excès d'acétylation favoriserait la prolifération et les capacités invasives des cellules [43]. Une augmentation de l'acétylation de la tubuline est également détectée dans certains carcinomes squameux de la tête et du cou [44].

Un aspect important à souligner est que le suppresseur de tumeurs Merlin n'est pas actif si les microtubules sont déacétylés [45]. CYLD (*ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase*), un autre suppresseur de tumeurs, interagit avec HDAC6 et l'inhibe, induisant une augmentation de la tubuline acétylée autour du noyau et dans le corps intermédiaire, ce qui ralentit la mitose et la cytokinèse [46]. Plusieurs études ont montré que les drogues qui ciblent HDAC6 augmentaient l'acétylation des microtubules et inhibaient la prolifération des cellules leucémiques et des cellules cancéreuses des tumeurs solides [47, 48].

Comment réconcilier ces données révélant, d'une part, une augmentation de la tubuline acétylée dans les cancers et d'autre part, un effet bénéfique d'une hyper-acétylation de la tubuline ? Une explication possible est que l'augmentation de l'acétylation de la tubuline est une tentative de la cellule pour se défendre contre la transformation tumorale. L'approche thérapeutique visant à inhiber l'HDAC6 renforcerait ce mécanisme de défense. L'hyper-acétylation de la lysine 40 pourrait empêcher sa triméthylation par SETD2 (*SET domain containing 2*) dans les microtubules du fuseau mitotique. Cette méthylation est nécessaire pour l'accomplissement d'une cytokinèse correcte [13]. Ceci pourrait être un argument en faveur de l'intérêt d'inhiber les tubuline déacétylases pour réduire la prolifération des cellules cancéreuses.

### Implication du cycle de détyrosination-retyrosination dans les processus cancéreux

Il a été observé, initialement dans les cancers du sein [49], puis dans d'autres types de cancers [50], que la TTL est éliminée au cours de la croissance tumorale, se comportant ainsi comme un suppresseur de tumeur. La perte de TTL se traduit par une accumulation anormale de tubuline détyrosinée, normalement minoritaire dans les cellules épithéliales. Dans une série de 134 tumeurs du sein, la présence de tubuline abondamment détyrosinée a été observée dans la moitié des cas. Cette détyrosination massive est révélée presque exclusivement dans les cancers ayant un grade histo-pronostique de Scarff Bloom et Richardson<sup>3</sup> maximal [51]. La détyrosination de la tubuline a donc une signification pronostique propre, indépendamment des facteurs pronostiques habituellement pris en compte en clinique.

Différents travaux ont été menés pour déterminer le lien entre détyrosination de la tubuline et invasion tumorale. La tubuline détyrosinée est enrichie dans des protrusions membranaires, les microtentacules, présentes sur les cellules circulantes de cancer du sein [52]. Ces microtentacules contribuent au processus métastatique. Elles permettent aux cellules qui se sont échappées des tumeurs primaires de s'attacher aux parois de petits vaisseaux sanguins pour faciliter leur extravasation et, ensuite, la formation de métastases. Le parthénolide qui exerce une action inhibitrice sur la TCP, réduit la formation de ces microtentacules et empêche l'attachement des cellules tumorales aux cellules endothéliales. Par ailleurs, un équilibre précis entre microtubules tyrosinés et microtubules détyrosinés est important pour le bon déroulement de la mitose. La détyrosination des microtubules permet leur interaction sélective avec la kinésine-7, responsable du guidage correct des chromosomes à l'équateur de la cellule lors de la mitose [29].

Puisque la TTL se comporte comme un suppresseur de tumeur, il est logique de s'interroger sur le rôle oncogénique éventuel de la TCP, et donc de l'expression des protéines VASH 1 et 2, ainsi que de SVBP, dans les tumeurs. Les protéines VASH1/2 ont été identifiées en 2004 par un groupe japonais [53], ignorant qu'il s'agissait d'enzymes en lien avec le cytosquelette. Initialement décrites comme le produit de gènes dont l'expression est induite par le VEGF (*vascular endothelial growth factor*), on pensait qu'il s'agissait de protéines sécrétées, régulatrices de l'angiogenèse, avec un mécanisme de sécrétion mal compris. En raison de leur rôle potentiel dans la régulation de l'angiogenèse, l'expression de VASH1/2 a été analysée dans différents types de cancer, toujours par des équipes japonaises [54]. À l'exception du cancer du côlon, l'expression élevée de VASH1/2 s'est avérée toujours corrélée à un grade histologique élevé et/ou à un mauvais pronostic et le niveau d'expression de VASH1 peut être utilisé pour prédire la réponse au traitement thérapeutique de patientes atteintes de cancer du sein [55]. L'ensemble de ces résultats suggère que – plutôt que la perte de TTL ou l'augmentation de l'expression de VASH1/2 – l'augmentation de tubuline détyrosinée qui en résulte pourrait avoir un rôle dans la progression tumorale.

<sup>3</sup> La classification de Scarff, Bloom et Richardson est fondée sur trois critères histologiques différents : le degré de différenciation architecturale, le nombre de mitoses par champ et l'importance du pléiomorphisme nucléaire.

### Modifications de la tubuline et propagation virale

Une stratégie utilisée par certains virus comme le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) pour se propager est de cibler les protéines de l'extrémité « plus » des microtubules pour provoquer leur stabilisation. Les microtubules ainsi stabilisés sont alors détyrosinés et acétylés et sont reconnus par des protéines motrices spécifiques qui facilitent le transport des particules virales vers le noyau [56]. Cibler les enzymes responsables de ces modifications post-traductionnelles pourrait donc perturber l'interaction des protéines motrices [57] et représenter une stratégie intéressante pour réduire l'infection virale. En accord avec cette hypothèse, il a été montré qu'une inhibition d'HDAC6 potentialise les traitements de cancers résultant d'une infection oncolytique virale [58].

### Acétylation, détyrosination et pathologies cardiovasculaires

Les troubles du rythme cardiaque, comme la fibrillation atriale, ont pour origine un dysfonctionnement de la contraction des cardiomyocytes souvent accompagné d'une déacétylation de l' $\alpha$ -tubuline. L'inhibition de la déacétylase HDAC6 empêche ces altérations des cardiomyocytes et la progression des symptômes pathologiques [59]. D'autres pathologies cardiaques ont pour origine une accumulation de protéines mal repliées. Leur élimination par autophagie est nécessaire pour améliorer la fonction cardiaque. Or l'inhibition d'HDAC6, qui provoque une hyper-acétylation des microtubules, induit une stimulation de l'autophagie [60]. Enfin, dans un modèle d'ischémie cérébrale chez le rat, la perte des cellules neuronales peut être réduite par un traitement post-ischémique avec la Tubastatine A, un inhibiteur d'HDAC6 [61].

L'état de tyrosination des microtubules représente un signal de régulation important de la mécanotransduction [62]. Dans le myocarde, quand les cellules cardiaques se contractent, les microtubules résistent à la compression en fléchissant, prenant alors une allure de sinuséide. La détyrosination des microtubules favorise leur interaction avec la desmine des sarcomères, ce qui confère aux myocytes une résistance mécanique. Un excès de détyrosination peut ainsi participer à la diminution de la fonction cardiaque dans certains états pathologiques [63]. Dans les muscles squelettiques, la détyrosination de l' $\alpha$ -tubuline augmente également la rigidité du cytosquelette et la mécanotransduction. Ainsi, dans un modèle murin de dystrophie musculaire, l'inhibition de la TCP par le parthénolide corrige la détyrosination aberrante de l' $\alpha$ -tubuline et empêche les arythmies et les blessures du muscle squelettique provoquées par des contractions accrues [64].

## Conclusion

Des données de plus en plus nombreuses indiquent que les modifications de la tubuline sont impliquées dans différentes pathologies. La découverte récente de l'activité tubuline carboxypeptidase du complexe vasohibine/SVBP permet désormais de décrire l'entièreté du cycle détyr/retyr. Cela ouvre la voie au développement de modèles animaux, dont l'analyse devrait encore réserver des surprises. Les enzymes de la (dé)acétylation sont connues depuis plus longtemps et les modèles murins sont déjà développés. On sait désormais qu'en plus de ces enzymes, il en existe d'autres présentant une activité similaire, comme Sirt2. Des substrats autres que la tubuline ont aussi été décrits pour les enzymes impliquées dans la (dé)acétylation.

En ce qui concerne le cycle détyr/retyr, si la TTL présente une spécificité pour la tubuline, la possibilité de l'existence d'autres substrats pour VASH/SVBP reste à examiner. L'existence d'autres enzymes présentant une activité tubuline carboxypeptidase peut aussi être envisagée. Ces connaissances sont importantes pour le développement de nouveaux inhibiteurs pharmacologiques sélectifs. ♦

## SUMMARY

### On the road to deciphering the tubulin code: focus on acetylation and detyrosination

Microtubules are cytoskeletal fibers formed by the assembly of  $\alpha$ - and  $\beta$ -tubulin heterodimers. They contribute to cell morphology, mobility and polarity, as well as to cellular transport processes and cell division. The microtubular network constantly adapts to cellular needs and may be composed of very dynamic or more stable microtubules. To regulate their diverse functions in a spatio-temporal manner, microtubules are subjected to numerous reversible post-translational modifications, which generate the "tubulin code". This review focuses on two modifications characteristic of stable microtubules - acetylation and detyrosination of  $\alpha$ -tubulin - and their deregulation in certain pathologies. ♦

## LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

## RÉFÉRENCES

1. Sadoul K, Khochbin S. The growing landscape of tubulin acetylation: lysine 40 and many more. *Biochem J* 2016 ; 473 : 1859-68.
2. Gadadhar S, Bodakuntla S, Natarajan K, Janke C. The tubulin code at a glance. *J Cell Sci* 2017 ; 130 : 1347-53.
3. L'Hernault SW, Rosenbaum JL. Chlamydomonas alpha-tubulin is posttranslationally modified by acetylation on the epsilon-amino group of a lysine. *Biochemistry* 1985 ; 24 : 473-8.
4. Akella JS, Wloga D, Kim J, et al. MEC-17 is an alpha-tubulin acetyltransferase. *Nature* 2010 ; 467 : 218-22.
5. Nogales E, Whittaker M, Milligan RA, Downing KH. High-resolution model of the microtubule. *Cell* 1999 ; 96 : 79-88.
6. Szyk A, Deaconescu AM, Specter J, et al. Molecular basis for age-dependent microtubule acetylation by tubulin acetyltransferase. *Cell* 2014 ; 157 : 1405-15.
7. Coombes C, Yamamoto A, McClellan M, et al. Mechanism of microtubule lumen entry for the alpha-tubulin acetyltransferase enzyme alphaTAT1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2016 ; 113 : E7176-E84.
8. Montagnac G, Chavrier P. Quand les microtubules rencontrent les puits recouverts de clathrine et permettent aux cellules de tenir le cap. *Med Sci (Paris)* 2014 ; 30 : 130-3.
9. Hubbert C, Guardiola A, Shao R, et al. HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase. *Nature* 2002 ; 417 : 455-8.
10. North BJ, Marshall BL, Borra MT, et al. The human Sir2 ortholog, SIRT2, is an NAD<sup>+</sup>-dependent tubulin deacetylase. *Mol Cell* 2003 ; 11 : 437-44.
11. Skultetyova L, Ustinova K, Kutil Z, et al. Human histone deacetylase 6 shows strong preference for tubulin dimers over assembled microtubules. *Sci Rep* 2017 ; 7 : 11547.
12. Skoge RH, Ziegler M. SIRT2 inactivation reveals a subset of hyperacetylated perinuclear microtubules inaccessible to HDAC6. *J Cell Sci* 2016 ; 129 : 2972-82.
13. Park IY, Powell RT, Tripathi DN, et al. Dual Chromatin and Cytoskeletal Remodeling by SETD2. *Cell* 2016 ; 166 : 950-62.
14. Alonso VL, Ritagliati C, Cribb P, et al. Overexpression of bromodomain factor 3 in *Trypanosoma cruzi* (TcBDF3) affects differentiation of the parasite and protects it against bromodomain inhibitors. *FEBS J* 2016 ; 283 : 2051-66.
15. Portran D, Schaedel L, Xu Z, et al. Tubulin acetylation protects long-lived microtubules against mechanical ageing. *Nat Cell Biol* 2017 ; 19 : 391-8.
16. Howes SC, Alushin GM, Shida T, et al. Effects of tubulin acetylation and tubulin acetyltransferase binding on microtubule structure. *Mol Biol Cell* 2014 ; 25 : 257-66.
17. Barra HS, Unates LE, Sayavedra MS, Caputto R. Capacities for binding amino acids by tRNAs from rat brain and their changes during development. *J Neurochem* 1972 ; 19 : 2289-97.
18. Aillaud C, Bosc C, Saoudi Y, et al. Evidence for new C-terminally truncated variants of alpha- and beta-tubulins. *Mol Biol Cell* 2016 ; 27 : 640-53.
19. Paturle-Lafanechere L, Manier M, Trigault N, et al. Accumulation of delta 2-tubulin, a major tubulin variant that cannot be tyrosinated, in neuronal tissues and in stable microtubule assemblies. *J Cell Sci* 1994 ; 107 : 1529-43.
20. Paturle-Lafanechere L, Edde B, Denoulet P, et al. Characterization of a major brain tubulin variant which cannot be tyrosinated. *Biochemistry* 1991 ; 30 : 10523-8.
21. Lafanechere L, Job D. The third tubulin pool. *Neurochem Res* 2000 ; 25 : 11-8.
22. Erck C, Peris L, Andrieux A, et al. A vital role of tubulin-tyrosine-ligase for neuronal organization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005 ; 102 : 7853-8.
23. Prota AE, Magiera MM, Kuijpers M, et al. Structural basis of tubulin tyrosination by tubulin tyrosine ligase. *J Cell Biol* 2013 ; 200 : 259-70.
24. Wehland J, Weber K. Tubulin-tyrosine ligase has a binding site on beta-tubulin: a two-domain structure of the enzyme. *J Cell Biol* 1987 ; 104 : 1059-67.
25. Dal Piaz F, Vassallo A, Lepore L, et al. Sesterterpenes as tubulin tyrosine ligase inhibitors. First insight of structure-activity relationships and discovery of new lead. *J Med Chem* 2009 ; 52 : 3814-28.
26. Aillaud C, Bosc C, Peris L, et al. Vasohibins/SVBP are tubulin carboxypeptidases (TCPs) that regulate neuron differentiation. *Science* 2017 ; 358 : 1448-53.
27. Nieuwenhuis J, Adamopoulos A, Bleijerveld OB, et al. Vasohibins encode tubulin detyrosinating activity. *Science* 2017 ; 358 : 1453-56.
28. Fonrose X, Ausseil F, Soleilhac E, et al. Parthenolide inhibits tubulin carboxypeptidase activity. *Cancer Res* 2007 ; 67 : 3371-8.
29. Barisic M, Silva e Sousa R, Tripathy SK, et al. Mitosis. Microtubule detyrosination guides chromosomes during mitosis. *Science* 2015 ; 348 : 799-803.
30. Peris L, Thery M, Faure J, et al. Tubulin tyrosination is a major factor affecting the recruitment of CAP-Gly proteins at microtubule plus ends. *J Cell Biol* 2006 ; 174 : 839-49.
31. Peris L, Wagenbach M, Lafanechere L, et al. Motor-dependent microtubule disassembly driven by tubulin tyrosination. *J Cell Biol* 2009 ; 185 : 1159-66.
32. Dunn S, Morrison EE, Liverpool TB, et al. Differential trafficking of Kif5c on tyrosinated and detyrosinated microtubules in live cells. *J Cell Sci* 2008 ; 121 : 1085-95.
33. d'Ydewalle C, Krishnan J, Chiheb DM, et al. HDAC6 inhibitors reverse axonal loss in a mouse model of mutant HSPB1-induced Charcot-Marie-Tooth disease. *Nat Med* 2011 ; 17 : 968-74.
34. Butler D, Bendiske J, Michaelis ML, et al. Microtubule-stabilizing agent prevents protein accumulation-induced loss of synaptic markers. *Eur J Pharmacol* 2007 ; 562 : 20-7.
35. Dompierre JP, Godin JD, Charrin BC, et al. Histone deacetylase 6 inhibition compensates for the transport deficit in Huntington's disease by increasing tubulin acetylation. *J Neurosci* 2007 ; 27 : 3571-83.
36. Godena VK, Brookes-Hocking N, Moller A, et al. Increasing microtubule acetylation rescues axonal transport and locomotor deficits caused by LRRK2 Roc-COR domain mutations. *Nat Commun* 2014 ; 5 : 5245.
37. Patel VP, Chu CT. Decreased SIRT2 activity leads to altered microtubule dynamics in oxidatively-stressed neuronal cells: implications for Parkinson's disease. *Exp Neurol* 2014 ; 257 : 170-81.



