



HAL
open science

Régulation de la stabilité du cytosquelette microtubulaire : conséquences sur la croissance de la jonction neuromusculaire chez la *Drosophile*

Bénédicte Franco

► **To cite this version:**

Bénédicte Franco. Régulation de la stabilité du cytosquelette microtubulaire : conséquences sur la croissance de la jonction neuromusculaire chez la *Drosophile*. Neurosciences [q-bio.NC]. Université Montpellier I, 2007. Français. NNT : . tel-00195343

HAL Id: tel-00195343

<https://theses.hal.science/tel-00195343>

Submitted on 14 Dec 2007

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE MONTPELLIER I

THESE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE MONTPELLIER I

Discipline : Neurosciences

Formation Doctorale : Endocrinologie Cellulaire et Moléculaire

Ecole Doctorale : Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé

présentée et soutenue publiquement
par

Bénédicte FRANCO

Titre :

Régulation de la stabilité du cytosquelette microtubulaire :
conséquences sur la croissance de la jonction neuromusculaire
chez la *Drosophile*

Soutenue le 18 Décembre 2007

JURY:

M Joël BOCKAERT
M Yves GRAU
Mme Marie-Laure PARMENTIER
M Alain DEBEC
M David SHEPHERD
Mme Fatiha NOTHIAS

Président
Directeur de thèse
Co-directrice de thèse
Rapporteur
Rapporteur
Examinatrice

INTRODUCTION

I)-Le cytosquelette

De la même manière que pour un vertébré, son ossature lui permet de garder sa forme et de se mouvoir, le cytosquelette représente l'ossature de la cellule mais pas uniquement. Il est vrai que si le cytosquelette représente l'architecture de la cellule et participe à l'organisation des composants cellulaires ainsi qu'au maintien de la polarité cellulaire par un ensemble de réseaux protéiques filamenteux, il n'en reste pas moins hautement dynamique. En effet, il est constamment réorganisé lors de la division cellulaire, de la migration, de changements de forme de la cellule, de la formation de prolongements cellulaires comme les neurites (axone et dendrites).

Le cytosquelette regroupe trois grands types de constituants d'après leur diamètre en microscopie électronique : les microtubules (25 nm de diamètre), les filaments intermédiaires (10 nm de diamètre) et les microfilaments d'actine (7 à 9 nm de diamètre).

1)-Les microtubules

a)-Composition et formation des microtubules

Les microtubules sont des structures protéiques de forme cylindrique creuse de 25 nm de diamètre et de longueur variable. Ils sont formés d'unités hétérodimériques de tubuline α et β (de 8 nm de longueur) qui sont capables de s'auto-associer longitudinalement pour former dans un premier temps un protofilament, ces derniers s'associant ensuite de manière hélicoïdale pour former un microtubule (Figure 1).

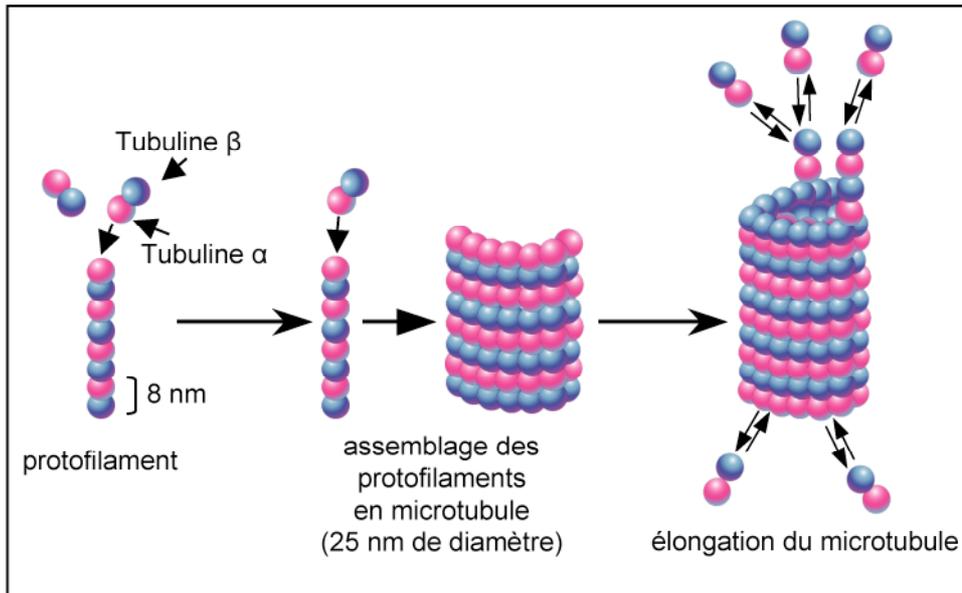


Figure 1 : La formation des microtubules. Les monomères de tubulines α et β s'associent entre eux pour former un protofilament. Les protofilaments s'associent ensuite longitudinalement et de manière hélicoïdale afin de former un microtubule.

L'association de chaque dimère (α et β) est dépendante de la liaison du GTP (Carlier, 1982). En effet, la sous-unité α lie du GTP non échangeable alors que la sous-unité β lie du GTP hydrolysable. Le GTP lié à la sous-unité β est nécessaire à l'élongation du microtubule, car son hydrolyse permet l'association d'un dimère (α et β tubuline) à l'extrémité du microtubule. Une fois le dimère incorporé dans le microtubule, le GDP restant ne peut être, lui, échangé.

Le microtubule est organisé en protofilaments qui s'associent latéralement afin de former cette structure cylindrique et creuse. Un microtubule peut être formé de 10 à 15 protofilaments selon les conditions d'assemblage (un microtubule de centrosome comporte 13 protofilaments). Les protofilaments s'associent de manière légèrement décalée, de sorte que la structure paraît légèrement hélicoïdale (Figure 1). De plus les microtubules sont polarisés, ils présentent une extrémité dite « moins » orientée vers le centre organisateur des microtubules (MicroTubules Organizing Center ou MTOC) souvent assimilé au centrosome (proche du centre de la cellule) et d'une extrémité dite « plus » orientée vers la périphérie de la cellule. L'extrémité plus est nommée ainsi car elle présente une vitesse d'assemblage des dimères de tubulines plus élevée (Figure 2).

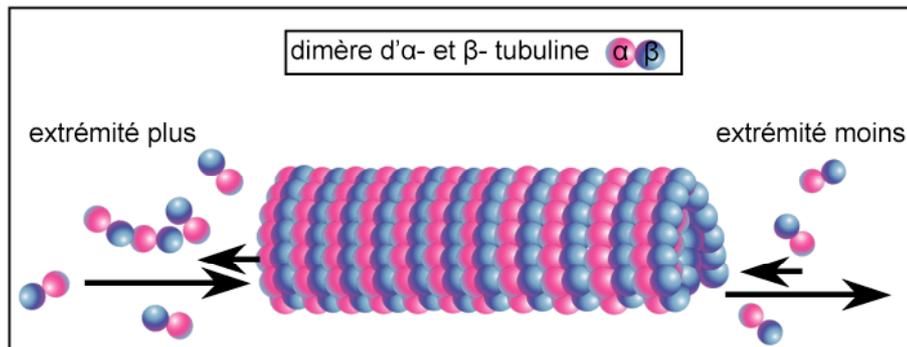


Figure 2 : Les microtubules sont des polymères polarisés. Ils présentent une extrémité plus où l'incorporation de tubuline est favorisée et une extrémité moins où la perte de Tubuline est plus importante.

Par ailleurs, au niveau de cette même extrémité plus, à proximité du centrosome, la γ tubuline est nécessaire à la nucléation du microtubule, c'est-à-dire à l'assemblage des dimères d' α et β tubuline et le début de l'élongation du polymère. Cependant la γ tubuline est aussi présente dans le cytoplasme où elle est associée à un complexe protéique appelé γ -TuRC (pour γ Tubulin Ring Complex). La γ tubuline servirait alors de matrice pour l'assemblage du microtubule en mimant une extrémité moins (Job et al., 2003). A l'opposé, se trouve l'extrémité moins dont la vitesse d'incorporation des dimères de tubuline est plus lente (Figure 2). Cette polarité des microtubules est essentielle pour l'accrochage et le déplacement le long des microtubules de complexes protéiques.

b)-La dynamique des microtubules

Les microtubules sont des structures hautement dynamiques (pour revue voir (Valiron et al., 2001)). En effet, ils oscillent entre des phases d'élongation et de raccourcissement. L'élongation se produit aux deux extrémités, mais se fait de manière plus rapide au niveau de l'extrémité plus (Figure 2). Il en va de même pour la perte de sous unités de tubuline. En microscopie électronique, les extrémités en cours d'élongation présentent des protofilaments plus longs que d'autres mais toujours rectilignes et dans l'axe du microtubule. Par contre, lors du raccourcissement, les extrémités sont plus étalées et ont tendance à se recourber (Kirschner et al., 1974). Les microtubules peuvent aussi avoir une extrémité en cours d'élongation et l'autre en cours de raccourcissement, c'est le phénomène de « treadmilling » ou tapis roulant (Figure 3).

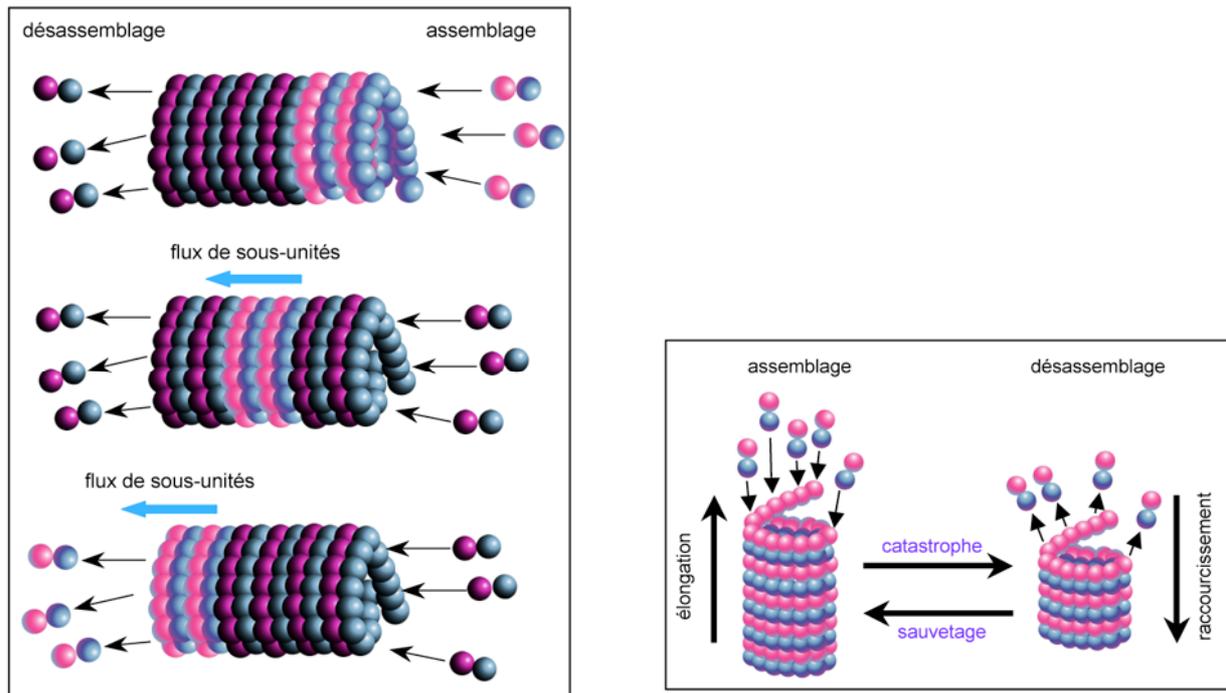


Figure 3 : Les microtubules sont soumis au « treadmilling » et à l’instabilité dynamique. A gauche : le processus de « treadmilling » a lieu lorsque se produit de l’assemblage de Tubuline au niveau de l’extrémité plus et du désassemblage de Tubuline au niveau de l’extrémité moins. A droite : l’instabilité dynamique correspond à une oscillation entre des périodes d’élargissement qui durent jusqu’à un point critique dit catastrophe, où le microtubule dépolymérise fortement pour ensuite se reformer au cours du sauvetage.

Les microtubules sont aussi assujettis à un phénomène qui est l’instabilité dynamique (Mitchison and Kirschner, 1984). Il se traduit par des périodes d’élargissement jusqu’à une certaine longueur, puis le microtubule atteint un point dit « catastrophe » qui se traduit par une forte dépolymérisation qui est ensuite sauvée et la polymérisation du microtubule reprend (Figure 3).

Un autre facteur important dans la stabilité des microtubules est la présence au niveau de l’extrémité plus de GTP ou de GDP (Figure 4).

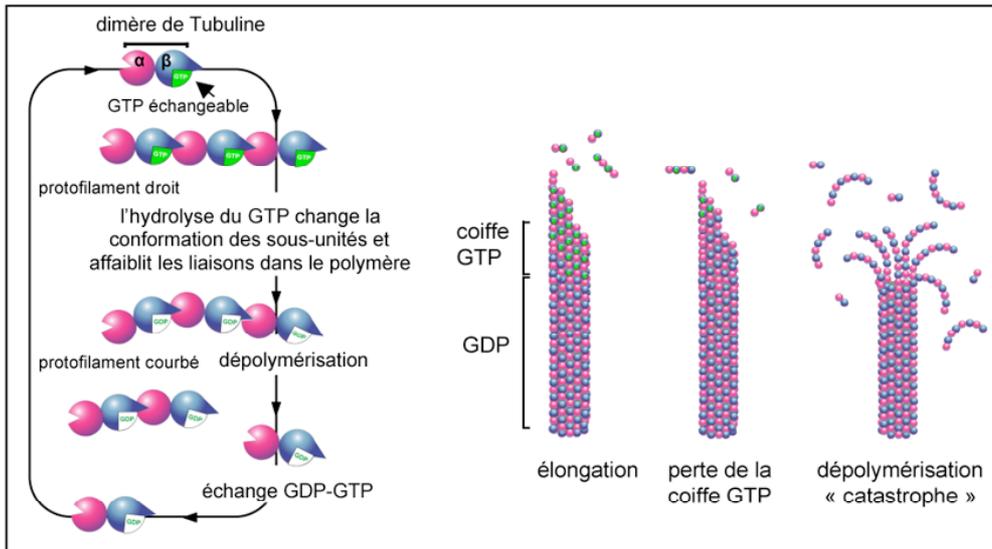


Figure 4 : La coiffe GTP. La présence de GTP rend le microtubule plus stable, car l'hydrolyse du GTP en GDP change la conformation du microtubule et le fragilise.

S'il y a beaucoup de GDP, cela veut dire soit qu'il est en phase de raccourcissement, soit qu'il n'y a pas eu beaucoup de nouvelle incorporation de tubuline. Ainsi, le microtubule en devient moins stable et plus propice à se dépolymériser. En effet, la formation du GDP entraîne un affaiblissement des liaisons entre dimère et polymère. Par contre, si l'extrémité plus est riche en GTP, il y a donc eu incorporation de nouvelles sous unités, le microtubule est plus stable. Il est comme « protégé » par une coiffe de GTP (GTP cap) (pour revue voir (Erickson and O'Brien, 1992)) (Figure 4).

Dans les neurones, les microtubules sont particulièrement stables comparés aux microtubules d'autres types cellulaires (Seitz-Tutter et al., 1988). C'est, d'ailleurs, une de leurs principales caractéristiques. Cette stabilité accrue est due à des modifications de la tubuline (détaillées ci-après), à une conformation particulière des microtubules. En fait plusieurs microtubules s'associent en faisceau, grâce à des protéines associées aux microtubules ou MAP (Microtubule Associated Proteins). Ces protéines sont aussi responsables d'une meilleure stabilisation des microtubules (détaillées plus loin). La stabilité du cytosquelette microtubulaire s'acquiert progressivement au cours du développement et de la maturation des axones et des dendrites (Lim et al., 1989).

c) Les modifications post traductionnelles de la tubuline et leurs fonctions

La tubuline peut subir des modifications post traductionnelles. La fonction biologique de ces modifications n'est pas encore totalement comprise. Cependant, certaines modifications semblent être corrélées à la durée de vie des microtubules (par exemple : acétylation, détyrosination). L'étude de ces modifications se fait essentiellement de manière biochimique afin de mieux comprendre leur rôle sur la dynamique des microtubules (pour revue sur les différentes modifications voir (Westermann and Weber, 2003)).

i) L'acétylation de la tubuline α

La tubuline α peut être acétylée au niveau de la position amine en position ϵ de la lysine 40. L'ajout d'un groupement acétyle se fait par une acétyltransférase et son retrait se fait grâce à une déacétylase de la famille des Histones DéACétylase (HDAC6). L'acétylation est souvent associée à un état stable des microtubules. En fait, l'acétylation est une réaction très lente, beaucoup plus lente que la vitesse d'assemblage des microtubules, et qui se ferait sur cette lysine 40 qui est orientée vers la lumière du microtubule. Par conséquent, l'acétylation survient sur des microtubules qui sont dans un état stable, et donc pas sur des microtubules qui sont dans une dynamique de polymérisation/dépolymérisation rapide.

Chez la *Drosophile*, il existe 4 formes de tubuline α , mais 3 de ces 4 formes comportent la Lysine sensible à l'acétylation (Figure 5).

Tub α H sapiens	MRECISIHVGQAGVQIGNACWELYCLEHGIQPDGQMPD	K	TIGG-----GDDSFN---	50
Tub α M musculus	MRECISIHVGQAGVQIGNACWELYCLEHGIQPDGQMPD	K	TIGG-----GDDSFN---	50
Tub α 67C Drome	MRECISIHVGQAGVQIGNACWELYCLEHGIQPDGQMPD	K	TVGG-----GDDSFN---	50
Tub α 84B Drome	MRECISIHVGQAGVQIGNACWELYCLEHGIQPDGQMPD	K	TVGG-----GDDSFN---	50
Tub α 84D Drome	MRECISVHIGQAGVQIGNACWELYCLEHGIQPDGHMPD	K	TVGG-----GDDSFN---	50
Tub α 85E Drome	MREVSIQIGQCGIQIGNACWELYLLEHGINLDGSLKTKEEL	TASGSSASVGHDT	SANDA	60
	*** :*::**.*:***** *****: ** : :. : .		*.*:	
Tub α H sapiens	-TFFSETGAGKHVPRAVFDLEPTVIDEVRTGTYRQLFHPEQL	ITGKEDAANNYARGHYT		109
Tub α M musculus	-TFFSETGAGKHVPRAVFDLEPTVIDEVRTGTYRQLFHPEQL	ITGKEDAANNYARGHYT		109
Tub α 67C Drome	-TFFSETGAGKHVPRAVFDLEPTVVDEVRTGTYRQLFHPEQL	ITGKEDAANNYARGHYT		109
Tub α 84B Drome	-TFFSETGAGKHVPRAVFDLEPTVVDEVRTGTYRQLFHPEQL	ITGKEDAANNYARGHYT		109
Tub α 84D Drome	-TFFSETGAGKHVPRAVFDLEPTVVDEVRTGTYRQLFHPEQL	ITGKEDAANNYARGHYT		109
Tub α 85E Drome	RTFFTETGNGKQVPRISIFVDLEPTVIDDVRNGCMRELYHPEQL	ISGKEDAANNYARGRYS		120
	.* **..*:*****.*:*.*.* * :*.*:*****:*****.*:*:			
Tub α H sapiens	IGKEIIDLVLDRIKRLADQCTGLQGFLVFHFSFGGGTSGGFTSLLMERLSVDY	GKSKLEF		169
Tub α M musculus	IGKEIIDLVLDRIKRLADQCTGLQGFLVFHFSFGGGTSGGFTSLLMERLSVDY	GKSKLEF		169
Tub α 67C Drome	IGKEIVDLVLDRIKRLADQCTGLQGFLIFHFSFGGGTSGGFTSLLMERLSVDY	GKSKLEF		169
Tub α 84B Drome	IGKEIVDLVLDRIKRLADQCTGLQGFLIFHFSFGGGTSGGFTSLLMERLSVDY	GKSKLEF		169
Tub α 84D Drome	IGKEIVDVLDRIKRLADQCTGLQGFLVFHFSFGGGTSGGFTSLLMERLSVDY	GKSKLEF		169
Tub α 85E Drome	IGKEVIDRVTSRLQKIAEQCDLSLQGLIFHSLGGGTSGGFTSLLVERLSTDY	SKKCLDF		180
	****:* * .*:*:*.** .*****:***:*****:****.*.*.*.*:			

iii)-La polyglutamylation

Elle consiste en l'ajout de chaînes de résidus glutamate au niveau du groupement γ -carboxylique d'un résidu glutamate présent dans la queue C terminale des tubulines α et β (Redeker et al., 1991) (Figure 6).

Tub α H sapiens	GEGMEEGEFSEAREDMAALEKDYEEVGVDSVEGEGE	EEEGEEY	451
Tub α M musculus	GEGMEEGEFSEAREDMAALEKDYEEVGVDSVEGEGE	EEEGEEY	451
Tub α 67C Drome	GEGMEEGEFSEAREDLAALEKDYEEVGMDSGDGEGE	G-AEEY	450
Tub α 84B Drome	GEGMEEGEFSEAREDLAALEKDYEEVGMDSGDGEGE	G-AEEY	450
Tub α 84D Drome	GEGMEEGEFAEAREDLAALEKDYEEVGDSTTELGE	D--EEY	449
Tub α 85E Drome	GEGMEEGEFTEARENIAVLERDFEEVGLDNAEEGGDEDFDEF		462
	*****:****:*.**:*:*****.*	*:	:::

Figure 6 : Alignement de séquences des extrémités C terminales des tubulines α . Extrémité C terminale des tubulines α humaine, murine et de *Drosophila*. La polyglutamylation (l'ajout de chaîne de glutamate) a lieu sur un résidu glutamate (en bleu).

Ce type de modification a été mis en évidence la première fois à partir de l'analyse en spectroscopie de masse d'extraits de cerveaux mammifères (Edde et al., 1990). Au niveau des neurones de mammifères, la polyglutamylation est une des modifications post traductionnelles prépondérantes de la tubuline : elle serait présente essentiellement au niveau des microtubules axonaux. Cette réaction réversible (une déglutamylase a été mise en évidence dans des neurones (Audebert et al., 1993)) influence l'interaction des MAPs avec les microtubules (Larcher et al., 1996; Bonnet et al., 2001).

Chez la *Drosophila*, de la tubuline α glutamylée est retrouvée dans le cerveau (Bobinnec et al., 1999).

iv)-La palmitoylation

La palmitoylation (ajout d'un acide palmitique) intervient sur des résidus cystéines de la tubuline α (Ozols and Caron, 1997). Cette modification contribuerait à la mise en place d'interactions entre les microtubules et le cortex cellulaire.

v)-La phosphorylation

L'ajout d'un groupement phosphate se fait sur la sérine en position 441 ou 444 de la tubuline β . Le rôle de la phosphorylation de la tubuline interviendrait dans la croissance neuritique (en particulier la phosphorylation de la tubuline β III) et dans la dynamique microtubulaire lors de la mitose (Fourest-Lieuvin et al., 2006).

vi)-Le cycle de tyrosination de la tubuline α

Le tubuline α est synthétisée avec une tyrosine comme acide aminé C terminal. Cette tyrosine peut être clivée par une Tubulin CarboxyPeptidase (TCP), exposant ainsi un résidu glutamate, la tubuline est alors appelée Glu-tubuline. Ce retrait de la tyrosine peut être restauré grâce à une Tubulin Tyrosine Ligase (TTL), qui permet l'ajout d'un nouveau résidu tyrosine (la tubuline résultante est la Tyr-tubuline). La tubuline cycle alors entre un état tyrosiné et un état détyrosiné. Cependant, la Glu-tubuline peut subir un autre clivage enzymatique et perdre le glutamate C terminal. La tubuline ayant perdu ces deux acides aminés terminaux (la tyrosine, puis le glutamate) est la tubuline $\Delta 2$, elle n'est alors plus le substrat de la TTL et se soustrait donc au cycle de tyrosination-détyrosination (Lafanechere and Job, 2000) (Figure 7).

Tub α H sapiens	GEGEEEGEEY	451
Tub α M musculus	GEGEEEGEEY	451
Tub α 67C Drome	GEGEG-AEEY	450
Tub α 84B Drome	GEGEG-AEEY	450
Tub α 84D Drome	ELGED--EY	449
Tub α 85E Drome	EGGDEDFDEF	462
	*: **:	

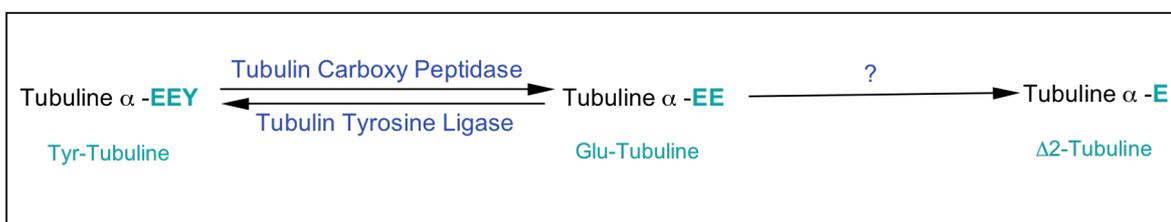


Figure 7 : Cycle de détyrosination-tyrosination de la tubuline α . Extrémité C terminale des tubulines α humaine, murine et de *Drosophila*. Le cycle de tyrosination se passe au niveau du dernier acide aminé synthétisé, la tyrosine. Elle peut être clivée puis ensuite rajoutée. Une fois la tyrosine clivée, le résidu glutamate exposé peut lui aussi être clivé, la tubuline ayant perdu ses deux derniers acides aminés est appelée $\Delta 2$ -tubuline.

La détyrosination de la tubuline est associée à un état stable des microtubules, car la tyrosination par la TTL ne survient que sur les monomères de tubuline et pas sur un microtubule polymérisé. En fait, la détyrosination ne conduit pas à une stabilisation des microtubules, mais traduit plutôt la durée de vie du microtubule (Khawaja et al., 1988). Concrètement, plus un microtubule est détyrosiné au plus cela fait longtemps que l'assemblage a eu lieu. Dans le cerveau mammifère, 80% de la tubuline est détyrosinée, elle est même sous forme $\Delta 2$.

Dans le système nerveux, la tubuline est une protéine extrêmement représentée. Donc, il est aisé de concevoir que les microtubules sont des structures très importantes pour les neurones, tant d'un point de vue de leur croissance (les microtubules étant impliqués dans la croissance des neurites : axones et dendrites), de leur architecture et peut-être potentiellement de leur fonctionnement. De même, il faut tenir compte des partenaires des microtubules comme les MAPs, qui sont de deux types, les MAPs structurales et les MAPs motrices qui permettent d'acheminer, le long des microtubules, des composants tels que des vésicules de sécrétion, des mitochondries ou même d'autres constituants du cytosquelette, à des endroits précis de la cellule, là où ils sont requis. En effet, il est nécessaire d'avoir les protéines nécessaires au niveau du compartiment cellulaire adéquat, comme il est important pour la synapse d'avoir des vésicules synaptiques qui sont issues du réseau transgolgien (après synthèse et maturation protéique) et qui doivent être véhiculées jusqu'à la synapse en vue de l'exocytose.

2)-L'actine

a)-Composition et formation des microfilaments d'actine

Au sein du cytosquelette, l'actine, un autre de ses constituants, se présente sous forme de microfilaments (de 7 à 9 nm de diamètre) résultant de la polymérisation de cette protéine globulaire. Les monomères d'actine (ou actine G pour actine globulaire) s'associent entre eux afin de former une structure fibrillaire, les filaments d'actine ou microfilaments. L'actine est alors dite actine F pour actine filamenteuse. Il existe 3 types d'actine, l'actine α présente dans les cellules musculaires, l'actine β et l'actine γ qui sont présentes dans les autres types cellulaires (Khaitlina, 2001).

Les microfilaments polymérisent en utilisant, comme les microtubules, un nucléotide. Dans le cas présent, il s'agit de l'ATP. La présence du nucléotide est essentielle à la survie de l'actine G, car sans cette liaison, l'actine G se dénature très vite. Lors de la phase initiale de nucléation, des monomères d'actine G liant l'ATP s'associent entre eux pour former une sorte de noyau, puis l'élongation se poursuit par addition de nouvelles sous-unités aux deux extrémités. Enfin, ces dernières se retrouvent dans un état plutôt stationnaire, d'ajout et de perte de monomère, alors qu'au niveau des monomères d'actine G plus centraux dans le filament, se produit la lente hydrolyse de l'ATP en ADP et Pi. A l'issue de cette réaction, l'actine devient stable sous forme actine F liant de l'ADP (Stukalin and Kolomeisky, 2006).

b)-La dynamique des microfilaments d'actine

Les microfilaments d'actine sont au même titre que les microtubules des structures polarisées avec une extrémité plus où la polymérisation de l'actine est rapide, et une extrémité moins où la polymérisation de l'actine est plus lente. Les microfilaments d'actine subissent comme les microtubules, le phénomène de « treadmilling » ou tapis roulant (ajout de sous unité à une extrémité et perte de sous unité à l'autre extrémité) (Wegner, 1976) (Figure 8).

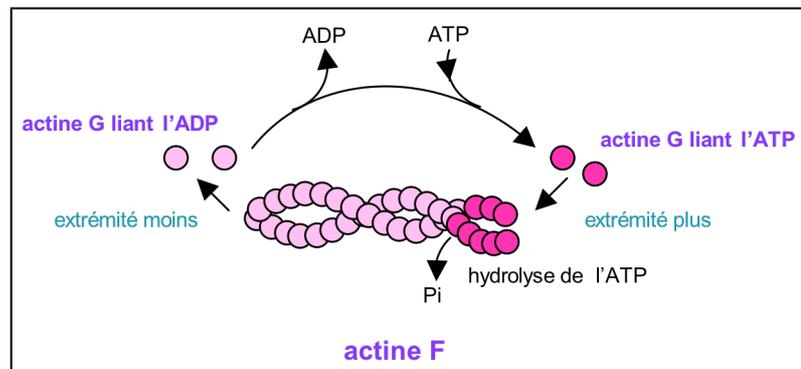


Figure 8 : Les microfilaments d'actine. Comme les microtubules, ils nécessitent un nucléotide, en l'occurrence de l'ATP, pour polymériser. Ils sont aussi polymérisés avec une extrémité plus qui polymérise plus vite que l'extrémité opposée, l'extrémité moins.

3)-Les filaments intermédiaires

a)-Composition

Ils sont constitués de protéines fibreuses diverses et variables selon les tissus. Cependant ils présentent tous une structure semblable.

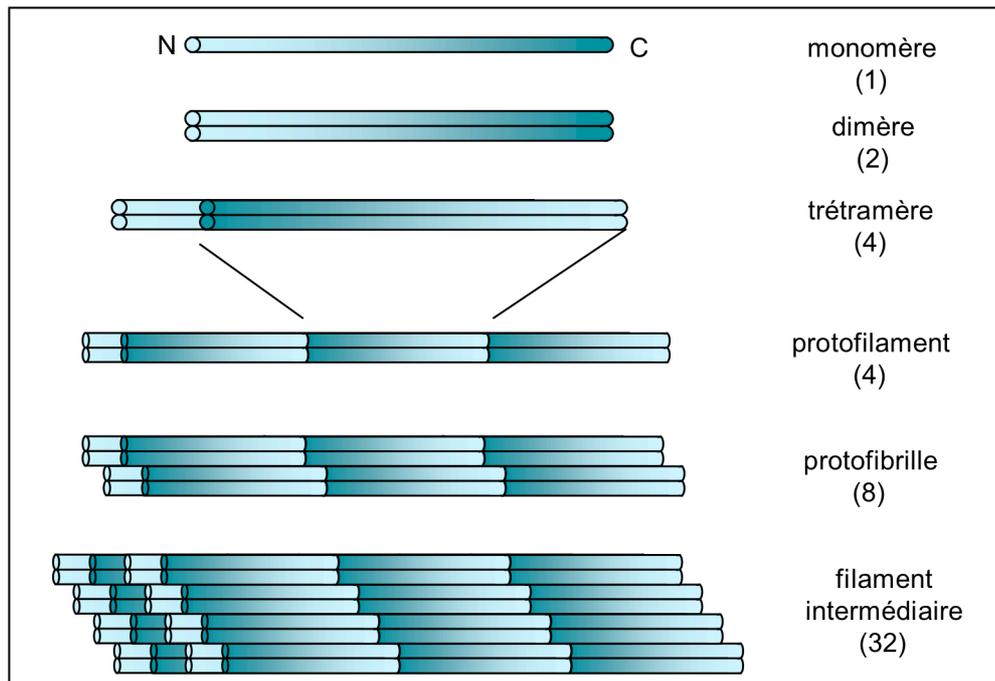


Figure 9 : Les filaments intermédiaires. Ils sont constitués de 32 monomères de la protéine qui les caractérise (vimentine, kératine, ...), assemblés en dimère, puis tétramère, puis en un protofilament (assemblage dans la longueur de tétramères), puis en une protofibrille (2 protofilaments) et enfin 4 protofibrilles forment un filament intermédiaire.

Chaque monomère peptidique comporte 3 domaines : un domaine central organisé en hélice α flanqué de deux extrémités, N et C terminales, globulaires. Deux monomères de même orientation s'associent ensemble pour former un dimère (2 monomères). Deux dimères d'orientation anti-parallèle s'associent pour former un tétramère (4 monomères). Les tétramères s'assemblent les uns à la suite des autres (à la queue leu leu), pour former un protofilament (4 monomères en coupe transversale). Les protofilaments s'associent deux par deux pour former une protofibrille (8 monomères). L'assemblage de 4 protofibrilles constitue un filament intermédiaire (32 monomères) (Figure 9).

Il existe 6 types de filaments intermédiaires :

Type I : kératines acides (épithéliums)

Type II : kératines basiques (épithéliums)

Type III : vimentine (mésenchyme)

desmine (muscle)

Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP, cellules gliales et astrocytes)

périphérine (système nerveux périphérique et central)

Type IV : neurofilaments L, M et H (neurones matures)

α -internexine (neurones immatures)

nestine (cellules souches du système nerveux central)

Type IV non standard : filensine et phakinine (cellules rétinienne)

Type V : lamines A, B et C (noyaux de toutes cellules)

b)-Les filaments intermédiaires dans le système nerveux (pour revue voir (Liu et al., 2004))

Concernant les neurofilaments, *in vitro*, ceux de type L s'associent entre eux pour former des homopolymères, alors que ceux de types M et H s'associent à un cœur de neurofilaments L et comportent les 3 protéines (Liem and Hutchison, 1982; Leung and Liem, 1996). Cependant, *in vivo*, il a été montré que les neurofilaments étaient des hétérodimères, dans lesquels les types L s'associaient soit avec les types M, soit avec les types H (Lee et al., 1993). Par ailleurs, au niveau des neurones, les neurofilaments interviennent dans la croissance radiale de l'axone et déterminent ainsi son diamètre. Le diamètre d'un axone est directement corrélé à la vitesse de conduction de l'influx nerveux.

Les neurofilaments peuvent interagir avec les microtubules, en particulier lors de leur transport le long de ces derniers. Ils peuvent aussi être phosphorylés

Fait marquant chez la *Drosophile*, il n'existe pas de filaments intermédiaires. En fait et plus précisément, les seuls filaments intermédiaires retrouvés chez la *Drosophile* sont les lamines nucléaires (pour revue voir (Fyrberg and Goldstein, 1990; Goldstein and Gunawardena, 2000)).

II)-Les protéines associées aux microtubules (MAPs)

Lors de la purification de préparations enrichies en microtubules, à partir d'extraits de cerveaux, et après plusieurs cycles de polymérisation-dépolymérisation des microtubules, une fraction protéique autre que la tubuline demeurait. Il s'agissait de protéines interagissant avec les microtubules ou MAP (Microtubule Associated Proteins) (pour revue voir (Matus, 1988)). Par la suite, des immunomarquages permettant de visualiser ces protéines ont montré que leur localisation suivait les microtubules. Ces protéines sont réparties en 2 grands groupes selon leur fonction. Il y a, d'une part, les MAPs structurales qui regroupent principalement des MAPs de Type I (Famille des MAP1) et II (Famille des MAP2/MAP4/Tau) et, d'autre part, les MAPs motrices : la Dynéine et la Kinésine, qui comme leur nom l'indique ont une activité motrice et se déplacent le long des microtubules.

Par ailleurs, il existe, à l'heure actuelle, d'autres MAPs en plus des deux grands groupes cités précédemment, comme les protéines liant les extrémités plus des microtubules ou + TIPs (\pm end TrackIng Proteins).

1)-Les MAPs structurales

Ces protéines sont responsables de la bonne conformation des microtubules regroupés en faisceau. Elles permettent la liaison de microtubules entre eux, entraînant un espacement correct des microtubules les uns par rapport aux autres.

a)-Famille MAP1, MAPs de Type I

i)-Localisation de ces protéines dans le système nerveux

Chez les vertébrés, les membres de cette famille sont au nombre de 3 : MAP1A, MAP1B et MAP1S (pour revue voir (Halpain and Dehmelt, 2006)). Historiquement, la MAP1A (Bloom et al., 1984) et la MAP1B (Bloom et al., 1985) ont été mises en évidence à partir d'extraits de cerveaux. Toutes deux co-sédimentaient avec les microtubules et, après migration sur gel, leur nom leur fut attribué en fonction de leur taille. MAP1A migre à environ 350 kDa et MAP1B 300 kDa. Plus récemment, en 2005, Orban-Nemeth *et al* (Orban-Nemeth et al., 2005) ont montré l'existence d'un troisième membre rattachable à cette famille, la MAP1S (S pour short car la protéine migre à 120 kDa).

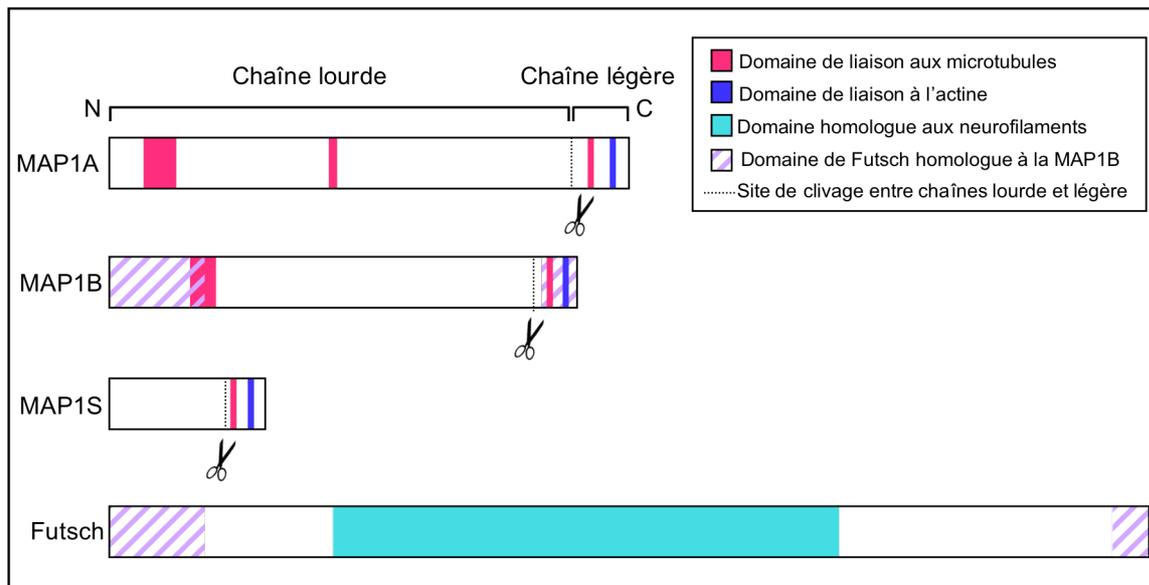


Figure 10 : Les MAPs de Type I. Chez les mammifères, il existe 3 MAPs de Type I (MAP1A, MAP1B et MAP1S), toutes trois sont clivées en une chaîne lourde et une chaîne légère. Elles lient les MTs, mais aussi peuvent lier l'actine. Chez la *Drosophila*, Futsch est le représentant de cette famille. Elle présente des homologies avec la MAP1B (hachures violettes) et un large domaine central proche des neurofilaments. Elle ne semblerait pas être clivée.

La MAP1A est purifiée à partir d'extraits des couches grise (contenant les corps cellulaires des neurones, les dendrites, les axones et des cellules gliales) et blanche (contenant uniquement des axones et des cellules gliales) dans le cerveau. Par ailleurs, des immunomarquages révèlent une expression uniforme de cette protéine sur des coupes de cerveaux de rats (Bloom et al., 1984). Cette protéine est peu présente à la naissance puis son taux d'expression augmente (Schoenfeld and Obar, 1994). D'autres études montrent une augmentation croissante de la concentration de MAP1A concomitante à l'expansion de l'arborisation dendritique où la protéine est particulièrement abondante (Schoenfeld et al., 1989).

La MAP1B est retrouvée de manière prépondérante dans les axones et les dendrites, associée aux microtubules. Elle est aussi présente au niveau des corps cellulaires ainsi que dans les cellules gliales (astrocytes et oligodendrocytes) (Bloom et al., 1985). Elle est fortement exprimée à la naissance et son taux d'expression augmente, dans un premier temps, quelques jours après la naissance, puis chute à un niveau bien inférieur (Schoenfeld and Obar, 1994). Par ailleurs, elle est fortement concentrée au niveau des axones en croissance et son expression diminue dans les axones matures (Schoenfeld et al., 1989), d'où un rôle dans la croissance et la maturation des neurites.

Quant à la MAP1S, elle est exprimée de manière assez ubiquitaire dans l'organisme (les taux d'expression les plus élevés étant dans le cerveau, les testicules, le cœur, le poumon et le foie). Son patron d'expression se rapproche de celui de la MAP1A, à savoir que le taux d'expression de cette protéine augmente dans la période post-natale. Cependant, le taux d'expression de MAP1S est plus élevé que celui de MAP1A (Orban-Nemeth et al., 2005).

Chez les mammifères, il existe donc trois membres de la famille des MAP1 (MAP1A, MAP1B, MAP1S). Par contre, chez la *Drosophila*, un seul homologue a été trouvé, il s'agit de la protéine Futsch (Hummel et al., 2000). En fait cette protéine ne présente des homologies de séquence avec les MAP1 que dans ses extrémités N et C terminales, la partie centrale de la protéine étant composée de régions répétées proches des séquences de neurofilaments de type H (Figure 10). Par ailleurs, ces séquences répétées de Futsch contiennent, 35 fois, le motif Lys-Ser-Pro (KSP) qui est très fréquemment phosphorylé dans les neurofilaments (Elhanany et al., 1994). Cependant, aucune donnée biologique n'a encore été réalisée afin de déterminer si ces séquences KSP de Futsch, pouvaient être phosphorylées.

ii)-L'interaction avec les microtubules

Chaque protéine de cette famille est synthétisée sous forme d'un précurseur polypeptidique qui est par la suite clivé, à proximité de l'extrémité C terminale, en une chaîne lourde et une chaîne légère.

Ces protéines se lient le long de microtubules par un domaine de liaison aux microtubules (MTBD pour MicroTubule Binding Domain) localisé du côté N terminal de la chaîne lourde (et donc de la protéine) (Figure 10). En fait, le domaine précis de la fixation de ces MAPs aux microtubules n'a pas, à ce jour, encore été déterminé. Pour la MAP1A, un domaine de liaison aux microtubules a été indentifié entre les acides aminés 1498 et 1518. Ce domaine est riche en acides aminés acides (Cravchik et al., 1994). Concernant la MAP1B, il a été montré que dans la région N terminale comprise entre les acides aminés 281 à 630 se trouvaient au moins deux MTBD (Vaillant et al., 1998). Ces deux régions flanquent une zone d'acides aminés basiques répétés, qui contient le motif Lys-Lys-Glu ou KKE. Ce motif KKE répété est connu dans la MAP1B pour lier les microtubules. La MAP1B peut se lier aux microtubules grâce aux motifs KKE. Cependant, une protéine MAP1B sans motifs KKE peut aussi se lier aux microtubules, d'où l'implication des régions flanquant les motifs KKE (Noble et al., 1989).

Par ailleurs, la MAP1A et la MAP1B présentent sur leur chaîne légère un domaine de liaison aux microtubules, ainsi qu'un domaine pouvant lier l'actine. Le domaine de liaison aux microtubules de la chaîne légère est localisé à l'extrémité N terminale de la chaîne légère (Zauner et al., 1992), alors que le domaine de liaison à l'actine est localisé au niveau de l'extrémité C terminale de cette même chaîne légère (Togel et al., 1998; Noiges et al., 2002) (Figure 10). En effet, la chaîne légère de la MAP1B lie les microtubules, permet de stabiliser les microtubules (ils deviennent plus résistants à l'effet dépolymérisant du nocodazole) et de les rendre malgré tout flexibles, car ils adoptent des conformations ondulantes et peuvent même aller jusqu'à former des boucles (Togel et al., 1998). Ces modifications dans la conformation des microtubules n'ont pas pu être imputées à la MAP1A. En effet, la liaison de la chaîne légère de la MAP1A ne modifie pas l'apparence des microtubules, mais, elle les stabilise tout de même et les protège de l'effet dépolymérisant de la colchicine (Noiges et al., 2002). De plus, les mêmes auteurs ont montré que la chaîne légère de la MAP1A et de la MAP1B favorisait la polymérisation du microtubule.

Les chaînes lourdes et les chaînes légères s'associent entre elles. Cette interaction permettrait une meilleure liaison aux microtubules des chaînes lourdes (Togel et al., 1998) et permettrait de réguler l'activité de la chaîne légère (ce processus a été décrit pour la MAP1B) (Togel et al., 1998). En effet, la stabilisation des microtubules par la chaîne légère est fortement diminuée lorsqu'elle est associée à la chaîne lourde. Le domaine protéique de la chaîne lourde impliqué dans l'interaction avec la chaîne légère est proche du MTBD N terminal (pour la MAP1B) (Hammarback et al., 1991).

La MAP1S peut être co-purifiée avec les microtubules. Contrairement aux deux autres membres de cette famille, la MAP1S ne comporte pas de site de liaison aux microtubules dans sa partie N terminale. En fait, la chaîne lourde de la MAP1S ne comporte pas de MTBD. C'est la chaîne légère qui possède le MTBD. Cependant, la chaîne lourde est tout de même retrouvée lors d'expériences de co-purification des microtubules, suggérant une interaction entre les deux parties de la MAP1S (Orban-Nemeth et al., 2005). L'interaction de la forme complète de la MAP1S ne semble pas avoir d'effet sur les microtubules. Par contre, la liaison de la chaîne légère seule, stabilise les microtubules, en les rendant résistants aux agents dépolymérisant (colchicine et nocodazole), et induit la formation de faisceaux de microtubules.

Contrairement aux MAPs de Type I de mammifères, l'homologue de *Drosophila*, Futsch, ne semble pas être clivé (Gogel et al., 2006).

iii)-L'interaction avec l'actine

En plus de leur capacité à lier les microtubules, les chaînes légères des MAP1A, MAP1B et MAP1S sont aussi capables de lier les microfilaments d'actine (Togel et al., 1998; Noiges et al., 2002; Orban-Nemeth et al., 2005). Ce domaine est localisé au niveau de l'extrémité C terminale de la chaîne légère (Figure 10). Cette double capacité d'interagir avec les microtubules d'une part, et les microfilaments d'actine d'autre part, des chaînes légères de ces MAPs de Type I leur permettrait de relier les deux cytosquelettes (microtubules et actine).

b)-Famille MAP2/MAP4/Tau, MAPs de type II

Cette famille comporte les protéines de vertébrés, MAP2, MAP4 et Tau (Schoenfeld and Obar, 1994). MAP2 et Tau sont préférentiellement exprimées dans les neurones, alors que MAP4 est présente dans de nombreux tissus, autres que les neurones (pour revue voir (Dehmelt and Halpain, 2005)).

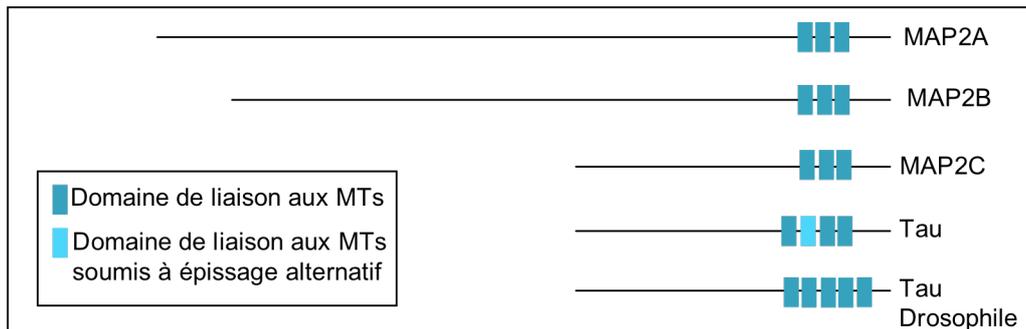


Figure 11 : Les MAPs de Types II. Dans le système nerveux mammifère, il existe 4 MAPs de Type II, MAP2A, MAP2B (protéines de haut poids moléculaire), MAP2C et Tau (plus petit poids moléculaire). Elles lient les microtubules au niveau de 3 voire 4 (pour certaines formes de Tau) domaines répétés. Chez la *Drosophile*, une protéine fait partie de cette famille : Tau (ou dTau), elle posséderait d'après sa séquence 5 domaines répétés.

i)-Localisation de ces protéines dans le système nerveux

La MAP2 est une protéine de haut poids moléculaire (> 250 kDa). Plus précisément, la MAP2 comprend 3 isoformes provenant de l'épissage alternatif d'un même gène (Garner and Matus, 1988). Il y a la MAP2A, la MAP2B et la MAP2C, cette dernière étant plus courte que les deux précédentes (≈ 70 kDa) (Figure 11). Ces protéines sont très présentes au niveau des dendrites. Leur taux d'expression varie au cours du développement. L'expression de la MAP2A augmente en période post-natale. La MAP2B est présente dès la naissance et son

taux se maintient. La MAP2C est exprimée depuis la période fœtale et son taux chute quelques jours après la naissance, ce taux demeure bas chez l'adulte (Riederer and Matus, 1985). Au niveau du cortex cérébral, les MAP2 sont associées aux dendrites tout au long du développement (Bernhardt et al., 1985). Lors de la phase de croissance des dendrites, les MAP2 sont concentrées dans les branches les plus distales de l'arbre dendritique. Dans le cortex mature, les MAP2A et B sont réparties uniformément dans toutes les dendrites (Riederer and Matus, 1985; Peng et al., 1986). De plus, dans les épines dendritiques, elle est localisée dans le cytoplasme et associée aux densités post-synaptiques, zones où il y a moins de marquage tubuline (Caceres et al., 1984). Ceci suggérerait que la MAP2, dans les épines, aurait un autre rôle que celui d'être associée aux microtubules. Elle pourrait interagir avec l'actine (Caceres et al., 1983).

Par ailleurs, la protéine Tau a une taille du même ordre de grandeur que celle de la MAP2C (elle migre en plusieurs bandes entre 40 et 70 kDa) et elle est produite à partir d'un seul gène soumis à un épissage alternatif (Himmler et al., 1989) (Figure 11). Trois exons (exons 2, 3 et 10) du gène tau subissent l'épissage alternatif.

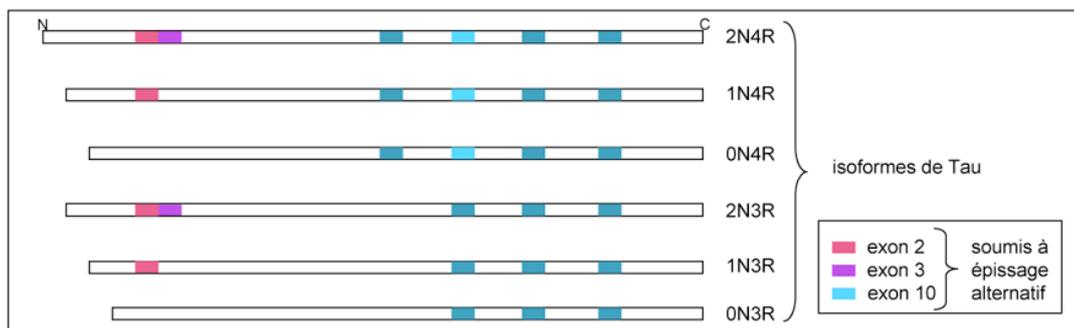


Figure 12 : Les différentes formes de Tau humain. Le gène tau humain comporte 3 exons soumis à épissage alternatif, ce qui permet de produire différentes formes de la protéine. Des formes avec aucun, un ou deux des exons dans le domaine de projection N terminal. Des formes avec trois ou quatre domaines répétés.

Ainsi, la région N terminale peut varier, soit la protéine ne comporte ni l'exon 2, ni l'exon 3, elle est alors notée 0N. Soit elle comporte l'exon 2 (1N), soit l'exon 2 et l'exon 3 (2N) (Figure 12). La région N-terminale de Tau est appelée domaine de projection, car le domaine protéique correspondant est projeté en dehors des microtubules. Ce domaine de projection pourrait réguler l'écartement entre les microtubules au sein de l'axone et augmenter le diamètre axonal (Chen et al., 1992; Georgieff et al., 1993). La région N terminale de Tau se lie à la spectrine, ainsi qu'à la membrane plasmique (Carlier et al., 1984; Brandt et al., 1995). Ainsi, Tau permettrait la connexion entre les microtubules et d'autres éléments du cytosquelette. La protéine Tau est constituée d'une région centrale conservée

entre les différentes formes. La partie C terminale contient des séquences répétées de 18 acides aminés. Ces séquences sont très conservées au cours de l'évolution (Figure 11 et 12). Elles correspondent très probablement aux domaines de liaison aux microtubules. Chaque domaine répété étant codé par un exon, l'épissage alternatif du transcrit permet l'obtention de protéines contenant plus ou moins de domaines (Himmler, 1989). Ainsi, il peut y avoir de 3 à 4 de ces domaines répétés (selon absence (3R) ou présence (4R) de l'exon 10) (Himmler, 1989; Himmler et al., 1989; Denk and Wade-Martins, 2007) (Figure 12). Il a été montré *in vitro* que les formes de Tau à 4 domaines répétés se lient aux microtubules avec une affinité environ trois fois supérieure à celle des formes à trois domaines répétés, et favoriseraient mieux la polymérisation des microtubules (Goode et al., 2000).

L'expression de Tau dans le système nerveux est restreinte aux axones, et ce dans différentes régions du cerveau (Binder et al., 1985; Peng et al., 1986). Par ailleurs, la protéine Tau est plus fortement retrouvée lors de purification de microtubules provenant de substance blanche (riche en axones), par rapport à des extraits de substance grise (où la quantité d'axones est estimée à 40 %).

Chez la *Drosophile*, il n'existe qu'un seul membre de cette famille, appelé Tau ou dTau (Heidary and Fortini, 2001) (Figure 11 et 13).

Tau H sapiens	MAEPRQEFVEMEDHAGTYGLDRKDQGGYTMHQDQEGDTDAGLKAEEAGIGDTPSLEDEA	60
Tau M musculus	MADPRQEFDTMEDHAG-----DYTLLQDQEGDMDHGLKAEEAGIGDTPNQEDQA	49
Tau Drome	MADVLEKSSLLDAVPLG-----DPHPPLPHQQLQOEAAAAAAAAANAAPPAPPQQQP	52
	** : : . : : . : : : : : : : : . : : . * : : : . * : : : .	
Tau H sapiens	AGHVTQARMVSKSKDGTGSDDKAKGADGKT--KIATPRGAAPPQKGQANATRIPAKTP	118
Tau M musculus	AGHVTQARVASK--DRTGNDEKAKGADGKTGAKIATPRGAASPAQKGTSNATRIPAKTT	107
Tau Drome	PPHQLQQQQPQQ----QQLQKQKAPANARANQDQKEGDNDSGVDESTQEKDRNGPNSPSSPV	108
	. * * : : : : : : : : : : : : : : . * . * : * . . * . .	
Tau H sapiens	PAPKTPSSGEPKSGD-RSGYSSPGSPGTPGSRSRTPSLPTPPTREPKKVAVVRTPPKS	177
Tau M musculus	PSPKTPPGSGEPKSGE-RSGYSSPGSPGTPGSRSRTPSLPTPPTREPKKVAVVRTPPKS	166
Tau Drome	KTPTS--TSSKPKDGSRTSRPPSATPSNKSAPKRSASKNRLLLLKTPPEPEPVKKVPMN---	163
	:* : : * : * * * * . : : * . . : * * * : . * * * : * *	
Tau H sapiens	PSSAKSRLQTAPVMPDLKNVRSKIGSTENLKHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQSKCGSKD	237
Tau M musculus	PSAKSRLQTAPVMPDLKNVRSKIGSTENLKHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQSKCGSKD	226
Tau Drome	-----KVQVGHAPSPNLKAVRSKIGSLDNATYKPGGGHVKIESKKIDIKAPRIEAKND	217
	:* . . . * * : * * * * * : * : : * * * * * : * * * * : . . . : *	
Tau H sapiens	NIKHVPGGGSVQIVYKPVLDLKVTSKCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDKDRVQSKIG	297
Tau M musculus	NIKHVPGGGSVQIVYKPVLDLKVTSKCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDKDRVQSKIG	286
Tau Drome	--KYPKGGGEKKIVTTKLQWN--AKSKIGSLENAAHKPGGGDKK IETLKMDFKDKAKPKVG	274
	* : : * * . : * * . : : . . . * * * * * * * * * * : : : : * * * * : . . . : *	
Tau H sapiens	SLDNITHVPGGGNKKIETHKLTFRENAKAKTDHGAEIVYKSPVVSVDTSRPHLSNVSSSTG	357
Tau M musculus	SLDNITHVPGGGNKKIETHKLTFRENAKAKTDHGAEIVYKSPVVSVDTSRPHLSNVSSSTG	346
Tau Drome	STANVKHQPGGGDIKIQTQKLEIKAQSKVGSLDNVKHKPGGGDKKIFDDKDYLNVEHSV	334
	* * : . * * * * : * * : * * : : : : : : * . * * . :	
Tau H sapiens	SIDMVD--SPQLATLADEVASLAKQGL	383
Tau M musculus	SIDMVD--SPQLATLADEVASLAKQGL	372

Tau Drome ALTTTPPTQSPPLPSMTASGADENLNQOS- 361
 :: ** : *. . . .* :*.

Figure 13 : Alignement de séquences des protéines Tau humaine, murine et de *Drosophile*. Alignement réalisé avec Clustal W 1.83. Les domaines de liaison aux microtubules (ou MTBD) sont représentés en gris. En bleu, il s'agit de la séquence des domaines de liaison de la protéine Tau de *Drosophile*. Cette protéine comporterait 5 MTBD. H sapiens, pour *Homo sapiens* ; M musculus, pour *Mus musculus* et Drome, pour *Drosophila melanogaster*.

ii)-L'interaction avec les microtubules

Le domaine de liaison aux microtubules des protéines de cette famille est localisé à l'extrémité C terminale de la protéine. Cette région C terminale est retrouvée associée aux microtubules. Sur les protéines MAP2, ce domaine consiste en 3 séquences imparfaitement répétées de 18 acides aminés et séparées de 13 à 14 acides aminés (Lewis et al., 1988). La partie C terminale de Tau présente 67% d'identité avec celle des MAP2, son domaine de liaison aux microtubules comprend entre 3 et 4 domaines répétés (Lewis et al., 1988).

Les protéines MAP2 et Tau permettent de stabiliser les microtubules (l'expression de Tau empêche le nocodazole de dépolymériser les microtubules) (Drubin and Kirschner, 1986; Weisshaar and Matus, 1993). Plus récemment, en cellules transfectées, l'expression de MAP2 et Tau conduit à la formation de faisceaux de microtubules. Ces microtubules peuvent encore subir l'instabilité dynamique. Ces MAPs ne figent donc pas complètement les microtubules, mais elles favorisent l'étape de polymérisation plutôt que l'étape de raccourcissement (Kaech et al., 1996).

Plus précisément concernant Tau, le nombre de domaines répétés joue un rôle sur l'interaction de la protéine avec les microtubules. Une protéine Tau avec 4 domaines lie les microtubules avec une meilleure affinité qu'une protéine ne comprenant que 3 domaines répétés (Butner and Kirschner, 1991). Par ailleurs, ces domaines répétés permettraient la polymérisation de microtubules à partir de tubuline libre (Ennulat et al., 1989). La protéine Tau favorise l'élongation des microtubules en facilitant l'addition de nouvelles sous-unités de tubuline au niveau de l'extrémité plus des microtubules (extrémité qui polymérise plus vite) (Drechsel et al., 1992). Tau pourrait être un acteur de la formation et du maintien des microtubules dans la cellule.

iii)-L'interaction avec l'actine

En 1978, Griffith et Pollard ont montré que la viscosité d'une solution d'actine augmentait soit en présence de microtubules décorés de MAPs, soit en présence de MAPs seules. De plus, ils observaient en microscopie électronique, que les microtubules et les microfilaments d'actine étaient proches les uns des autres. Ceci suggérait une interaction entre les microtubules et les microfilaments, impliquant les MAPs (Griffith and Pollard, 1978). Par ailleurs, les mêmes auteurs ont montré, par la suite, que parmi les MAPs qui interagissaient avec l'actine il y avait des MAPs de haut poids moléculaire (dont fait partie la MAP2) et des MAPs de poids moléculaire plus petit (comme MAP2C et Tau) (Griffith and Pollard, 1982).

MAP2 en présence d'actine purifiée peut conduire, *in vitro*, à la formation de fins faisceaux de microfilaments d'actine (Sattilaro et al., 1981). Cette fonction sur les filaments d'actine passe par une interaction de la MAP2 avec l'actine. Le domaine de MAP2 interagissant avec l'actine est celui capable de lier les microtubules. La production d'un peptide synthétique comportant un des domaines répétés (liant les microtubules) de MAP2 se lie à l'actine (Correas et al., 1990). L'association de la MAP2 avec l'actine semblerait être privilégiée lorsque les domaines répétés sont phosphorylés sur une sérine dans la séquence KXGS (cette séquence est présente sur chacun des 3 domaines répétés) (Ozer and Halpain, 2000).

Comme MAP2, Tau se lie à l'actine grâce à ses domaines répétés (Correas et al., 1990). La protéine Tau, comme MAP2, comporte sur chacun de ses domaines répétés la séquence KXGS. L'interaction avec l'actine serait aussi régulée par la phosphorylation, car des formes très phosphorylées de Tau s'associent à l'actine (Fulga et al., 2007).

2)-Les MAPs motrices

En plus des MAPs structurales qui régulent l'architecture du cytosquelette microtubulaire, d'autres MAPs peuvent s'y lier. Il s'agit des MAPs motrices, ou moteurs moléculaires qui, comme leur nom l'indique, permettent le déplacement des structures le long des microtubules, ces derniers leur servant de rails. Elles sont de deux types : les kinésines et les dynéines et nécessitent de l'énergie, sous forme d'hydrolyse d'ATP, pour se déplacer (pour revue voir (Hirokawa, 1998; Mallik and Gross, 2004)) (Figure 14).

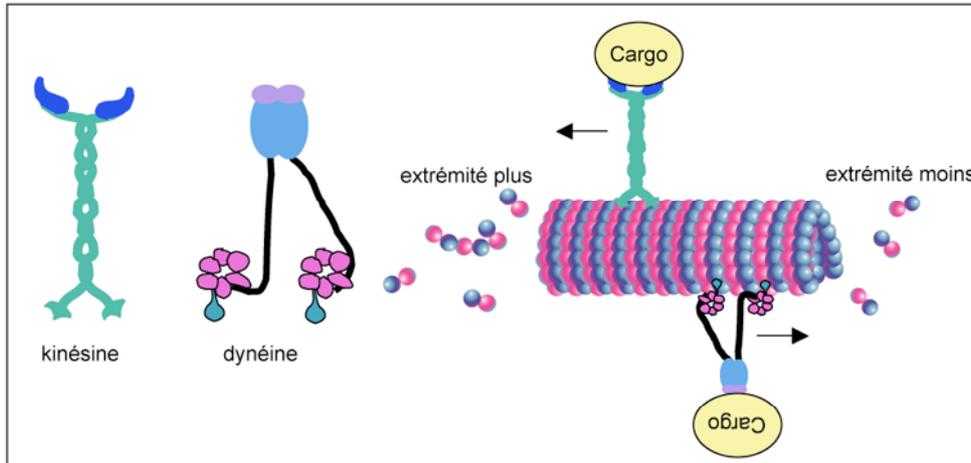


Figure 14 : Les MAPs motrices. La kinésine est formée de deux chaînes lourdes (en vert) qui se fixent sur les microtubules et deux chaînes légères (en bleu) qui permettent de lier le cargo (vésicule, mitochondries,...). Elle se déplace vers l'extrémité plus des microtubules. La dynéine comporte deux têtes (en rose) qui viennent au contact des microtubules grâce à un bras (en bleu). Elle lie le cargo à l'opposé et se déplace vers l'extrémité moins des microtubules.

Dans le système nerveux et en particulier dans les axones, elles ont un rôle essentiel à jouer. En effet, la transcription et la traduction ayant lieu au niveau du corps cellulaire du neurone, il est nécessaire que l'ensemble des composants de l'axone et de la terminaison synaptique se déplacent des lieux de synthèse vers leur destination finale. Les moteurs moléculaires se chargent de ce travail, en convoyant le long des microtubules les protéines nécessaires à la synapse (pour revue voir (Goldstein and Yang, 2000)).

a)-La Kinésine

La kinésine se déplace vers l'extrémité plus des microtubules. Ce déplacement est appelé transport antérograde (Hirokawa et al., 1991). La kinésine est composée de 2 chaînes lourdes et de 2 chaînes légères (respectivement en vert et bleu, Figure 14). Elle a deux têtes globulaires (une sur chaque chaîne lourde) qui se lient aux microtubules, une partie « tige » et une queue sur laquelle se lie le cargo qu'elles transportent (Hirokawa, 1998). Le mouvement de la kinésine le long des microtubules est rendu possible grâce à l'hydrolyse d'ATP (lié aux têtes globulaires), ce qui permet des changements de conformation de la protéine. Elle peut alors « marcher » sur les microtubules (Schliwa and Woehlke, 2003).

b)-La Dynéine

La dynéine se déplace vers l'extrémité moins des microtubules (Hirokawa et al., 1990; Hafezparast et al., 2003). La dynéine est une très grosse protéine composée de 2 chaînes lourdes, de 3 chaînes intermédiaires et de 4 chaînes légères (Hirokawa, 1998). La dynéine a 7 têtes globulaires qui forment une sorte d'anneau. Parmi les 7 têtes, 4 ont une activité ATPasique. Les têtes sont au contact des microtubules par l'intermédiaire d'un bras. A l'opposé, les têtes sont reliées a une partie plus linéaire qui se termine par l'extrémité liant le cargo (Mallik and Gross, 2004) (Figure 14).

3)-D'autres MAPs

a)-Une autre MAP présente dans le cerveau, la protéine STOP

Il existe dans le système nerveux, une autre MAP qui a été découverte car elle conférait aux microtubules une résistance au froid. En effet, les microtubules du système nerveux sont connus pour être résistants au froid, c'est-à-dire qu'ils ne dépolymérisent pas à basse température. Il s'agit de la protéine STOP (Stable Tubule-Only Peptide) (Bosc et al., 1996). De plus cette protéine permet aux microtubules de résister à la dépolymérisation induite par le nocodazole. Par ailleurs, elle inhibe la dynamique des microtubules en favorisant la détyrosination de la tubuline, ce qui conduit à une stabilisation des microtubules. STOP joue aussi un rôle dans la formation des neurites, elle permet l'initiation de cette pousse. En effet, lorsque la protéine est inhibée, la formation des neurites n'a pas lieu (Guillaud et al., 1998).

Par ailleurs, la protéine STOP est aussi retrouvée associée à l'actine. Pour cela, il faut qu'elle soit phosphorylée par la CaMKII (Calcium calModuline dependant Kinase II), ce qui se produit dans certaines conditions d'activation du neurone (Baratier et al., 2006). De manière générale, la protéine STOP dans les neurones est pratiquement tout le temps associée aux microtubules leur conférant leur grande stabilité (Bosc et al., 1999). Cependant lors de l'activation des neurones, elle peut-être phosphorylée et se détache des microtubules pour aller lier l'actine et les protéines synaptiques, supposant ainsi un autre rôle pour cette protéine (Baratier et al., 2006). Les protéines STOP ne sont retrouvées que dans les génomes de vertébrés ; *Drosophila* n'a pas de protéine STOP (Bosc et al., 2001; Bosc et al., 2003). Ceci est en accord avec nos expériences au laboratoire, qui ont montré que l'endormissement des

larves sur de la glace avant dissection entraînait une dépolymérisation des microtubules axonaux (marquage tubuline diffus et non plus sous forme de faisceau).

b)-Les MAPs qui se lient à l'extrémité des microtubules (pour revue voir (Schuyler and Pellman, 2001 ; Akhmanova and Hoogenraad, 2005))

i)-APC

APC pour Adenomatous Polyposis Coli mis en évidence dans les cancers colorectaux est aussi capable de se lier aux microtubules, en particulier ceux proches de la membrane plasmique de cellules en migration (Nathke et al., 1996). En effet, elle se lie au cytosquelette microtubulaire via son domaine C terminal. De plus, soit la protéine entière soit le domaine C terminal seul sont capables d'induire l'assemblage des microtubules (Munemitsu et al., 1994; Mimori-Kiyosue et al., 2000b). Plus précisément, APC se lie à l'extrémité plus des microtubules et permet d'induire la formation de faisceaux (Mimori-Kiyosue et al., 2000a; Mogensen et al., 2002). En outre, APC est capable de stabiliser les microtubules, car en présence de nocodazole, des microtubules associés à APC dépolymérisent moins vite que des microtubules seuls (Zumbrunn et al., 2001).

Au niveau du système nerveux, la protéine APC est préférentiellement localisée dans les neurones (Brakeman et al., 1999). De plus dans les neurones, elle est retrouvée associée aux microtubules dans le cône de croissance ainsi que dans les neurites (Morrison et al., 1997b; Morrison et al., 1997a).

Chez la *Drosophila*, il existe deux protéines APC, APC1 et APC2. Ces deux protéines sont exprimées dans le cerveau larvaire au niveau des neuroblastes. Elles sembleraient impliquées dans la division asymétrique qui caractérise ce type de cellules (Akong et al., 2002).

ii)-EB1

La protéine APC peut interagir avec EB1 au niveau de sa partie C terminale (extrémité qui s'associe aussi aux microtubules) comme cela a été montré en double hybride (Su et al., 1995). EB1 est aussi retrouvée associée aux microtubules et permet la formation de faisceaux (Bu and Su, 2001). Par ailleurs, EB1 se lie aux extrémités en croissance des microtubules et pourrait participer au processus de pousse neuritique (Morrison et al., 2002).

Chez la *Drosophila*, une des protéines EB1 joue un rôle dans le bon fonctionnement des mécanorécepteurs de l'animal. Les mutants présentent des défauts corrélés à un dysfonctionnement de ce type de neurones (Elliott et al., 2005).

iii)-CLIP et CLASP (pour revue voir (Galjart, 2005))

Chez les mammifères, il existe deux protéines CLIP (Cytoplasmic Linker Protein reliant des organelles cytoplasmiques aux microtubules (Rickard and Kreis, 1996)), CLIP-170 et CLIP-115, elles lient des vésicules d'endocytose et participent au trafic vésiculaire. Toutes deux peuvent lier les microtubules, au niveau de leur extrémité plus. De plus, elles permettent d'induire la formation de faisceaux de microtubules (Hoogenraad et al., 2000). En outre, CLIP-115 est présente de manière prépondérante dans les neurones et en particulier au niveau des dendrites au niveau desquels, de nouvelles structures membranaires ont été mises en évidence, les dendritic lamellar bodies dont le rôle exact n'est pas encore connu (De Zeeuw et al., 1997).

Chez la *Drosophila*, il existe une protéine homologue aux CLIP, D-CLIP-190. Cette protéine cosédimente avec les microtubules. Par ailleurs, elle est présente dans le système nerveux central embryonnaire et, plus précisément dans les axones (Lantz and Miller, 1998).

Les protéines CLIP peuvent être associées à d'autres protéines, les CLASP (CLIP Associating Proteins). Ces protéines peuvent aussi lier les microtubules, de manière assez similaire aux protéines CLIP, et présentent des propriétés stabilisatrices du cytosquelette microtubulaire. Par ailleurs, les CLASP peuvent interagir avec les CLIP et aussi les microtubules, jouant alors un rôle sur leur dynamique (Akhmanova et al., 2001).

Chez la *Drosophila*, l'homologue des CLASP, est Orbit/MAST qui est localisée dans le cône de croissance des neurones embryonnaires. Elle est importante pour le guidage correct des axones (en effet, dans l'embryon certains neurones croisent la ligne médiane et pas d'autres) (Lee et al., 2004).

4)-L'interaction de ces MAPs avec les microtubules est régulée par phosphorylation

Lors du développement neuronal, le cytosquelette de microtubules est mobilisé afin de permettre la pousse neuritique. Pour ce processus sont donc mobilisés les microtubules et les MAPs, et en particulier la phosphorylation que subissent ces protéines (Avila et al., 1994).

C'est le cas de la MAP1B qui est soumise à la phosphorylation par diverses kinases. Plus précisément, il existe deux types de phosphorylation de la MAP1B, le mode I et le mode II (Avila et al., 1994) (Figure 15). Ces deux modes diffèrent par les kinases impliquées et surtout par l'effet produit de la phosphorylation sur la MAP1B envers les microtubules (Ulloa et al., 1993b; Ulloa et al., 1994).

-Le mode I :

La phosphorylation est réalisée par des kinases dites « proline-directed protein kinase » (le résidu cible de la phosphorylation est localisé dans une région riche en proline), telles les Cdk (Cyclin-Dependant Kinase) ou les MAP kinases (Mitogen Activated Protein). La MAP1B phosphorylée selon ce mode I est retrouvée dans les parties les plus distales du cône de croissance (Ulloa et al., 1994). Elle pourrait représenter un marqueur actif de la pousse axonale (Gordon-Weeks et al., 1993). En effet, elle s'associe plus faiblement, d'une manière générale, aux microtubules, cependant elle se lie préférentiellement aux microtubules riches en tubuline tyrosinée (microtubules plutôt « jeunes ») (Garcia Rocha and Avila, 1995; Goold et al., 1999). La MAP1B phosphorylée selon le mode I pourrait conduire à la formation de faisceau de microtubules plus lâches, comme ceux observés dans le cône de croissance. De plus, la perte de la phosphorylation de type I semblerait associée à la maturation synaptique (Ulloa et al., 1994).

Une autre kinase pourrait être associée à ce mode de phosphorylation au vu de l'effet produit sur la MAP1B. Il s'agit de la GSK3 β (Glycogen Synthase Kinase). En effet, la MAP1B phosphorylée par la GSK3 β est retrouvée au niveau de microtubules tyrosinés, retardant leur détyrosination. La MAP1B ainsi phosphorylée permettrait de maintenir les microtubules dans un état dynamique, indispensable à l'élongation du cône de croissance (Goold et al., 1999). Par ailleurs, l'inhibition de la GSK3 β induit une diminution de MAP1B phosphorylée au niveau du cône de croissance (Lucas et al., 1998). Même si la MAP1B phosphorylée selon le mode I est capable de se lier à des microtubules, cependant, elle est incapable de les protéger contre l'effet dépolymérisant du nocodazole (protection assurée par la MAP1B non phosphorylée) (Goold et al., 1999).

Chez la *Drosophile*, la protéine homologue aux MAP1, Futsch, pourrait être phosphorylée sur deux résidus Sérine par la GSK3 β (Shaggy chez la *Drosophile*) (Gogel et al., 2006) (Figure 15).

-Le mode II :

Ce mode de phosphorylation est catalysé par la CK II (Casein Kinase) et il induit une meilleure affinité de la MAP1B pour les microtubules qu'une phosphorylation de mode I (Ulloa et al., 1993a; Garcia Rocha and Avila, 1995). La MAP1B phosphorylée selon le mode II est préférentiellement retrouvée dans le cerveau adulte, dans les axones et les dendrites (Ulloa et al., 1994). De plus elle favoriserait l'élongation des neurites (Ulloa et al., 1993a).

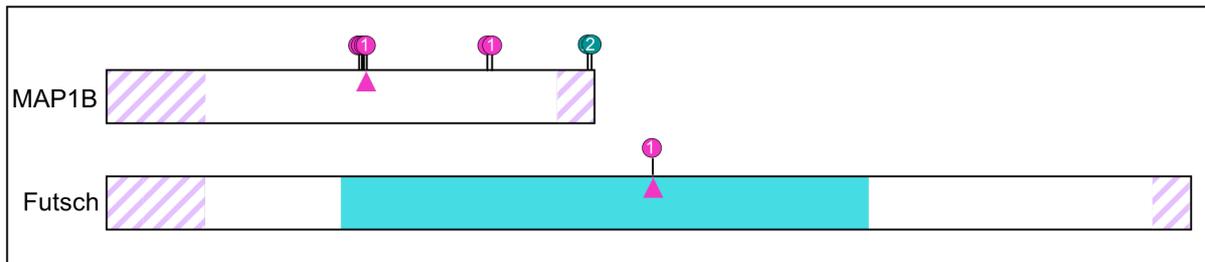


Figure 15 : Sites de phosphorylation des MAPs de type I, MAP1B pour les mammifères et Futsch pour la *Drosophila*. En rose, les phosphorylations de mode I, celles présentant une flèche rose peuvent être produites par la GSK3 β /Shaggy (ces sites sont reconnus par un anticorps : BUGS (Trivedi et al., 2005; Gogel et al., 2006)). Cependant, Futsch comporte un domaine homologue aux neurofilaments (en bleu clair), qui pourrait potentiellement être phosphorylé, comme le sont les neurofilaments. Les sites de phosphorylation impliqués sont des motifs KSP, on en compte 35 sur Futsch. Cependant, aucune donnée biologique n'amène la preuve que ces motifs soient effectivement phosphorylés sur la MAP de *Drosophila*. En bleu, les phosphorylations de mode II. Sur la MAP1B, ces sites de phosphorylation ont été identifiés grâce à des anticorps reconnaissant la protéine phosphorylée. Pour les sites de mode I : anticorps SMI 31 (Johnstone et al., 1997) et 531 (Ulloa et al., 1993b) ; et pour les sites de mode II : anticorps 842 (Ulloa et al., 1993b). Les régions hachurées en violet représentent les régions homologues entre les deux protéines.

La phosphorylation des MAPs de type II (MAP2, MAP4 et Tau) conduit à leur détachement des microtubules. Il en résulte une accentuation de l'instabilité dynamique des microtubules (Illenberger et al., 1996). En fait, ces MAPs stabilisent les microtubules en diminuant la fréquence des périodes de dépolymérisation massive et en augmentant celle de polymérisation. La phosphorylation induit une diminution de l'affinité des MAPs pour les microtubules. Elles se détachent donc et ne jouent plus leur rôle stabilisateur. Les microtubules sont alors moins « protégés » face au processus d'instabilité dynamique, ils peuvent être donc, plus facilement, dépolymérisés. En outre, non seulement la phosphorylation de Tau induit son décrochage des microtubules (Wagner et al., 1996), mais aussi, et consécutivement à ce décrochage, la pousse des neurites (Biernat et al., 2002).

Les protéines MAP2 et Tau sont phosphorylées par différents types de kinases, mais elles sont aussi la cible d'une famille de kinases identifiées justement parce qu'elles

phosphorylaient des MAPs. Il s'agit des MARK (MAP/microtubule Affinity-Regulating Kinase) (Drewes et al., 1997). Par exemple, une kinase de cette famille MARK2/PAR1 est requise pour la croissance des neurites. L'implication de cette kinase dans ce processus passe par la phosphorylation de Tau au niveau d'un motif KXGS qui est présent dans les domaines répétés de la MAP (Biernat et al., 2002).

III)-La croissance des neurites : dendrites et axone

Afin d'établir toutes les connections entre les neurones ou entre un neurone et sa cible (qu'elle soit musculaire ou autre), il faut que, lors du développement, les neurones envoient des prolongements afin d'entrer en contact avec les cellules cibles alentour. Ramón y Cajal fut le premier à observer ce phénomène de croissance de l'axone et des dendrites guidés par une structure particulière, qu'il a nommé : cône de croissance. Afin de contacter sa cible, le cône de croissance reçoit de nombreux signaux de son environnement. Il doit les interpréter afin de s'orienter correctement et pour cela il mobilise son cytosquelette. Le cytosquelette en périphérie du cône de croissance va subir des remaniements afin de produire des prolongements qui seront ensuite stabilisés avant de se différencier en synapse fonctionnelle.

1)-Le rôle de l'actine et des microtubules au niveau du cône de croissance

L'organisation interne de l'actine et des microtubules change rapidement dans le cône de croissance bien avant que des changements dans la forme de ce cône de croissance ne soient observables (pour revue voir (Tanaka and Sabry, 1995; Dent and Gertler, 2003)).

a)-L'actine

Les premières étapes de la pousse neuritique représentent une orientation du cône de croissance dans son environnement afin de déterminer la localisation la plus propice à l'élongation des axones ou dendrites. Le cône de croissance va donc envoyer des prolongements cytoplasmiques qui, en contact avec des signaux extracellulaires favorables, vont induire sur le cône de croissance une prise d'orientation et *a posteriori* la pousse neuritique. Pour ce faire, la membrane plasmique est remodelée par l'actine sous membranaire afin de former soit des filopodes, qui sont des structures assez fines poussant et

se rétractant, soit des lamellipodes, qui ressemblent à une sorte de voile entre deux filopodes poussant et se rétractant aussi (Bray and Chapman, 1985; Goldberg and Burmeister, 1986). Ces structures permettent de tester l'environnement afin d'orienter correctement le cône de croissance. Par ailleurs, les filopodes et les lamellipodes permettent d'attacher le cône de croissance à la surface cellulaire et peuvent générer la force nécessaire pour l'avancement du cône de croissance (Heidemann et al., 1990). Ces structures cytoplasmiques, en particulier les lamellipodes, peuvent être rapidement colonisées par des organelles afin de permettre la maturation (Goldberg and Burmeister, 1986).

Les filopodes et les lamellipodes sont essentiellement remplis de microfilaments d'actine. Dans les filopodes, les microfilaments d'actine sont regroupés en faisceau avec leur extrémité qui polymérise le plus vite du côté de la lisière du cône de croissance et l'extrémité polymérisant le plus lentement orienté vers le centre de la cellule. Ceci permet de polymériser l'actine qui pousse alors la membrane afin de former les filopodes. Concrètement, la séquence d'évènements est la suivante : les microfilaments d'actine polymérisent au niveau de leur extrémité proche de la lisière du cône de croissance, associée à une perte d'actine globulaire à l'autre extrémité du microfilament, proche celle-ci du centre de la cellule. Il en résulte comme un déplacement vers l'intérieur de l'actine, nommé flux rétrograde (Forscher and Smith, 1988). Les lamellipodes présentent aussi des microfilaments d'actine mais ils sont moins structurés que dans les filopodes, ils se croisent, ils ondulent et leur orientation est aléatoire (Lewis and Bridgman, 1992).

b)-Les microtubules

Lors de la formation de ces structures dépendantes de l'actine, en particulier les lamellipodes, le cytosquelette microtubulaire ne reste pas inactif. En effet, lui aussi explore ces prolongements cytoplasmiques. Les microtubules assujettis à l'instabilité dynamique, poussent et se rétractent permettant l'exploration des lamellipodes (Tanaka and Kirschner, 1991). En effet, lorsque l'instabilité dynamique des microtubules est abolie grâce à de faibles quantités de vinblastine, le cône de croissance ne progresse plus, il est « sur pause ». Cet effet est corrigé après rinçage de la drogue et le cône de croissance reprend une activité normale (Tanaka et al., 1995). En plus de l'instabilité dynamique, les microtubules peuvent être raccourcis et se déplacer dans le cône de croissance. Ils peuvent alors être fragmentés pour mieux repousser lors de l'élongation (Dent et al., 1999).

L'accumulation des polymères d'actine au site de la future pousse est l'étape préalable à l'orientation et l'invasion des microtubules. Concrètement, les deux types de cytosquelette sont nécessaires car si le cône de croissance est traité avec des molécules qui dépolymérisent soit les microfilaments d'actine, soit les microtubules, soit les deux, il ne se produit plus de branches collatérales au cône de croissance, comme s'il ne pouvait plus y avoir de formation de nouveau cône de croissance (Dent and Kalil, 2001). Cependant, pour que les microtubules puissent envahir correctement la zone en contact avec le substrat, il faut une perte d'actine (Lin and Forscher, 1993). En effet, il a été montré que l'application de cytochalasine (drogue qui inhibe la polymérisation des microfilaments d'actine) au niveau du cône de croissance permettait aux microtubules d'envahir les lamellipodes (Forscher and Smith, 1988). La colonisation des lamellipodes par les microtubules se fait grâce à la propriété des microtubules qui ont leur extrémité plus qui incorpore plus rapidement les sous-unités de tubuline, l'extrémité plus étant orientée vers la lisière du cône de croissance. Dans un premier temps, les microtubules sont étalés ou peuvent former des boucles. Ce sont des microtubules qui ont poussé plus vite que le cône de croissance et qui se replient. Puis lorsque la croissance reprend ou se poursuit les microtubules forment alors des faisceaux bien linéaires (Lin and Forscher, 1993; Dent et al., 1999). Une fois les microtubules présents et stabilisés, le cône de croissance peut alors poursuivre sa progression et la pousse neuritique se poursuit. Pour cela, les microtubules forment des faisceaux stables et la membrane du cône de croissance s'accroche le long du faisceau (Tanaka and Kirschner, 1991).

2)-Rôle des MAPs

Les MAPs de type II, une fois phosphorylées, se décrochent des microtubules. Ce qui provoque une pousse des neurites (Biernat et al., 2002), en particulier pour Tau. Donc dans le cône de croissance il semblerait que les MAPs aient un rôle à jouer. De même, la forme juvénile de MAP2, MAP2C, peut lier et organiser les microfilaments d'actine (important pour la déformation initiale du cône de croissance) (Cunningham et al., 1997). Cette famille de MAPs pourrait moduler le cytosquelette cortical du cône de croissance.

Une fois les faisceaux de microtubules formés au sein du cône de croissance, il est nécessaire de les stabiliser pour permettre la pousse axonale. Il semblerait que les MAPs soient impliquées dans ce processus. MAP1B, MAP2 et Tau sont présentes dans le cône de croissance (Gordon-Weeks, 1991). Plus précisément, au niveau de la zone de croissance, il y a beaucoup de MAP1B phosphorylée qui permettrait de maintenir les microtubules dans un état

moins stable et dynamique nécessaire aux remaniement inhérents au cône de croissance (Mansfield et al., 1991; Gordon-Weeks et al., 1993). Par contre, sa distribution au sein de l'axone est sous forme de gradient de la périphérie vers la zone plus proximale, suggérant qu'à cet endroit ce serait la MAP1B non phosphorylée qui se lierait aux microtubules pour les stabiliser.

3)-Voies de signalisation impliquées

a)-Les petites GTPases de la famille Rho

Concernant les remaniements des microfilaments d'actine, il semblerait que les petites GTPases de la famille Rho soient impliquées (pour revue voir (Hall, 1998; Gordon-Weeks, 2004)). Cette famille, des Rho GTPases, comprend les protéines Cdc42, Rho et Rac qui jouent un rôle sur le cytosquelette d'actine. Ces trois protéines, comme tout membre de la famille de Ras, sont actives lorsqu'elles lient le GTP et sont inactives quand elles lient le GDP. Ce retour à un état inactif se fait à la suite de l'hydrolyse du GTP en GDP. Pour les rendre de nouveau actives, il faut que le GDP soit échangé en GTP et c'est le rôle des GEF (Guanine-nucleotide Exchange Factor). Leur activité est aussi régulée par des GAP (GTPases Activating Proteins) qui activent ainsi leur activité catalytique. Elles jouent chacune sur une des structures du cône de croissance. En effet, Cdc42 induit la formation et la stabilisation des filopodes. Rac, quant à elle, provoque la formation des lamellipodes. Et enfin, Rho induit des fibres de stress afin de maintenir une certaine tension dans le cône de croissance (Ridley and Hall, 1992), (pour revue voir (Burrige and Wennerberg, 2004)). Si malheureusement, la tension induite par Rho est présente trop tôt, le cône de croissance se rétracte (Mackay et al., 1995; Nobes and Hall, 1995). Par ailleurs, il semblerait qu'il y est une cascade d'événements produits par ces protéines. En effet, l'activation de Cdc42 induit, dans cet ordre, des filopodes, puis des lamellipodes, des points d'adhésion focale (point d'adhésion de la cellule avec le substrat) et enfin des fibres de stress. La formation des 3 dernières structures est tout de même dépendante de l'activation de Rac et de Rho (Nobes and Hall, 1995). Le modèle serait alors que Cdc42 active Rac, qui active par la suite Rho (Ridley et al., 1992; Chant and Stowers, 1995). Chez la *Drosophila*, il a été mis en évidence que Drac1 (homologue de Rac) et Dcdc42 (homologue de Cdc42) sont exprimées dans le système nerveux et que ces protéines jouent un rôle dans la croissance axonale (Luo et al., 1994).

b)-La voie Wnt

La voie canonique des Wnt est initiée par les facteurs sécrétés Wnt (mammifères) et Wingless (Wg, *Drosophile*) (pour revue voir (Cadigan and Nusse, 1997; Ruel et al., 1999) et www.stanford.edu/~rnusse/wntwindow.html). Ces protéines se lient à leur récepteur à sept domaines transmembranaires de la famille des Frizzled (Boutros et al., 2000). L'activation de Frizzled permet d'activer une protéine adaptatrice Dishevelled. Le mécanisme grâce auquel Frizzled active Dishevelled fait encore l'objet de débats. Par ailleurs, il a été mentionné que la liaison de Wnt avec Frizzled pouvait faire intervenir un troisième partenaire LRP/Arrow (chez la *Drosophile*), et que cette protéine induisait le recrutement de l'Axine à la membrane déstabilisant le complexe de destruction (formé par l'Axine, APC et la GSK3 β où la kinase phosphoryle une de ses cibles qui est ensuite dégradée par le protéasome) (pour revue voir (Cadigan and Liu, 2006)). Dishevelled va ensuite interagir avec l'Axine. L'Axine, complexée avec APC et la GSK3 β , se dissocie alors du complexe de destruction. La kinase GSK3 β ne peut alors plus phosphoryler ses substrats, dont la β -Caténine/Armadillo (chez la *Drosophile*). Cette dernière n'est alors plus dégradée par le protéasome et peut transloquer dans le noyau et s'associer avec d'autres facteurs (LEF/TCF), afin d'activer la transcription de gènes cibles (pour revue voir (Peifer and Polakis, 2000)) (Figure 16).

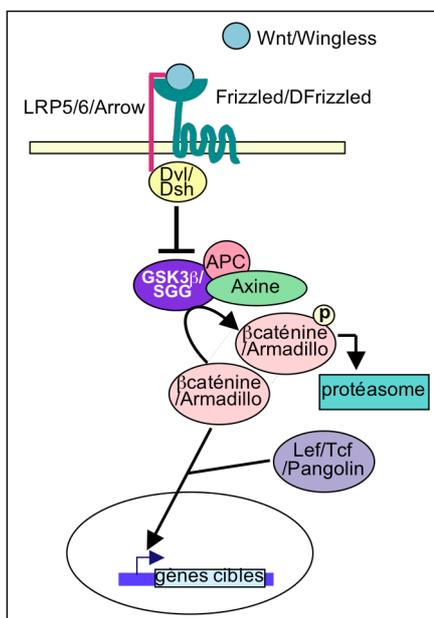


Figure 16 : La voie de signalisation canonique des Wnt, Wingless (Wg) chez la *Drosophile*. Les protéines sécrétés Wnt/Wg se lient à leur récepteur à sept domaines transmembranaires Frizzled et au cofacteur LRP5/6/Arrow. Cette interaction recrute la protéine adaptatrice Dishevelled (Dvl/Dsh) entraînant la déstabilisation du complexe Glycogen Synthase Kinase 3 β (GSK3 β)/Shaggy (SGG)-Adenomatous Polyposis Coli (APC)-Axine, ce qui a pour conséquence d'inhiber la GSK3 β /SGG. L'inhibition de la kinase permet à la β -Caténine/Armadillo d'éviter la dégradation par le protéasome. Ainsi la β -Caténine/Armadillo libre s'associe, une fois transloquée dans le noyau, avec des facteurs de transcription tel Lef/Tcf/Pangolin et active la transcription de gènes cibles.

Concernant les microtubules, la régulation passe par les MAPs et en particulier la phosphorylation. Une des kinases impliquées pourrait être la GSK3 β car elle est capable de phosphoryler Tau (Hanger et al., 1992) et MAP1B (Goold et al., 1999). Pour la première, la phosphorylation induit son décrochage des microtubules ; pour la seconde la phosphorylation permet de préserver des microtubules dans un état plus dynamique et donc plus propice à la mise en place d'un cône de croissance. Ceci est corroboré par les travaux de (Lucas et al., 1998) et (Goold et al., 1999), qui montrent que l'inhibition de la GSK3 β conduit à une diminution de la quantité de MAP1B phosphorylée au niveau du cône de croissance, à un arrêt du cône de croissance et la différenciation des synapses. L'inhibition peut être induite par une drogue, le LiCl (chlorure de lithium), ou des facteurs externes comme les Wnt. Cependant, le détail exact de la voie de transduction impliquée en amont de GSK3 β n'a pas été élucidé. Ces protéines dans la voie canonique inhibent la GSK3 β .

D'autres composants de la voie de transduction Wg/Wnt peuvent modifier le cytosquelette microtubulaire, sans pour autant que leur rôle ait été mis en évidence dans un contexte d'activation ou d'inhibition de cette voie de transduction. En effet, APC (Adenomatous Polyposis Coli) interagit avec l'actine sous-membranaire (Lu et al., 2001; Rosin-Arbesfeld et al., 2001) et est aussi présente au niveau des microtubules via EB1, régulant la stabilité de ces derniers (Mimori-Kiyosue et al., 2000a). Par ailleurs, APC est aussi un substrat de GSK3 β : sa phosphorylation réduit sa capacité à se lier aux microtubules (Zumbrunn et al., 2001). De manière plus intégrée, Cdc42 peut induire la phosphorylation de GSK3 β , inactivant ainsi la kinase (Etienne-Manneville and Hall, 2003). La GSK3 β ne phosphoryle donc plus APC, qui peut aller se lier aux extrémités plus des microtubules et permettre la formation de faisceaux dans une zone où s'établit la polarité cellulaire de cellules en migration, comme le cône de croissance par exemple.

Une des protéines liant l'extrémité des microtubules, comme la protéine CLASP, est aussi une cible de la GSK3 β ; elle se décroche des microtubules une fois phosphorylée (Akhmanova et al., 2001).

En conclusion, la kinase GSK3 β peut réguler plusieurs MAPs et ainsi jouer sur les microtubules lors de la mise en place du cône de croissance, ces MAPs sont aussi connues pour lier l'actine et donc cette kinase peut jouer sur les deux cytosquelettes, de même que la voie des Wnt en amont de la kinase.

IV)-La jonction neuromusculaire larvaire de *Drosophile*

Au laboratoire, notre modèle d'étude est la jonction neuromusculaire (JNM) de *Drosophile*. Du fait qu'elle soit glutamatergique (comme les jonctions neuromusculaires de nombreux invertébrés) (Jan and Jan, 1976), cette synapse peut être utilisée comme modèle de synapse excitatrice glutamatergique du système nerveux central. Elle comporte d'ailleurs des récepteurs au glutamate proches de ceux retrouvés dans les synapses centrales (Littleton and Ganetzky, 2000), des protéines responsables de l'échafaudage correct de ces récepteurs comme Discs-Large (Dlg), l'homologue de PSD95 (Budnik et al., 1996). Par ailleurs, cette synapse est aussi une jonction neuromusculaire, qui n'a pas les repliements postsynaptiques présents dans les jonctions neuromusculaires de vertèbres (Sanes et al., 1998), mais qui comporte un appareil membranaire postsynaptique, le réticulum sous-synaptique (RSS) dont la fonction n'est pas encore connue. Des membres du complexe de protéines associées à la dystrophine sont aussi présents à cette jonction neuromusculaire, comme la dystrophine (van der Plas et al., 2006; van der Plas et al., 2007) et le dystroglycan (données du laboratoire).

Cette JNM présente un avantage majeur qui est son accessibilité. Il est très facile de disséquer une larve. En outre, elle est très stéréotypée, une JNM peut être identifiée par le nerf qui en est à l'origine, par le muscle qu'elle contacte et la morphologie des boutons synaptiques (Hoang and Chiba, 2001).

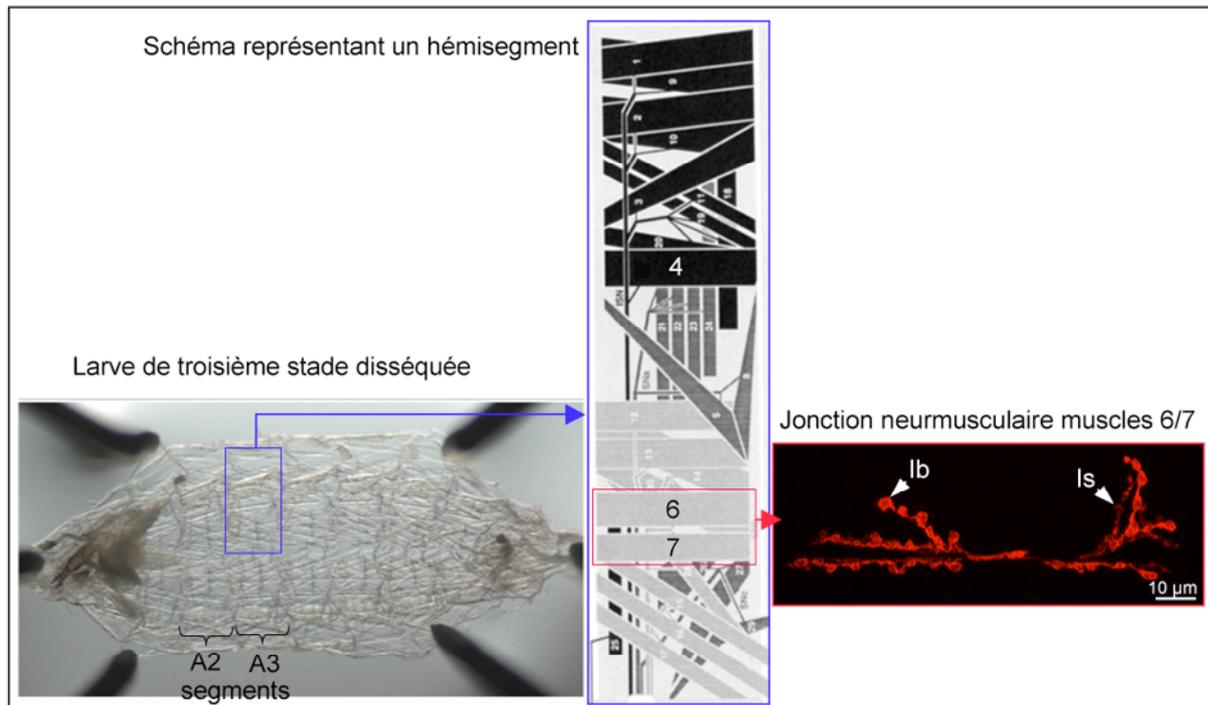


Figure 17 : La jonction neuromusculaire (JNM) larvaire de *Drosophila*. A gauche : la larve est disséquée sur la face dorsale, permettant de mettre à jour les muscles ventraux. Il y a 8 segments abdominaux, les observations se font, en général, au niveau des segments 2 et 3 (A2, A3) (photo de LY Jan et YN Jan). La musculature est très stéréotypée, chaque segment est constitué de la même organisation musculaire. Au centre : un hémisegment schématisé. Les muscles les plus en surface sont principalement étudiés. Pour les quantifications, les comptages se font sur les muscles 6 et 7. Le muscle 4 est aussi fréquemment observé, il ne comporte qu'un seul type de boutons synaptiques, les Ib (gros boutons) (Neuromuscular Junction in *Drosophila*, V Budnik et L Sian Gramates). A droite, une JNM sur muscle 6 et 7, deux types de boutons composent cette synapse, les Ib et les Is (boutons plus petits).

Selon les muscles observés, plusieurs types de boutons sont présents. Il existe en effet des terminaisons synaptiques qui ne contiennent que des boutons dont le diamètre est compris entre 3 et 6 μm et qui ont un RSS très développé. Ces boutons sont appelés Ib (b pour big). D'autres motoneurones ont une terminaison synaptique constituée de boutons plus petits (2 à 4 μm de diamètre), avec un RSS moins développé. Ces boutons sont appelés Is (s pour small). Les JNM à boutons Is seraient responsables de la contraction phasique des muscles alors que les boutons de type Ib ont une activité tonique. Il existe d'autres types de terminaisons motoneuronales (type II et type III qui ne sont observées que sur quelques muscles et dont la fonction n'est pas encore élucidée) (Gramates and Budnik, 1999; Hoang and Chiba, 2001). Au cours de cette étude nous observerons essentiellement les boutons de type Ib. En général, les observations faites sont similaires pour les boutons Ib et Is, mais la plus grande taille des boutons Ib fait que leur analyse est toujours privilégiée car elle est plus informative.

1)-Croissance de la jonction neuromusculaire, une fois que le nerf a contacté le muscle :

Une fois que les motoneurones sont arrivés au contact de la cellule musculaire, et que le cône de croissance a formé des pré-varicosités (Yoshihara et al., 1997) L'axone forme une arborisation ramifiée contenant les varicosités synaptiques ou boutons synaptiques - il s'agit de synapses « en passant » - là où a lieu la libération du neurotransmetteur. Tout au long du développement larvaire, l'extension de la jonction neuromusculaire se traduit par une augmentation du nombre de boutons synaptiques. Concrètement, il faut que la synapse s'adapte à la taille croissante du muscle. Donc, plus le muscle grandit entre le premier et le troisième stade larvaire, plus il y a formation de nouveaux boutons synaptiques (Atwood et al., 1993; Schuster et al., 1996). La formation de nouveaux boutons se fait par deux types de processus. Le premier consiste en l'ajout de nouveaux boutons synaptiques intercalés entre

des boutons déjà existants. Le second a lieu à l'extrémité de la ramification où un nouveau bouton est ajouté à la suite du dernier bouton de la branche, appelé aussi bouton terminal. Le premier mode représenterait la procédure majeure d'addition de nouveaux boutons synaptiques (61% contre 39%, (Zito et al., 1999)). Par ailleurs, les boutons apparaissent soit suite à un bourgeonnement à partir d'un bouton déjà présent, soit c'est un bouton qui semble se « diviser » afin de donner une nouvelle varicosité, soit enfin, il y a formation d'un nouveau bouton à partir de la membrane axonale (Zito et al., 1999) (Figure 18).

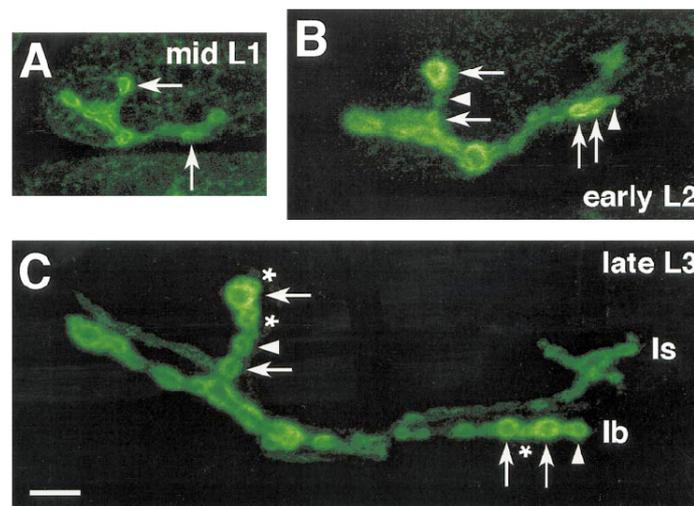


Figure 18 : La formation de nouveaux boutons synaptiques. (A, B et C) une même JNM au cours des 3 stades larvaires. Panneau A, au premier stade larvaire, la flèche verticale montre un bouton qui va se diviser. Ce bouton qui s'est divisé (2 flèches verticales) est retrouvé au deuxième stade larvaire (B). La pointe de flèche verticale montre qu'un nouveau bouton va bourgeonner. Panneau B, la pointe de flèche horizontale, représente un bouton qui s'intercale entre deux boutons (flèches horizontales). En fin de troisième stade larvaire, la branche horizontale comporte un nouveau bouton qui a bourgeonné (pointe de flèche verticale), ainsi qu'un autre qui est sur le point de s'intercaler (astérisque). Concernant la branche verticale, le bouton qui s'intercalait au stade précédent est maintenant complètement formé (pointe de flèche horizontale), deux nouveaux boutons sont en formation un s'intercale et l'autre se forme à l'extrémité de la branche (astérisques). Image de (Zito et al., 1999).

2)-Les microtubules dans la croissance de la jonction neuromusculaire

Lors d'un immunomarquage anti-tubuline au niveau de la jonction neuromusculaire, le faisceau de microtubule est visible dans la partie la plus centrale de la jonction. En effet, il court le long de la terminaison synaptique, il forme un faisceau dans les branches et traverse les boutons synaptiques.

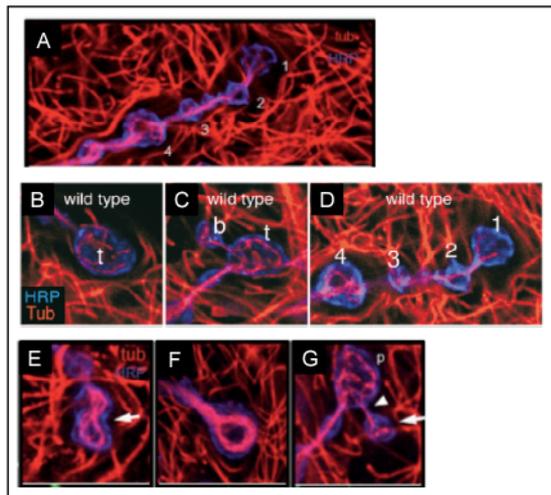


Figure 19 : Le cytosquelette microtubulaire à la JNM. (A-G) Marquage HRP (membrane du neurone, en bleu) et Tubuline (en rouge) de JNM. (A) Les microtubules traversent la JNM, jusqu'au dernier bouton ou bouton terminal (t sur B et C). Les microtubules sont plus fins dans ce dernier bouton (A, B, C et D bouton 1). Lors de la formation d'un nouveau boutons par bourgeonnement (b sur C), les microtubules plus fins viennent coloniser la varicosité en formation (C et G). Les microtubules peuvent former des boucles (D bouton 4, E et F) lieu de future formation de ramification. Images de (Ruiz-Canada et al., 2004; Ruiz-Canada and Budnik, 2006).

Cependant, dans certains boutons, le marquage semble un peu plus diffus autour de l'axe central, et même parfois il forme des filaments (plus fréquemment observés dans les boutons terminaux). Aucune étude *in vivo* de la dynamique des microtubules associée aux phénomènes de division et de bourgeonnement des varicosités n'a encore été faite au niveau de la JNM. Les observations sur tissus fixés montrent que le faisceau central de microtubules s'affine vers la partie distale de la JNM et les microtubules sont ramifiés au niveau du bouton terminal (où a lieu une partie de la croissance, par bourgeonnement) (Figure 19). De plus, il existe souvent des boucles de microtubules au niveau des boutons synaptiques qui sont des points de ramification de la JNM (départ de plusieurs branches) (Figure 19). Ces observations laissent à penser que le cytosquelette microtubulaire est remanié afin de former un nouveau bouton synaptique (Roos et al., 2000; Ruiz-Canada et al., 2004), mais les phénomènes exacts mis en jeu restent encore à être découverts.

3)-Les MAPs structurales de Drosophile

Chez la *Drosophile* il existe un représentant de chaque famille de MAPs structurales. En effet, Futsch est l'homologue des MAPs de Type I (Hummel et al., 2000). Pour les MAPs de Type II, il n'y a qu'un seul homologue, il s'agit de la protéine Tau (Heidary and Fortini, 2001).

a)-Futsch

Futsch est une MAP à part entière car elle est localisée au niveau du cytosquelette microtubulaire et elle s'associe aux microtubules *in vitro*. Elle est, aussi, nécessaire à la croissance des dendrites et de l'axone (Hummel et al., 2000). En outre, Futsch joue un rôle sur la stabilité des microtubules, car en contexte perte de fonction *futsch*, les faisceaux de microtubules apparaissent fragmentés au niveau des varicosités (Roos et al., 2000). En parallèle, l'immunoréactivité tubuline est anormalement localisée. Par ailleurs, en regardant finement la localisation de Futsch, il est remarquable que la protéine est présente en plus faible quantité dans les boutons terminaux, où les microtubules ne sont plus présents sous forme de faisceaux, mais sous forme de filaments dispersés. Dans ces boutons terminaux supposés être très dynamique, Futsch ne suit plus les fins faisceaux de microtubules présents (Ruiz-Canada et al., 2004). L'interprétation de cette situation est, que pour le bourgeonnement d'un nouveau bouton, un cytosquelette microtubulaire dynamique serait nécessaire et donc la présence de MAP stabilisatrice comme Futsch devient facultative (Roos et al., 2000; Ruiz-Canada et al., 2004). Au cours du « vieillissement » du bouton, l'association de Futsch aux microtubules devient nécessaire pour les stabiliser (Ruiz-Canada et al., 2004). Cette association de Futsch aux microtubules semble être sous la dépendance de l'aPKC (atypical Protein Kinase C) (Ruiz-Canada et al., 2004). Cependant, la phosphorylation directe de Futsch par cette kinase et l'implication sur la stabilité des microtubules n'a pas encore été mise en évidence. Mais, il serait possible que l'aPKC phosphoryle Futsch selon une phosphorylation de mode II (voir paragraphe sur la phosphorylation des MAPs), ce qui rendrait la protéine plus affine pour les microtubules et permettrait leur meilleure stabilisation par la MAP.

En termes de croissance, Futsch, en stabilisant les microtubules, permet une croissance correcte de la jonction neuromusculaire. C'est pourquoi, en contexte perte de fonction *futsch*, la synapse est moins développée ce qui se traduit par moins de boutons synaptiques (Roos et al., 2000).

b)-Tau

Chez la *Drosophila*, il existe un seul représentant de la famille des MAPs de Type II : il s'agit de la protéine Tau (Heidary and Fortini, 2001). Les auteurs ont montré que, dans l'embryon, la protéine est retrouvée dans le cerveau, dans la chaîne ventrale et dans le système nerveux périphérique. De plus, ils ont observé une colocalisation de Tau avec la

tubuline dans les photorécepteurs. Cette protéine Tau est capable de se lier aux microtubules *in vitro* (Doerflinger et al., 2003).

Concernant, le rôle de Tau à la jonction neuromusculaire, peu d'informations sont disponibles à l'heure actuelle. Ce qui a été décrit, c'est l'effet de la surexpression de la protéine Tau humaine dans les motoneurons. Il s'ensuit des défauts de transport axonal ainsi que des synapses moins développées accompagnées de localisations altérées de marqueurs des vésicules synaptiques (Chee et al., 2005; Chee et al., 2006). Plus récemment, les mêmes chercheurs ont montré que la surexpression de la protéine Tau de *Drosophila* conduisait aux mêmes phénotypes que la surexpression de la protéine humaine (Ubhi et al., 2007).

4)-Le rôle de la voie Wingless

Au niveau des boutons synaptiques de la jonction neuromusculaire, Wingless (Wg) est présent et sécrété par les varicosités. De même, son récepteur DFrizzled 2 (DFz2) est présent à la synapse (Packard et al., 2002). Les mêmes auteurs ont montré par ailleurs, qu'en contexte mutant pour *wg*, la jonction neuromusculaire était moins développée, que le nombre de boutons synaptiques était réduit. Comme c'est le cas dans un mutant *futsch* (Roos et al., 2000). En fait, la non activation de la voie Wg conduit à un défaut de croissance, ressemblant à une perte de la protéine Futsch au niveau des microtubules. Le cytosquelette est affecté, il est comme désagrégé ou très filamenteux. Le cytosquelette serait peu stabilisé et donc dans un état très dynamique, sans pour autant, permettre la croissance (Packard et al., 2002). Ce phénotype pourrait faire intervenir la GSK3 β /Shaggy (Sgg, chez la *Drosophila*). Cette kinase, en aval des facteurs Wnt, est capable de phosphoryler la MAP1B, diminuant ainsi l'interaction de la MAP stabilisatrice avec les microtubules (Lucas et al., 1998; Goold et al., 1999). De plus, chez la *Drosophila*, Sgg est capable de phosphoryler Futsch (Gogel et al., 2006).

Quant à la protéine Tau, il a été montré, à la jonction neuromusculaire, que la surexpression de la forme humaine de la protéine entraînait des défauts dans le transport axonal, dans la croissance et dans l'excitabilité des synapses. Ces défauts sont potentialisés en présence d'une forme constitutivement active de Sgg (Mudher et al., 2004).

Comme chez les mammifères, la GSK3 β de *Drosophila*, Sgg, est capable de jouer sur les MAPs et par conséquent sur les microtubules.

OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE ET
MOYENS MIS EN OEUVRE

Au laboratoire, nous nous intéressons aux mécanismes impliqués dans la formation des synapses. Notre modèle d'étude est la jonction neuromusculaire (JNM) de la larve de *Drosophila*. Cette synapse facile d'accès permet d'étudier les processus impliqués dans la croissance synaptique. Le fait de travailler avec la *Drosophila* présente un avantage majeur, qui est la grande collection de mutants disponibles et tous les outils génétiques comme le système Gal4-UAS (Brand and Perrimon, 1993) (Figure 20).

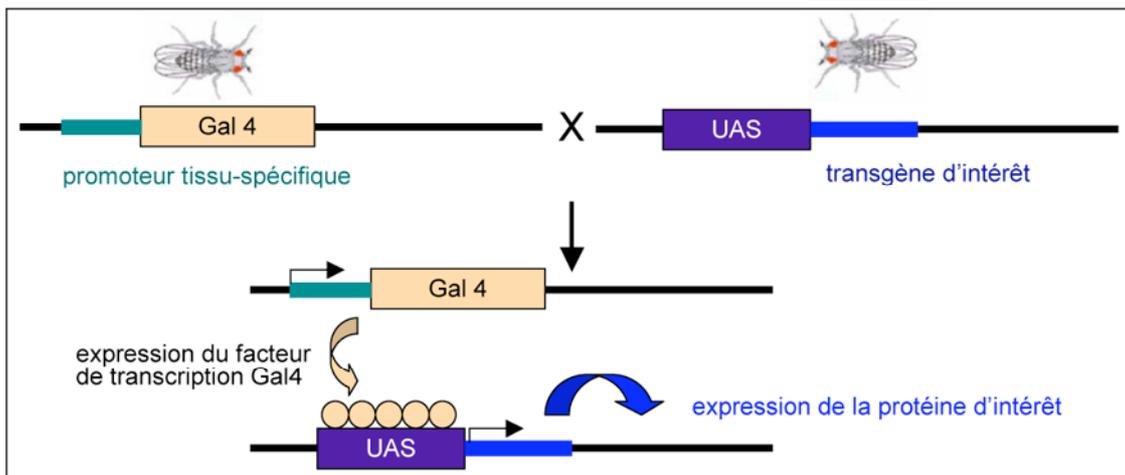


Figure 20 : Le système Gal4/UAS. Ce système binaire d'expression permet d'exprimer chez la *Drosophila*, un facteur de transcription Gal4 sous le contrôle d'un promoteur tissu-spécifique. Ce facteur de transcription va pouvoir ensuite activer des séquences cibles UAS en amont du gène d'intérêt. Il est alors possible d'exprimer dans un tissu donné un gène d'intérêt.

Ce système permet l'expression de transgène à un moment déterminé du développement et dans un tissu donné. En effet, il existe de nombreuses souches exprimant le facteur de transcription de levure Gal4 sous le contrôle d'un promoteur tissu spécifique. La présence de Gal4 est censée ne pas intervenir sur la physiologie de la *Drosophila*. Ces souches peuvent être croisées avec des souches qui ont dans leur génome un transgène silencieux fusionné à des séquences UAS (Upstream Activation Sequences) activables qu'en présence de Gal4. Ainsi, dans la descendance, les individus expriment le transgène d'intérêt dans un tissu déterminé.

Afin d'élucider les mécanismes mis en jeu lors de la formation des synapses, il faut connaître les molécules participant à ces processus. L'identification de nouveaux intervenants à la JNM a pu être réalisée grâce à un crible de lignées protein-trap. Ces lignées comportent dans leur génome, l'insertion d'un exon codant pour la GFP (Figure 21). Cet exon inséré dans

un intron et flanqué des séquences d'épissage est alors intégré dans le transcrit. La protéine endogène produite est fluorescente (Morin et al., 2001).

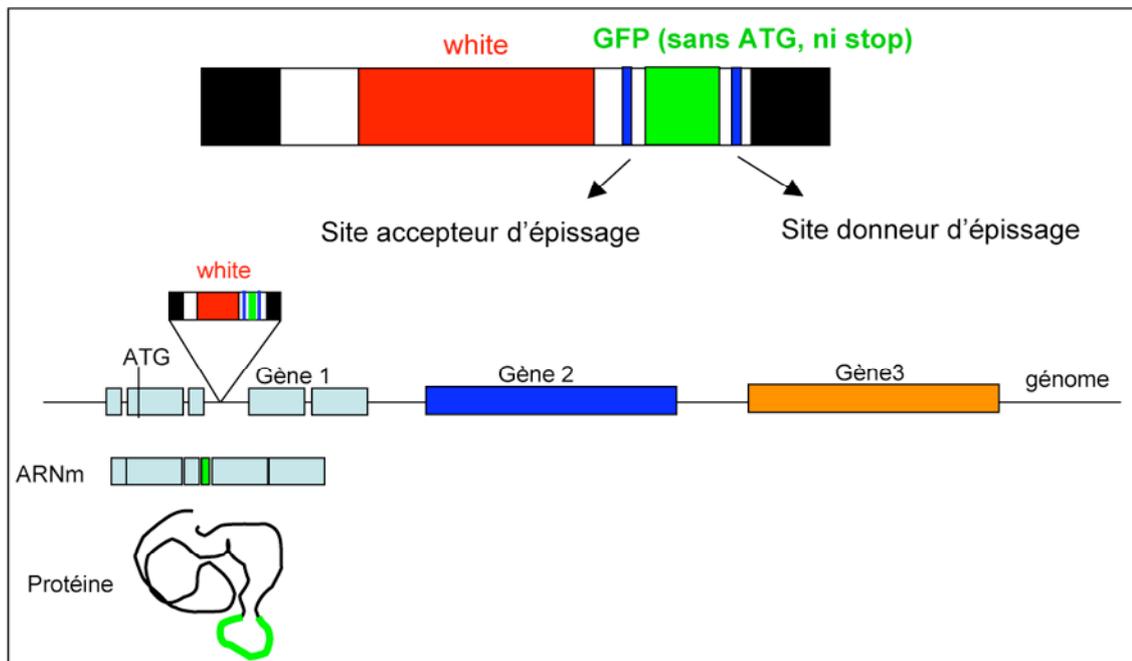


Figure 21 : Le protein-trap. Un transposon comportant un exon codant pour la GFP flanqué de sites d'épissage est inséré de manière aléatoire dans le génome. Lorsqu'il est inséré dans un intron d'un gène, il est ensuite incorporé dans l'ARNm et conduit ensuite à la production d'une protéine étiquetée GFP. La présence de la GFP n'est pas censée modifier le niveau d'expression, ni la localisation de la protéine.

Nous avons pu ainsi identifier la protéine Shaggy, dont nous avons étudié le rôle dans la croissance de la JNM. Cette kinase fait intervenir une MAP, Futsch. Par ailleurs, Shaggy est un des effecteur de la voie Wingless.

Avant de poursuivre plus avant dans les voies de signalisation pouvant intervenir dans la croissance de la JNM. Il est important de mieux comprendre son architecture et en particulier, le cytosquelette de microtubules. D'appréhender les remaniements subis par les microtubules lors de la croissance, le rôle des MAPs. Nous avons donc étudié le rôle des MAPs structurales sur la stabilité du cytosquelette microtubulaire et les conséquences sur la croissance de la JNM.

Enfin, la suite logique du travail était d'intégrer les modifications nécessaires à la croissance dans un mécanisme de signalisation. Sachant que Shaggy, membre de la voie

Wingless, intervient sur la croissance, toute la cascade est-elle nécessaire pour contrôler la croissance ? D'où provient le signal qui induit la croissance ?

RESULTATS

I)-Recherche de nouveaux acteurs de la croissance de la JNM

Le crible de lignées protein-trap, avait pour but d'identifier des protéines importantes dans la croissance et/ou le fonctionnement de la JNM. Concrètement, il s'agissait de regarder les JNM des différentes souches et de voir si certaines présentaient une fluorescence GFP. Une des lignées sélectionnée fut la lignée 105-1 (Figure 22), où on peut voir une fluorescence GFP dans l'axone du motoneurone (Figure 22, flèche) et dans les boutons synaptiques (Figure 22, pointes de flèche).

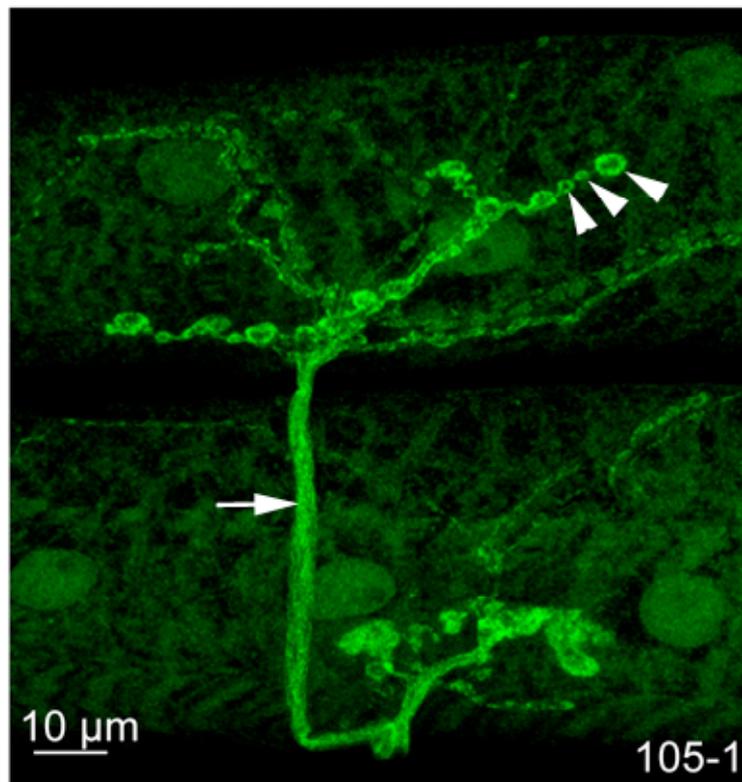


Figure 22 : JNM d'une larve de la lignée 105-1 sélectionnée lors du crible protein-trap. La JNM présente une forte fluorescence que ce soit dans l'axone du motoneurone (flèche) ou dans les boutons synaptiques (pointes de flèche). Par ailleurs, on peut distinguer un signal au niveau des stries du muscle et dans les noyaux.

Dans la lignée 105-1, l'insertion du transposon a eu lieu dans la gène codant pour la protéine Shaggy (Sgg). Cette protéine est l'homologue de la GSK3 de mammifères. La GSK3 (Glycogen Synthsae Kinase) est une kinase historiquement connue pour son rôle inhibiteur de la production de glycogène par phosphorylation de l'enzyme responsable de cette production, la glycogen synthase. Suite à une stimulation de la cellule par l'insuline, la GSK3 est inhibée

par phosphorylation, il s'ensuit une levée d'inhibition sur la glycogène synthase et donc la production de glycogène.

La GSK3 est aussi connue pour être inhibée suite à une stimulation de la cellule par les facteurs Wnt/Wingless. La cible de la kinase (la β -caténine/Armadillo) n'est plus dégradée et peut ainsi aller dans le noyau pour activer la transcription de gènes cibles en s'associant avec des facteurs de transcription.

Au niveau du système nerveux mammifère, la GSK3 est connue pour réguler l'interaction des protéines associées aux microtubules (les MAPs structurales, comme MAP1B et Tau). La phosphorylation de ces protéines entraîne une modification de leur affinité pour les microtubules, elles s'en détachent. Les microtubules, ainsi dépourvus de MAPs structurales, sont moins stables et ont tendance à se dépolymériser.

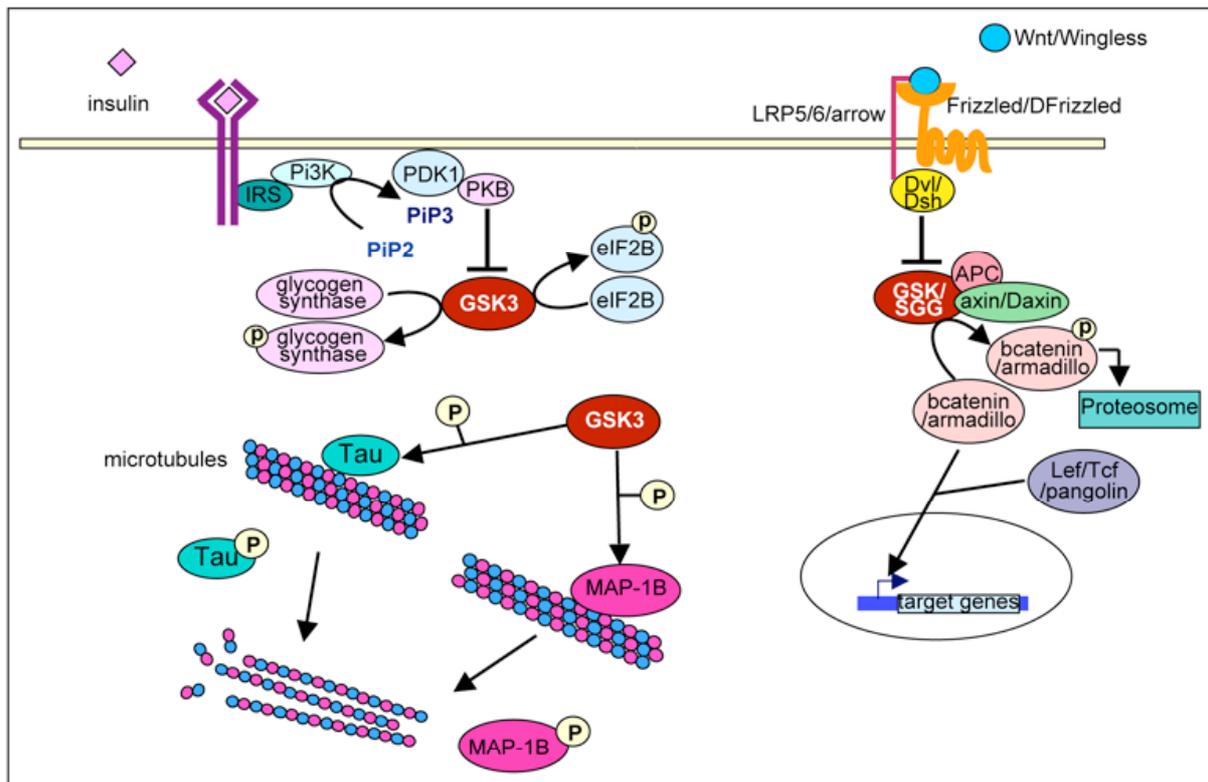


Figure 23 : Les voies de signalisation impliquant la GSK3. La GSK3 est normalement active dans une cellule, elle est alors très fréquemment inhibée suite à une activation de la cellule par l'insuline ou les facteurs Wnt/Wingless. Par ailleurs, dans le système nerveux des mammifères, elle est connue pour phosphoryler les MAPs structurales (comme MAP1B et Tau) ce qui entraîne leur dissociation des microtubules et une déstabilisation de ces-derniers. Chez la *Drosophile*, l'homologue de la GSK3 est Shaggy (Sgg).

Chez la *Drosophile*, l'homologue de la GSK3 est Shaggy. Shaggy est en aval dans la voie de signalisation Wingless, cette voie est importante au cours du développement

embryonnaire. Suite au crible des lignées protein-trap, nous avons pu voir que Shaggy était présente au niveau de la JNM. Où est-elle exactement localisée à la JNM ? Quel y est son rôle ? Joue-t-elle sur les MAPs structurales ?

Shaggy, the Homolog of Glycogen Synthase Kinase 3, Controls Neuromuscular Junction Growth in *Drosophila*

Bénédicte Franco,¹ Laurent Bogdanik,¹ Yves Bobinnec,² Alain Debec,² Joël Bockaert,¹ Marie-Laure Parmentier,¹ and Yves Grau¹

¹Laboratoire de Génomique Fonctionnelle, Unité Propre de Recherche Centre National de la Recherche Scientifique 2580, 34094 Montpellier Cedex 5, France, and ²Biology du Développement, Unité Mixte de Recherche 7009, Observatoire Océanologique, 06230 Villefranche sur Mer, France

A protein-trap screen using the *Drosophila* neuromuscular junction (NMJ) as a model synapse was performed to identify genes that control synaptic structure or plasticity. We found that Shaggy (*Sgg*), the *Drosophila* homolog of the mammalian glycogen synthase kinases 3 α and β , two serine–threonine kinases, was concentrated at this synapse. Using various combinations of mutant alleles of *shaggy*, we found that Shaggy negatively controlled the NMJ growth. Moreover, tissue-specific expression of a dominant-negative *Sgg* indicated that this kinase is required in the motoneuron, but not in the muscle, to control NMJ growth. Finally, we show that *Sgg* controlled the microtubule cytoskeleton dynamics in the motoneuron and that Futsch, a microtubule-associated protein, was required for Shaggy function on synaptic growth.

Key words: motoneuron; morphological plasticity; microtubule loop; microtubule-associated protein; glycogen synthase kinase; synaptic plasticity

Introduction

Once established, synaptic connections can be modified throughout animal life. Physiological tuning of synapses may be accompanied by morphological changes of these synapses. Such a synaptic plasticity is thought to be the cellular basis of information processing and storage in the brain (Muller et al., 2002).

To identify the molecular mechanisms controlling synaptic structure and plasticity, we undertook a genetic approach in *Drosophila melanogaster*, focusing on the larval neuromuscular junction (NMJ). This synapse is functional at the end of embryogenesis and is required for the contraction of the body-wall muscles, leading to larval hatching and larval locomotion. This synapse shares important features with central excitatory synapses of the mammalian brain: it is a glutamatergic synapse containing ionotropic glutamate receptors, the postsynaptic density protein Discs-Large (DLG; homologous to PSD-95) and other proteins also found in mammalian central synapses (Gramates and Budnik, 1999; Broadie and Richmond, 2002). Finally, the *Drosophila* NMJ is a dynamic structure with morphological plasticity that depends on its activity as well as on the size of the target muscles. For example, during larval development, there is a 10-fold in-

crease in the number of synaptic boutons in correlation with the growth of the target muscle (Schuster et al., 1996a). Furthermore, the hyperactive *eag Sh* mutants show a twofold increase in the number of boutons compared with wild-type larvae (Schuster et al., 1996b).

Protein kinases are responsible for the phosphorylation of proteins, a major post-translational modification involved in numerous signaling and regulation pathways. Protein kinases represent one of the largest families of proteins, all possessing a common catalytic core. There are >450 kinases in the human genome and ~255 kinases in the *Drosophila* genome. Many of these kinases play a role from early development onward, and mutants for the corresponding genes die during embryonic development. Thus, it is difficult to genetically screen for the role of such proteins in synaptic structure and plasticity at late stages of development when the synapses are established.

Here, we used a protein-trap screen (Morin et al., 2001) where a green fluorescent protein (GFP) exon is inserted within genes, leading to fusion fluorescent proteins. We selected a line where this exon is inserted in the *shaggy* (*sgg*) gene. Shaggy is the *Drosophila* homolog of mammalian glycogen synthase kinase (GSK) 3. We observed that *Sgg* is concentrated in the presynaptic side of the NMJ. Using a hypomorph mutation of *sgg*, we discovered that this kinase negatively controls NMJ growth. Motoneuron-specific expression of a dominant-negative isoform of *Sgg* revealed that this kinase is required presynaptically for this NMJ growth control. Finally, inhibition of *Sgg* leads to an increase in the number of microtubule loops, suggesting that part of the growth control of the NMJ by *Sgg* occurs via changes in the microtubule cytoskeleton dynamics. This is supported by epistasis experiments between *sgg* and *futsch*, a gene encoding a

Received Nov. 12, 2003; revised June 1, 2004; accepted June 1, 2004.

This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, and the French Ministry of Research and Technology. We thank V. Budnik, E. Buchner, G. Davis, P. Heitzler, C. Klämbt, C. O'Kane, C. Schuster, and D. Woods for providing fly stocks or antibodies. We thank M. Bourouis and V. Homburger for discussions and J.-P. Pin, F. Maschat, J.-M. Dura, and C. Mitri for critical reading of this manuscript.

Correspondence should be addressed to Marie-Laure Parmentier, Unité Propre de Recherche Centre National de la Recherche Scientifique 2580, 141 rue de la Cardonille 34094 Montpellier Cedex 5, France. E-mail: mlparmentier@cipe.cnrs.fr.

DOI:10.1523/JNEUROSCI.1580-04.2004

Copyright © 2004 Society for Neuroscience 0270-6474/04/246573-05\$15.00/0

microtubule-associated protein (MAP), showing that *futsch* is indeed downstream of *sgg*.

Materials and Methods

Fly stocks. The *sgg*^{K22} mutant and the *sgg* mini10 transgene were obtained from P. Heitzler (Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Illkirch, France). The *sgg* mini10 construct carries the cDNA sequence of the SGG10 isoform fused to genomic untranslated region sequences of *sgg* (Ruel et al., 1993). Upstream activating sequence (UAS)-*sgg*^{DN} stocks (on chromosomes 2 and 3) and deficiency *Df(1)64j4* were obtained from the Bloomington Stock Center (Bloomington, IN). We used the Gal4 drivers *elavC155* and myosin heavy chain (MHC)-Gal4 (C. Goodman, University of California, Berkeley, CA), BG380 (V. Budnik, University of Massachusetts Medical School, Worcester, MA), and OK6 (C. O'Kane, University of Cambridge, Cambridge, UK). We obtained stronger phenotypes with the chromosome 2 UAS-*sgg*^{DN} (see Fig. 3C) compared with chromosome 3 UAS-*sgg*^{DN} (see Fig. 4D). The *futsch*^{N94} and *futsch*^{K68} alleles were obtained from C. Klämbt (Universität of Münster, Münster, Germany) and G. Davis (University of California, San Francisco, CA). All stocks were reared at 25°C, except crosses with the UAS-*sgg*^{DN} that were reared at 29°C during larval stages and larvae used for Figure 4D. Wild-type flies were Canton S (CS) or *yw*^{CS}.

To perform epistasis experiments between *futsch* and *sgg*, we constructed a (OK6-Gal4; UAS-*sgg*^{DN})/SM5:TM6B stock, which was crossed with *futsch* mutant females to obtain *futsch*^{N94} or *futsch*^{K68/Y}; OK6/+; UAS-*sgg*^{DN}/+ larvae.

Immunocytochemistry and confocal microscopy. Wandering third instar larvae were dissected in 4% paraformaldehyde and 1× PBS. The following antibodies were used: mouse monoclonal anti-GSK-3β, raised against an epitope conserved in Sgg (1:100; Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY), guinea-pig anti-DLG (1:1000; D. Woods, University of California, Irvine, CA), mouse monoclonal anti-Synapsin (1:100; E. Buchner, Universität Würzburg, Würzburg, Germany), mouse monoclonal anti-cystein string protein (CSP) (1:10, K. Zinsmaier, University of Arizona, Tucson, AZ), mouse monoclonal anti-Futsch (22C10, 1:100) (Roos et al., 2000), and rabbit polyclonal anti-horse radish peroxidase (HRP) (1:1000; Sigma, St. Louis, MO). 22C10 was obtained from the Developmental Studies Hybridoma Bank (University of Iowa, Iowa City, IA). Fluorescent-conjugated antibodies were from Jackson ImmunoResearch (West Grove, PA) and Molecular Probes (Eugene, OR). Confocal images were acquired using a Bio-Rad (Hercules, CA) MRC 1024 laser-scanning confocal microscope (Centre Régional d'Imagerie Cellulaire, Montpellier, France).

Quantification. Synaptic boutons (only type Ib) on muscles 6/7 of the A3 segment were counted from HRP-stained preparations on a wide-field fluorescence microscope (Zeiss Axiophot; Zeiss, Thornwood, NY) at 100× magnification. A picture of the inner surface of muscle 6/7 was taken at 20× magnification to quantify the muscle area. The normalized bouton number was calculated by dividing bouton numbers by muscle surface area (Schuster et al., 1996a). Data were expressed as a percentage of the control of each experiment. We observed no major differences in muscle size between the genotypes. Hence, rough bouton number quantification yielded the same phenotypes as normalized bouton number. To correct for variations in total bouton number, we quantified the amount of satellite boutons as a percentage of the mean total bouton number for each genotype. Statistical analysis was performed using a two-tailed Student's *t* test.

Results

SGG is enriched in the presynaptic side at the NMJ

To visualize proteins concentrated at the NMJ, we took advantage of a GFP transposon-based screen, in which a GFP sequence engineered as an exon is randomly inserted in genes (Morin et al.,

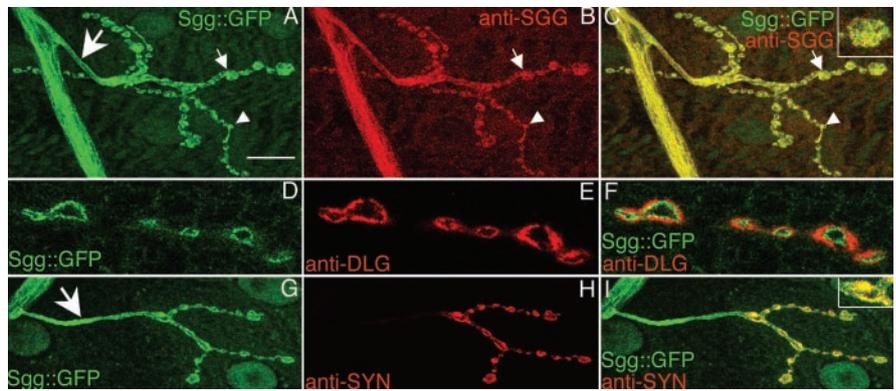


Figure 1. Synaptic localization of Sgg::GFP and Shaggy. GFP fluorescence (A, D, G) and anti-SGG (B), anti-DLG (E), and anti-Synapsin (SYN) (H) immunostainings on 105-1 protein trap line. All NMJs shown are located on muscle 4, but the same results could be observed on any other body-wall muscle. Color merges are shown (C, F, I), with higher magnification of one varicosity in C and I. Small arrows indicate type Ib boutons, and arrowheads indicate type Is boutons. Large arrows indicate the nerve branch. Scale bars: A–C, G–I, 20 μm; D–F, 10 μm.

2001). Insertions of the GFP exon in frame with an expressed gene were recovered by screening larvae for fluorescence. We selected lines that presented a clear fluorescence at the third instar larvae NMJs. In line 105-1, the GFP exon was inserted in the second intron of the *sgg* gene (position 8665 of scaffold AE003425.3), thus producing an Sgg::GFP fusion protein. We confirmed the in-frame insertion of the GFP sequence by 5' and 3' rapid amplification of cDNA ends experiments (data not shown). Null mutations of *sgg* are lethal at the embryonic stage or the first instar larval stage (Ruel et al., 1993). Here, the transgenic line was homozygous viable and fertile, suggesting that the Sgg::GFP fusion protein was functional. This transgenic line presented a clear fluorescence at the NMJs of all body-wall muscles. Both type Ib and Is synaptic boutons, which correspond to different glutamatergic motoneurons innervating the muscles, expressed Sgg::GFP (Fig. 1A). At the NMJ, all of the GFP signal overlapped with an anti-Sgg immunostaining, indicating that the GFP signal indeed corresponded to tagged Shaggy proteins (Fig. 1A–C). We obtained qualitatively the same anti-Sgg signal on wild-type CS flies, indicating that Sgg::GFP localization was the same as the wild-type Sgg localization (data not shown). Comparison of Sgg::GFP fluorescence with the postsynaptic marker DLG (Lahey et al., 1994) revealed that Sgg::GFP was not localized in the postsynaptic side but was presynaptic (Fig. 1D–F). We confirmed this presynaptic localization by observing that Sgg::GFP colocalized with the vesicle marker Synapsin (Klagges et al., 1996) (Fig. 1G–I). Moreover, we also detected some clear Sgg::GFP signal in axonal branches (Fig. 1A, G, arrows). Altogether, these results show that Sgg is enriched in the presynaptic side of the NMJ.

Mutation in *sgg* alters the growth of the NMJ

To examine *sgg* function during the development of the NMJ, we used the hypomorph mutation *sgg*^{K22}. This mutation is viable until the third instar larval stage. We did not detect any Sgg immunoreactivity at the NMJs of *sgg*^{K22} third instar larvae (Fig. 2A–D) nor any Sgg product on Western blot from third instar larva protein extracts (data not shown). In all of our experiments using *sgg* mutants, we chose crawling larvae, indicating that the NMJs were functional.

During larval development, there is constant adaptation of the NMJ size to the increase in muscle size. This includes an increase in the number and size of synaptic boutons as well as in the

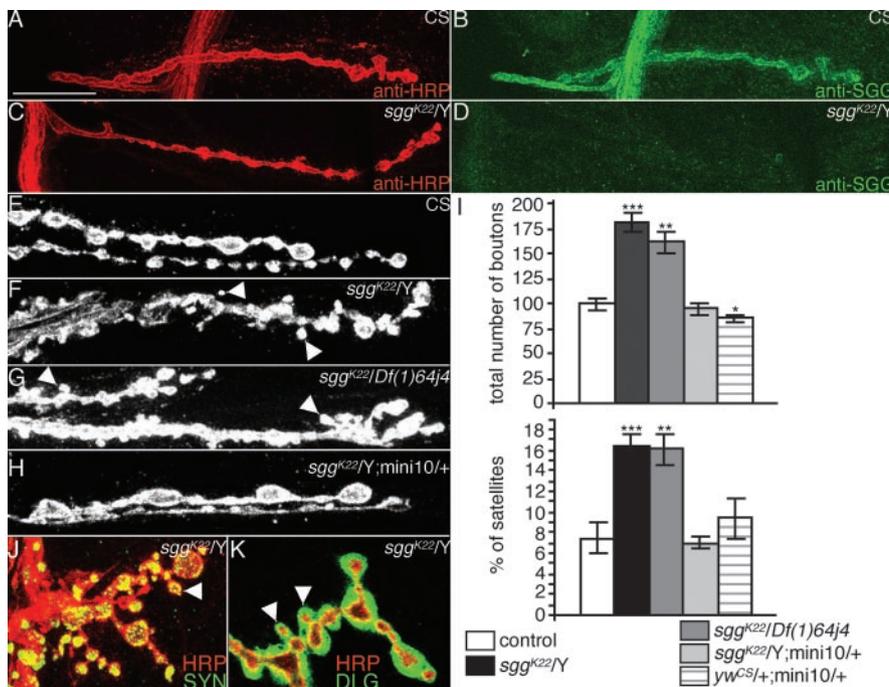


Figure 2. Morphological phenotype of *sgg* mutants. *A–D*, Anti-HRP (*A, C*) and anti-SGG (*B, D*) immunostainings on a CS male larva (*A, B*) or *sgg^{K22/Y}* larva (*C, D*). *E–H*, Illustration of the overgrowth phenotype in *sgg^{K22/Y}* (*F*) or *sgg^{K22/Df(1)64j4}* (*G*) mutant larvae. This phenotype is rescued to the wild-type range (*E*) by the addition of an *sgg* minigene (*mini10*) in the genome of *sgg^{K22}* mutants (*H*). The NMJs of muscle 6/7 are visualized with an anti-HRP staining. *I*, Quantification of the total number of Ib boutons and the percentage of satellite boutons at muscles 6/7 NMJs of CS male ($n = 12$), *sgg^{K22/Y}* ($n = 25$), *sgg^{K22/Df(1)64j4}* ($n = 29$), *sgg^{K22/Y;mini10/+}* ($n = 14$), and *yw^{CS/+;mini10/+}* ($n = 13$) larvae. Statistical comparisons to the CS control: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. *J*, Anti-SYN (green) and anti-HRP (red) double staining on an *sgg^{K22/Y}* muscle 13 NMJ. *K*, Anti-DLG (green) and anti-HRP (red) double staining on an *sgg^{K22/Y}* muscle 13 NMJ. In all images, arrowheads indicate satellite boutons. Scale bars: *A–D*, 20 μm ; *F–H*, 11 μm ; *J, K*, 14 μm .

number of active zones (Schuster et al., 1996a; Lnenicka and Keshishian, 2000). We examined synaptic morphology by labeling presynaptic terminals using anti-HRP, an insect neuronal marker. Analysis of NMJs in *sgg^{K22}* mutants showed that the loss of *sgg* function had clear consequences for the growth of the synapse. Indeed, NMJ expansion was dramatically increased, resulting in an 80% increase in the number of type Ib boutons on muscle 6/7 in *sgg^{K22}* mutant larvae compared with wild-type controls (Fig. 2*E–I*) (100.0 ± 5.8 for CS; 181.4 ± 9.7 for *sgg^{K22/Y}*). To ensure that this phenotype was caused by *shaggy* loss of function and not to a second site mutation, we used the deficiency *Df(1)64j4* known to delete the entire *sgg* gene (Ruel et al., 1993). *sgg^{K22/Df(1)64j4}* larvae also displayed a 60% increase in bouton number (161.9 ± 10.3). Interestingly, in both *sgg* loss-of-function genotypes, the increase in bouton number was accompanied by a twofold increase in the number of “satellite” boutons (Torroja et al., 1999) [7.4 ± 1.5 for CS; 16.5 ± 1.1 for *sgg^{K22/Y}*; 16.1 ± 1.5 for *sgg^{K22/Df(1)64j4}*] (i.e., boutons budding off from a bouton present in the axis of the branch, or boutons budding off from neuronal connections between two boutons) (Fig. 2*F–I*). Both phenotypes of *sgg^{K22}* mutant larvae were rescued to wild-type range by adding one copy of a wild-type *sgg* minigene (*mini10*) in the genome (94.9 ± 5.4 for type Ib boutons; 7.0 ± 0.6 for satellite boutons) (Fig. 2*H, I*). This demonstrates that these phenotypes were attributable to the loss of *shaggy* function.

Because *sgg* loss-of-function mutants displayed an overdeveloped NMJ, we would expect to observe the opposite phenotype in the presence of a gain of *sgg* function. We tested this hypothesis by quantifying the number of synaptic boutons in larvae possessing,

in addition to the wild-type *sgg* gene on the X chromosome, an additional autosomal copy of *sgg*. In these larvae, the total number of Ib boutons (85.0 ± 4.3) was decreased compared with the control larvae, whereas the percentage of satellite boutons (9.4 ± 1.9) was not significantly modified. These data show that a dose increase of *sgg* is sufficient to slightly shrink the NMJ.

To determine whether all boutons in *sgg* mutant synapses had normal features of synaptic boutons, we studied the localization of presynaptic and postsynaptic markers. Analysis of presynaptic synapsin (Fig. 2*J*) and CSP (data not shown) revealed that each bouton, and notably the satellite ones, was immunopositive for these markers. Similarly, we found that all boutons were surrounded by postsynaptic DLG immunoreactivity (Fig. 2*K*). Thus, the mutant boutons, showing a wild-type localization of some elements of the presynaptic and postsynaptic apparatus, are probably functional. Altogether, these results show that Sgg has an inhibitory role in expanding the NMJ but may not play an important role in bouton differentiation.

Presynaptic Sgg controls the NMJ growth

Anti-Sgg immunostaining as well as Sgg::GFP fluorescence were concentrated in the presynaptic side, suggesting a role of the presynaptic Sgg in the phenotypes de-

scribed above. To examine the function of presynaptic Sgg, we used a dominant-negative version of the Sgg10 isoform (Bourouis, 2002). The mutation introduced in the coding sequence is the substitution A81T leading to a “kinase-null” enzyme. We overexpressed this transgene (*sgg^{DN}*) under the control of different presynaptic (or postsynaptic) Gal4 drivers and quantified the bouton number. For presynaptic expression, we used the panneuronal *elav-Gal4* driver as well as the *BG380-Gal4* and *OK6-Gal4* drivers, which have patterns of expression more restricted to motoneurons. For postsynaptic expression, we used the *MHC-Gal4* driver, which drives expression in all body-wall muscles, as checked with *UAS-mCD8GFP* (data not shown). In all genotypes where *Sgg^{DN}* is expressed presynaptically, we observed a 50–100% increase in the number of synaptic boutons (Fig. 3*A–C*) (100.0 ± 5.5 for CS; 157.4 ± 6.4 for *BG380-Gal4*; 164.9 ± 9.8 for *elav-Gal4*; 212.8 ± 18.3 for *OK6-Gal4*). Interestingly, the number of boutons did not change when the dominant-negative construct was expressed postsynaptically (Fig. 3*C*) (92.6 ± 4.4 for *MHC-Gal4*). The results were similar when we considered the satellite boutons: presynaptic inhibition of Sgg led to a twofold to threefold increase in the percentage of satellite boutons (8.0 ± 0.9 for CS; 12.9 ± 1.3 for *BG380-Gal4*; 15.8 ± 1.5 for *elav-Gal4*; 20.2 ± 1.5 for *OK6-Gal4*), whereas postsynaptic inhibition of Sgg led to no changes (Fig. 3*C*) (7.5 ± 0.8 for *MHC-Gal4*).

Again, immunostainings against the presynaptic markers CSP, Synapsin, and the postsynaptic marker DLG revealed that all boutons were immunoreactive for these markers, suggesting that they are all functional (data not shown). Altogether, our

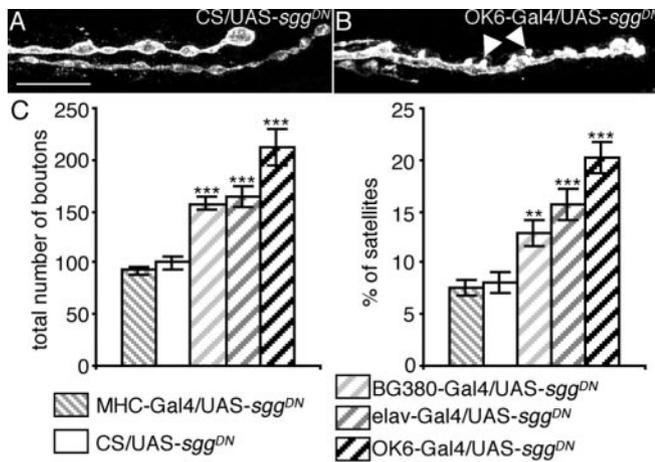


Figure 3. Overexpression of a dominant-negative Sgg with different Gal4 drivers. *A, B*, Illustration of the overgrowth phenotype when Sgg^{DN} is expressed presynaptically: anti-HRP staining of a muscle 6/7 NMJ of a control female larva (CS/UAS-*sgg*^{DN}) (*A*) or a female overexpressing Sgg^{DN} presynaptically (OK6-Gal4/UAS-*sgg*^{DN}) (*B*). Arrowheads indicate satellite boutons. Scale bar, 11 μ m. *C*, Quantification of the total bouton number and the percentage of satellite boutons of control and Sgg^{DN} overexpressing flies. $n = 25, 26, 18, 31,$ and 14 for crosses with CS, MHC-Gal4, BG380-Gal4, elav-Gal4, and OK6-Gal4, respectively. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

results show that presynaptic but not postsynaptic kinase activity of Sgg is required for normal synaptic growth.

Sgg controls the microtubule cytoskeleton dynamics

One feature of the Sgg inhibition phenotype was the increase in the percentage of satellite boutons. No such increase is found in other mutants displaying an NMJ overgrowth phenotype, like the *eag Sh* hyperactive mutants (Budnik et al., 1990; Torroja et al., 1999). Satellite boutons can be considered potential ramifications because they are not in line with the other boutons. Ramifications of the NMJ have recently been shown to occur when the microtubule cytoskeleton forms a loop within a bouton (Roos et al., 2000). We wondered whether the increase in satellite boutons observed in *sgg* loss-of-function conditions was related to modifications in the microtubule cytoskeleton dynamics. We therefore performed stainings directed against the *Drosophila* MAP1B homolog, Futsch, and quantified the number of microtubule loops when the dominant-negative form of Sgg was expressed in the motoneurons or in the muscle. There were effectively more loops when the percentage of satellite boutons increased in larvae expressing Sgg^{DN} presynaptically (Fig. 4*A–C*) (1.6 ± 0.2 for CS; 3.8 ± 0.6 for BG380-Gal4; 3.0 ± 0.3 for elav-Gal4; 5.5 ± 0.4 for OK6-Gal4). In larvae expressing Sgg^{DN} postsynaptically, the amount of microtubule loops (1.0 ± 0.3 for MHC-Gal4), like the percentage of satellite boutons, remained unchanged. In Figure 4*B*, we show that many loops were localized in satellite boutons (arrows). Altogether, these results show that Sgg controls the dynamics of the microtubule cytoskeleton, such that an inhibition of the kinase leads to an increase in the number of microtubule loops, which is possibly the cause of the increase in the amount of satellite boutons.

Futsch is downstream of Shaggy

To find out whether microtubule effectors are actually downstream of *shaggy*, we performed epistasis experiments. We used two *futsch* hypomorph loss-of-function mutations, *futsch*^{N94} and *futsch*^{K68}, which respectively display a partially or strongly disorganized microtubule cytoskeleton. Moreover, microtubule loop

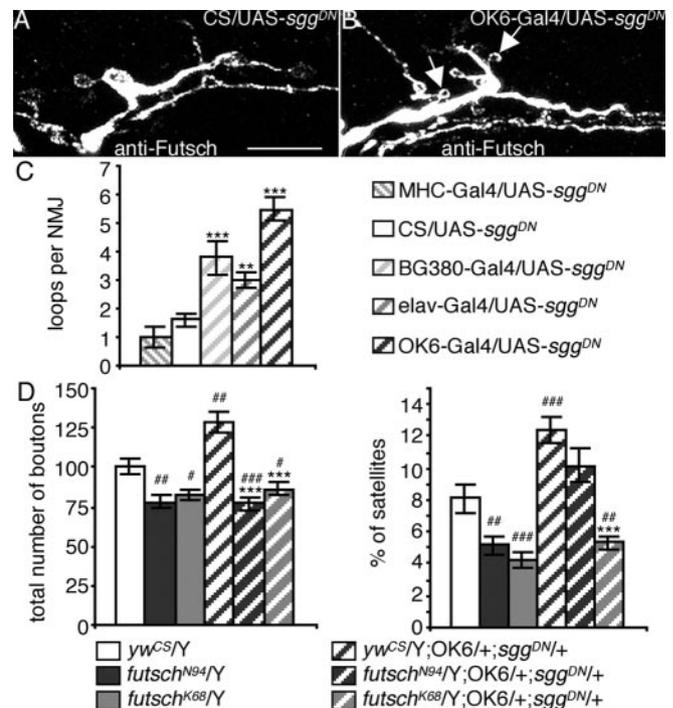


Figure 4. Effect of Sgg^{DN} overexpression on microtubule dynamics and genetic interaction with *futsch*. *A, B*, Illustration of the increase in the number of microtubule loops when Sgg^{DN} is expressed presynaptically: anti-Futsch staining of a muscle 13 NMJ on a control female larva (CS/UAS-*sgg*^{DN}) (*A*) or a female overexpressing Sgg^{DN} presynaptically (OK6-Gal4/UAS-*sgg*^{DN}) (*B*). Arrows indicate loops within satellite boutons. Scale bar, 10 μ m. *C*, Quantification of the number of microtubule loops in control larvae versus larvae expressing the Sgg^{DN} protein. $n = 15, 9, 9, 15,$ and 6 for UAS-*sgg*^{DN} crosses with CS, MHC-Gal4, BG380-Gal4, elav-Gal4, and OK6-Gal4. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. *D*, Genetic interaction between Sgg^{DN} expressed presynaptically and *futsch*^{N94} or *futsch*^{K68}. Quantification of boutons number and percentage of satellite boutons of larvae expressing Sgg^{DN} in the presynapse in a wild-type, *futsch*^{N94}, and *futsch*^{K68} genetic background. $n = 29$ for *yw*^{CS}/*Y*, 22 for *futsch*^{N94}/*Y* and *futsch*^{K68}/*Y*, 28 for *yw*^{CS}/*Y*;OK6/+; *sgg*^{DN}/+, 30 for *futsch*^{N94}/*Y*;OK6/+; *sgg*^{DN}/+, and 22 for *futsch*^{K68}/*Y*;OK6/+; *sgg*^{DN}/+. *** $p < 0.001$ for statistical significance versus *yw*^{CS}/*Y*; OK6/+; *sgg*^{DN}/+; # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$; ### $p < 0.001$ for statistical significance versus *yw*^{CS}/*Y*.

formation is absent in both mutants (Roos et al., 2000). We verified that the two *futsch* mutants displayed a 20% decreased number of synaptic boutons compared with CS larvae, as shown by Roos et al. (2000) (Fig. 4*D*) (100.0 ± 5.0 for *yw*^{CS}; 78.1 ± 4.6 for *futsch*^{N94}; 82.5 ± 3.9 for *futsch*^{K68}). We also detected a significant decrease in the percentage of satellite boutons in these mutants (Fig. 4*D*) (8.1 ± 0.9 for *yw*^{CS}; 5.2 ± 0.6 for *futsch*^{N94}; 4.2 ± 0.5 for *futsch*^{K68}). These phenotypes are opposite of those observed in *sgg* loss-of-function conditions. Hence, if the NMJ overgrowth observed in *sgg* mutants requires intact microtubule effectors, we should not see this phenotype when the microtubule cytoskeleton is affected. To test this hypothesis, we presynaptically overexpressed the dominant-negative form of Sgg in wild-type or *futsch* mutant background (see Materials and Methods). Although NMJs of larvae expressing Sgg^{DN} presynaptically in a wild-type background presented a 30% increase of bouton number (128.5 ± 6.8), NMJs of larvae expressing Sgg^{DN} in either *futsch*^{N94} or *futsch*^{K68} background did not display any increase in bouton number (76.7 ± 4.4 and 86.4 ± 3.8 , respectively) but displayed the *futsch* phenotype (Fig. 4*D*). The situation was similar when we looked at the satellite bouton phenotype (Fig. 4*D*). Larvae expressing Sgg^{DN} in the *futsch*^{K68} background displayed the *futsch*^{K68} phenotype (5.3 ± 0.3). Interestingly, the phenotype was intermediate in the *futsch*^{N94} background (10.2 ± 1.1). This

may be attributable to the remaining Futsch protein detected in these mutants. We also performed Futsch immunostaining of NMJs of *futsch^{N94}* larvae either expressing or not expressing the Sgg^{DN} transgene. In both cases, Futsch protein was diffusely localized in the synaptic boutons, indicating that the inhibition of Sgg does not affect the localization of this mutant Futsch protein (data not shown).

Altogether, our data demonstrate that the NMJ overgrowth observed when Sgg is inhibited presynaptically requires the microtubule-associated protein Futsch.

Discussion

The gene *sgg* is known to play an important role in embryo morphogenesis and cell fate determination (Ruel et al., 1993). Here, our screen let us find that the kinase encoded by this gene was highly concentrated at larval motoneuron terminals. This suggested a role for this protein in these differentiated neurons. In accordance with this hypothesis, we showed, using the mutant *sgg^{K22}* and a dominant-negative construct of Sgg, that this kinase negatively controlled the NMJ growth during the larval stages. These data are the first to reveal a role of this kinase in the growth of a differentiated and functional synapse. Using different presynaptic and postsynaptic markers, we could not detect any obvious defect in synapse differentiation. However, the *sgg^{K22}* allele is not a null allele. Thus, we cannot exclude that shaggy plays other roles than growth control at the NMJ.

The function of GSK-3 β in neuronal development, and notably in synapse differentiation had been studied previously on neuronal cultures using lithium chloride (LiCl) as a GSK-3 β inhibitor (Lucas and Salinas, 1997; Hall et al., 2000). These authors observed more synapsin-positive clusters along the axons in the presence of LiCl (Hall et al., 2000). This last observation was interpreted as an increase in accumulation of synapsin at the synapses (i.e., a modification in the differentiation of synapses). However, we can interpret this result as an increase in the number of synapses. This *in vitro* result would then be in accordance with our *in vivo* data at the *Drosophila* NMJ, where inhibition of Shaggy increases the number of synaptic boutons.

Targeted expression of Sgg^{DN} showed that the function of Shaggy on the growth of the NMJ was required presynaptically and that it requires the kinase function of Sgg. Some major presynaptic targets of GSK-3 β known in vertebrates are microtubule-associated proteins like tau, MAP1B, and MAP2 (Cohen and Frame, 2001). Here, we show that when we inhibit Shaggy in the motoneuron, there is an increase in the number of microtubule loops. This change in the dynamics of the microtubule skeleton suggests that some microtubule-associated proteins like the *Drosophila* tau homolog or the MAP1B homolog, Futsch, may also be substrates of Shaggy. Of interest, we could identify consensus sites for GSK-3 like phosphorylation [SXXX(ST)(PR)XXS] in the sequence of these proteins (96 for Futsch; 1 for tau) but do not have evidence yet that these proteins are phosphorylated by Shaggy. Recently, an effect of LiCl treatment was observed on axonal transport defects resulting from human Tau overexpression in *Drosophila* larvae, suggesting a functional interaction between Shaggy and Tau (Mudher et al., 2004). Here, we demonstrated that the protein Futsch was required for the overgrowth phenotype observed in *sgg* loss-of-function conditions.

How is the activity of Sgg controlled at the NMJ? The kinase Sgg is known to be inhibited in both the insulin and the WNT/

Wingless (Wg) signaling pathways (Cohen and Frame, 2001). There is little evidence of the presence of insulin-like peptides or insulin receptor-like proteins at the NMJ in *Drosophila* (Gorczyca et al., 1993). Wg has been shown to be released by larval motoneurons in *Drosophila* and to control the NMJ growth (Gramates and Budnik, 1999; Packard et al., 2002). The control of Sgg activity via different signaling pathways at the NMJ is still an open question.

References

- Bourouis M (2002) Targeted increase in shaggy activity levels blocks wingless signaling. *Genesis* 34:99–102.
- Broadie KS, Richmond JE (2002) Establishing and sculpting the synapse in *Drosophila* and *C. elegans*. *Curr Opin Neurobiol* 12:491–498.
- Budnik V, Zhong Y, Wu CF (1990) Morphological plasticity of motor axons in *Drosophila* mutants with altered excitability. *J Neurosci* 10:3754–3768.
- Cohen P, Frame S (2001) The renaissance of GSK3. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:769–776.
- Gorczyca M, Augart C, Budnik V (1993) Insulin-like receptor and insulin-like peptide are localized at neuromuscular junctions in *Drosophila*. *J Neurosci* 13:3692–3704.
- Gramates LS, Budnik V (1999) Assembly and maturation of the *Drosophila* larval neuromuscular junction. *Int Rev Neurobiol* 43:93–117.
- Hall AC, Lucas FR, Salinas PC (2000) Axonal remodeling and synaptic differentiation in the cerebellum is regulated by WNT-7a signaling. *Cell* 100:525–535.
- Klagges BR, Heimbeck G, Godenschwege TA, Hofbauer A, Pflugfelder GO, Reifegerste R, Reisch D, Schaupp M, Buchner S, Buchner E (1996) Invertebrate synapsins: a single gene codes for several isoforms in *Drosophila*. *J Neurosci* 16:3154–3165.
- Lahey T, Gorczyca M, Jia XX, Budnik V (1994) The *Drosophila* tumor suppressor gene *dlg* is required for normal synaptic bouton structure. *Neuron* 13:823–835.
- Lnenicka GA, Keshishian H (2000) Identified motor terminals in *Drosophila* larvae show distinct differences in morphology and physiology. *J Neurobiol* 43:186–197.
- Lucas FR, Salinas PC (1997) WNT-7a induces axonal remodeling and increases synapsin I levels in cerebellar neurons. *Dev Biol* 192:31–44.
- Morin X, Daneman R, Zavortink M, Chia W (2001) A protein trap strategy to detect GFP-tagged proteins expressed from their endogenous loci in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:15050–15055.
- Mudher A, Shepherd D, Newman TA, Mildren P, Jukes JP, Squire A, Mears A, Berg S, MacKay D, Asuni AA, Bhat R, Lovestone S (2004) GSK-3 β inhibition reverses axonal transport defects and behavioural phenotypes in *Drosophila*. *Mol Psychiatry* 9:522–530.
- Muller D, Nikonenko I, Jourdain P, Alberi S (2002) LTP, memory and structural plasticity. *Curr Mol Med* 2:605–611.
- Packard M, Koo ES, Gorczyca M, Sharpe J, Cumberledge S, Budnik V (2002) The *Drosophila* Wnt, wingless, provides an essential signal for pre- and postsynaptic differentiation. *Cell* 111:319–330.
- Roos J, Hummel T, Ng N, Klambt C, Davis GW (2000) *Drosophila* Futsch regulates synaptic microtubule organization and is necessary for synaptic growth. *Neuron* 26:371–382.
- Ruel L, Pantescio V, Lutz Y, Simpson P, Bourouis M (1993) Functional significance of a family of protein kinases encoded at the shaggy locus in *Drosophila*. *EMBO J* 12:1657–1669.
- Schuster CM, Davis GW, Fetter RD, Goodman CS (1996a) Genetic dissection of structural and functional components of synaptic plasticity. I. Fasciclin II controls synaptic stabilization and growth. *Neuron* 17:641–654.
- Schuster CM, Davis GW, Fetter RD, Goodman CS (1996b) Genetic dissection of structural and functional components of synaptic plasticity. II. Fasciclin II controls presynaptic structural plasticity. *Neuron* 17:655–667.
- Torroja L, Packard M, Gorczyca M, White K, Budnik V (1999) The *Drosophila* beta-amyloid precursor protein homolog promotes synapse differentiation at the neuromuscular junction. *J Neurosci* 19:7793–7803.

CONCLUSIONS

Dans ce travail, nous nous sommes donc intéressés à déterminer quels mécanismes pouvaient être impliqués dans la croissance de la jonction neuromusculaire (JNM) de *Drosophila*. Dans un premier temps, nous avons pu identifier un nouvel acteur de cette croissance, la kinase Shaggy. Cette kinase contrôle négativement la croissance de cette synapse. Afin de former de nouveaux boutons synaptiques, cette kinase doit être inhibée. Chez les mammifères, en culture de cellules, il avait été montré que l'inhibition de cette kinase (GSK3 β) par un agent pharmacologique, le chlorure de lithium, conduisait à la formation de nouvelles synapses. Cet effet est mimé, lorsque les cultures cellulaires sont traitées avec un facteur Wnt, Wnt7a (Lucas and Salinas, 1997; Hall et al., 2000). Les Wnt sont connus, pour inhiber GSK3 β . La voie de signalisation des Wnt semblerait réguler la formation de nouvelles synapses, via la GSK3 β /Shaggy. Par ailleurs, la formation des synapses sous stimulation par Wnt7a implique des remaniements du cytosquelette de microtubules. La GSK3 β est responsable de la phosphorylation de la MAP-1B, et par conséquent, responsable des modifications dans la dynamique des microtubules (Lucas et al., 1998; Goold et al., 1999).

De manière assez prévisible, les modifications de la croissance de la JNM que nous avons observées, lorsque Shaggy n'est pas fonctionnelle, font intervenir le cytosquelette de microtubules et Futsch, une des MAPs structurale identifiée chez la *Drosophila*. Nous mettons donc en évidence un rôle de Shaggy proche de celui de son homologue mammifère dans l'établissement de nouvelles synapses.

Nous nous sommes par la suite tournés vers l'étude de ces MAPs structurales. Chez les mammifères, les deux grandes familles de MAPs (famille des MAP1A/B/S et MAP2/Tau) sont connues pour être importantes dans le développement des neurites. La *Drosophila* présente l'avantage de n'avoir qu'un seul représentant de chaque famille codé par son génome, Futsch (pour les MAP1) et dTau (pour les MAP2/Tau). Ces protéines, toutes deux présentes au niveau du faisceau de microtubules axonaux, ne semblent pourtant pas jouer le même rôle. D'ailleurs, nous avons pu observer que dTau était aussi localisée de manière assez homogène dans les boutons synaptiques. Donc leurs localisations ne sont pas strictement identiques à la JNM de *Drosophila*. Par ailleurs, leurs fonctions ne sont pas, non plus, semblables. Futsch induit la croissance de la JNM, contrairement à Tau qui semble la restreindre. Cette action sur la croissance passe par des changements dans la conformation du réseau de microtubules, dans l'agencement des microtubules les uns par rapport aux autres.

Futsch permet d'espacer les microtubules, alors que Tau les resserre. Par ailleurs, chez les mammifères, ces protéines avaient été montrées comme agissant sur le cytosquelette de microtubules lors de la pousse neuritique (Dehmelt and Halpain, 2005; Halpain and Dehmelt, 2006). Cependant, peu de choses étaient connues concernant leur rôle au cours de la synaptogenèse. Nous montrons, que Futsch intervient dans la localisation correcte des vésicules synaptiques. Lorsque la MAP est absente, une partie des vésicules n'est plus correctement placée en périphérie de la varicosité. Ces défauts sont observés aussi sur le réseau d'actine filamenteuse. Nous n'avons pas pu mettre en évidence une interaction directe entre Futsch et l'actine, comme c'est le cas chez les mammifères. L'effet du défaut de localisation de l'actine filamenteuse et des vésicules pourrait être dû à un réseau de microtubules anormal en l'absence de Futsch. On pourrait imaginer que, lorsque Futsch n'est plus là, le faisceau de microtubules n'est pas conformé correctement et donc l'architecture de la varicosité en est affectée. Cependant, quelle protéine fait le lien entre les microtubules et les éléments du bouton ? Apparemment pas Futsch car la protéine n'est pas très présente dans les boutons synaptiques. Futsch pourrait interagir avec d'autres protéines présentes dans les varicosités et permettre la localisation correcte des constituants. Une protéine permettant de faire le lien entre microtubules et actine filamenteuse est la protéine Shortstop/Kakapo qui fait partie de la famille des Plakines. Ces protéines sont capables de relier les différents cytosquelettes présents dans la cellule (Leung et al., 2002). Les mutants de *shortstop/kakapo* ont des JNM réduites (Prokop et al., 1998). Futsch pourrait agir conjointement avec cette protéine afin de maintenir les cytosquelettes microtubulaire et d'actine corrects dans le bouton synaptique.

Nous avons montré que Futsch était importante pour la localisation correcte de la synapse associé à un effet sur la croissance. Nous nous sommes intéressés aux voies de signalisation pouvant réguler la croissance de la JNM en passant par les MAPs, et Futsch en particulier. La voie Wingless (Wg) semble être un bon candidat. Lorsque *wg* est muté, la JNM est moins développée (Packard et al., 2002). De même lorsque son récepteur DFz2 (DFz2) est absent la croissance est affectée, la JNM comporte moins de boutons synaptiques (Mathew et al., 2005). Nous avons confirmé ce dernier résultat, et nous avons montré que Dishevelled (Dsh), la protéine adaptatrice en aval semble aussi impliquée dans la croissance de cette synapse. Par ailleurs, nous avons montré que DFz2 contrôlait la croissance de manière autonome cellulaire, suggérant un mécanisme d'action autocrine de Wg sur la JNM. De manière plus globale, Wg pourrait contrôler la taille de la JNM en activant la voie de

signalisation canonique comprenant DFz2, Dsh et Shaggy. Ce contrôle fait, manifestement, intervenir les microtubules et la MAP Futsch. Lorsque nous avons voulu étudier le rôle présynaptique de Dsh, nous avons été surpris de l'effet de stabilisation sur les microtubules, indépendant de Futsch. Idéalement, nous nous attendions à ce que Dsh stabilise les microtubules mais certainement pas en délocalisant la MAP des microtubules. Cet effet de Dsh pourrait être direct ou faire appel à d'autres protéines membres aussi de la voie Wg comme la protéine APC. Sans Wg, APC est complexée avec l'Axine et Shaggy pour phosphoryler la β -caténine et provoquer ainsi sa dégradation via le protéasome. Un des mécanismes possibles d'action de Dsh dans l'inhibition de la kinase est l'interaction de Dsh avec l'Axine par leur domaine DIX, déstabilisant le complexe et libérant les partenaires (Cliffe et al., 2003). Parmi ces partenaires, APC est capable de se lier aux microtubules (Goldstein and Gunawardena, 2000; Mimori-Kiyosue et al., 2000b). APC pourrait être la protéine qui permet la stabilisation des microtubules après activation de Dsh. Son rôle à la JNM reste encore à être déterminé.

La simplicité génomique de la *Drosophila* en fait un outil de choix pour toute étude génétique. De nombreuses protéines sont conservées chez cet organisme. La JNM de *Drosophila* est donc un système simple pour étudier les mécanismes de la croissance axonale et de la mise en place des synapses. Cependant, il reste encore de nombreuses zones d'ombre avant d'élucider les processus de la pousse axonale et de l'établissement des synapses. Une des voies d'avenir serait de pouvoir étudier *in vivo* la dynamique du cytosquelette microtubulaire et des protéines associées. Pour cela, on peut étiqueter ces protéines avec des marqueurs fluorescents (GFP, RFP...) et utiliser des organismes transgéniques. Le problème à résoudre est la détection, sous microscope, de ces protéines à leur niveau endogène d'expression. En effet, nous savons que la surexpression, via des phénomènes de compétition ..., induit une distorsion de la «réalité biologique», d'où le challenge actuel en terme d'amélioration de l'intensité lumineuse émise par les étiquettes ou de capacité de détection de faible niveau de fluorescence des caméras.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Akhmanova A, Hoogenraad CC (2005) Microtubule plus-end-tracking proteins: mechanisms and functions. *Curr Opin Cell Biol* 17:47-54.
- Akhmanova A, Hoogenraad CC, Drabek K, Stepanova T, Dortland B, Verkerk T, Vermeulen W, Burgering BM, De Zeeuw CI, Grosveld F, Galjart N (2001) Clasps are CLIP-115 and -170 associating proteins involved in the regional regulation of microtubule dynamics in motile fibroblasts. *Cell* 104:923-935.
- Akong K, McCartney BM, Peifer M (2002) *Drosophila* APC2 and APC1 have overlapping roles in the larval brain despite their distinct intracellular localizations. *Dev Biol* 250:71-90.
- Atwood HL, Govind CK, Wu CF (1993) Differential ultrastructure of synaptic terminals on ventral longitudinal abdominal muscles in *Drosophila* larvae. *J Neurobiol* 24:1008-1024.
- Audebert S, Desbruyeres E, Gruszczynski C, Koulakoff A, Gros F, Denoulet P, Edde B (1993) Reversible polyglutamylation of alpha- and beta-tubulin and microtubule dynamics in mouse brain neurons. *Mol Biol Cell* 4:615-626.
- Avila J, Dominguez J, Diaz-Nido J (1994) Regulation of microtubule dynamics by microtubule-associated protein expression and phosphorylation during neuronal development. *Int J Dev Biol* 38:13-25.
- Baratier J, Peris L, Brocard J, Gory-Faure S, Dufour F, Bosc C, Fourest-Lieuvin A, Blanchoin L, Salin P, Job D, Andrieux A (2006) Phosphorylation of microtubule-associated protein STOP by calmodulin kinase II. *J Biol Chem* 281:19561-19569.
- Bernhardt R, Huber G, Matus A (1985) Differences in the developmental patterns of three microtubule-associated proteins in the rat cerebellum. *J Neurosci* 5:977-991.
- Biernat J, Wu YZ, Timm T, Zheng-Fischhofer Q, Mandelkow E, Meijer L, Mandelkow EM (2002) Protein kinase MARK/PAR-1 is required for neurite outgrowth and establishment of neuronal polarity. *Mol Biol Cell* 13:4013-4028.
- Binder LI, Frankfurter A, Rebhun LI (1985) The distribution of tau in the mammalian central nervous system. *J Cell Biol* 101:1371-1378.
- Bloom GS, Schoenfeld TA, Vallee RB (1984) Widespread distribution of the major polypeptide component of MAP 1 (microtubule-associated protein 1) in the nervous system. *J Cell Biol* 98:320-330.
- Bloom GS, Luca FC, Vallee RB (1985) Microtubule-associated protein 1B: identification of a major component of the neuronal cytoskeleton. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82:5404-5408.
- Bobinnec Y, Marcaillou C, Debec A (1999) Microtubule polyglutamylation in *Drosophila melanogaster* brain and testis. *Eur J Cell Biol* 78:671-674.
- Bonnet C, Boucher D, Lazereg S, Pedrotti B, Islam K, Denoulet P, Larcher JC (2001) Differential binding regulation of microtubule-associated proteins MAP1A, MAP1B, and MAP2 by tubulin polyglutamylation. *J Biol Chem* 276:12839-12848.
- Bosc C, Andrieux A, Job D (2003) STOP proteins. *Biochemistry* 42:12125-12132.
- Bosc C, Oenariet E, Andrieux A, Job D (1999) STOP proteins. *Cell Struct Funct* 24:393-399.
- Bosc C, Cronk JD, Pirolet F, Watterson DM, Haiech J, Job D, Margolis RL (1996) Cloning, expression, and properties of the microtubule-stabilizing protein STOP. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:2125-2130.
- Bosc C, Frank R, Denariet E, Ronjat M, Schweitzer A, Wehland J, Job D (2001) Identification of novel bifunctional calmodulin-binding and microtubule-stabilizing motifs in STOP proteins. *J Biol Chem* 276:30904-30913.
- Boutros M, Mihaly J, Bouwmeester T, Mlodzik M (2000) Signaling specificity by Frizzled receptors in *Drosophila*. *Science* 288:1825-1828.

- Brakeman JS, Gu SH, Wang XB, Dolin G, Baraban JM (1999) Neuronal localization of the Adenomatous polyposis coli tumor suppressor protein. *Neuroscience* 91:661-672.
- Brand AH, Perrimon N (1993) Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 118:401-415.
- Brandt R, Leger J, Lee G (1995) Interaction of tau with the neural plasma membrane mediated by tau's amino-terminal projection domain. *J Cell Biol* 131:1327-1340.
- Bray D, Chapman K (1985) Analysis of microspike movements on the neuronal growth cone. *J Neurosci* 5:3204-3213.
- Bu W, Su LK (2001) Regulation of microtubule assembly by human EB1 family proteins. *Oncogene* 20:3185-3192.
- Budnik V, Koh YH, Guan B, Hartmann B, Hough C, Woods D, Gorczyca M (1996) Regulation of synapse structure and function by the *Drosophila* tumor suppressor gene *dlg*. *Neuron* 17:627-640.
- Burridge K, Wennerberg K (2004) Rho and Rac take center stage. *Cell* 116:167-179.
- Butner KA, Kirschner MW (1991) Tau protein binds to microtubules through a flexible array of distributed weak sites. *J Cell Biol* 115:717-730.
- Caceres A, Payne MR, Binder LI, Steward O (1983) Immunocytochemical localization of actin and microtubule-associated protein MAP2 in dendritic spines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80:1738-1742.
- Caceres A, Binder LI, Payne MR, Bender P, Rebhun L, Steward O (1984) Differential subcellular localization of tubulin and the microtubule-associated protein MAP2 in brain tissue as revealed by immunocytochemistry with monoclonal hybridoma antibodies. *J Neurosci* 4:394-410.
- Cadigan KM, Nusse R (1997) Wnt signaling: a common theme in animal development. *Genes Dev* 11:3286-3305.
- Cadigan KM, Liu YI (2006) Wnt signaling: complexity at the surface. *J Cell Sci* 119:395-402.
- Carlier MF (1982) Guanosine-5'-triphosphate hydrolysis and tubulin polymerization. Review article. *Mol Cell Biochem* 47:97-113.
- Carlier MF, Simon C, Cassoly R, Pradel LA (1984) Interaction between microtubule-associated protein tau and spectrin. *Biochimie* 66:305-311.
- Chant J, Stowers L (1995) GTPase cascades choreographing cellular behavior: movement, morphogenesis, and more. *Cell* 81:1-4.
- Chee F, Mudher A, Newman TA, Cuttle M, Lovestone S, Shepherd D (2006) Overexpression of tau results in defective synaptic transmission in *Drosophila* neuromuscular junctions. *Biochem Soc Trans* 34:88-90.
- Chee FC, Mudher A, Cuttle MF, Newman TA, MacKay D, Lovestone S, Shepherd D (2005) Over-expression of tau results in defective synaptic transmission in *Drosophila* neuromuscular junctions. *Neurobiol Dis* 20:918-928.
- 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.
- Cliffe A, Hamada F, Bienz M (2003) A role of Dishevelled in relocating Axin to the plasma membrane during wingless signaling. *Curr Biol* 13:960-966.
- Correas I, Padilla R, Avila J (1990) The tubulin-binding sequence of brain microtubule-associated proteins, tau and MAP-2, is also involved in actin binding. *Biochem J* 269:61-64.
- Cravchik A, Reddy D, Matus A (1994) Identification of a novel microtubule-binding domain in microtubule-associated protein 1A (MAP1A). *J Cell Sci* 107 (Pt 3):661-672.
- Cunningham CC, Leclerc N, Flanagan LA, Lu M, Janmey PA, Kosik KS (1997) Microtubule-associated protein 2c reorganizes both microtubules and microfilaments into distinct

- cytological structures in an actin-binding protein-280-deficient melanoma cell line. *J Cell Biol* 136:845-857.
- De Zeeuw CI, Hoogenraad CC, Goedknecht E, Hertzberg E, Neubauer A, Grosveld F, Galjart N (1997) CLIP-115, a novel brain-specific cytoplasmic linker protein, mediates the localization of dendritic lamellar bodies. *Neuron* 19:1187-1199.
- Dehmelt L, Halpain S (2005) The MAP2/Tau family of microtubule-associated proteins. *Genome Biol* 6:204.
- Denk F, Wade-Martins R (2007) Knock-out and transgenic mouse models of tauopathies. *Neurobiol Aging*.
- Dent EW, Kalil K (2001) Axon branching requires interactions between dynamic microtubules and actin filaments. *J Neurosci* 21:9757-9769.
- Dent EW, Gertler FB (2003) Cytoskeletal dynamics and transport in growth cone motility and axon guidance. *Neuron* 40:209-227.
- Dent EW, Callaway JL, Szebenyi G, Baas PW, Kalil K (1999) Reorganization and movement of microtubules in axonal growth cones and developing interstitial branches. *J Neurosci* 19:8894-8908.
- Doerflinger H, Benton R, Shulman JM, St Johnston D (2003) The role of PAR-1 in regulating the polarised microtubule cytoskeleton in the *Drosophila* follicular epithelium. *Development* 130:3965-3975.
- 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.
- Drewes G, Ebner A, Preuss U, Mandelkow EM, Mandelkow E (1997) MARK, a novel family of protein kinases that phosphorylate microtubule-associated proteins and trigger microtubule disruption. *Cell* 89:297-308.
- Drubin DG, Kirschner MW (1986) Tau protein function in living cells. *J Cell Biol* 103:2739-2746.
- Edde B, Rossier J, Le Caer JP, Desbruyeres E, Gros F, Denoulet P (1990) Posttranslational glutamylation of alpha-tubulin. *Science* 247:83-85.
- Elhanany E, Jaffe H, Link WT, Sheeley DM, Gainer H, Pant HC (1994) Identification of endogenously phosphorylated KSP sites in the high-molecular-weight rat neurofilament protein. *J Neurochem* 63:2324-2335.
- Elliott SL, Cullen CF, Wrobel N, Kernan MJ, Ohkura H (2005) EB1 is essential during *Drosophila* development and plays a crucial role in the integrity of chordotonal mechanosensory organs. *Mol Biol Cell* 16:891-901.
- Ennulat DJ, Liem RK, Hashim GA, Shelanski ML (1989) Two separate 18-amino acid domains of tau promote the polymerization of tubulin. *J Biol Chem* 264:5327-5330.
- Erickson HP, O'Brien ET (1992) Microtubule dynamic instability and GTP hydrolysis. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 21:145-166.
- Etienne-Manneville S, Hall A (2003) Cdc42 regulates GSK-3beta and adenomatous polyposis coli to control cell polarity. *Nature* 421:753-756.
- Forscher P, Smith SJ (1988) Actions of cytochalasins on the organization of actin filaments and microtubules in a neuronal growth cone. *J Cell Biol* 107:1505-1516.
- Fourest-Lieuvin A, Peris L, Gache V, Garcia-Saez I, Juillan-Binard C, Lantéz V, Job D (2006) Microtubule regulation in mitosis: tubulin phosphorylation by the cyclin-dependent kinase Cdk1. *Mol Biol Cell* 17:1041-1050.
- Fulga TA, Elson-Schwab I, Khurana V, Steinhilb ML, Spires TL, Hyman BT, Feany MB (2007) Abnormal bundling and accumulation of F-actin mediates tau-induced neuronal degeneration in vivo. *Nat Cell Biol* 9:139-148.

- Fyrberg EA, Goldstein LS (1990) The *Drosophila* cytoskeleton. *Annu Rev Cell Biol* 6:559-596.
- Galjart N (2005) CLIPs and CLASPs and cellular dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:487-498.
- Garcia Rocha M, Avila J (1995) Characterization of microtubule-associated protein phosphoisoforms present in isolated growth cones. *Brain Res Dev Brain Res* 89:47-55.
- Garner CC, Matus A (1988) Different forms of microtubule-associated protein 2 are encoded by separate mRNA transcripts. *J Cell Biol* 106:779-783.
- Georgieff IS, Liem RK, Couchie D, Mavilia C, Nunez J, Shelanski ML (1993) Expression of high molecular weight tau in the central and peripheral nervous systems. *J Cell Sci* 105 (Pt 3):729-737.
- Gogel S, Wakefield S, Tear G, Klambt C, Gordon-Weeks PR (2006) The *Drosophila* microtubule associated protein Futsch is phosphorylated by Shaggy/Zeste-white 3 at an homologous GSK3beta phosphorylation site in MAP1B. *Mol Cell Neurosci* 33:188-199.
- Goldberg DJ, Burmeister DW (1986) Stages in axon formation: observations of growth of *Aplysia* axons in culture using video-enhanced contrast-differential interference contrast microscopy. *J Cell Biol* 103:1921-1931.
- Goldstein LS, Gunawardena S (2000) Flying through the *drosophila* cytoskeletal genome. *J Cell Biol* 150:F63-68.
- Goldstein LS, Yang Z (2000) Microtubule-based transport systems in neurons: the roles of kinesins and dyneins. *Annu Rev Neurosci* 23:39-71.
- Goode BL, Chau M, Denis PE, Feinstein SC (2000) 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.
- Goold RG, Owen R, Gordon-Weeks PR (1999) Glycogen synthase kinase 3beta phosphorylation of microtubule-associated protein 1B regulates the stability of microtubules in growth cones. *J Cell Sci* 112 (Pt 19):3373-3384.
- Gordon-Weeks PR (1991) Control of microtubule assembly in growth cones. *J Cell Sci Suppl* 15:45-49.
- Gordon-Weeks PR (2004) Microtubules and growth cone function. *J Neurobiol* 58:70-83.
- Gordon-Weeks PR, Mansfield SG, Alberto C, Johnstone M, Moya F (1993) A phosphorylation epitope on MAP 1B that is transiently expressed in growing axons in the developing rat nervous system. *Eur J Neurosci* 5:1302-1311.
- Gramates LS, Budnik V (1999) Assembly and maturation of the *Drosophila* larval neuromuscular junction. *Int Rev Neurobiol* 43:93-117.
- Griffith LM, Pollard TD (1978) Evidence for actin filament-microtubule interaction mediated by microtubule-associated proteins. *J Cell Biol* 78:958-965.
- Griffith LM, Pollard TD (1982) The interaction of actin filaments with microtubules and microtubule-associated proteins. *J Biol Chem* 257:9143-9151.
- Guillaud L, Bosc C, Fourest-Lieuvin A, Denarier E, Pirolet F, Lafanechere L, Job D (1998) STOP proteins are responsible for the high degree of microtubule stabilization observed in neuronal cells. *J Cell Biol* 142:167-179.
- Hafezparast M, Klocke R, Ruhrberg C, Marquardt A, Ahmad-Annur A, Bowen S, Lalli G, Witherden AS, Hummerich H, Nicholson S, Morgan PJ, Oozageer R, Priestley JV, Averill S, King VR, Ball S, Peters J, Toda T, Yamamoto A, Hiraoka Y, Augustin M, Korthaus D, Wattler S, Wabnitz P, Dickneite C, Lampel S, Boehme F, Peraus G, Popp A, Rudelius M, Schlegel J, Fuchs H, Hrabe de Angelis M, Schiavo G, Shima DT, Russ AP, Stumm G, Martin JE, Fisher EM (2003) Mutations in dynein link motor neuron degeneration to defects in retrograde transport. *Science* 300:808-812.

- Hall A (1998) Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* 279:509-514.
- Hall AC, Lucas FR, Salinas PC (2000) Axonal remodeling and synaptic differentiation in the cerebellum is regulated by WNT-7a signaling. *Cell* 100:525-535.
- Halpain S, Dehmelt L (2006) The MAP1 family of microtubule-associated proteins. *Genome Biol* 7:224.
- Hammarback JA, Obar RA, Hughes SM, Vallee RB (1991) MAP1B is encoded as a polyprotein that is processed to form a complex N-terminal microtubule-binding domain. *Neuron* 7:129-139.
- Hanger DP, Hughes K, Woodgett JR, Brion JP, Anderton BH (1992) Glycogen synthase kinase-3 induces Alzheimer's disease-like phosphorylation of tau: generation of paired helical filament epitopes and neuronal localisation of the kinase. *Neurosci Lett* 147:58-62.
- Heidary G, Fortini ME (2001) Identification and characterization of the *Drosophila* tau homolog. *Mech Dev* 108:171-178.
- Heidemann SR, Lamoureux P, Buxbaum RE (1990) Growth cone behavior and production of traction force. *J Cell Biol* 111:1949-1957.
- Himmler A (1989) Structure of the bovine tau gene: alternatively spliced transcripts generate a protein family. *Mol Cell Biol* 9:1389-1396.
- Himmler A, Drechsel D, Kirschner MW, Martin DW, Jr. (1989) Tau consists of a set of proteins with repeated C-terminal microtubule-binding domains and variable N-terminal domains. *Mol Cell Biol* 9:1381-1388.
- Hirokawa N (1998) Kinesin and dynein superfamily proteins and the mechanism of organelle transport. *Science* 279:519-526.
- Hirokawa N, Sato-Yoshitake R, Yoshida T, Kawashima T (1990) Brain dynein (MAP1C) localizes on both anterogradely and retrogradely transported membranous organelles in vivo. *J Cell Biol* 111:1027-1037.
- Hirokawa N, Sato-Yoshitake R, Kobayashi N, Pfister KK, Bloom GS, Brady ST (1991) Kinesin associates with anterogradely transported membranous organelles in vivo. *J Cell Biol* 114:295-302.
- Hoang B, Chiba A (2001) Single-cell analysis of *Drosophila* larval neuromuscular synapses. *Dev Biol* 229:55-70.
- Hoogenraad CC, Akhmanova A, Grosveld F, De Zeeuw CI, Galjart N (2000) Functional analysis of CLIP-115 and its binding to microtubules. *J Cell Sci* 113 (Pt 12):2285-2297.
- Hummel T, Krukkert K, Roos J, Davis G, Klambt C (2000) *Drosophila* Futsch/22C10 is a MAP1B-like protein required for dendritic and axonal development. *Neuron* 26:357-370.
- Illenberger S, Drewes G, Trinczek B, Biernat J, Meyer HE, Olmsted JB, Mandelkow EM, Mandelkow E (1996) Phosphorylation of microtubule-associated proteins MAP2 and MAP4 by the protein kinase p110mark. Phosphorylation sites and regulation of microtubule dynamics. *J Biol Chem* 271:10834-10843.
- Jan LY, Jan YN (1976) L-glutamate as an excitatory transmitter at the *Drosophila* larval neuromuscular junction. *J Physiol* 262:215-236.
- Job D, Valiron O, Oakley B (2003) Microtubule nucleation. *Curr Opin Cell Biol* 15:111-117.
- Johnstone M, Gould RG, Bei D, Fischer I, Gordon-Weeks PR (1997) Localisation of microtubule-associated protein 1B phosphorylation sites recognised by monoclonal antibody SMI-31. *J Neurochem* 69:1417-1424.
- Kaech S, Ludin B, Matus A (1996) Cytoskeletal plasticity in cells expressing neuronal microtubule-associated proteins. *Neuron* 17:1189-1199.
- Khaitlina SY (2001) Functional specificity of actin isoforms. *Int Rev Cytol* 202:35-98.

- Khawaja S, Gundersen GG, Bulinski JC (1988) Enhanced stability of microtubules enriched in detyrosinated tubulin is not a direct function of detyrosination level. *J Cell Biol* 106:141-149.
- Kirschner MW, Williams RC, Weingarten M, Gerhart JC (1974) Microtubules from mammalian brain: some properties of their depolymerization products and a proposed mechanism of assembly and disassembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* 71:1159-1163.
- Lafanechere L, Job D (2000) The third tubulin pool. *Neurochem Res* 25:11-18.
- Lantz VA, Miller KG (1998) A class VI unconventional myosin is associated with a homologue of a microtubule-binding protein, cytoplasmic linker protein-170, in neurons and at the posterior pole of *Drosophila* embryos. *J Cell Biol* 140:897-910.
- Larcher JC, Boucher D, Lazereg S, Gros F, Denoulet P (1996) Interaction of kinesin motor domains with alpha- and beta-tubulin subunits at a tau-independent binding site. Regulation by polyglutamylation. *J Biol Chem* 271:22117-22124.
- Lee H, Engel U, Rusch J, Scherrer S, Sheard K, Van Vactor D (2004) The microtubule plus end tracking protein Orbit/MAST/CLASP acts downstream of the tyrosine kinase Abl in mediating axon guidance. *Neuron* 42:913-926.
- Lee MK, Xu Z, Wong PC, Cleveland DW (1993) Neurofilaments are obligate heteropolymers in vivo. *J Cell Biol* 122:1337-1350.
- Leung CL, Liem RK (1996) Characterization of interactions between the neurofilament triplet proteins by the yeast two-hybrid system. *J Biol Chem* 271:14041-14044.
- Leung CL, Green KJ, Liem RK (2002) Plakins: a family of versatile cytolinker proteins. *Trends Cell Biol* 12:37-45.
- Lewis AK, Bridgman PC (1992) Nerve growth cone lamellipodia contain two populations of actin filaments that differ in organization and polarity. *J Cell Biol* 119:1219-1243.
- Lewis SA, Wang DH, Cowan NJ (1988) Microtubule-associated protein MAP2 shares a microtubule binding motif with tau protein. *Science* 242:936-939.
- Liem RK, Hutchison SB (1982) Purification of individual components of the neurofilament triplet: filament assembly from the 70 000-dalton subunit. *Biochemistry* 21:3221-3226.
- Lim SS, Sammak PJ, Borisy GG (1989) Progressive and spatially differentiated stability of microtubules in developing neuronal cells. *J Cell Biol* 109:253-263.
- Lin CH, Forscher P (1993) Cytoskeletal remodeling during growth cone-target interactions. *J Cell Biol* 121:1369-1383.
- Littleton JT, Ganetzky B (2000) Ion channels and synaptic organization: analysis of the *Drosophila* genome. *Neuron* 26:35-43.
- Liu Q, Xie F, Siedlak SL, Nunomura A, Honda K, Moreira PI, Zhua X, Smith MA, Perry G (2004) Neurofilament proteins in neurodegenerative diseases. *Cell Mol Life Sci* 61:3057-3075.
- Lu B, Roegiers F, Jan LY, Jan YN (2001) Adherens junctions inhibit asymmetric division in the *Drosophila* epithelium. *Nature* 409:522-525.
- Lucas FR, Salinas PC (1997) WNT-7a induces axonal remodeling and increases synapsin I levels in cerebellar neurons. *Dev Biol* 192:31-44.
- Lucas FR, Goold RG, Gordon-Weeks PR, Salinas PC (1998) Inhibition of GSK-3beta leading to the loss of phosphorylated MAP-1B is an early event in axonal remodeling induced by WNT-7a or lithium. *J Cell Sci* 111 (Pt 10):1351-1361.
- Luo L, Liao YJ, Jan LY, Jan YN (1994) Distinct morphogenetic functions of similar small GTPases: *Drosophila* Drac1 is involved in axonal outgrowth and myoblast fusion. *Genes Dev* 8:1787-1802.
- Mackay DJ, Nobes CD, Hall A (1995) The Rho's progress: a potential role during neuriteogenesis for the Rho family of GTPases. *Trends Neurosci* 18:496-501.

- Mallik R, Gross SP (2004) Molecular motors: strategies to get along. *Curr Biol* 14:R971-982.
- Mansfield SG, Diaz-Nido J, Gordon-Weeks PR, Avila J (1991) The distribution and phosphorylation of the microtubule-associated protein MAP 1B in growth cones. *J Neurocytol* 20:1007-1022.
- Mathew D, Ataman B, Chen J, Zhang Y, Cumberledge S, Budnik V (2005) Wingless signaling at synapses is through cleavage and nuclear import of receptor DFrizzled2. *Science* 310:1344-1347.
- Matus A (1988) Microtubule-associated proteins: their potential role in determining neuronal morphology. *Annu Rev Neurosci* 11:29-44.
- Mimori-Kiyosue Y, Shiina N, Tsukita S (2000a) The dynamic behavior of the APC-binding protein EB1 on the distal ends of microtubules. *Curr Biol* 10:865-868.
- Mimori-Kiyosue Y, Shiina N, Tsukita S (2000b) Adenomatous polyposis coli (APC) protein moves along microtubules and concentrates at their growing ends in epithelial cells. *J Cell Biol* 148:505-518.
- Mitchison T, Kirschner M (1984) Dynamic instability of microtubule growth. *Nature* 312:237-242.
- Mogensen MM, Tucker JB, Mackie JB, Prescott AR, Nathke IS (2002) The adenomatous polyposis coli protein unambiguously localizes to microtubule plus ends and is involved in establishing parallel arrays of microtubule bundles in highly polarized epithelial cells. *J Cell Biol* 157:1041-1048.
- Morin X, Daneman R, Zavortink M, Chia W (2001) A protein trap strategy to detect GFP-tagged proteins expressed from their endogenous loci in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:15050-15055.
- Morrison EE, Moncur PM, Askham JM (2002) EB1 identifies sites of microtubule polymerisation during neurite development. *Brain Res Mol Brain Res* 98:145-152.
- Morrison EE, Askham JM, Clissold P, Markham AF, Meredith DM (1997a) The cellular distribution of the adenomatous polyposis coli tumour suppressor protein in neuroblastoma cells is regulated by microtubule dynamics. *Neuroscience* 81:553-563.
- Morrison EE, Askham J, Clissold P, Markham AF, Meredith DM (1997b) Expression of beta-catenin and the adenomatous polyposis coli tumour suppressor protein in mouse neocortical cells in vitro. *Neurosci Lett* 235:129-132.
- Mudher A, Shepherd D, Newman TA, Mildren P, Jukes JP, Squire A, Mears A, Drummond JA, Berg S, MacKay D, Asuni AA, Bhat R, Lovestone S (2004) GSK-3beta inhibition reverses axonal transport defects and behavioural phenotypes in *Drosophila*. *Mol Psychiatry* 9:522-530.
- Munemitsu S, Souza B, Muller O, Albert I, Rubinfeld B, Polakis P (1994) The APC gene product associates with microtubules in vivo and promotes their assembly in vitro. *Cancer Res* 54:3676-3681.
- Nathke IS, Adams CL, Polakis P, Sellin JH, Nelson WJ (1996) The adenomatous polyposis coli tumor suppressor protein localizes to plasma membrane sites involved in active cell migration. *J Cell Biol* 134:165-179.
- Nishimura I, Yang Y, Lu B (2004) PAR-1 kinase plays an initiator role in a temporally ordered phosphorylation process that confers tau toxicity in *Drosophila*. *Cell* 116:671-682.
- Nobes CD, Hall A (1995) Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell* 81:53-62.
- Noble M, Lewis SA, Cowan NJ (1989) The microtubule binding domain of microtubule-associated protein MAP1B contains a repeated sequence motif unrelated to that of MAP2 and tau. *J Cell Biol* 109:3367-3376.

- Noiges R, Eichinger R, Kutschera W, Fischer I, Nemeth Z, Wiche G, Propst F (2002) Microtubule-associated protein 1A (MAP1A) and MAP1B: light chains determine distinct functional properties. *J Neurosci* 22:2106-2114.
- Orban-Nemeth Z, Simader H, Badurek S, Trancikova A, Propst F (2005) Microtubule-associated protein 1S, a short and ubiquitously expressed member of the microtubule-associated protein 1 family. *J Biol Chem* 280:2257-2265.
- Ozer RS, Halpain S (2000) Phosphorylation-dependent localization of microtubule-associated protein MAP2c to the actin cytoskeleton. *Mol Biol Cell* 11:3573-3587.
- Ozols J, Caron JM (1997) Posttranslational modification of tubulin by palmitoylation: II. Identification of sites of palmitoylation. *Mol Biol Cell* 8:637-645.
- Packard M, Koo ES, Gorczyca M, Sharpe J, Cumberledge S, Budnik V (2002) The *Drosophila* Wnt, wingless, provides an essential signal for pre- and postsynaptic differentiation. *Cell* 111:319-330.
- Peifer M, Polakis P (2000) Wnt signaling in oncogenesis and embryogenesis--a look outside the nucleus. *Science* 287:1606-1609.
- Peng I, Binder LI, Black MM (1986) Biochemical and immunological analyses of cytoskeletal domains of neurons. *J Cell Biol* 102:252-262.
- Prokop A, Uhler J, Roote J, Bate M (1998) The kakapo mutation affects terminal arborization and central dendritic sprouting of *Drosophila* motoneurons. *J Cell Biol* 143:1283-1294.
- Redeker V, Le Caer JP, Rossier J, Prome JC (1991) Structure of the polyglutamyl side chain posttranslationally added to alpha-tubulin. *J Biol Chem* 266:23461-23466.
- Rickard JE, Kreis TE (1996) CLIPs for organelle-microtubule interactions. *Trends Cell Biol* 6:178-183.
- Ridley AJ, Hall A (1992) The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell* 70:389-399.
- Ridley AJ, Paterson HF, Johnston CL, Diekmann D, Hall A (1992) The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell* 70:401-410.
- Riederer B, Matus A (1985) Differential expression of distinct microtubule-associated proteins during brain development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82:6006-6009.
- Roos J, Hummel T, Ng N, Klambt C, Davis GW (2000) *Drosophila* Futsch regulates synaptic microtubule organization and is necessary for synaptic growth. *Neuron* 26:371-382.
- Rosin-Arbesfeld R, Ihrke G, Bienz M (2001) Actin-dependent membrane association of the APC tumour suppressor in polarized mammalian epithelial cells. *Embo J* 20:5929-5939.
- Ruel L, Stambolic V, Ali A, Manoukian AS, Woodgett JR (1999) Regulation of the protein kinase activity of Shaggy(Zeste-white3) by components of the wingless pathway in *Drosophila* cells and embryos. *J Biol Chem* 274:21790-21796.
- Ruiz-Canada C, Budnik V (2006) Synaptic cytoskeleton at the neuromuscular junction. *Int Rev Neurobiol* 75:217-236.
- Ruiz-Canada C, Ashley J, Moeckel-Cole S, Drier E, Yin J, Budnik V (2004) New synaptic bouton formation is disrupted by misregulation of microtubule stability in aPKC mutants. *Neuron* 42:567-580.
- Sanes JR, Apel ED, Burgess RW, Emerson RB, Feng G, Gautam M, Glass D, Grady RM, Krejci E, Lichtman JW, Lu JT, Massoulie J, Miner JH, Moscoso LM, Nguyen Q, Nichol M, Noakes PG, Patton BL, Son YJ, Yancopoulos GD, Zhou H (1998) Development of the neuromuscular junction: genetic analysis in mice. *J Physiol Paris* 92:167-172.
- Sattilaro RF, Dentler WL, LeCluyse EL (1981) Microtubule-associated proteins (MAPs) and the organization of actin filaments in vitro. *J Cell Biol* 90:467-473.

- Schliwa M, Woehlke G (2003) Molecular motors. *Nature* 422:759-765.
- Schoenfeld TA, Obar RA (1994) Diverse distribution and function of fibrous microtubule-associated proteins in the nervous system. *Int Rev Cytol* 151:67-137.
- Schoenfeld TA, McKerracher L, Obar R, Vallee RB (1989) MAP 1A and MAP 1B are structurally related microtubule associated proteins with distinct developmental patterns in the CNS. *J Neurosci* 9:1712-1730.
- Schuster CM, Davis GW, Fetter RD, Goodman CS (1996) Genetic dissection of structural and functional components of synaptic plasticity. I. Fasciclin II controls synaptic stabilization and growth. *Neuron* 17:641-654.
- Schuyler SC, Pellman D (2001) Microtubule "plus-end-tracking proteins": The end is just the beginning. *Cell* 105:421-424.
- Seitz-Tutter D, Langford GM, Weiss DG (1988) Dynamic instability of native microtubules from squid axons is rare and independent of gliding and vesicle transport. *Exp Cell Res* 178:504-512.
- Stukalin EB, Kolomeisky AB (2006) ATP hydrolysis stimulates large length fluctuations in single actin filaments. *Biophys J* 90:2673-2685.
- Su LK, Burrell M, Hill DE, Gyuris J, Brent R, Wiltshire R, Trent J, Vogelstein B, Kinzler KW (1995) APC binds to the novel protein EB1. *Cancer Res* 55:2972-2977.
- Tanaka E, Sabry J (1995) Making the connection: cytoskeletal rearrangements during growth cone guidance. *Cell* 83:171-176.
- Tanaka E, Ho T, Kirschner MW (1995) The role of microtubule dynamics in growth cone motility and axonal growth. *J Cell Biol* 128:139-155.
- Tanaka EM, Kirschner MW (1991) Microtubule behavior in the growth cones of living neurons during axon elongation. *J Cell Biol* 115:345-363.
- Togel M, Wiche G, Propst F (1998) Novel features of the light chain of microtubule-associated protein MAP1B: microtubule stabilization, self interaction, actin filament binding, and regulation by the heavy chain. *J Cell Biol* 143:695-707.
- Trivedi N, Marsh P, Goold RG, Wood-Kaczmar A, Gordon-Weeks PR (2005) Glycogen synthase kinase-3beta phosphorylation of MAP1B at Ser1260 and Thr1265 is spatially restricted to growing axons. *J Cell Sci* 118:993-1005.
- Ubhi KK, Shaibah H, Newman TA, Shepherd D, Mudher A (2007) A comparison of the neuronal dysfunction caused by *Drosophila* tau and human tau in a *Drosophila* model of tauopathies. *Invert Neurosci* 7:165-171.
- Ulloa L, Diaz-Nido J, Avila J (1993a) Depletion of casein kinase II by antisense oligonucleotide prevents neuritogenesis in neuroblastoma cells. *Embo J* 12:1633-1640.
- Ulloa L, Avila J, Diaz-Nido J (1993b) Heterogeneity in the phosphorylation of microtubule-associated protein MAP1B during rat brain development. *J Neurochem* 61:961-972.
- Ulloa L, Diez-Guerra FJ, Avila J, Diaz-Nido J (1994) Localization of differentially phosphorylated isoforms of microtubule-associated protein 1B in cultured rat hippocampal neurons. *Neuroscience* 61:211-223.
- Vaillant AR, Muller R, Langkopf A, Brown DL (1998) Characterization of the microtubule-binding domain of microtubule-associated protein 1A and its effects on microtubule dynamics. *J Biol Chem* 273:13973-13981.
- Valiron O, Caudron N, Job D (2001) Microtubule dynamics. *Cell Mol Life Sci* 58:2069-2084.
- van der Plas MC, Pilgram GS, Plomp JJ, de Jong A, Fradkin LG, Noordermeer JN (2006) Dystrophin is required for appropriate retrograde control of neurotransmitter release at the *Drosophila* neuromuscular junction. *J Neurosci* 26:333-344.
- van der Plas MC, Pilgram GS, de Jong AW, Bansraj MR, Fradkin LG, Noordermeer JN (2007) *Drosophila* Dystrophin is required for integrity of the musculature. *Mech Dev* 124:617-630.

- Wagner U, Utton M, Gallo JM, Miller CC (1996) Cellular phosphorylation of tau by GSK-3 beta influences tau binding to microtubules and microtubule organisation. *J Cell Sci* 109 (Pt 6):1537-1543.
- Wegner A (1976) Head to tail polymerization of actin. *J Mol Biol* 108:139-150.
- Weisshaar B, Matus A (1993) Microtubule-associated protein 2 and the organization of cellular microtubules. *J Neurocytol* 22:727-734.
- Westermann S, Weber K (2003) Post-translational modifications regulate microtubule function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:938-947.
- Yoshihara M, Rheuben MB, Kidokoro Y (1997) Transition from growth cone to functional motor nerve terminal in *Drosophila* embryos. *J Neurosci* 17:8408-8426.
- Zauner W, Kratz J, Staunton J, Feick P, Wiche G (1992) Identification of two distinct microtubule binding domains on recombinant rat MAP 1B. *Eur J Cell Biol* 57:66-74.
- Zito K, Parnas D, Fetter RD, Isacoff EY, Goodman CS (1999) Watching a synapse grow: noninvasive confocal imaging of synaptic growth in *Drosophila*. *Neuron* 22:719-729.
- Zumbrunn J, Kinoshita K, Hyman AA, Nathke IS (2001) Binding of the adenomatous polyposis coli protein to microtubules increases microtubule stability and is regulated by GSK3 beta phosphorylation. *Curr Biol* 11:44-49.