



HAL
open science

La kinase neuronale PAK3 :Etude des trois mutations responsables de retard mental non syndromique et mise en évidence de deux nouveaux variants d'épissage

Patricia Kreis

► To cite this version:

Patricia Kreis. La kinase neuronale PAK3 :Etude des trois mutations responsables de retard mental non syndromique et mise en évidence de deux nouveaux variants d'épissage. Neurosciences [q-bio.NC]. Université Paris Sud - Paris XI, 2007. Français. NNT: . tel-00199812

HAL Id: tel-00199812

<https://theses.hal.science/tel-00199812>

Submitted on 19 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.

**UNIVERSITÉ PARIS XI
FACULTÉ DE MÉDECINE PARIS-SUD**

Année 2006-2007

N°

THESE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ PARIS XI

spécialité : Signalisations, Neurosciences, Endocrinologie, Reproduction

présentée et soutenue publiquement

par

Patricia KREIS

le 14 décembre 2007

Titre

La kinase neuronale PAK3 :

**Etude des trois mutations responsables de retard mental non syndromique
et mise en évidence de deux nouveaux variants d'épissage**

Directeur de thèse : **Dr. Jean-Vianney BARNIER**

JURY

Pr. Hervé DANIEL

Président

Dr. Sandrine ETIENNE-MANNEVILLE

Rapporteur

Dr. Laurent FAGNI

Rapporteur

Dr. Pierre BILLUART

Examineur

Dr. Jean-Vianney BARNIER

Directeur de thèse

Remerciements,

Je souhaite remercier les membres de mon jury :

Monsieur le Pr. Hervé Daniel pour avoir accepté la présidence du Jury de ma thèse.

Madame le Dr. Sandrine Etienne-Manneville et Monsieur le Dr. Laurent Fagni qui ont volontiers accepté d'être rapporteurs.

Monsieur le Dr. Pierre Billuart pour avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse.

Je remercie :

Gérard Baux, directeur du laboratoire de Neurobiologie Cellulaire et Moléculaire de m'avoir accueilli au sein du laboratoire

Jean-Vianney Barnier qui m'a appris énormément pendant mes années de thèse et qui m'a permis de mener ma thèse dans de bonnes conditions. Je le remercie pour sa gentillesse, son énergie, son enthousiasme des manip réussies et ses idées qui fusent!

Toutes les personnes qui m'ont donné le matériel nécessaire pour réaliser les expériences souhaitées : John Collard, Philippe Fort, Cécile Gauthier-Rouière, John O'Bryan, Roger Tsien pour les plasmides, Sylvie Rétaux, Stéphane Vernier, Alessandro Alunni pour les ARNm, Charles Duyckaerts pour les biopsies de cerveau de patients atteints de la maladie d'Alzheimer et Jamel Chelly pour l'ADN des patients atteints de retard mental.

Nos collaborateurs Suisses Bernadett Boda et Dominique Muller.

La Fondation pour la Recherche Médicale qui m'a apporté un soutien financier pendant 1 an.

Tous les membres du laboratoire pour leur accueil et leur gentillesse,

En particulier, l'équipe "34" pour tous les moments scientifiques et non scientifiques, les réunions d'équipes du Vendredi dans la bonne humeur et les odeurs des fromages de montagne, la traditionnelle cueillette des framboises du mois de juillet, les barbecues chez chef et sous-chef, les jolies cartes postales pour les délaissés du mois d'Août, les pâtes de fruits, chocolats et autres spécialités culinaires. Je remercie Véronique pour son amitié, son aide quotidienne, sa rigueur dans ses classeurs de manip (grâce à qui je l'espère, les miens resteront toujours bien organisés !) et les nombreuses courses à pieds ensemble. Emmanuel, avec qui j'ai eu grand plaisir à partager mon bureau, qui a dû supporter mes papiers qui volent dans le bureau ainsi que ma concentration absolue des derniers mois (à en oublier d'arroser sa précieuse plante verte !). Je le remercie pour ses bonnes (ou mauvaises...) blagues, pour les concours de talons qui passent, les batailles de pissette d'eau et autres divertissements du quotidien. Je souhaite également remercier Sandrine alias

madame commande, pour sa sympathie et sa gaieté, Nicolas pour sa rigueur et tous ses questionnements scientifiques, Vincent pour sa gentillesse sans limite et Xavier pour ses blagounettes et pets des mains incessants.

Les personnes de l'aile B en particulier ceux qui répondent à l'appel du "miam miam", Yvette, François et Seana qui a pris beaucoup de son temps pour relire mes manuscrits ainsi que Bernadette, toujours partante pour des "minipreps dernière minute".

Les électrophysiologistes et "patcheurs de neurones", Muriel et Philippe ainsi que Jean-Stéphane Joly du DEPSN pour ses conseils en phylogénie.

Les coureurs du mardi-mercredi-vendredi, "Saint Bernard", Stéphane, Jean-Vianney, Pierre, Muriel, Véronique et en particulier Alexandre mon relayeur et coach des montées à fond les bananes au château de Gif...

Tous les étudiants du laboratoire que je n'ai pas cités, François, Emmanuelle, Nicolas, Hua, Elodie, Sébastien, Stéphanie, Caroline, Gaëlle qui prendra sûrement ma succession.

L'équipe pédagogique de physiologie animale d'Orsay, en particulier Heather Mc Lean ma tutrice qui m'a initié à l'enseignement, Laurence, Yesser et Karine qui met l'ambiance folle dans les couloirs...

Une petite pensée pour momo, notre poisson rouge, survivant des chocs électriques mais pas des chaleurs de l'été...

Tous mes amis et spécialement Claire et Alix qui comptent énormément pour moi.

Mes parents qui m'ont permis d'en arriver là, en particulier mon père qui m'a donné goût au monde de la recherche, ma mère pour ses bons petits plats et ma sœur pour son éternel soutien.

SOMMAIRE

Liste des principales abréviations	1
Liste des figures.....	3
INTRODUCTION	4
I. Le retard mental	5
1) Définition	5
2) Sévérité du retard mental	5
3) Différentes formes de retard mental	5
3.1) Le retard mental syndromique	5
3.2) Le retard mental non syndromique	6
4) Les causes du retard mental	6
4.1) Les causes environnementales	6
4.2) Les causes génétiques	6
4.2.1) Anomalies chromosomiques.....	6
4.2.2) Mutations monogéniques	6
5) La classification syndromique/non syndromique du retard mental lié à l’X est aujourd’hui remise en question.....	7
6) Les gènes responsables de retard mental non syndromique sont impliqués dans plusieurs processus fondamentaux pour la fonction des synapses	8
6.1) Régulation de l’expression génique	10
6.2) Régulation de l’organisation des protéines synaptiques	10
6.3) Régulation du transport des vésicules synaptiques via les GTPases Rab	10
6.4) Régulation du cytosquelette d’actine via les GTPases de la famille Rho.....	11
6.4.1) α -PIX	11
6.4.2) FGD1.....	11
6.4.3) OPHN1.....	11
6.4.4) PAK3.....	12
6.4.5) La Lim Kinase 1 et retard mental syndromique.....	13
II. Processus de mémorisation et plasticité synaptique dans le cerveau des mammifères.....	15
1) L’hippocampe : structure clé dans les processus d’apprentissage et de mémorisation	15
2) La potentialisation à long terme (LTP) dans l’hippocampe comme modèle d’étude électrophysiologique des processus mnésiques.....	17
3) Les voies de signalisation fondamentales dans la plasticité synaptique	20
3.1) La régulation génique	20
3.2) La synthèse protéique	21

3.3) La régulation du cytosquelette d'actine	21
3.4) La régulation de l'endocytose	22
III. Rôle fonctionnel des épines dendritiques dans la plasticité synaptique	23
1) Les neurones sont des cellules polarisées	23
2) Structure des épines dendritiques.....	23
3) La régulation de la morphologie des épines est dépendante de l'activité synaptique	25
4) Des anomalies de morphologie des épines dendritiques sont associées au retard mental	26
5) La spinogénèse.....	27
6) Mécanismes moléculaires de la morphogénèse de l'épine dendritique	28
6.1) La dynamique de l'actine et la forme de la synapse	28
6.2) L'épine dendritique comprend de nombreux récepteurs et protéines de signalisation...	30
6.2.1) Les récepteurs de surface	32
6.2.2) Les protéines d'échafaudage.....	33
6.2.2.1) La protéine PSD-95	
6.2.2.2) Les membres de la famille Shank 1-3	
6.2.3) Les GTPases de la famille Rho.....	34
6.2.4) Rôle des GTPases sur la morphologie des épines dendritiques.....	35
6.2.5) Les régulateurs des GTPases	36
6.2.6) Les effecteurs des GTPases de la famille Rho.....	37
6.2.6.1) Les p21-activated kinases (PAK)	
6.2.6.2) La famille de protéines d'échafaudage WASP (Wiskott–Aldrich syndrome protein) et WAVE (WASP family Verprolin-homologous protein).	
6.2.6.3) La protéine adaptatrice IRSp53	
6.2.6.4) La Rho Kinase	
6.2.7) Les molécules d'adhésions	39
IV. Caractérisation des PAKs.....	40
1) Les kinases PAK appartiennent à la grande famille de kinases appelée STE20	40
2) Les PAK du Groupe I : PAK1, 2, 3	41
2.1) Structure	41
2.2) La régulation de la kinase PAK	41
2.2.1) Le recrutement membranaire des PAK.....	42
2.2.2) Le p21-binding domaine (PBD) permet la liaison de PAK aux GTPases activatrices.....	43

2.2.3) Le domaine auto-inhibiteur permet de maintenir la kinase à l'état inactif	43
2.2.4) La phosphorylation de PAK permet son activation et maintient la kinase dans sa conformation ouverte	45
2.2.5) La fixation d'autres facteurs module l'activité des PAKs	45
3) Les PAK du Groupe II : PAK4, 5, 6	46
4) Les phénotypes associés à la perte de fonction de PAK	46
5) Les fonctions biologiques des kinases PAK	47
5.1) Les kinases PAK régulent la dynamique du cytosquelette	47
5.2) Rôle des PAK dans le développement embryonnaire, la différenciation neuronale et le guidage axonal.....	48
5.2.1) La migration cellulaire	49
5.2.2) Le guidage axonal	50
5.2.3) La différenciation neuronale	53
6) Rôle des kinases PAK dans la prolifération cellulaire, l'apoptose et le cancer.....	53
6.1) Régulation du cycle cellulaire.....	54
6.2) La voie de l'apoptose et de la survie cellulaire.....	54
6.3) PAK et Cancer	55
7) PAK et plasticité	55
7.1) Les kinases PAK sont impliquées dans la plasticité synaptique.....	55
7.2) Plusieurs voies de signalisation impliquant les kinases PAK régulent la morphogenèse des épines	56
7.3) Déficit des kinases PAK et maladie d'Alzheimer	57
7.4) Un rôle spécifique de PAK3 dans la plasticité synaptique	58
V. L'épissage alternatif et les fonctions cognitives au cours de l'évolution.....	59
1) Le chromosome X a joué un rôle déterminant dans l'évolution des fonctions des gènes chez les mammifères	59
2) L'épissage alternatif est un des mécanismes qui a permis la complexification du génome des eucaryotes supérieurs	59
2.1) Définition de l'épissage alternatif.....	59
2.2) Le mécanisme d'épissage	61
2.3) Modèles d'évolution de l'épissage alternatif.....	63
2.4) La régulation de l'expression génique dans le cerveau	63
2.5) L'épissage alternatif et les pathologies associées	64

RESULTATS	65
Objectifs de ma thèse	65
I. Etude des mutations de PAK3 responsables de retard mental non syndromique sur les propriétés biochimiques et biologiques de la kinase	67
1) Kreis P, Thevenot E, Rousseau V, Boda B, Muller D, Barnier JV (2007) The p21-activated kinase 3 implicated in mental retardation regulates spine morphogenesis through a Cdc42-dependent pathway. J Biol Chem 282:21497-21506	67
2) La kinase PAK3 lie mieux Cdc42 que PAK1	77
3) Localisation des mutants de PAK3 dans les cellules COS-7 et leurs effets sur la morphologie cellulaire.....	78
II. Le gène PAK3 code pour quatre variants d'épissage doués de nouvelles caractéristiques (article soumis)	81
III. Homodimérisation et hétérodimérisation des kinases PAK : nouveau modèle de régulation des kinases PAK du groupe I	106
1) Les gènes PAK3 et PAK1 sont co-exprimés dans le même neurone	109
2) PAK1 et PAK3 forment des homodimères ou des hétérodimères dans des fibroblastes.....	111
2.1) Mise en évidence des homodimères PAK1/PAK1	111
2.2) Mise en évidence des homodimères PAK3a/PAK3a et des hétérodimères PAK3a/PAK1	112
2.3) PAK3b forme des homodimères avec PAK3b et des hétérodimères avec PAK3a et PAK1	113
3) PAK3 forme des hétérodimères avec PAK1 <i>in vivo</i>	114
3.1) Spécificité des anticorps utilisés pour immunoprécipiter PAK3 et PAK1 <i>in vivo</i>	114
3.2) PAK1 co-immunoprécipite avec PAK3 dans des extraits de cerveau de souris.....	116
IV. PAK3 dans la physiopathologie.....	117
1) Recherche de mutations dans les exons alternatifs dans une cohorte de patients atteints de retard mental.....	117
2) Analyse de l'expression de PAK3 chez des patients atteints de la maladie d'Alzheimer	118

DISCUSSION.....	120
1) Rôle de PAK3 dans le cerveau.....	120
1.1) Relation entre les mutations, leurs conséquences biochimiques et les phénotypes cliniques	120
1.2) PAK3 et les GTPases de la famille Rho	122
1.3) Le recrutement de PAK3 dans les épines	123
1.4) PAK3 et spinogénèse	124
1.4.1) Les filopodes sont-ils des précurseurs des épines ?	124
1.4.2) Rôle du module Cdc42-PAK3 dans la formation des épines.....	125
1.4.3) Quel est ou quels sont les mécanismes d'activation du module Cdc42/PAK3 ? .	126
1.4.4) Quelles sont les cibles du module Cdc42/PAK3	126
1.5) PAK3 régule-elle la différenciation neuronale ?	127
2) Comment sont régulés les variants de PAK3 constitutivement actifs ?	128
2.1) Mise en évidence de nouveaux variants d'épissage de PAK3	128
2.2) Mécanismes de régulation des nouveaux variants de PAK3 constitutivement actifs.....	129
CONCLUSIONS/PERSPECTIVES	131
BIBLIOGRAPHIE	132

Liste des principales abréviations

Liste des principales abréviations

AID :	auto-inhibitory domain
AMPA :	α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isolaxone propionate
AMPC :	adenosine monophosphate cyclic
Arp :	actin related protein
BDNF :	brain-derived neurotrophic factor
CaMKII :	calcium/calmodulin-dependant kinase II
Cdc42 :	cell division cycle 42
Cdk5 :	cyclin-dependant kinase 5
CREB :	cAMP response element-binding
CRIB :	Cdc42 and Rac interactive binding domain
DSCAM :	Down Syndrome Cell Adhesion Molecule
ERK :	extracellular-signal regulated kinase
FGD1 :	facio-genital dysplasia
FMR :	fragile X mental retardation
FMRP :	fragile X mental retardation protein
GAP :	GTPase activating protein
GDI :	guanine dissociation inhibitor
GEF :	guanine exchange factor
GIT :	G-protein-coupled receptor kinase interacting protein
IRSp53 :	insulin receptor substrate 53
IS :	inhibitory switch
KI :	kinase inhibitory
KO :	Knock out
LIM Kinase :	Lin11, Isl-1 & Mec-3 Kinase
LTD :	long term depression
LTP :	long term potentiation
MAPK :	mitogen-activated protein kinase
mGluR :	metabotropic glutamate receptor
NMDA :	N-methyl-D-aspartate
OPHN :	oligophrenin
PAK :	p21-activated kinase
PBD :	p21-binding domain
PDZ :	PSD95, Dlg, Zona Occludens
Pix :	p21-associated kinase-interacting exchange factor
PKA :	protein kinase A
PSD :	post synaptic density
PSD95 :	post synaptique densité-95
QI :	quotient intellectuel
Rab :	Ras associated binding
Rac :	Ras-related C3-botulinum toxin substrate
Rho :	Ras homologue
RSK2 :	ribosomal S6 kinase 2
Si-RNA :	silencing-RNA
WASP :	Wiscott-Aldrich syndrome protein
WAVE :	WASP family Verprolin-homologous protein

Liste des tableaux et des figures

INTRODUCTION

Tableau 1. Gènes localisés sur le chromosome X dont la mutation provoque un retard mental non-syndromique associé ou non à un retard mental syndromique

Figure 1. Représentation schématique de la séquence codante de PAK3 et la position des quatre mutations

Figure 2. La voie de signalisation Rho GTPase/PAK3/actine

Figure 3a. Structure du lobe temporal médian d'un cerveau humain

Figure 3b. Organisation anatomique de l'hippocampe

Figure 4. Mécanismes intracellulaires de la LTP initiée par l'activation des récepteurs NMDA

Figure 5. Induction différentielle des phénomènes de LTP et LTD au niveau de la synapse

Figure 6. Régulation du recyclage des récepteurs AMPA par endocytose

Figure 7. Représentation schématique de la structure d'un neurone

Figure 8. Les différentes morphologies des épines dendritiques

Figure 9. La morphologie des épines et l'activité synaptique

Figure 10. La densité des épines et l'activité synaptique

Figure 11. Illustration de dendrites apicales de cellules pyramidales du cortex cérébral humain

Figure 12. Trois modèles de spinogénèse

Figure 13. La polymérisation de l'actine a lieu en trois étapes

Figure 14. La régulation de l'actine dans la densité post-synaptique

Figure 15. Effets de l'activation des GTPases sur le cytosquelette d'actine de fibroblastes Swiss 3T3

Figure 17. Arbre phylogénique de la famille PAK

Figure 18. Schéma des différentes régions fonctionnelles des kinases PAK du groupe I

Figure 19. Les deux voies de recrutement membranaire de PAK

Figure 20. Mécanismes d'activation des PAK du groupe I

Figure 21. Phénotypes associés aux souris KO des différentes kinases PAK

Figure 22. Organisation de l'actine et des microtubules dans une cellule

Figure 23. Modèle du rôle de PAK dans la migration cellulaire

Figure 24. Organisation du cytosquelette d'un cône de croissance

Figure 25. Projection des cellules photoréceptrices au niveau de la rétine de drosophile

Figure 26. Implication des kinases PAK dans le guidage axonal mené par les sémaphorines, les éphrines et slits

Figure 27. Modification de la morphologie des épines induite par la perte d'expression de PAK3 par Si-RNA.

Figure 28. Différents modes d'épissage alternatifs

Figure 29. Schéma de la régulation de l'épissage alternatif

Figure 30. Schéma de l'épissage d'un pré-ARNm

RESULTATS

Figure 31. Etude de la liaison de Cdc42 et Rac1 à PAK1 et PAK3

Figure 32. Etude de la localisation des mutants de PAK3 dans les cellules COS et leur effet sur la morphologie cellulaire

Figure 33. Arbre phylogénique de la division des vertébrés

Figure 34. Structure des PAK groupe I

Figure 35. Modèle de régulation des isoformes PAK3b, c et cb sous forme d'hétérodimères

Figure 36. Coexpression dans un même neurone des isoformes PAK3 et PAK1 détectées par RT-PCR sur cellule unique

Figure 37. Mise en évidence de dimères PAK1/PAK1

Figure 38. Mise en évidence de dimères PAK3a/PAK3a et PAK3a/PAK1

Figure 39. PAK3b forme des homo- et hétérodimères

Figure 40. Spécificité des anticorps dirigés contre PAK3 et PAK1

Figure 41. PAK3 forme des hétérodimères avec PAK1 *in vivo*

Figure 42. Etude de l'expression des variants de PAK3 chez des patients atteints de la maladie d'Alzheimer par RT-PCR semi-quantitative

DISCUSSION

Tableau 2. Tableau récapitulatif des mutations de PAK3 associées au retard mental

INTRODUCTION

Mon travail de thèse porte sur l'étude de la kinase neuronale PAK3 dont plusieurs mutations conduisent à un retard mental. Une étude approfondie des propriétés de cette protéine devrait permettre de mieux comprendre les mécanismes moléculaires à la base des processus de l'apprentissage et de la mémorisation. Ainsi, dans une première partie de mon introduction, je me suis intéressée à la pathologie du retard mental. Puis j'ai détaillé les phénomènes de plasticité synaptique à l'origine des processus mnésiques qui incluent la modulation de la structure des épines dendritiques et qui nécessitent tout un ensemble de protéines différentes incluant la kinase PAK3. Dans une quatrième partie, j'ai exposé les caractéristiques et propriétés fonctionnelles des kinases PAK. Enfin, puisque le gène PAK3 est soumis à un épissage alternatif, j'ai choisi de détailler ce mécanisme et de montrer en quoi il peut être indispensable dans de nombreuses fonctions en particulier les processus cognitifs.

I. Le retard mental

1) Définition

D'après la définition de l'Organisation Mondiale de la Santé, le retard mental est dû à un arrêt du développement mental ou un développement mental incomplet, caractérisé par des défauts cognitifs, du langage, de la motricité et de la sociabilité. Le retard mental se manifeste généralement avant l'âge de 18 ans et affecte environ 3% de la population des pays industrialisés. Bien que la définition et la classification du retard mental offrent souvent matière à débat, celui-ci est très souvent défini par un quotient intellectuel (QI) inférieur à 70 et regroupe sous la même dénomination un ensemble complexe de pathologies (Chelly et Mandel, 2001).

2) Sévérité du retard mental

Par comparaison avec un individu normal possédant un QI de 100, on distingue plusieurs degrés de retard mental : léger ($50 \leq \text{QI} \leq 69$), moyen ($35 \leq \text{QI} \leq 49$), grave ($20 \leq \text{QI} \leq 34$) et profond ($\text{QI} < 20$). De nombreuses études ne distinguent pourtant que deux retards mentaux : léger ($50 \leq \text{QI} \leq 70$) et profond ($\text{QI} < 50$).

3) Différentes formes de retard mental

Plusieurs classifications de retard mental ont été proposées, en fonction de la sévérité du déficit cognitif, de son association ou non à d'autres signes cliniques, de son étiologie et enfin de son mode de transmission dans le cas des maladies génétiques. On a distingué deux classes de retards mentaux décrits ci-dessous.

3.1) Le retard mental syndromique

Le retard mental dit syndromique est caractérisé par une déficience intellectuelle associée à un ou plusieurs signes cliniques tels que des dysmorphies faciales, des malformations cérébrales ou cardiaques, des anomalies neuromusculaires, de comportement ou des défauts métaboliques. C'est le cas par exemple du syndrome de Williams associé à une cardiopathie congénitale accompagnée d'un faciès déformé et d'un comportement caractéristique de l'individu affecté (Donnai et Karmiloff-Smith., 2000).

3.2) Le retard mental non syndromique

Si le retard mental est le seul signe clinique, il est qualifié de non syndromique. Contrairement au retard mental syndromique, les gènes impliqués dans le retard mental non syndromique sont responsables uniquement d'une déficience mentale (Chelly et Mandel, 2001). De ce fait, l'étude de ces gènes fournit des éléments importants pour comprendre les mécanismes moléculaires responsables des fonctions cognitives.

4) Les causes du retard mental

Les origines du retard mental sont très hétérogènes. Elles sont principalement liées à des facteurs environnementaux (20% des cas de retard mental) ou à des facteurs génétiques (40% des cas) (Curry et al., 1997). Il est important de noter que l'origine des 40% des retards mentaux sévères et la majorité des retards mentaux légers reste encore inexplicé.

4.1) Les causes environnementales

L'alcoolémie, la prise de médicaments pendant la grossesse, les accouchements difficiles, les naissances prématurées, les infections pendant les premières années du développement de l'enfant sont des facteurs de risques de retard mental (Curry et al., 1997).

4.2) Les causes génétiques

4.2.1) Anomalies chromosomiques

Le développement de techniques cytogénétiques et moléculaires, au cours de ces dernières années, a permis un progrès considérable dans le dépistage des anomalies associées au retard mental. L'anomalie chromosomique la plus fréquente est la trisomie 21, qui est de ce fait la première cause génétique de retard mental. La méthode FISH (Fluorescence *in situ* hybridization) a permis d'identifier des microdélétions associées à des syndromes caractéristiques telle que le syndrome de Williams associé à une microdélétion du chromosome 7 (Sugayama, 2003). L'étude des extrémités télomériques a aussi permis de mettre en évidence certaines microdélétions responsables de retard mental (Raymond et al., 2006).

4.2.2) Mutations monogéniques

L'identification de mutations monogéniques responsables de retard mental a permis d'associer des gènes uniques à des pathologies. Des études épidémiologiques ont montré que les hommes sont plus atteints que les femmes dans une proportion de 20 à 30%. En effet, plus

de 20% des gènes impliqués dans des retards mentaux d'origine génétique sont localisés sur le chromosome X. Or sachant que ce chromosome ne porte que 4% de l'ensemble des gènes, il porte ainsi presque six fois plus de gènes responsables de retard mental que les autosomes (Zechner, 2001).

Le syndrome de l'X fragile est la cause la plus fréquente de retard mental monogénique (Chelly et Mandel, 2001). Les patients atteints du syndrome de l'X fragile ont une expansion anormale du triplet CGG au niveau du promoteur du gène *FMR1* (fragile X mental retardation 1) qui code pour la protéine FMRP (fragile X mental retardation protein). Cette expansion qui dépasse 200 répétitions, conduit à une hyperméthylation de la région promotrice et à l'extinction de l'expression du gène (Oostra et Chiurazzi, 2001).

Aujourd'hui, grâce aux progrès issus des données du séquençage du génome humain et des efforts conjoints de plusieurs laboratoires européens, une quarantaine de gènes liés au chromosome X et responsables de retard mental a pu être identifiée. Parmi ces gènes, une vingtaine est impliquée dans le retard mental non syndromique (Ropers et Hamel, 2005) comme par exemple le gène *FMR2* (fragile X mental retardation 2) identifié en 1996 et les gènes *Oligophrenine* et *PAK3* (p21-activated kinase 3) identifiés en 1998 (Gecz et al., 1996; Allen et al., 1998; Billuart et al., 1998). La découverte de ces nouveaux gènes a permis de réaliser des avancées sensibles dans la compréhension des mécanismes physiopathologiques des processus cellulaires et moléculaires impliqués dans les déficiences mentales. En 2002, le premier gène autosomique récessif responsable d'un retard mental non syndromique a été identifié. Ce gène appelé *PRSSI2* (protease serine 12) code pour la neurotrypsine, une protéine sécrétée appartenant à la famille des protéases à sérine (Molinari et al., 2002).

5) La classification syndromique/non syndromique du retard mental lié à l'X est aujourd'hui remise en question

Au cours des dernières années, suite à l'augmentation du nombre de gènes identifiés et à une étude plus approfondie des signes cliniques des patients et les progrès réalisés en imagerie, la distinction retard mental syndromique et non syndromique lié à l'X s'est révélée être moins marquée (Frints et al., 2002). En effet, selon la nature de la mutation, certains gènes sont responsables soit d'un retard mental syndromique, soit d'une forme non syndromique, ce qui suggère l'existence d'un continuum entre les retards mentaux syndromiques et non syndromiques. Ainsi certaines mutations provoquant une perte de fonction partielle de la protéine, conduisent à un retard mental modéré de forme non syndromique alors que d'autres mutations provoquant une perte de fonction totale de la protéine sont associées à un retard

mental syndromique (Frints et al., 2002). C'est le cas notamment du gène *RPS6KA3* (ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypeptide 3) qui code pour la protéine RSK2 (ribosomal S6 kinase 2). Ce gène est muté dans le syndrome de Coffin-Lowry mais peut être aussi associé à un retard mental non syndromique (Tarpey et al., 2004). Des mutations dans le gène *ARX* (Aristaless related homeobox gene), dont une duplication de 24 pb conduit à une élongation poly-alanine, sont associées à un spectre très large de phénotypes qui varient d'un retard mental non syndromique à un retard mental syndromique (Mandel et Chelly, 2004). De plus, des cas de retard mental initialement classés comme non syndromiques ont pu être reclassés comme syndromiques à la suite d'observations plus poussées ayant permis de dégager des signes cliniques distinctifs. Par exemple, l'Oligophrénine, initialement identifiée comme responsable de retard mental non syndromique, a récemment été impliquée dans un retard mental associé à plusieurs signes cliniques notamment à une épilepsie ou une hypoplasie du cervelet (Billuart et al., 1998 ; Bergmann et al., 2003). Comme nous le verrons dans la suite de cette introduction (partie I, §6.4.4), si PAK3 est classée à l'heure actuelle dans les formes non syndromiques, la description en 2007 d'une famille avec une nouvelle mutation, pourrait le reclasser dans les formes syndromiques (Peippo et al., 2007).

6) Les gènes responsables de retard mental non syndromique sont impliqués dans plusieurs processus fondamentaux pour la fonction des synapses

Les protéines impliquées dans le retard mental non syndromique lié à l'X peuvent schématiquement se répartir en trois groupes fonctionnels qui sont la régulation génique, le métabolisme, ou les voies de signalisation synaptique (tableau 1). Ces protéines jouent un rôle important dans les phénomènes de plasticité synaptique notamment dans des fonctions synaptiques telles que le transport des vésicules synaptiques via les GTPases Rab (Ras associated binding) ou la dynamique du cytosquelette d'actine via les GTPases de la famille Rho (Ras homologue) (Ramakers, 2002 ; Ropers et Hamel, 2005 ; Renieri et al., 2005). L'actualisation récente des données est disponible sur le site xlmr.interfree.it/home.htm.

Retard mental non syndromique lié à l'X		
Symbole	Gène	Fonction de la protéine
Métabolisme		
FACL4	Fatty acid-CoA ligase 4	Synthèse de lipides complexes
Signalisation synaptique		
ARHGEF6= PIX	Rho guanine nucleotide exchange factor 6	Facteur d'échange des GTPases Rac et Cdc42
PAK3	p21-activated kinase 3	Sérine thréonine kinase
AGTR2	Angiotensin II receptor	Récepteur à l'angiotensine II
GDI1	Guanine dissociation inhibitor I	Stabilise la forme GDP des GTPases Rab
ILR1RAPL	Interleukin-1 receptor accessory protein like	Membre de la famille des récepteurs à interleukine
TM4SF2	Transmembrane 4 superfamily member 2	Tétraspandine
NLGN4	Neuroigin-4	Molécule d'adhésion
DLG3	Neuroendocrin-disc large homolog 3	Protéine d'échafaudage liée aux récepteurs NMDA
Régulation génique		
FMR2	Fragile-X mental retardation 2	Facteur de transcription
ZNF41	Zinc finger-41	Facteur de transcription
FTSJ1	FtsJ homologue 1	Méthyl transférase de ARNr
JARID1C	Jumonji/AT-rich interactive domain 1C	Remodelage de la chromatine
Retard mental syndromique et non syndromique lié à l'X		
Symbole	Gène	Fonction de la protéine
Métabolisme		
SLC6A8	Solute carrier family 6	Transporteur de créatine
Signalisation synaptique		
RSK2	Ribosomal S6 kinase 2	Sérine thréonine kinase
FGD1	Facio-genital dysplasia	Facteur d'échange des GTPases Rho
OPHN1	Oligophrénine	Stimule l'activité GTPase de Rho
Régulation génique		
ARX	Aristaless-related homeobox gene	Protéine à homéodomaine
ATRX	α -Thalassaemia/mental retardation syndrome	Hélicase
MeCP2	Methyl CpG-binding protein 2	Liaison à l'ADN méthylé
PQBP1	Polyglutamine tract binding protein-1	Régulation transcriptionnelle

Tableau 1. Gènes localisés sur le chromosome X dont la mutation provoque un retard mental non-syndromique associé ou non à un retard mental syndromique. La partie supérieure du tableau présente les gènes responsables à l'heure actuelle uniquement d'un retard mental non syndromique. La partie inférieure du tableau regroupe les gènes impliqués dans le retard mental non syndromique et syndromique. Il est à noter que la nouvelle mutation de PAK3 récemment identifiée pourrait classer ce gène dans le groupe non syndromique/syndromique (Peippo et al., 2007). Adapté de Ropers et Hamel, 2005

6.1) Régulation de l'expression génique

L'expression génique est régulée par le remodelage de la chromatine ou par la modulation de l'activité de protéines impliquées dans les étapes de la transcription. Plusieurs protéines responsables de retard mental sont impliquées dans des processus de la régulation de l'expression génique. Par exemple, la sérine thréonine kinase, RSK2 dont la mutation est responsable du syndrome de Coffin-Lowry, peut changer l'activité de certains facteurs de transcription comme CREB (cAMP response element-binding) ou réguler la structure de la chromatine par phosphorylation de l'histone H3. Il a récemment été montré que RSK2 peut aussi phosphoryler des protéines à domaine PDZ (PSD95, dlg, zona occludens) pour réguler la transmission synaptique (Thomas et al., 2005). La protéine MeCP2 (methyl CpG binding protein) dont la mutation est responsable du syndrome de Rett, inhibe l'expression génique via la méthylation de l'ADN (Bienvenu et Chelly, 2006). Enfin la protéine FMR2 dont l'expansion anormale CCG est associée au retard mental non syndromique code pour un activateur transcriptionnel (Hillman et Gecz, 2001).

6.2) Régulation de l'organisation des protéines synaptiques

Des mutations dans le gène *NLGN4* (Neuroligin-4) qui code pour la neuroligine 4 sont responsables de retard mental non syndromique ou sont associées à de l'autisme (Laumonnier et al., 2004). Les neuroligines reliées à plusieurs molécules de densité post-synaptique, sont des molécules d'adhésion localisées au niveau de la membrane post-synaptique, qui jouent un rôle important dans la balance des synapses excitatrices et inhibitrices (Levinson & El-Husseini, 2005).

Le gène *DLG3* (Neuroendocrine-disc large homolog 3) impliqué aussi dans le retard mental non syndromique code pour la protéine SAP102 (synapse-associated protein 102), un membre de la famille MAGUK (membrane associated guanylate kinase) impliquée dans l'organisation des récepteurs de la synapse (Kim et Sheng, 2004). La protéine SAP102 interagit directement avec les récepteurs NMDA (N-methyl-D-aspartate) dans la densité post-synaptique (Tarpey et al., 2004).

6.3) Régulation du transport des vésicules synaptiques via les GTPases Rab

Plusieurs mutations responsables de retard mental affectent des gènes impliqués dans le transport vésiculaire et la régulation du recyclage des vésicules synaptiques via les GTPases de la famille Rab (Renieri et al., 2005). Deux protéines, l' α -GDI (guanine dissociation inhibitor I) qui inhibe la dissociation du GDP des GTPases Rab et l'ILRAPL (IL-1 receptor

accessory protein-like) qui joue un rôle inhibiteur sur la stimulation de l'exocytose dans les cellules PC12, sont mutées dans des formes non syndromique de retard mental (Renieri et al., 2005).

6.4) Régulation du cytosquelette d'actine via les GTPases de la famille Rho

Les mécanismes cellulaires et moléculaires des processus de mémorisation et des déficits cognitifs sont souvent associés à des modifications du cytosquelette neuronal (Luo, 2002).

Quatre protéines (α -PIX, FGD1, OPHN1, PAK3) responsables de retard mental lié à l'X sont des régulateurs ou effecteurs directs des Rho GTPases qui comprennent les sous familles Rho, Rac (Ras-related C3-botulinum toxin substrate) et Cdc42 (cell division cycle 42) (Chelly et Mandel, 2001).

6.4.1) α -PIX

La protéine α -PIX (α -p21-associated kinase-interacting exchange factor) codée par le gène *ARHGEF6*, est un facteur d'échange de Rac et Cdc42. Il a été montré que PIX interagit avec les protéines kinases PAK (p21-activated kinase) (Manser et al., 1998). L'importance fonctionnelle de ce complexe sera détaillée dans IV §2.2.1. La mutation identifiée chez des patients atteints de retard mental non syndromique, est située dans le premier intron du gène entraînant un saut d'exon de l'exon 2 et une délétion du domaine CH (calponin homology) de la protéine (Kutsche et al., 2000). Les conséquences biochimiques de cette délétion ne sont pas connues.

6.4.2) FGD1

Le gène *FGD1* (facio-genital dysplasia), initialement impliqué dans une dysplasie faciogénitale (Aarskog-Scott Syndrome) (Pasteris et al., 1994) est aussi associé à un retard mental non syndromique (Lebel et al., 2002). *FGD1* code pour un facteur d'échange de Cdc42. La protéine FGD1 régule le cytosquelette d'actine et la morphologie cellulaire via la cortactine qui active le complexe Arp2/3 (actin related protein) impliqué dans la nucléation de l'actine (Kim et al., 2004).

6.4.3) OPHN1

La protéine appelée oligophrénine 1 codée par le gène *OPHN1*, est un activateur de l'hydrolyse du GTP en GDP, c'est-à-dire est une GAP (GTPase activating protein) des GTPases RhoA, Rac1 et Cdc42 (Billuart et al., 1998). L'*OPHN1* a été identifié grâce à la présence d'une translocation équilibrée (X;12) chez une patiente atteinte de retard mental

(Bienvenu et al., 1997). Une recherche de gènes dans une famille candidate MRX60 a permis d'isoler une délétion du nucléotide 1578 entraînant l'apparition d'un codon stop (Billuart et al., 1998). La translocation et la délétion rendent l'ARNm instable suggérant donc que la protéine est absente chez ces patients. Depuis, d'autres mutations ont été identifiées notamment des délétions, des insertions et des mutations ponctuelles chez des patients atteints de retard mental syndromique caractérisé notamment par une hypoplasie du cervelet (Zanni et al., 2005). L'importance de l'Oligophréline dans la formation et la fonction synaptique est détaillée dans la partie III, §6.2.5.

6.4.4) PAK3

PAK3 est une sérine thréonine kinase effectrice des GTPases de la famille Cdc42 et Rac1. Quatre mutations responsables de retard mental non syndromique ont été identifiées dans le gène *PAK3*. Ces mutations sont localisées dans différentes régions fonctionnelles de la kinase et sont indiquées dans la figure 1. Trois mutations, R419X, A365E et W446S sont situées dans le domaine kinase et la mutation R67C est située à l'extrémité NH2 du domaine de liaison aux GTPases. La première mutation (R419X), identifiée dans le pedigree MRX30 résulte de la substitution d'une base C par une base T (Allen et al., 1998). Ainsi, l'arginine 419 est mutée en un codon stop (TGA) au niveau du sous domaine VII du domaine kinase dans une région 100% conservée chez les mammifères. Cette mutation conduit à une terminaison prématurée de la protéine qui est dépourvue d'activité kinase. La deuxième mutation (A365E) située dans le domaine kinase a été identifiée dans une grande famille australienne sur 5 générations (Gedeon et al., 2003). La substitution d'une base C par une base A dans l'exon 10 entraîne le remplacement d'une arginine par un résidu glutamate. La caractéristique des patients de cette famille, hormis le défaut cognitif est qu'ils présentent de grandes oreilles. La mutation R67C, identifiée dans une grande famille française, est localisée dans une région polybasique du domaine de liaison aux GTPases (Bienvenu et al., 2000). La mutation dans l'exon 2 substitue un C par un T et change l'arginine 67 en cystéine. Très récemment, une quatrième mutation (W446S) associée au retard mental a été rapportée dans le domaine kinase de PAK3. Les femmes hétérozygotes, porteuses de la mutation W446S présentent des déficiences cognitives proches de celles des hommes (Peippo et al., 2007). La substitution d'un G par un C entraîne le remplacement d'un tryptophane par une sérine. Certains patients présentent en plus du retard mental, une microencéphalie, de grandes oreilles, des défauts de langage et de l'anxiété (Peippo et al., 2007).

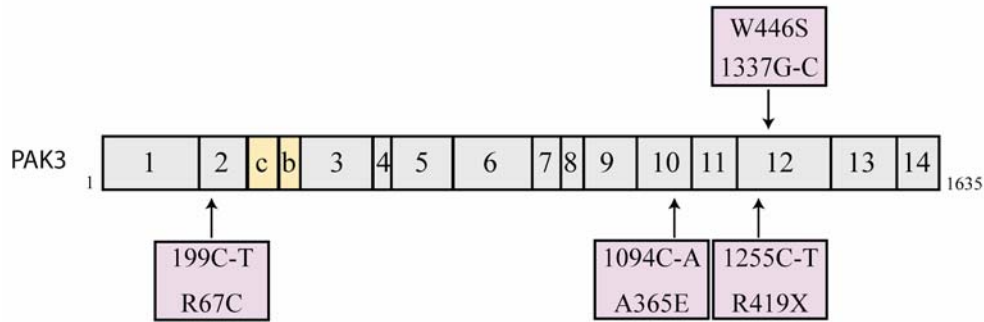


Figure 1. Représentation schématique de la séquence codante de PAK3 et la position des quatre mutations. Le gène PAK3 est formé de 15 introns (non indiqués sur le schéma) et de 16 exons codants dont 2 sont alternatifs. Les exons constitutifs sont numérotés de 1 à 14 et les deux exons alternatifs sont appelés c et b. Les localisations des 4 mutations responsables de retard mental sont notées par une flèche. La numérotation correspond à la séquence codante de PAK3.

6.4.5) La Lim Kinase 1 et retard mental syndromique

La LIM (Lin11, Isl-1 & Mec-3) Kinase 1, associée au syndrome de Williams, régule la polymérisation et la dépolymérisation de l'actine. Ce syndrome est associé à une délétion d'environ 1.5Mb du chromosome 7 qui contient environ 17 gènes dont *la LIM Kinase 1* et *l'élastine* (Donnai et Karmiloff-smith, 2000). La perte du gène de l'élastine est responsable des troubles cardiaques mais n'explique pas les symptômes cognitifs des patients. Chez la souris, l'inactivation du gène de la LIM Kinase 1 entraîne des altérations de la LTP (long term potentiation) et des troubles cognitifs (voir partie IV, §7.2) (Meng et al., 2002). Ces résultats suggèrent fortement que la délétion de la LIM Kinase soit responsable des symptômes cognitifs chez ces patients. Edwards a montré que la kinase PAK1 phosphoryle la LIM Kinase 1, sur la thréonine 508 au niveau de la boucle activatrice pour l'activer (Edwards, 1999). La LIM Kinase 1 à son tour phosphoryle la Cofiline sur la sérine 3 inhibant ainsi la dépolymérisation de l'actine (Arber et al., 1998) (voir partie III, §6.1).

Les cinq protéines oligophréniennes 1, α -PIX, FGD11, PAK3 et la LIM Kinase sont situées dans la voie de signalisation des Rho GTPases et sont responsables de retard mental syndromique ou non syndromique (voir Figure 2). Elles jouent un rôle fondamental dans la transduction du signal qui régule la dynamique du cytosquelette. De ce fait, la kinase PAK3 est au centre d'une voie de signalisation impliquée dans le retard mental et dans la dynamique du cytosquelette d'actine (voir partie IV, §5.1 et §7).

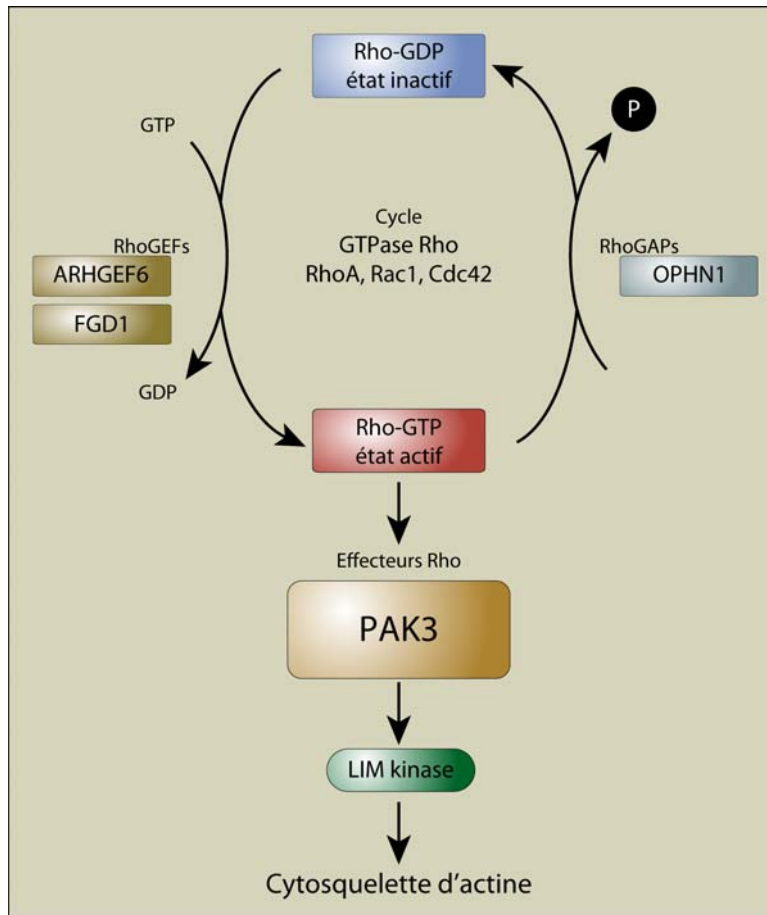


Figure 2. La voie de signalisation Rho GTPase/PAK3/actine. La kinase PAK3 est au centre d'une voie de signalisation qui contrôle le cytosquelette d'actine. Les acteurs illustrés sur la figure sont impliqués dans le retard mental. Adaptée de Chechlaz et Gleeson, 2003.

II. Processus de mémorisation et plasticité synaptique dans le cerveau des mammifères

Un des grands défis des neurosciences est l'étude des mécanismes moléculaires de l'apprentissage et de la mémorisation. L'apprentissage est l'acquisition de nouvelles informations et la mémorisation correspond à la rétention et à la capacité de rappel de l'information acquise. Plusieurs structures du cerveau jouent un rôle important dans ces processus : le néocortex et les structures du lobe temporal interne, en particulier l'hippocampe. La découverte d'un grand nombre de gènes responsables de retard mental au cours des dernières années, a permis d'apporter des éléments nouveaux sur des mécanismes cellulaires et moléculaires responsables des fonctions cognitives.

1) L'hippocampe : structure clé dans les processus d'apprentissage et de mémorisation

L'hippocampe est situé dans le cortex cérébral médianement par rapport aux ventricules latéraux (Figure 3a). C'est une structure repliée sur elle-même en deux couches. L'une des couches est le Gyrus Dentelé et l'autre la Corne d'Ammon composée de deux régions caractéristiques : CA1 et CA3 (Figure 3b). L'hippocampe est caractérisé par un circuit neuronal tri-synaptique : le cortex entorhinal envoie des informations à l'hippocampe par l'intermédiaire de la voie perforante dont les axones font synapse sur les neurones du gyrus dentelé. Ceux-ci envoient, à leur tour, leurs axones (fibres moussues) vers la zone CA3 où elles établissent des synapses avec les dendrites des cellules pyramidales. Ces dernières envoient de longs prolongements axonaux (collatérales de Schaeffer) vers les dendrites des cellules pyramidales de la zone CA1.

2) La potentialisation à long terme (LTP) dans l'hippocampe comme modèle d'étude électrophysiologique des processus mnésiques

Il y a presque un siècle, il a été proposé que l'apprentissage soit corrélé à des changements de la structure et de la fonction des neurones. En 1894, Cajal a été le premier à suggérer que la mémoire est stockée grâce à l'établissement de nouvelles connections synaptiques (Cajal, 1894). En 1949, Hebb proposa que l'activité simultanée de deux neurones connectés puisse renforcer leur connectivité. La LTP découverte par Bliss et Lømo dans le Gyrus Dentelé de l'hippocampe est un modèle d'étude des phénomènes d'apprentissage et de mémorisation (Bliss et Lømo, 1973). La LTP peut être induite par des stimulations électriques haute fréquence et se traduit par une augmentation importante et durable de l'efficacité de la transmission synaptique au niveau de la synapse stimulée. Les modifications qui sous-tendent la potentialisation sont seulement localisées au niveau des synapses activées, ce qui rend le phénomène très spécifique. Les acteurs de la transmission synaptique excitatrice dans l'hippocampe sont les récepteurs au glutamate parmi lesquels on distingue les récepteurs NMDA et les récepteurs AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isolaxone propionate). Ce sont des récepteurs-canaux perméables aux cations qui se différencient par leurs propriétés cinétiques et leur perméabilité au calcium. La potentialisation d'une synapse excitatrice requiert dans un premier temps une dépolarisation de l'élément post-synaptique (*via* l'activation des récepteurs AMPA) permettant la levée du bloc Mg^{2+} des récepteurs NMDA. Ceci provoque l'activation de ces derniers et une entrée massive de calcium dans l'élément post-synaptique. Plusieurs voies de signalisation sensibles au calcium sont alors activées, notamment la voie de la CaMKII (calcium/calmodulin-dependent kinase II) ou de l'AMPC (adenosine monophosphate cyclic) qui active la PKA (proteïn kinase A) (Figure 4). Ces kinases peuvent alors phosphoryler localement des récepteurs, modifier leurs propriétés intrinsèques et leur insertion à la membrane, ou activer des voies de signalisation menant à la modification de l'expression génique (Cooke et Bliss, 2006). Ainsi, l'expression précoce de la LTP (voir paragraphe suivant) résulte principalement d'une augmentation du nombre de récepteurs AMPA au niveau de la membrane post-synaptique (Lu et al., 2001). Pour une même stimulation pré-synaptique, la réponse post-synaptique sera alors plus grande après induction de la LTP puisque un plus grand nombre de récepteurs AMPA sera activé.

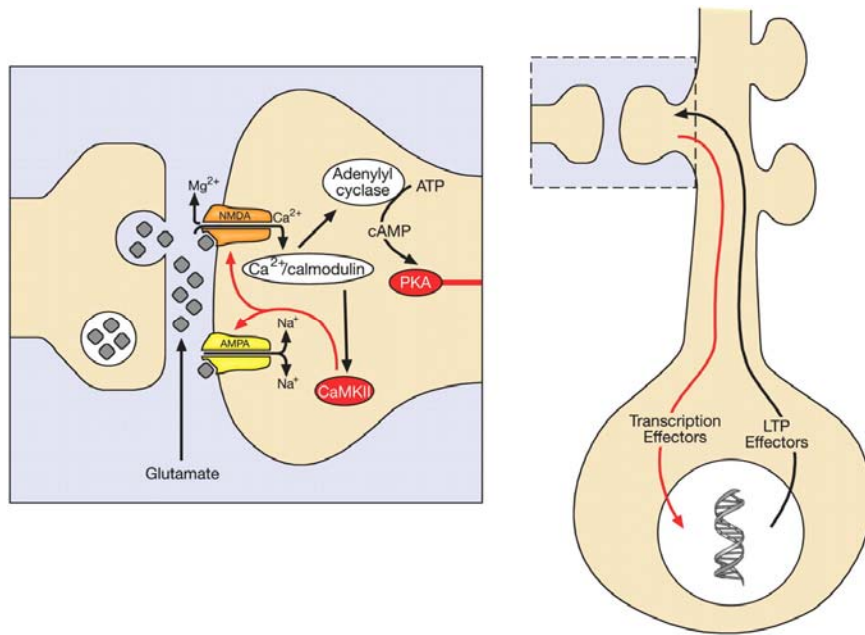


Figure 4. Mécanismes intracellulaires de la LTP initiée par l'activation des récepteurs NMDA. L'influx de calcium par les récepteurs NMDA permet d'activer plusieurs kinases. La CaMKII activée par le Ca^{2+} et la calmoduline va modifier la transmission synaptique en phosphorylant les récepteurs au glutamate ou en permettant l'insertion de nouveaux récepteurs à la membrane. La PKA, dépendante de l'AMPc est impliquée dans la régulation de la transcription de gènes dont les protéines sont nécessaires à la LTP. D'après Cooke et Bliss, 2006.

La LTP est divisée en deux phases, une phase précoce E-LTP (early phase-LTP) indépendante de la synthèse protéique et une phase tardive L-LTP (late phase-LTP) dépendante de la synthèse protéique (Pfeiffer et Huber, 2006). Chez les rongeurs, la LTP précoce qui dure environ 1h, est souvent induite par une seule série de stimulations haute fréquence et est médiée par des modifications post-traductionnelles de protéines déjà existantes. La LTP tardive qui dure plus de 4h, nécessite des stimulations "tétaniques" répétées et espacées ainsi que la synthèse de protéines. Cette synthèse protéique est à l'origine du maintien des phénomènes de LTP et LTD (long term depression) par la régulation du transport des récepteurs AMPA ou la stabilisation de la structure post-synaptique, ce qui permet de maintenir les récepteurs à la synapse (Pfeiffer et Huber, 2006).

Contrairement à la LTP, la LTD peut être induite par une série de stimulations électriques à basses fréquence et conduit à une diminution de la transmission synaptique. Généralement, la LTD nécessite l'activation des récepteurs NMDA, un faible influx de calcium et l'activation d'une cascade de sérine/thréonine phosphatases. Parfois, l'influx calcique peut aussi provenir d'autres sources, notamment de stocks internes de calcium ou de l'activation de récepteurs métabotropiques mGluR (metabotropic glutamate receptor) couplés à des protéines G hétéro-

trimériques (Massey et Bashir, 2007). L'induction de la LTD est principalement liée à une diminution du nombre de récepteurs AMPA à la membrane post-synaptique et à une diminution de la probabilité d'ouverture du canal du récepteur AMPA suite à sa déphosphorylation (Malenka et Bear, 2004) (Figure 5). Le transport et le turnover des récepteurs AMPA jouent un rôle important dans les changements d'efficacité synaptique pendant la LTP et la LTD. Les processus de mémorisation impliquent donc la régulation fine de l'expression et de la modulation des récepteurs AMPA.

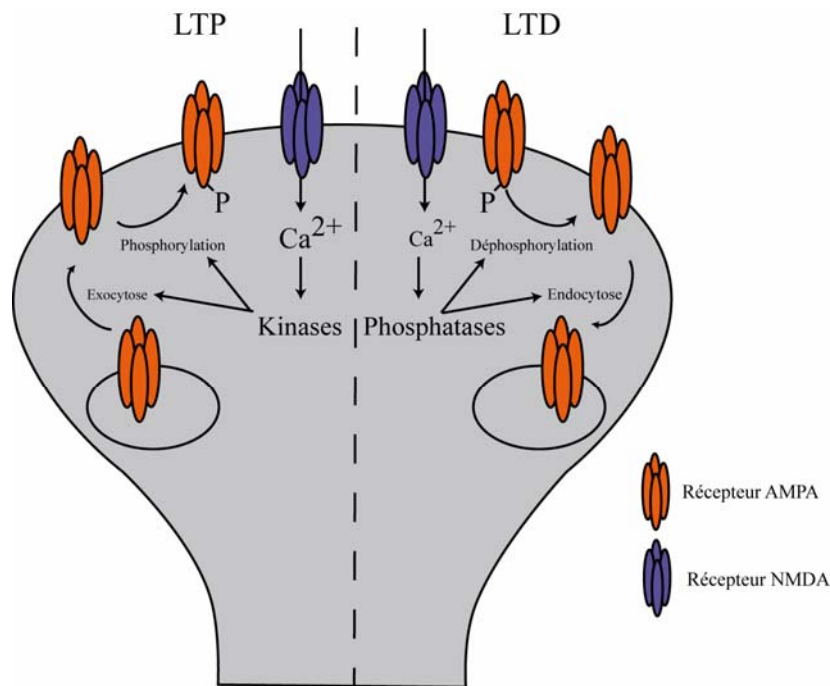


Figure 5. Induction différentielle des phénomènes de LTP et LTD au niveau de la synapse. Lors de la LTP, une forte entrée de calcium permet l'activation de kinases qui augmentent la transmission synaptique en augmentant le nombre de récepteurs AMPA à la membrane. Au contraire, lors de la LTD, une entrée de calcium modérée active des phosphatases responsables de la diminution de l'efficacité synaptique en réduisant le nombre de récepteurs AMPA à la membrane. D'après Malenka et Bear, 2004.

3) Les voies de signalisation fondamentales dans la plasticité synaptique

Il existe quatre principales régulations permettant d'induire et de maintenir la LTP : la régulation génique, la synthèse protéique, la régulation du cytosquelette d'actine et la régulation des mécanismes d'endocytose et d'exocytose.

3.1) La régulation génique

La voie de la CaM Kinase, plus particulièrement la CamKI et CamKIV ainsi que la voie de l'AMPC, permettent d'induire l'expression génique via le facteur de transcription CREB (Adams et Sweatt, 2002). Récemment, il a été montré qu'un régulateur de CREB, dénommé TORC (Transducer of regulated CREB) transloque dans le noyau suite à l'activité neuronale. Cette translocation est indispensable pour permettre l'activation transcriptionnelle de CREB (Wu et al., 2007). Les voies des MAP Kinases jouent aussi un rôle clé dans les phénomènes de plasticité synaptique pour contrôler la transcription (Thomas et Huganir, 2004). La cascade de signalisation ERK/MAPK (extracellular-signal regulated kinase/mitogen-activated protein kinase) a été particulièrement bien étudiée dans ces processus (Adams et Sweatt, 2002). L'activation des GTPases Ras permet l'activation du premier module la MAPKKK Raf-1 qui phosphoryle la MAPKK Mek1/2. Une fois activée, ce deuxième module phosphoryle la kinase ERK. Parmi les cibles de ERK, on retrouve notamment les protéines nucléaires comme CREB (Adams et Sweatt, 2002). L'inhibition de l'activation des ERK diminue la LTP et inhibe la formation de nouvelles épines dendritiques (voir partie III pour l'importance des épines dendritiques dans la plasticité synaptique) (Thomas et Huganir, 2004). Par ailleurs il a été montré récemment que des mutations dans 2 gènes qui contrôlent l'activation de ERK, *K-ras* et *B-raf* sont associées au syndrome CFC (Cardio-facio-cutaneous syndrome) caractérisé par un faciès déformé, des défauts cardiaques et un retard mental (Rodriguez-Viciana et al., 2006 ; Niihori et al., 2006). Un autre argument de l'importance de la voie des MAP Kinases ERK dans la plasticité synaptique vient de SynGAP, une GAP de Ras. SynGAP est une protéine abondante de la densité post-synaptique qui interagit directement avec la protéine d'échafaudage PSD-95 (post-synaptique densité-95) (Figure 14) (Dosemeci et al., 2007 ; Vazquez et al., 2004). La perte d'expression de *SynGAP* chez les souris KO (Knock out), accélère la formation des synapses, en augmentant notamment la largeur des épines dendritiques (Vazquez et al., 2004). Une deuxième voie des MAP Kinases impliquées dans la plasticité synaptique est la voie de la GTPase Rap située en amont de la MAP Kinase JNK/p38. Alors que la voie ERK est impliquée l'induction de la LTP, la voie JNK serait impliquée dans celle de la LTD (Thomas et Huganir, 2004). SPAR (spine-associated

RapGAP) est une GAP de Rap qui interagit avec PSD-95 et régule la forme des épines dendritiques (Pak et al., 2001). Il a été montré que SPAR est directement phosphorylée par SNK (serum-inductible kinase) ce qui entraîne l'ubiquitination et la dégradation de SPAR et une diminution du nombre d'épines dendritiques (Pak et Sheng, 2003).

3.2) La synthèse protéique

Le maintien de la LTP et la LTD nécessite la synthèse de protéines impliquées dans les phénomènes de plasticité synaptique (Kandel, 2001). La kinase TOR (target of rapamycin) impliquée dans la plasticité synaptique, contrôle la traduction via la phosphorylation du répresseur de la traduction 4E-BP1 (eucaryotic translation initiation factor (eIF) 4E -binding protein 1) et de S6K (S6 kinase) (Hay et Sonenberg, 2004). Il a été montré que la Rapamycin, un inhibiteur de l'activité de TOR pouvait inhiber la LTP (Hay et Sonenberg, 2004). Par ailleurs, la protéine FMRP qui régule la stabilisation des ARNm, et dont la perte de fonction est responsable du syndrome de l'X fragile, est impliquée dans la LTD dépendante du récepteur mGluR (Bear et al., 2004). La protéine FMRP inhibe la traduction protéique, notamment MAP1B (microtubule-associated protein 1B translation), impliquée dans la stabilité des microtubules au cours du développement neuritique et synaptique (Lu et al., 2004).

Il était longtemps supposé que les protéines nécessaires au fonctionnement des neurones provenaient du corps cellulaire. Pourtant, en 1982, Steward et Levy ont détecté par microscopie électronique des polyribosomes dans les dendrites (Steward et Levy, 1982). Grâce à l'utilisation de précurseurs de l'uridine et de l'hybridation in situ, la présence d'ARNm spécifiques a été montrée dans les dendrites de neurones d'hippocampe en culture (Martin et Zukin, 2006). Par ailleurs, il a été montré que des stimulations électriques pouvaient augmenter la concentration de messagers ou de protéines spécifiques dans les dendrites en réponse à une stimulation. C'est le cas notamment pour la CaMKII dont la concentration dendritique augmente suite à une stimulation tétanique (Ouyang et al., 1999) ou le facteur d'élongation eEF1A, dont l'expression dans les dendrites est augmentée par la LTP et bloquée par des inhibiteurs de la traduction (Tsokas et al., 2005).

3.3) La régulation du cytosquelette d'actine

Voir parties I §6.4 et III §6.1

3.4) La régulation de l'endocytose

L'endocytose et l'exocytose sont des mécanismes indispensables à la libération ou la recapture des neurotransmetteurs au niveau pré-synaptique. Au niveau post-synaptique, l'endocytose, l'exocytose ainsi que la diffusion latérale sont des phénomènes clés nécessaires au trafic de protéines, notamment des récepteurs AMPA, pour permettre les changements d'efficacité synaptique pendant la LTP et la LTD. L'endocytose est médiée par les vésicules à clathrines qui forment un manteau regroupant les protéines nécessaires à l'internalisation et au recyclage de protéines membranaires. Parmi celles-là, la dynamine en formant un oligomère autour de son cou, permet la scission de la vésicule à clathrine. Des zones d'endocytose riches en clathrine ont été identifiées dans les épines dendritiques. Ces régions sont proches mais distincts de la densité post-synaptique (Blanpied et Ehlers, 2004). Récemment, il a été montré que la dynamine-3 qui est enrichie dans le cerveau permet de stabiliser les zones d'endocytose en formant un complexe avec les protéines d'échafaudages Shank et Homer (Lu et al., 2007 ; Jaskolski et al., 2007). En effet, Homer qui interagit avec la dynamine-3 et avec Shank permet de faire le lien entre la densité post-synaptique où se localise Shank et la zone d'endocytose où se trouve la dynamine-3. De plus, la perte d'expression de *Homer*, entraîne une délocalisation de la zone d'endocytose et une diminution du nombre de récepteurs AMPA à la membrane. Ces résultats suggèrent que la zone d'endocytose est impliquée dans la capture des récepteurs AMPA qui quittent la densité post-synaptique pour éviter leur diffusion loin de la synapse et permettre ainsi un recyclage rapide des récepteurs (Figure 6).

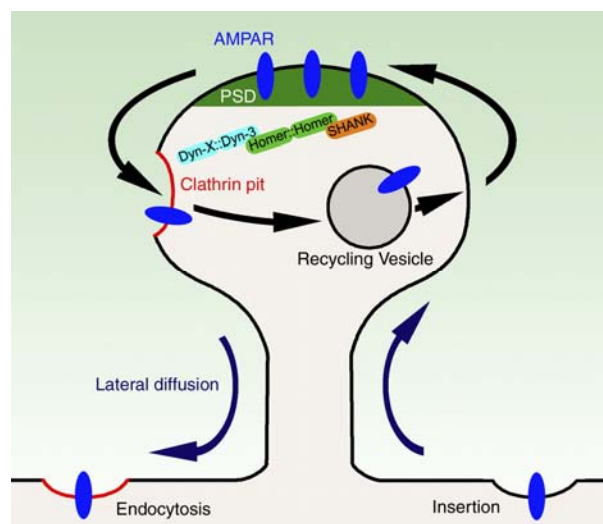


Figure 6. Régulation du recyclage des récepteurs AMPA par endocytose. Les récepteurs AMPA (en bleus foncés) diffusent latéralement jusqu'à la zone d'endocytose (en rouge) pour être internalisés et recyclés. Les protéines Homer (en verts) interagissent avec Shank (en orange) et la Dynamine 3 (en bleu clair) qui peut dimériser avec d'autres dynamines. D'après Jaskolski et al., 2007.

III. Rôle fonctionnel des épines dendritiques dans la plasticité synaptique

1) Les neurones sont des cellules polarisées

Les neurones sont formés schématiquement de cinq régions de morphologie distincte : 1) le corps cellulaire (ou soma), 2) les dendrites, 3) l'axone, 4) les terminaisons pré-synaptiques et 5) les terminaisons post-synaptiques (Figure 7). La plupart des corps cellulaire des neurones ont un diamètre de 10 à 50 μm . Le corps cellulaire donne généralement naissance à un seul axone. Les axones et les dendrites diffèrent par leur fonction, leur structure et par leur composition en protéines et organelles. Alors que les axones peuvent atteindre des longueurs très importantes, les dendrites font rarement plus de 2 mm de longueur. Le rôle premier de l'axone est de conduire le message nerveux jusqu'à la terminaison pré-synaptique où les neurotransmetteurs sont libérés dans la fente synaptique. Les dendrites reçoivent et intègrent l'information au niveau des structures post-synaptiques ; celles-ci peuvent être organisées en épines dendritiques.

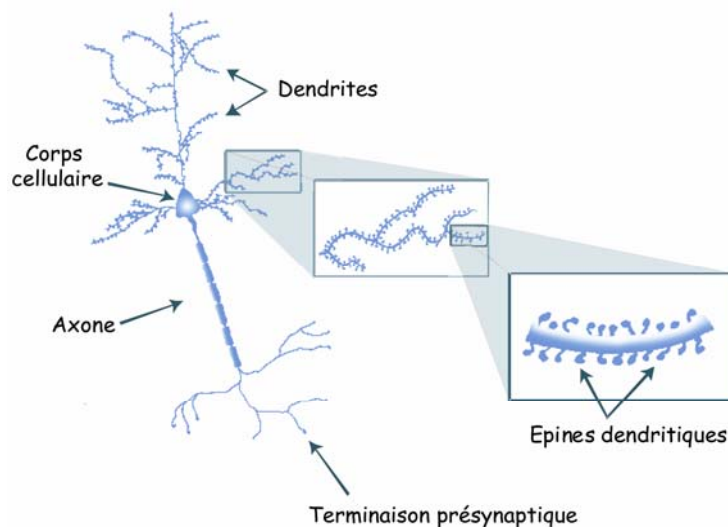


Figure 7. Représentation schématique de la structure d'un neurone

2) Structure des épines dendritiques

Les épines dendritiques sont de petites protrusions de l'ordre du micron situées le long des dendrites et qui forment l'élément post-synaptique de la plupart des synapses. On les retrouve sur les neurones pyramidaux glutamatergiques du cortex et de l'hippocampe ainsi que sur les neurones de Purkinje GABAergiques (Yuste et Bonhoeffer, 2004). Elles jouent un rôle

fondamental dans la transmission synaptique et la plasticité. L'existence des épines est connue depuis un siècle mais leur organisation structurale n'a été que récemment étudiée et commence à être mieux connue. Les épines matures sont formées d'une tête (0.5-2 μm de diamètre) et d'un cou (0.04-1 μm) (Calabrese et al. 2006). Leur densité peut atteindre 10 épines par μm . Malgré leur petite taille, les épines sont des structures autonomes qui possèdent toutes les molécules nécessaires à la signalisation post-synaptique, à la machinerie traductionnelle, à l'endocytose (Pfeiffer et Huber, 2006 ; Racz et al., 2004). Cette compartimentation permet ainsi des changements spécifiques d'une épine individuelle, indépendamment de ses voisines.

Les épines dendritiques sont des structures très dynamiques, leur nombre et leur forme pouvant varier au cours du temps. On distingue plusieurs types de protrusions : des filopodes caractérisés par un long prolongement sans cou ni élargissement à l'extrémité, des épines matures avec un cou large et court et une grosse tête appelées "mushroom-shaped spines" et des épines de dimensions plus restreintes avec un cou très court, appelées "stubby spines" (Figure 8). Enfin, on retrouve des épines branchées, où deux ou plusieurs têtes émergent du même cou (Yuste et Bonhoeffer, 2004).

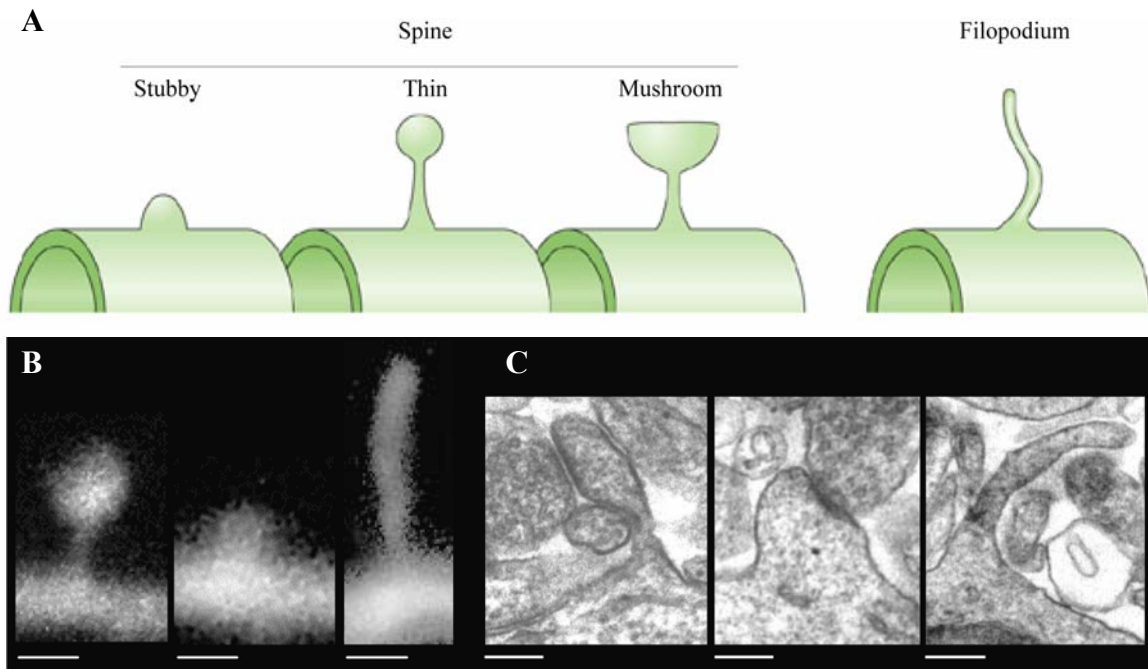


Figure 8. Les différentes morphologies des épines dendritiques. A. Schéma des différents types d'épines. B/C. Structure des épines dendritiques de neurones d'hippocampe imagées en microscopie confocale (B) et en microscopie électronique (C). Gauche : "mushroom-shaped spine", au centre : "stubby spine", à droite : filopode. Echelle : 0.5 μm . D'après Yuste et Bonhoeffer, 2004 et De Roo et al., 2007.

La structure des épines se caractérise par plusieurs domaines fonctionnels, une matrice compacte localisée juste sous la membrane post-synaptique appelée densité post-synaptique (PSD : "post synaptic density") (voir partie III, §6.2), le cytosquelette d'actine (voir partie III, §6.1), ainsi que des domaines de trafic membranes permettant l'endocytose et l'exocytose (Blanpied et Ehlers, 2004).

3) La régulation de la morphologie des épines est dépendante de l'activité synaptique

Plusieurs études montrent clairement que la plasticité synaptique est associée à des changements de la morphologie des épines et du nombre d'épines. Alors que la LTP est associée à un élargissement de la tête de l'épine, la LTD entraîne plutôt une rétraction des épines (Tada et Sheng, 2006) (Figure 9). Il existe une corrélation entre la taille de l'épine et l'efficacité synaptique reliée vraisemblablement par le nombre important de récepteurs AMPA dans les épines à tête large (Kasai et al., 2003). Les épines larges sont stables et peu plastiques, elles maintiennent les connections existantes alors que les petites épines sont instables, plus mobiles et plus facilement potentialisable ce qui leur permet de donner naissance à une épine large.

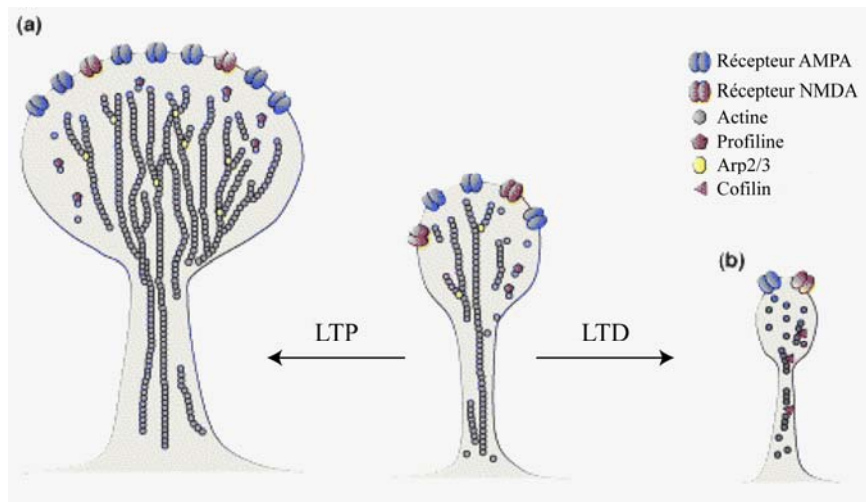


Figure 9. La morphologie des épines et l'activité synaptique. La LTP et la LTD entraînent des changements de la polymérisation de l'actine et de la morphologie des épines. **a)** Élargissement de la tête de l'épine, polymérisation de l'actine et recrutement de récepteurs AMPA. **b)** Rétrécissement de l'épine et dépolymérisation de l'actine. D'après Tada et Sheng, 2006.

En plus des changements de la forme de l'épine, le nombre des épines peut aussi être modifié suite à une augmentation de l'activité synaptique. Dans l'hippocampe, la LTP induit une

augmentation de la densité des épines dendritiques et un apprentissage par test de conditionnement associatif chez le rat augmente le nombre d'épines dendritiques (Figure 10).

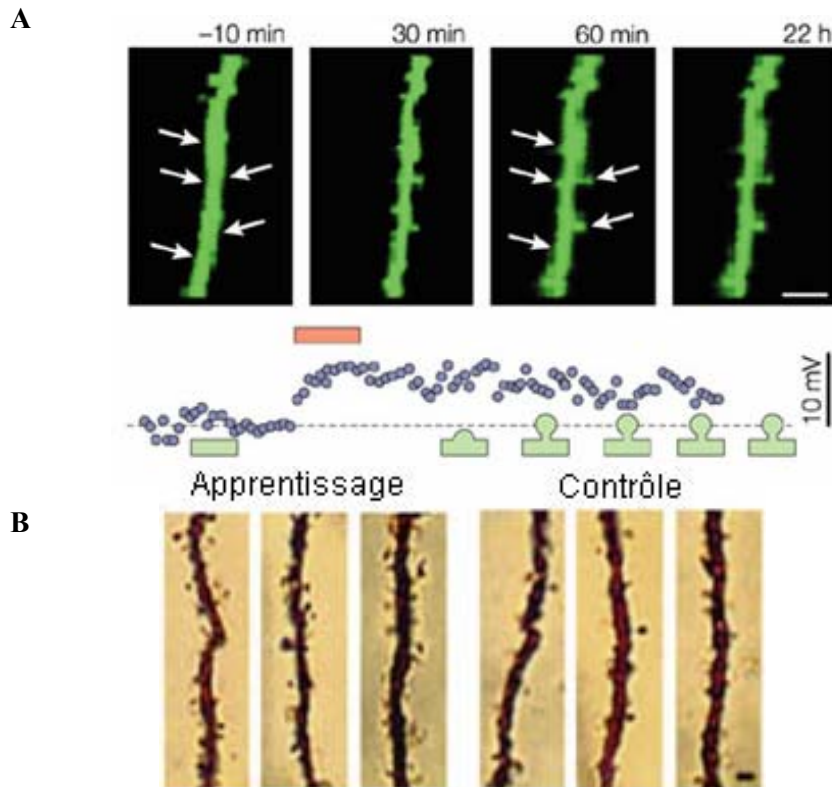


Figure 10. La densité des épines et l'activité synaptique.

La LTP (A) ainsi que l'apprentissage (B) induisent la croissance des épines dendritiques.

(A) La LTP est induite dans l'hippocampe et les épines sont visualisées par microscopie biphotonique.

(B) 24h après un apprentissage chez le rat, la densité des épines de l'hippocampe est visualisée par coloration de Golgi. D'après Lamprecht et LeDoux, 2004.

4) Des anomalies de morphologie des épines dendritiques sont associées au retard mental

La morphologie des épines dendritiques varie en fonction de plusieurs facteurs : la mémorisation, la stimulation électrique, l'âge, les hormones. De plus, leurs formes sont altérées dans certaines pathologies comme la malnutrition, l'alcoolisme, le retard mental (Fiala et al., 2002 ; Tada et Sheng, 2006, Lamprecht et LeDoux, 2004) (Figure 11). On distingue des anomalies de densité d'épines, de taille d'épines avec des modifications de la longueur du cou et de la taille de tête ainsi que des distorsions totales de la forme de l'épine pouvant aller jusqu'à l'altération des organelles de l'épine dans des cas extrêmes d'œdèmes cérébraux (Fiala et al., 2002, Purpura, 1974). Des anomalies de morphologie des épines

dendritiques ont été répertoriées dans des retard mentaux de sévérité variable comme la trisomie 21, le syndrome de l’X fragile ou le Syndrome de Rett (Fiala et al., 2002).

Les synapses se sont avérées être des sites fonctionnels importants des protéines associées au retard mental. En effet un nombre important de gènes XLMR (X-linked mental retardation) est impliqué dans leur formation, leur structure et leur fonction.

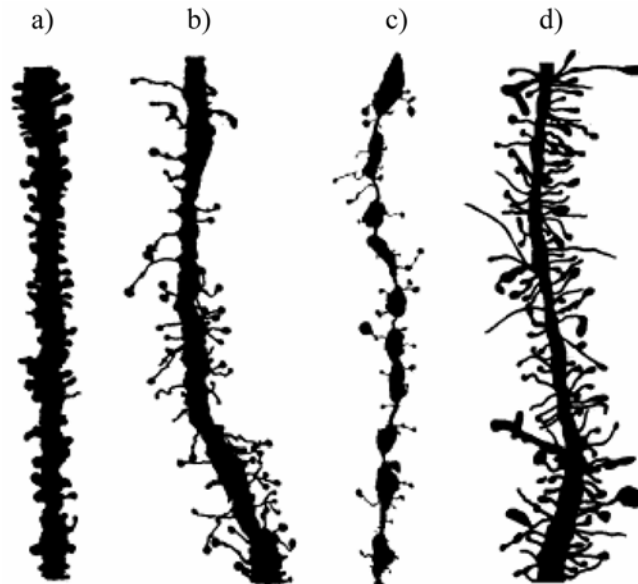


Figure 11. Illustration de dendrites apicales de cellules pyramidales du cortex cérébral humain. a) Dendrite d’un enfant de 6 mois. b) Dendrite d’un enfant de 10 mois atteint de retard mental. c) Dendrite d’un enfant de 5 mois avec un retard mental sévère. d) Dendrite d’un adulte atteint de syndrome de l’X fragile. Dans les cas de retard mentaux, les épines sont anormalement longues, fines et tordues avec une densité modifiée. D’après Fiala et al., 2002 et Purpura, 1974.

5) La spinogénèse

La formation des épines a lieu à deux périodes, pendant le développement du système nerveux suite à l’extension des dendrites et des axones, mais aussi tout au long de la vie, dans le système nerveux mature, pour stabiliser, éliminer, ou renforcer un contact synaptique. Le réseau neuronal se forme et se renouvelle grâce à la structure très dynamique des épines dendritiques (De Roo et al., 2007). Malgré le développement des techniques d’imagerie, les mécanismes qui régulent la formation et la stabilisation d’une épine nouvellement formée sont mal connus. Plusieurs modèles de spinogénèse ont été avancés (revue de Yuste et Bonhoeffer, 2004) (Figure 12). Sotelo propose un modèle dans lequel la formation d’une épine est une propriété intrinsèque du neurone et indépendante de la terminaison pré-synaptique. Le modèle de Millers/Peters propose que les terminaisons nerveuses afférentes induisent la formation des épines. Dans ce cas, la partie pré-synaptique vient au contact du dendrite pour induire

l'allongement et la maturation de l'épine. Enfin, un troisième modèle "filopodial" est basé sur la formation au préalable d'un filopode précurseur de l'épine, qui va contacter un axone pour induire l'élément pré-synaptique et former une épine mature. Pour ces trois modèles, une fois formée, l'épine se stabilise pour former une grosse tête avec une forte concentration de PSD95 (Post Synaptique Densité 95) dépendante de l'activité synaptique (De Roo et al., 2007). Une question importante est de savoir si les différents types d'épines se forment par les mêmes mécanismes ou bien si les mécanismes varient d'un type de neurone à un autre, à différents endroits de l'arborisation axono-dendritique, voire même au cours de la vie, développement versus adulte.

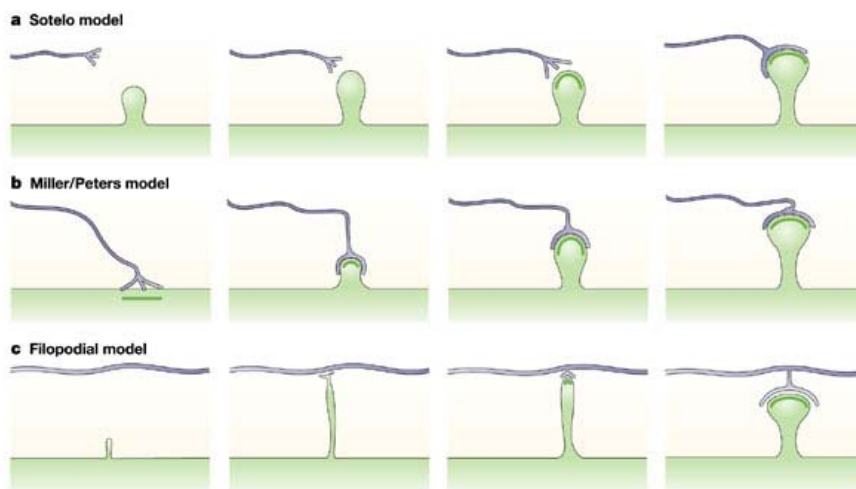


Figure 12. Trois modèles de spinogénèse. **a)** Dans le modèle de Sotelo, les épines émergent de façon indépendante de la terminaison axonale. **b)** Dans le modèle de Miller/Peters, la terminaison axonale induit la formation de l'épine. **c)** Dans le modèle filopodial, le filopode capture une terminaison axonale et forme une épine. D'après Yuste et Bonhoeffer, 2004.

6) Mécanismes moléculaires de la morphogénèse de l'épine dendritique

En aval des médiateurs de la transmission synaptique (i.e. récepteurs au glutamate) se situent de nombreuses voies de signalisation qui contrôlent la dynamique du cytosquelette responsable de l'architecture de l'épine.

6.1) La dynamique de l'actine et la forme de la synapse

L'actine constitue l'élément majeur du cytosquelette des épines dendritique sous forme polymérisée filamenteuse (F-actine) mais il existe aussi un pool monomérique globulaire (G-actine) (Matus et al., 1982). La polymérisation de l'actine débute par une première phase de nucléation de l'actine pour assembler les premières molécules d'actine en noyaux de

nucléation. L'extrémité notée (+) de l'actine (barbed end) va avoir tendance à capter en très grande majorité de l'ATP-actine, favorisant ainsi la polymérisation à cette extrémité (Chen et al., 2004). Pour permettre la dépolymérisation de l'actine, l'ATP est hydrolysé et un monomère ADP-actine est relargué à l'extrémité noté (-) de l'actine (pointed end) (Figure 13). Le renouvellement de l'actine est finement régulé par de nombreuses protéines de liaison à l'actine (Paavilainen et al., 2004). On distingue notamment des protéines impliquées dans la nucléation de l'actine comme le complexe Arp2/3 (actin-related protein 2/3), des protéines de liaison à l'actine globulaire ou filamentueuse, favorisant la polymérisation comme la profiline ou entraînant la dépolymérisation de l'actine comme la Cofiline. D'autres protéines comme la filamine A permettent d'assembler l'actine en réseaux orthogonaux. Il est intéressant de noter que certaines mutations du gène qui code pour la filamine A sont responsables de syndromes associés à un retard mental (Feng et Walsh, 2004). Les membres de la famille ADF/Cofiline augmentent le renouvellement et le dynamisme de l'actine en augmentant l'association et la dissociation des monomères d'actine du côté (+) et (-) respectivement (Chen et al., 2000). La Cofiline se lie avec une forte affinité à l'ADP-G-actine et inhibe l'échange de l'ADP en ATP. Au contraire la profiline qui entre en compétition avec la Cofiline pour fixer les monomères d'actine-G-ADP, favorise cet échange (Paavilainen et al., 2004). L'activité de la Cofiline est inhibée par la phosphorylation de la LIM Kinase sur la sérine 3 (Arber et al., 1998). La dynamique locale de l'actine est déterminante dans les processus de LTP, dans la formation, le changement de la morphologie et la mobilité de l'épine (Fukazawa et al., 2003 ; Fischer et al., 1998).

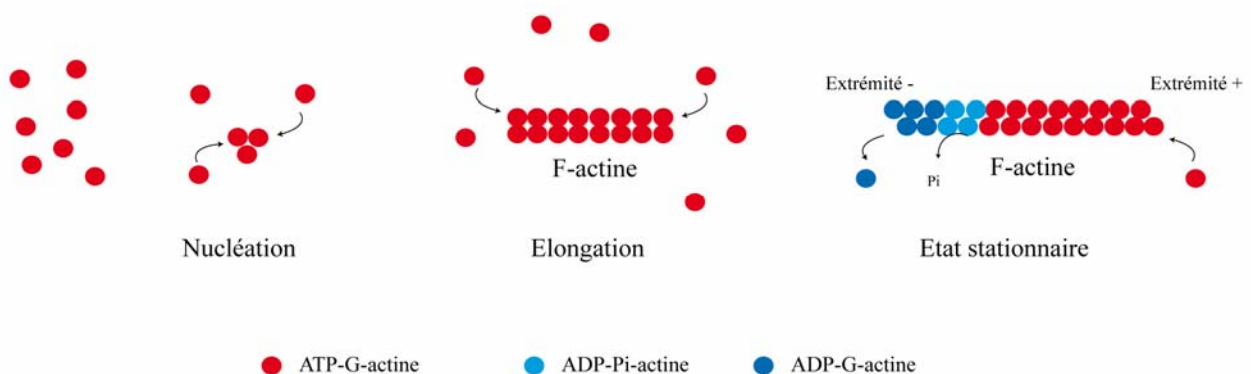


Figure 13. La polymérisation de l'actine a lieu en trois étapes. La phase de nucléation permet l'association de trois monomères d'actine et constitue l'étape limitante de la polymérisation. Lorsque la concentration en G-actine est suffisante, la polymérisation est plus importante que la dépolymérisation, permettant ainsi l'élongation. A l'état stationnaire, la dépolymérisation à l'extrémité (-) est égale à la polymérisation à l'extrémité (+). Adapté de Chen et al., 2000.

La manipulation du cytosquelette d'actine avec des agents pharmacologiques pour inhiber la polymérisation ou la dépolymérisation de l'actine a un effet marqué sur la structure des épines et la localisation des protéines synaptiques (Dillon et Goda, 2005). Au cours de la spinogénèse, l'expression de l'actine augmente et la surexpression de l'actine dans des neurones de tranches d'hippocampe induit une augmentation de la densité des épines (Jonhson et Ouimet, 2006). De plus, une augmentation de la quantité d'actine dans les épines dendritiques est observée suite à une stimulation tétanique, phénomène inhibé par la latrunculin-A qui empêche la polymérisation de l'actine (Rex et al., 2007). Il existe de nombreuses voies de signalisation au sein de l'épine qui contrôlent la polymérisation de l'actine et le maintien d'un pool important de monomères d'actine, et qui répondent à différents signaux transmembranaires (Dillon et Goda, 2005).

6.2) L'épine dendritique comprend de nombreux récepteurs et protéines de signalisation

La densité post-synaptique de l'épine permet d'ancrer et de regrouper de nombreux récepteurs et protéines de signalisation. De nombreuses études biochimiques ont été menées pour identifier les différents composants du complexe. Récemment, 288 protéines ont été identifiées dans la densité post-synaptique en purifiant par affinité la fraction insoluble de la PSD avec un anticorps anti-PSD-95 (Dosemeci et al., 2007). Parmi les protéines de l'épine dendritique, on distingue les récepteurs de surface, les protéines d'échafaudage, les GTPases de la famille Rho, les régulateurs et effecteurs de ces GTPases et les molécules d'adhésions (Figure 14).

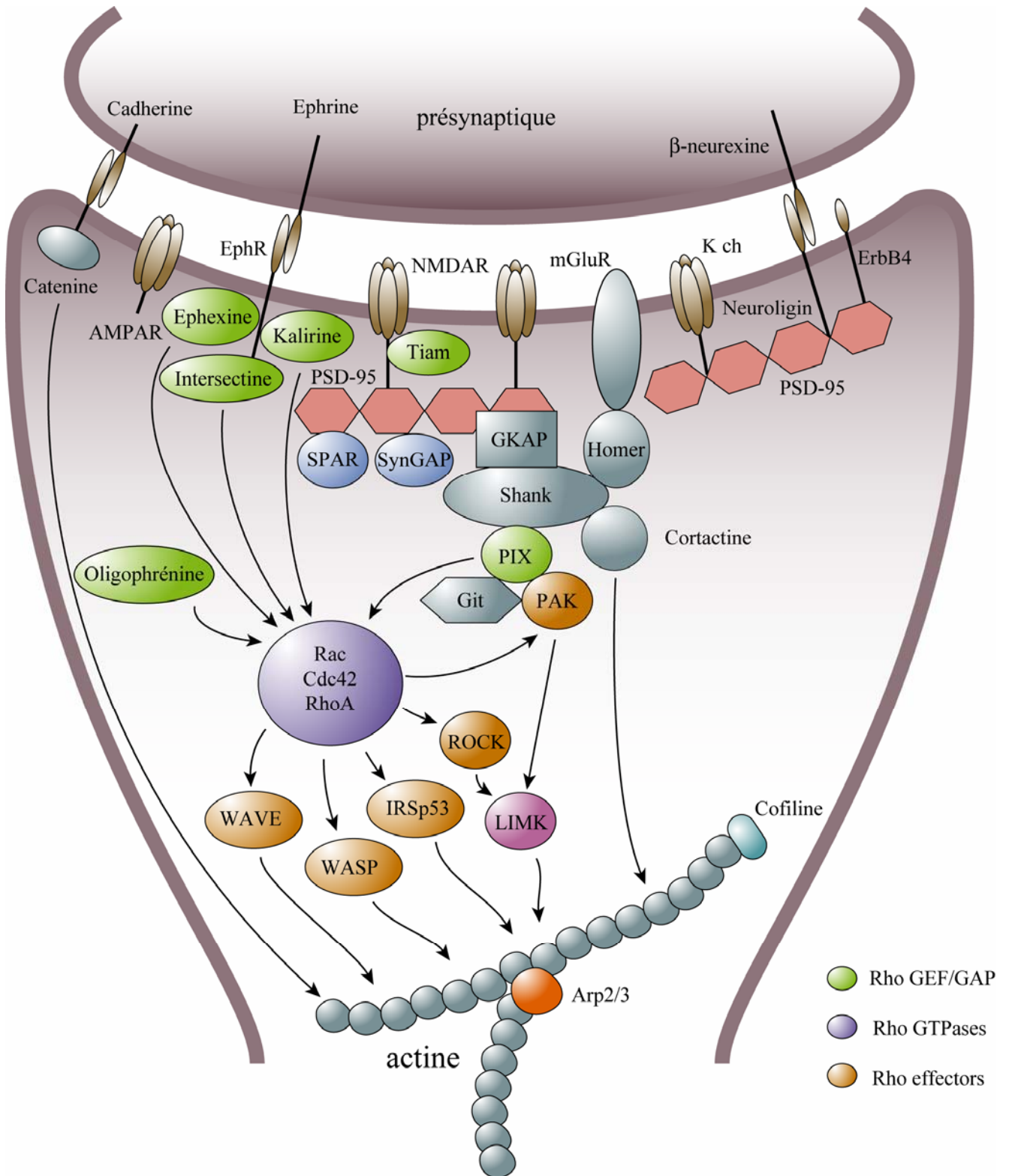


Figure 14. La régulation de l'actine dans la densité post-synaptique. Plusieurs voies de signalisation qui régulent l'actine sont indiquées sur le schéma. De part leur rôle central dans la régulation du cytosquelette, les GTPases Rho (en violet), leurs régulateurs (en vert) et leurs effecteurs (en orange) régulent la morphologie des épines dendritiques.

6.2.1) Les récepteurs de surface

De nombreux récepteurs et canaux ioniques sont situés au niveau de la densité post-synaptique. Ils sont entre autres responsables de l'activation de cascades de signalisation qui contrôlent la dynamique du cytosquelette d'actine (Figure 14). On distingue les récepteurs canaux au glutamate : AMPA et NMDA ainsi que les récepteurs métabotropiques du groupe I (mGluR). Parmi les récepteurs à activité tyrosine kinase situés dans la densité post-synaptique, on distingue plusieurs membres de la grande famille de récepteurs des éphrines (Eph) (Aoto et Chen, 2006). Les Ephs sont des récepteurs transmembranaires qui sont regroupés en deux familles, les Eph A et les Eph B. Les éphrines de type A ou B sont des ligands membranaires pré-synaptiques qui forment le signal extracellulaire pour activer respectivement en trans les Ephs A et B situées dans la membrane post-synaptique. Les EphA4, EphB1, EphB2 et EphB3 sont localisés au niveau des épines et jouent un rôle important dans leur morphogenèse. Chez la souris, alors que la spinogenèse des mutants individuels EphB1, EphB2 et EphB3 est peu affectée, la triple invalidation altère profondément ce processus (Henkemeyer, 2003). Au contraire, l'invalidation de Eph4 seule provoque une forte anomalie de formation des épines (Murai et al., 2003). Les voies de signalisation mises en jeu dans la régulation de la morphogenèse des épines par les Ephs commencent à être comprises et plusieurs mécanismes ont été décrits.

Le premier article du groupe de R. Huganir, montre que l'éphrin B régule la morphogenèse des épines dendritiques via le recrutement et la phosphorylation des récepteurs EphB, le recrutement du facteur d'échange spécifique de Rac1, la Kalirine, et l'activation de Rac1, entraînant celle de PAK (Penzes, 2003). L'EphB peut aussi réguler la morphologie des épines en recrutant FAK (focal adhesion kinase) pour permettre l'activation de la GTPases RhoA (Moeller et al., 2006) ou en recrutant un facteur d'échange spécifique de Cdc42, l'intersectine, pour permettre l'activation de Cdc42 (Irie et Yamaguchi, 2002). Par ailleurs, l'activation de EphA4 entraîne la rétraction de l'épine en recrutant la Cdk5 (cyclin-dependant kinase 5), qui active le facteur d'échange spécifique de RhoA, l'ephexine 1 (Fu et al., 2007). ErbB4 est un autre récepteur à activité tyrosine kinase de la famille des EGF (epidermal growth factor) situé dans la densité post-synaptique et qui joue un rôle important dans la structure et la fonction des synapses. Son ligand est la neuréguline-1 qui est impliquée dans la schizophrénie. Alors que la surexpression de *ErbB4* augmente la taille des épines dendritiques, sa perte d'expression réduit fortement la densité des épines (Li et al., 2007).

6.2.2) Les protéines d'échafaudage

La complexité de la structure et de l'organisation du réseau de la densité post-synaptique résultent de la présence de plusieurs protéines d'échafaudage. Parmi celles-là, les protéines PSD-95 et Shank permettent le regroupement de nombreuses protéines grâce à la présence de plusieurs domaines d'interaction protéique comme les domaines PDZ (Kim et Sheng, 2004). Ces domaines PDZ permettent la liaison à l'extrémité COOH de plusieurs protéines ou l'interaction directe avec d'autres domaines PDZ, permettant de former des complexes multimériques.

6.2.2.1) La protéine PSD-95

Cette protéine est localisée très près de la membrane post-synaptique (Figure 14). Sa localisation lui permet de rassembler à la fois les récepteurs, les canaux ioniques et les protéines cytoplasmiques. Par ailleurs, sa localisation très spécifique et son abondance font de la protéine PSD-95 un outil précieux pour révéler les épines dendritiques. La PSD-95 lie directement les récepteurs NMDA et les canaux potassiques de type Shaker (Kim et Sheng, 2004). Sa surexpression dans les neurones d'hippocampe augmente le regroupement des récepteurs AMPA, l'amplitude et la fréquence des courants mEPSC (miniature excitatory post-synaptic current) et le nombre d'épines dendritiques (El-Husseini, 2000).

6.2.2.2) Les membres de la famille Shank 1-3

Comme la PSD-95, les protéines Shank (Src homology 3 domain and ankyrin repeat-containing) sont à l'interface entre l'activité synaptique et la régulation du cytosquelette d'actine (Figure 14). Elles sont plutôt situées dans la partie cytoplasmique par rapport à la protéine PSD95 (Kim et Sheng, 2004). Les Shank interagissent indirectement avec les récepteurs NMDA via GKAP (guanylate kinase-associated protein) et avec de nombreuses protéines régulatrices de l'actine comme IRSp53 (insulin receptor substrate p53), la cortactine et β -PIX (β -p21-associated kinase-interacting exchange factor) (Kim et Sheng, 2004). L'interaction de β -PIX avec Shank se fait grâce au domaine leucine zipper de β -PIX et au domaine d'interaction à PDZ qui n'est pas retrouvé dans α -PIX (Park et al., 2003). Il est intéressant de noter que la surexpression de Shank1 dans les neurones d'hippocampe induit une augmentation de la colocalisation de β PIX et de PAK1 dans les épines dendritiques (Park et al., 2003). Par conséquent l'interaction Shank/ β PIX pourrait être responsable du recrutement de PAK1 au niveau des épines dendritiques. Par ailleurs, il a été montré que la surexpression de *Shank* induit une maturation des épines et un élargissement des têtes d'épines via son

interaction avec Homer, une autre protéine d'échafaudage qui lie les récepteurs mGluR et les récepteurs à IP3 (inositol 1,4,5-trisphosphate) (Sala et al., 2001). De plus, la perte d'expression de *Shank* par Si-(small interfering) RNA réduit le nombre d'épines dans des neurones d'hippocampe en culture alors que la surexpression de Shank3 induit la formation d'épines dans des neurones granulaires du cervelet normalement dépourvus d'épines (Roussignol et al., 2005). Confirmant le lien entre Shank et plasticité, il a été démontré que Shank3 est associée au syndrome de délétion 22q13.3 (Bonaglia et al., 2001) caractérisé notamment par un retard mental. Plus récemment il a été montré que Shank3 est aussi impliquée dans l'autisme (Durand et al., 2007).

6.2.3) Les GTPases de la famille Rho

Au centre des voies de signalisation qui contrôlent le cytosquelette d'actine se trouvent les GTPases et leurs régulateurs (Figure 14). Les GTPases de la famille Rho, en particulier RhoA, Rac1 et Cdc42 sont des régulateurs du cytosquelette d'actine. Elles jouent un rôle important dans la morphologie cellulaire, la régulation de la prolifération cellulaire et la différenciation (Hall A., 2005). Dans des fibroblastes, les GTPases Rho régulent les fibres de stress et l'assemblage des adhésions focales, les protéines Rac et Cdc42 régulent respectivement la formation des lamellipodes et les extensions filopodiales et les repliements membranaires (Figures 15 et 22).

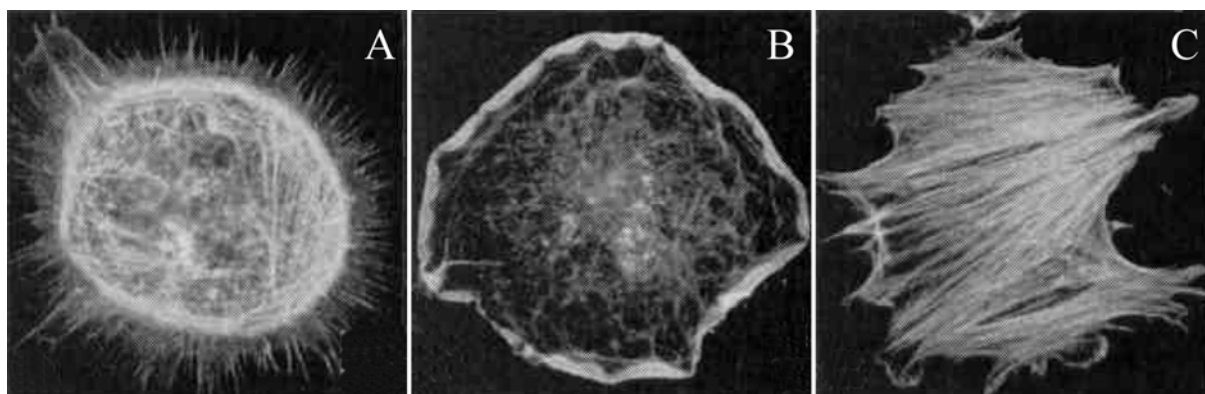


Figure 15. Effets de l'activation des GTPases sur le cytosquelette d'actine de fibroblastes Swiss 3T3. L'activation de Cdc42 entraîne la formation de filopodes (A), l'activation de Rac1, la formation de lamellipodes (B) et l'activation de RhoA, la formation de fibres de stress (C) sur le cytosquelette d'actine de fibroblastes Swiss 3T3. Marquage à la rhodamine-phalloïdine. D'après Hall, 1998.

Elles jouent aussi un rôle important dans la différenciation des neurones, leur morphogénèse, leur migration, la polarité, la croissance et le guidage axonal ainsi que dans la formation des

épines dendritiques (Govek et al., 2005). Les GTPases alternent entre deux conformations : active liée au GTP et inactive liée au GDP. L'équilibre entre ces deux conformations est régulé par des facteurs d'échange (GEF : guanine exchange factor) permettant l'échange du GDP par le GTP, des protéines GAP catalysant l'hydrolyse du GTP, et enfin des protéines GDI inhibant la dissociation du GDP.

Malgré des effets spécifiques de chaque GTPase, il existe des "cross-talk" permanents entre les trois protéines. En effet, les GTPases RhoA, Rac1 et Cdc42 sont reliées entre elles par une cascade d'activation dans laquelle Cdc42 active Rac1 qui lui-même active RhoA (Giniger et al., 2002). Un dynamisme permanent du cytosquelette permet la contractilité cytoplasmique (dépendante de Rho), la stabilisation de l'actine (Rac) et l'extension filopodiale (Cdc42) pour permettre la croissance axonale des neurones (Giniger et al., 2002). Notons toutefois que Rho, Rac1 et Cdc42 sont les archétypes d'une famille d'une vingtaine de petites protéines G dont on ne connaît à l'heure actuelle que peu de choses.

6.2.4) Rôle des GTPases sur la morphologie des épines dendritiques

Des mutants dominant négatifs (N17) ou constitutivement actifs (V12) des GTPases ont été très utilisés pour étudier l'effet des GTPases sur la morphogenèse des épines dendritiques. Un mutant dominant négatif exerce sa fonction en séquestrant le facteur d'échange nécessaire à l'activation de la GTPase alors qu'un mutant constitutivement actif n'est pas capable d'hydrolyser l'ATP et il reste donc actif en absence de signaux activateurs en amont. L'étude du rôle des GTPases sur la morphogenèse des épines dendritiques a été réalisée dans différents systèmes : cellules de Purkinje de souris transgéniques, neurones corticaux, neurones d'hippocampe en culture (Luo et al., 1996 ; Tashiro et al., 2000 ; Nakayama et al., 2000). La surexpression du mutant constitutivement actif de *RhoA* diminue la densité et la longueur des épines dendritiques alors que l'inhibition de RhoA augmente la longueur des épines (Nakayama et al., 2000 ; Tashiro et al., 2000). Dans les cellules de Purkinje, la surexpression d'une forme active de *Rac1* induit une diminution de la taille des épines et une augmentation de leur densité (Luo et al., 1996). Dans les neurones d'hippocampe, l'expression d'une forme active de *Rac1* résulte en une augmentation du nombre de protrusions, plus particulièrement des filopodes alors que l'expression d'une forme dominante négative de *Rac1* induit une diminution de la densité des épines dendritiques (Nakayama et al., 2000). Zhang a montré en 2005 en utilisant la technique de FRET (fluorescence resonance energy transfer) que l'activité locale de Rac au niveau des épines dendritiques est augmentée lors de la formation des synapses (Zhang, 2005). Le rôle de la GTPase Cdc42 a été beaucoup

moins étudié (revue de Govek et al., 2005). L'expression d'une forme constitutivement active de *Cdc42* a peu d'effet sur la morphologie et la densité des épines (Tashiro et al., 2000). Pourtant la perte de fonction de l'orthologue de *Cdc42* chez la drosophile diminue la densité des épines de 50% (Scott et al., 2003).

D'autres GTPases de cette famille jouent aussi un rôle dans la morphologie des épines dendritiques. Ainsi, il a été montré que la GTPase *Rnd1* affecte aussi la formation des épines dendritiques. *Rnd1* fait partie d'une sous famille des GTPases de la famille Rho, qui a la particularité d'être constitutivement liée au GTP et d'être régulée de façon transcriptionnelle (Nobes et al., 1998 ; Marie-Claire et al., 2007). L'expression de *Rnd1* dans des fibroblastes inhibe la formation des fibres de stress et l'adhésion de la cellule à la matrice extracellulaire (Nobes et al., 1998). La surexpression de *Rnd1* dans des neurones d'hippocampe augmente la longueur des épines dendritiques alors que sa perte d'expression par l'utilisation d'oligonucléotides antisens augmente le nombre de filopodes et diminue la longueur et le nombre des épines dendritiques (Ishikawa et al., 2003).

6.2.5) Les régulateurs des GTPases

De nombreux facteurs d'échanges de *Rac1* et *Cdc42*, notamment α -PIX, β -PIX, Intersectine, Tiam, Kalirin et Vav sont impliqués dans la différenciation neuronale et la spinogénèse (Govek et al., 2005).

La surexpression de *PIX* ou la perte de son expression par Si-RNA perturbe la morphogénèse des épines (Zhang et al., 2003 ; Nodé-Langlois et al., 2006). α -PIX et *PAK3* dont les mutations sont responsables de retard mental, sont situées dans la même voie de signalisation qui contrôle la spinogénèse (Nodé-Langlois et al., 2006). En effet, l'expression d'une forme constitutivement active de *PAK3* restaure le phénotype normal de neurones dans lesquels l'expression de α -PIX a été supprimée (Nodé-Langlois et al., 2006). Un mutant de l'intersectine, un GEF spécifique de *Cdc42*, incapable de lier EphB, perturbe fortement la formation des épines (Irie et Yamaguchi, 2002). Un variant d'épissage de la Kalirine, médie les effets de EphB sur la maturation des épines en activant *Rac1* et son effecteur PAK (Penzes et al., 2003). Enfin Tiam1, un GEF spécifique de *Rac1*, interagit directement avec les récepteurs NMDA et sa perte d'expression par Si-RNA perturbe le développement des épines en diminuant leur densité et en augmentant le nombre de protrusions de type filopodiales (Tolias et al., 2005). Plusieurs GAP jouent aussi un rôle important dans la régulation des épines dendritiques. L'oligophrénine, une GAP de RhoA, *Rac1* et *Cdc42* interagit avec Homer et sa perte d'expression par Si-RNA diminue le nombre d'épines dendritiques (Govek

et al., 2004). Ce phénotype est restauré par l'expression d'un inhibiteur de la Rho Kinase, suggérant que l'oligophénine agit sur la morphologie des épines principalement via la voie RhoA/Rho Kinase. La perte d'expression de *OPHN1* dans les souris KO diminue le nombre d'épines mature au niveau des dendrites apicales, altère la mémoire spatiale et entraîne des anomalies de comportements et d'hyperactivité (Khelifaoui et al., 2007). Alors que la LTP et la LTD sont normales chez ces souris, la facilitation par stimulations couplées (paired-pulse facilitation) qui reflète la libération des neurotransmetteurs est altérée, suggérant que la perte de l'expression de l'Oligophénine est associée à des altérations pré- et post- synaptiques (Khelifaoui et al., 2007).

6.2.6) Les effecteurs des GTPases de la famille Rho.

De nombreux effecteurs des GTPases de la famille Rho sont des régulateurs du cytosquelette d'actine et jouent un rôle important dans la morphogenèse des épines dendritiques (Govek et al., 2005).

6.2.6.1) Les p21-activated kinases (PAK)

Voir partie IV §7

6.2.6.2) La famille de protéines d'échafaudage WASP (Wiskott–Aldrich syndrome protein) et WAVE (WASP family Verprolin-homologous protein)

Les protéines de cette famille sont des activateurs du complexe Arp2/3 responsable de l'étape de nucléation lors de la polymérisation de l'actine. Les deux familles se différencient par leur partie N-terminale impliquée dans la régulation de la protéine et leur rôle dans les différentes voies de signalisation (Stradal et al., 2004). Les protéines WASP et N-WASP sont des effecteurs de Cdc42 grâce à la présence d'un domaine CRIB (Cdc42 and Rac interactive binding domain). Les protéines WAVE font partie d'un complexe protéique qui contribue à leur localisation et à leur stabilité (Takenawa et Suetsugu, 2007). La protéine IRSp53 localisée dans ce complexe augmente l'activité de WAVE-2 en présence de Rac1 et PIP3 (Phospho-inositol triphosphate) et contribue à la formation de lamellipodes induite par Rac/WAVE (Takenawa et Suetsugu, 2007). Parmi les membres des familles WASP et WAVE, les protéines N-WASP, WAVE-1 et WAVE-3 sont enrichies dans le cerveau et sont impliquées dans la morphogenèse des épines dendritiques (Miki et al., 1996 ; Suetsugu et al., 1999). Irie et Yamaguchi ont montré qu'un dominant négatif de N-WASP qui empêche son

interaction avec le complexe Arp2/3 inhibe la formation de l'épine (Irie et Yamaguchi, 2002). La perte de fonction de WAVE-1 diminue le nombre d'épines dendritiques matures et la phosphorylation et déphosphorylation de WAVE1 joue un rôle important dans la morphologie des épines (Kim et al., 2006). Pilpel et Segal ont montré que WAVE3 qui est préférentiellement exprimé dans les épines, est très mobile et pourrait être à l'origine de nouvelles protrusions dendritiques (Pilpel & Segal, 2005)

6.2.6.3) La protéine adaptatrice IRSp53

IRSp53 est une autre protéine effectrice des GTPases Cdc42 et Rac, fortement localisée dans les densités post-synaptiques (Choi et al., 2005). Sa surexpression dans les neurones augmente la densité des épines alors que sa perte d'expression par Si-RNA diminue la densité et la taille des épines (Choi et al., 2005). IRSp53 stimule la formation des lamellipodes via Rac1 et WAVE2 et la formation de filopodes via Cdc42 et Mena (mouse homolog of enabled), un membre des régulateurs de l'actine Ena (enabled)/VASP (Vasodilatator-stimulated phosphoprotein) (Takenawa et Suetsuga, 2007 ; Krugmann et al., 2001). L'interaction de la GTPase Cdc42 au domaine CRIB de IRSp53 lève l'inhibition intramoléculaire et permet la liaison de Mena au domaine SH3 de IRSp53 (Krugmann et al., 2001).

6.2.6.4) La Rho Kinase

Les effecteurs des GTPases Rho comprennent notamment la Rho Kinase, une sérine thréonine kinase qui joue un rôle important dans la réorganisation de l'actine via RhoA. La Rho Kinase est capable d'activer par phosphorylation la MLC (myosine light chain) pour augmenter la contractilité ou bien de phosphoryler la LIM Kinase pour permettre la polymérisation de l'actine (Bokoch, 2003). L'effet de la Rho Kinase sur la morphologie des épines a souvent été étudié en utilisant des inhibiteurs spécifiques (Tashiro et al., 2000 ; Tashiro et Yuste, 2004 ; Govek et al., 2004). En bloquant la Rho Kinase, la longueur des épines nouvellement formées est augmentée et leur mobilité est modifiée (Tashiro et Yuste, 2004 ; Tashiro et al., 2000).

6.2.7) Les molécules d'adhésions

La communication entre neurones passe principalement par la libération de neurotransmetteurs mais est aussi médiée par des molécules d'adhésion qui forment un pont entre les parties pré- et post-synaptique pour permettre une communication bidirectionnelle (Calabrese et al., 2006). Les neurexines pré-synaptiques et neuroligines post-synaptiques sont ainsi impliquées dans la formation de synapses excitatrices et inhibitrices. Elles sont reliées à plusieurs molécules de la densité post-synaptique grâce à leur domaine PDZ. Les cadhérines sont formées d'une partie extracellulaire composée de 5 répétitions de 100 acides aminés et une partie intracellulaire reliée au cytosquelette d'actine via les caténines (Figure 14). Les N-cadherines (neuronales) situées de part et d'autre de la synapse, régulent la morphologie et la mobilité de l'épine. Ces molécules d'adhésion jouent un rôle important dans la plasticité synaptique, en modulant la LTP, la morphologie des épines dendritiques, le recrutement de protéines de la signalisation et la stabilité de l'épine (Dalva et al., 2007 ; Kasai et al., 2003).

« Les neurones, ces papillons mystérieux de l'âme, dont les battements d'ailes pourraient - qui sait - clarifier un jour le secret de la vie mentale. » Ramòn y Cajal

IV. Caractérisation des PAKs

1) Les kinases PAK appartiennent à la grande famille de kinases appelée STE20

Les sérines thréonines kinases PAK font partie de la famille des kinases STE20 qui comprend une cinquantaine de kinases chez l'homme (Dan et al., 2001). Chez *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* et les mammifères, les PAK se répartissent en deux groupes de fonction et de structure distincts (Figure 17). Chez les mammifères, le groupe I comprend les PAK1, 2 et 3 et le groupe II comprend les PAK 4, 5 et 6. Les PAKs sont des effecteurs des GTPases de la famille Rac et Cdc42. Presque tous les eucaryotes à l'exception des plantes possèdent un ou plusieurs gènes PAK, ce qui suggère l'importance fonctionnelle de ces kinases. Elles sont toutes formées d'une région régulatrice N-terminale, qui comprend le domaine de liaison aux GTPases nommé p21-binding domain (PBD) et d'un domaine kinase très conservé en C-terminal. Nous verrons plus loin la caractérisation plus fine des kinases du groupe I que nous avons effectuée (article 2).

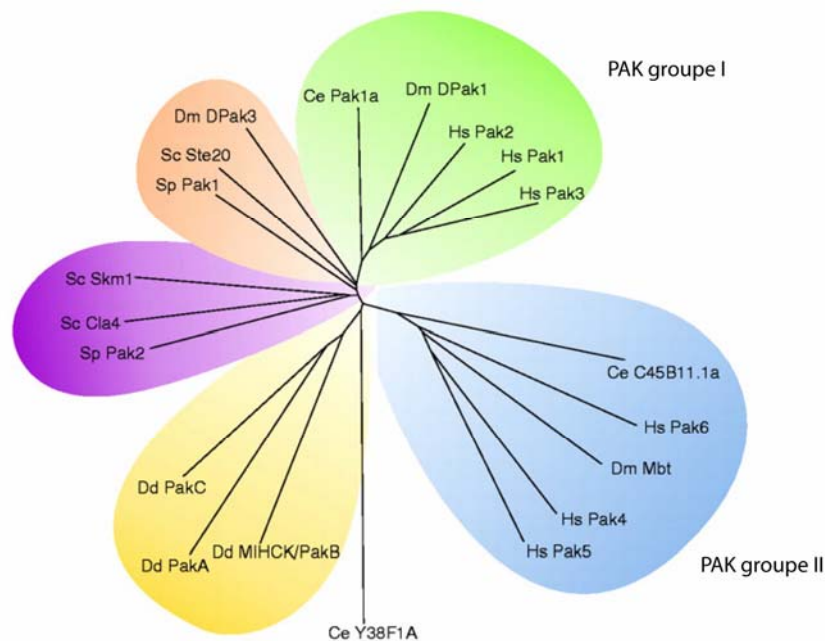


Figure 17. Arbre phylogénique de la famille PAK. Les PAKs de *Caenorhabditis elegans*, de *Drosophila melanogaster* et des mammifères se regroupent dans les groupes I (en vert) et II (en bleu). Les membres des groupes I et II se distinguent par leur structure et leur fonction. Ce : *Caenorhabditis elegans* ; Dd : *Dictyostelium discoideum* ; Hs : *Homo sapiens* ; Mm : *Mus musculus* ; Sc : *Saccharomyces cerevisiae* ; Sp : *Schizosaccharomyces pombe*. D'après Hofmann et al., 2004.

2) Les PAK du Groupe I : PAK1, 2, 3

2.1) Structure

Les kinases du groupe I ont une région N-terminale très conservée. On y distingue un domaine auto-inhibiteur (AID : auto-inhibitory domain) qui chevauche le PBD et plusieurs régions riches en résidus proline impliquées dans l'interaction avec les molécules adaptatrices Nck/Dock, les facteurs d'échange pour Rac et Cdc42 de la famille PIX/Cool et Grb2 (revue de Daniels et Bokoch, 1999). La structure des PAKs est illustrée dans la figure 18.

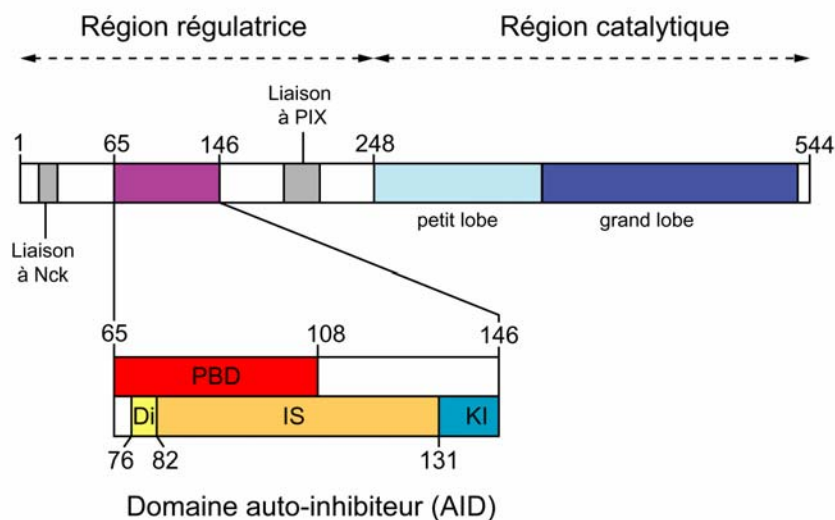


Figure 18. Schéma des différentes régions fonctionnelles des kinases PAK du groupe I . La région régulatrice amino-terminale contient un domaine de liaison aux GTPases (PBD : p21-binding domain), plusieurs régions riches en prolines (rectangles gris) et un domaine auto-inhibiteur (AID : auto-inhibitory domain). Le domaine auto-inhibiteur se subdivise en 3 régions: Di (dimerisation interface), IS (inhibitory switch) et KI (kinase inhibitory) qui permettent la dimerisation et l'inhibition du domaine catalytique. La numérotation des acides aminés fait référence à la séquence de PAK3. Adaptée de Lei et al., 2000.

2.2) La régulation de la kinase PAK

Le modèle général d'activation des PAKs du groupe I est le suivant : PAK est recrutée à la membrane où elle est activée par les GTPases Cdc42 et Rac1. L'interaction avec les GTPases permet de lever l'inhibition du domaine catalytique par le domaine auto-inhibiteur. La kinase PAK s'active ensuite par phosphorylation sur thréonine et sérines pour ensuite phosphoryler ses substrats.

2.2.1) Le recrutement membranaire des PAK

Deux voies principales, illustrées dans la figure 19, permettent le recrutement membranaire des PAKs. La première voie implique l'activation des récepteurs à activité tyrosine kinase localisés dans la membrane. La phosphorylation sur tyrosine des récepteurs, crée des sites d'interaction pour l'adaptateur Nck. Dans le cytoplasme, Nck interagit via son second domaine SH3 avec le premier domaine riche en prolines des kinases PAK (Bagrodia et al., 1995). Le complexe Nck/PAK ainsi formé, qui préexiste dans le cytoplasme, est alors recruté au niveau de la membrane. Cette interaction est régulée par auto-phosphorylation. En effet, il a été montré que suite à son activation, PAK1 s'autophosphoryle sur la sérine 21, ce qui inhibe la liaison entre PAK1 et Nck (Zhao, 2000a). Une seconde étude, publiée par Zhou en 2003, a montré que la phosphorylation de la sérine 21 de PAK1 est régulée par la kinase Akt (Zhou et al., 2003).

Une deuxième voie de recrutement de PAK à la membrane fait intervenir le facteur d'échange PIX. Il existe deux gènes *PIX* appelés *PIX α* et *PIX β* , ce dernier code pour quatre variants d'épissage (Kim et Park, 2001). Le recrutement membranaire de PIX amène PAK à la membrane au niveau des adhésions focales (Manser et al., 1998 ; Bagrodia et al., 1998 ; Koh et al., 2001). Plusieurs données suggèrent que le complexe PIX/PAK est recruté à la membrane grâce à la dimerisation de PIX (Koh et al., 2001 ; Baird et al., 2005) ou via la liaison de PAK à G $\beta\gamma$ (Li et al., 2003). La formation du complexe PAK/PIX est aussi régulée par auto-phosphorylation de PAK (Zhao et al., 2000b). Ceci permet d'établir un mécanisme cyclique de régulation de PAK, compatible avec la nature saltatoire des mouvements membranaires et avec l'action transitoire de l'activation des cascades en aval. Les différentes protéines PIX régulent différemment l'activité de PAK par un mécanisme encore inconnu (Bagrodia et al., 1998; Daniels et al., 1999; Feng et al., 2002).

Les PIX interagissent aussi avec une autre famille de protéines adaptatrices CAT (Cool-associated tyrosine phosphosubstrates)/GIT impliquées dans la liaison avec la paxilline et la tyrosine kinase FAK, régulant la dynamique des adhésions focales (Zhao et al., 2000b). PIX et GIT forment de gros complexes multimériques qui recrutent, suite à l'activation des GTPases Rac et Cdc42, les kinases PAK (Revue de Hoefen et Berk, 2006).

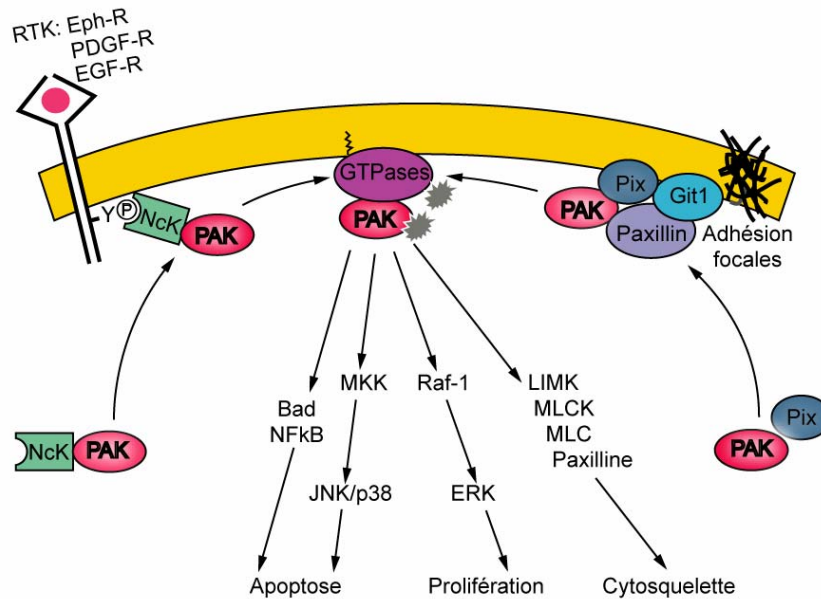


Figure 19. Les deux voies de recrutement membranaire de PAK. Après activation du récepteur tyrosine kinase (RTK), la kinase PAK est recrutée à la membrane via l'adaptateur Nck. Cette localisation de PAK permet son activation par les GTPases, ancrées à la membrane. Une deuxième voie de recrutement à la membrane implique le facteur d'échange PIX qui amène PAK au niveau des adhésions focales.

2.2.2) Le p21-binding domaine (PBD) permet la liaison de PAK aux GTPases activatrices

Le PBD permet à la kinase d'interagir avec la forme active des GTPases, c'est-à-dire la forme GTP. Ce domaine est composé d'environ 40 acides aminés (Lei et al., 2000). La région minimale nécessaire à l'interaction avec les GTPases est un motif de 16 acides aminés appelé le CRIB (Burbelo et al., 1995). Cette région est retrouvée dans quasiment toutes les protéines effectrices des GTPases de la famille Rac et Cdc42 notamment WASP, ACK (Cdc42-associated tyrosine kinase 1) ou la MLK (mixed lineage kinase). Plusieurs autres résidus sont importants pour établir une liaison spécifique avec les GTPases notamment la région riche en lysine situé en amont du domaine CRIB (Knaus et al., 1998).

2.2.3) Le domaine auto-inhibiteur permet de maintenir la kinase à l'état inactif

Zhao a montré qu'un polypeptide de 67 acides aminés issu de la région Nter de PAK inhibe l'activation de la kinase par Cdc42 (Zhao et al., 1998). La coexpression de ce peptide avec la forme constitutivement active Cdc42-V12, inhibe la perte des fibres de stress et la formation

de filopodes normalement induit par cette GTPase. Il a également été montré que plusieurs mutations dans le AID empêchent la liaison de PAK avec la partie catalytique : la kinase est dans une conformation ouverte (Tu et Wigler, 1999). La structure cristallographique de PAK1 a permis de montrer qu'au repos, la kinase est sous forme d'un dimère, la partie Nter de la kinase interagissant avec la partie catalytique (Lei et al., 2000) (Figure 20). La liaison du domaine inhibitory switch (IS) au grand lobe de la kinase permet d'amener le segment kinase inhibitory (KI) dans le sillon catalytique de la kinase pour empêcher son activation. La dimerisation fait intervenir plusieurs régions, en particulier le feuillet $\beta 1$ du domaine de dimerisation (Di) et le domaine IS qui interagit avec le domaine catalytique. La liaison de Cdc42 au PBD change la conformation du domaine IS, permet de lever l'inhibition du KI, dissocie le dimère et entraîne par conséquent l'activation de la kinase (Figure 20). La structure cristallographique a été réalisée grâce à l'expression de deux fragments indépendants, celui du domaine auto-inhibiteur et celui du domaine kinase. De ce fait, cette étude ne permettait pas de déterminer si une molécule de PAK inhibe son propre domaine kinase (régulation en cis) ou si elle inhibe son partenaire (régulation en trans). Néanmoins, des expériences biochimiques ont montré que l'inhibition des homodimères de PAK1 se faisait par une régulation en trans : la partie N-terminal d'un monomère de PAK1 inhibe le domaine catalytique de l'autre (Parrini et al., 2002).

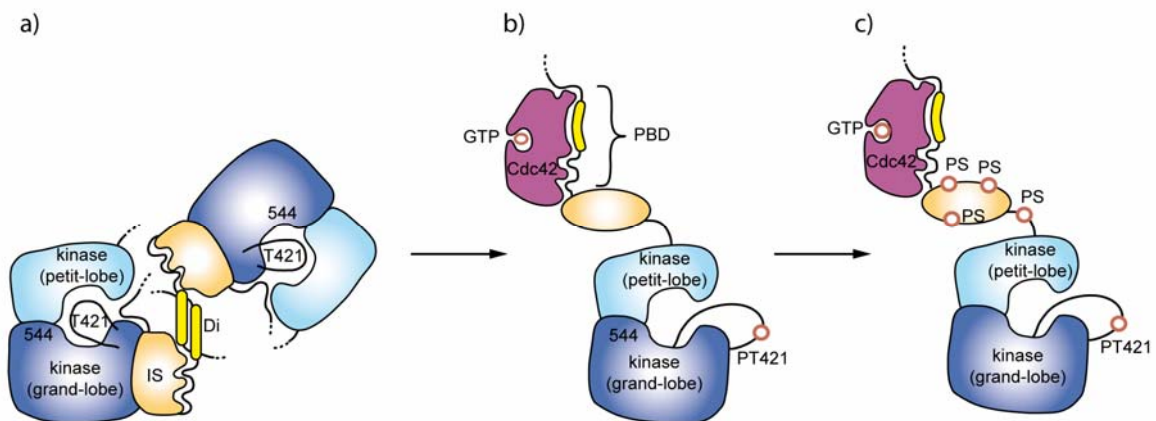


Figure 20. Mécanismes d'activation des PAK du groupe I. a) Conformation auto-inhibée. Les PAK sont sous forme d'homodimères. Le domaine IS (inhibitory switch) s'associe au grand lobe et stabilise la forme inactive du domaine kinase. b) La liaison des GTPases sous forme active permet de dissocier le dimère et de déplier le domaine IS. Ainsi le domaine KI (kinase inhibitory) n'occlus plus le domaine catalytique et la boucle activatrice est libérée. La trans-phosphorylation de la T421 active la kinase. c) Une fois la T421 phosphorylée, la kinase s'auto-phosphoryle sur plusieurs sites sérines (PS : phosphosérine). Ces modifications empêchent la kinase de basculer dans sa forme inactive. Adaptée de Lei et al., 2000.

2.2.4) La phosphorylation de PAK permet son activation et maintient la kinase dans sa conformation ouverte

Au cours de l'activation de la kinase PAK, un certain nombre de sites sont phosphorylés notamment 6 résidus sérines dans la région amino-terminale et un résidu thréonine (T421) dans la région catalytique (Chong et al., 2001). La phosphorylation de la thréonine 421 située dans la boucle activatrice joue un rôle fondamental dans l'activation de la kinase (Zenke et al., 1999). Elle peut être auto-phosphorylée ou phosphorylée par une kinase extérieure comme PDK1 (King et al., 2000). La phosphorylation des résidus sérines, notamment la sérine 144 située dans le domaine auto-inhibiteur, empêche le repliement du domaine kinase pour maintenir la kinase dans sa configuration ouverte (Chong et al., 2001) et ainsi empêcher son interaction avec les GTPases (Jung et al., 2005). Toutefois, certains sites des PAK sont des cibles d'autres kinases régulatrices, et la phosphorylation de PAK1 par Cdk5 est impliquée dans l'inhibition de PAK (Nikolic et al., 1998)

2.2.5) La fixation d'autres facteurs module l'activité des PAKs

Les kinases PAK sont des phosphoprotéines dont le degré d'activité est finement régulé par plusieurs facteurs. La fusion d'une séquence d'adressage à la membrane contribue à activer PAK, permettant donc son activation par un mécanisme indépendant des GTPases (Bokoch et al., 1998). En effet, certains lipides enchâssés dans les membranes sont capables d'activer la kinase. Certains dérivés de la sphingosine bloquent la liaison du AID et induisent les mêmes types de phosphorylation que lors de l'activation de PAK par les GTPases (Bokoch et al., 1998, Zenke et al., 1999).

Les facteurs d'échange α -PIX et β -PIX sont également capables de moduler l'activité de PAK. De par son interaction directe avec PAK, α -PIX est capable d'activer PAK par des mécanismes dépendants et indépendants de son activité GEF (Daniels et al., 1999). La présence d'une région de 18 acides aminés appelé T1 dans β -PIX est responsable de son effet inhibiteur sur l'activité de PAK (Feng et al., 2002). Cette région pourrait inhiber l'activité GEF de PIX et bloquer l'accès d'autres régulateurs au site actif de PAK.

De plus, certains substrats de PAK sont capables de l'activer par leur liaison directe. L'interaction de la filamine A (Vadlamudi et al., 2002) avec le domaine CRIB de PAK1 ou la DSCAM (Down Syndrome Cell Adhesion Molecule) avec le domaine kinase (Li et Gyan, 2004) stimule l'activité de la kinase.

3) Les PAK du Groupe II : PAK4, 5, 6

Structuralement les PAK du groupe II sont très différentes des PAK du groupe I. La région Nter des kinases du groupe II montre moins de 40% d'identité avec les PAK du groupe I mais ont plus de 60% d'identité entre les différentes PAK de ce groupe (Jaffer et Chernoff, 2002).

Ces kinases possèdent également un PBD, cependant la liaison aux GTPases ne modifie pas l'activité de la kinase. Bien que leur mécanisme de régulation n'ait pas encore été élucidé, les membres du groupe II sont principalement impliqués dans la formation de filopodes et la pousse neuritique (Hofmann, 2004).

4) Les phénotypes associés à la perte de fonction de PAK

Les trois kinases du groupe I ont une structure très semblable mais elles diffèrent par leur expression tissulaire : *PAK1* est exprimé dans le cerveau, les muscles et la rate, *PAK2* est ubiquitaire et *PAK3* est exprimé uniquement dans le cerveau (cf article 2, Figure 4D, p98). Parmi les membres du groupe II, *PAK4* est exprimé dans la plupart des tissus, avec une expression préférentielle dans la prostate, les testicules et le colon. Comme *PAK3*, *PAK5* est exprimé spécifiquement dans le cerveau et l'expression de *PAK6* est détectée dans le cerveau, les reins, le placenta, les testicules et la prostate (Jaffer et Chernoff, 2002). L'étude génétique de la fonction des gènes *PAK* chez les mammifères se développe de plus en plus. Les souris KO *PAK1*, *PAK3* et *PAK5* sont viables alors que la perte d'expression de *PAK2* et *PAK4* est létale à l'état embryonnaire (Figure 21) (Hofmann, 2004 ; Qu et al, 2003 ; Li et al., 2003 ; Meng et al., 2005). Compte tenu de la forte expression de *PAK4* durant les phases précoces du développement, elle joue probablement un rôle important dans le développement embryonnaire de la souris.

Kinase invalidée	Phénotype	Référence
PAK1	Défauts immunitaires	Hofmann, Jaffer, Chernoff, non publié
PAK2	Létale	Hofmann, Jaffer, Chernoff, non publié
PAK3	Défauts d'apprentissage/ mémorisation	Meng, 2005
PAK4	Létale, défauts cardiaque et neuronaux	Qu et al., 2003
PAK5	Pas de phénotype	Li et Minden, 2003

Figure 21. Phénotypes associés aux souris KO des différentes kinases PAK

5) Les fonctions biologiques des kinases PAK

De par l'abondance des protéines d'interaction et des substrats de PAK, ces kinases jouent un rôle important dans de nombreux processus cellulaires.

5.1) Les kinases PAK régulent la dynamique du cytosquelette

Les filaments d'actine, les microtubules et les filaments intermédiaires forment les trois constituants majeurs du cytosquelette. L'actine est répartie en deux types de structures (Figure 22) :

1) *Des faisceaux formés de filaments d'actine parallèles présents dans les fibres de stress et les filopodes.* Les filopodes sont des excroissances fines qui sondent le milieu extracellulaire en quête de signaux attractifs ou répulsifs. Les fibres de stress sont constituées de fibres d'actine-myosine qui relient les points focaux entre eux pour permettre de faire un lien entre le cytosquelette et le milieu extracellulaire. Les adhésions focales sont des complexes protéiques qui lient la matrice extracellulaire au cytosquelette d'actine via des récepteurs transmembranaires appelés les intégrines.

2) *Des réseaux d'actine retrouvés à la périphérie cellulaire.* Les filaments d'actine sont réticulés entre eux pour former de larges protubérances appelées les lamellipodes.

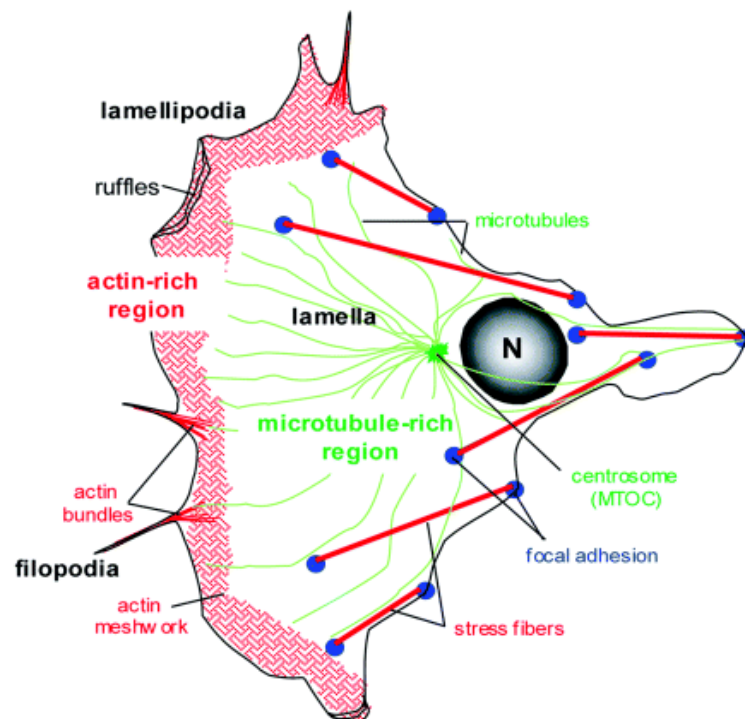


Figure 22. Organisation de l'actine et des microtubules dans une cellule. On distingue deux régions : une région riche en actine (en rouge) composée de faisceaux d'actine (i.e. les filopodes et les fibres de stress) et de réseaux d'actine (i.e. les lamellipodes), et une région formée de microtubules (en vert). D'après Etienne-Manneville, 2004.

Les kinases PAK se concentrent au niveau de zones riches en actine, au niveau des repliements membranaires, des bords migrants et plus transitoirement au niveau des adhésions focales (Dharmawardhane et al., 1997 ; Sells et al., 2000). La surexpression des *PAKs* induit des extensions membranaires notamment des lamellipodes et des filopodes ainsi que la dissociation des fibres de stress et des adhésions focales (Sells et al., 1997, Nayal et al., 2006). Ces effets sont dépendants ou indépendants de l'activité kinase. Ainsi, il a été montré que l'activité kinase est essentielle à la dissolution des adhésions focales alors que l'effet de PAK sur la formation des lamellipodes et des repliements membranaires est indépendant de l'activité kinase (Frost, 1998).

Les PAK agissent sur le cytosquelette en phosphorylant différentes protéines de signalisation. En effet, ces kinases :

- contrôlent la polymérisation de l'actine en régulant les LIM Kinases 1 et 2 qui phosphorylent et inhibent la Cofiline, une protéine impliquée dans la dépolymérisation de l'actine (Edwards et al., 1999).

- régulent la myosine II en phosphorylant sa chaîne légère pour augmenter la contraction de la cellule, ou sa kinase régulatrice MLCK (myosin light chain kinase) pour l'inhiber (Bokoch, 2003).

- agissent sur les microtubules en régulant la stathmine, une protéine régulatrice de l'état de polymérisation des microtubules (Daub et al., 2001). PAK1 phosphoryle aussi TCoB (tubuline cofacteur B) pour générer de nouveaux microtubules (Vadlamudi et al., 2005).

- régulent la structure des adhésions focales en interagissant directement avec la paxilline pour la phosphoryler (Nayal et al., 2006).

- régulent les repliements membranaires en phosphorylant la filamine A, une protéine qui assure les liaisons orthogonales des filaments d'actine, et leur liaison aux intégrines (Vadlamudi et al., 2002).

5.2) Rôle des PAK dans le développement embryonnaire, la différenciation neuronale et le guidage axonal

De part leur rôle important dans la régulation du cytosquelette, les kinases PAK jouent aussi un rôle fondamental dans la forme et dans les mouvements cellulaires en particulier la migration cellulaire, la pousse neuritique et le guidage axonal.

5.2.1) La migration cellulaire

La migration cellulaire est essentielle durant le développement embryonnaire et son dysfonctionnement est une caractéristique des cellules métastatiques. La migration des fibroblastes nécessite une extension des lamellipodes, un attachement du cytosquelette à la matrice extracellulaire et une force qui permet de propulser la cellule en avant. La polymérisation de l'actine serait responsable de la formation et l'extension des lamellipodes, la myosine permettrait d'amener la force nécessaire au mouvement de la cellule, et les microtubules formés d'un réseau polarisé permettraient aux organelles et protéines de se déplacer au sein de la cellule (Etienne-Manneville S., 2004). L'expression d'une forme active ou inactive de *PAK* modifie la mobilité cellulaire (Sells et al., 2000). La forme active de PAK est localisée au niveau du bord migrant de la cellule pour y inhiber la contractilité (via la phosphorylation de MLCK) et permettre la dissociation des fibres de stress et des adhésions focales pour finalement augmenter le mouvement de la cellule vers l'avant (Sells et al., 2000 ; Bokoch, 2003). L'absence de PAK active à l'arrière de la cellule, permet de rétracter les filopodes et de maintenir ainsi la direction de la cellule (Figure 23).

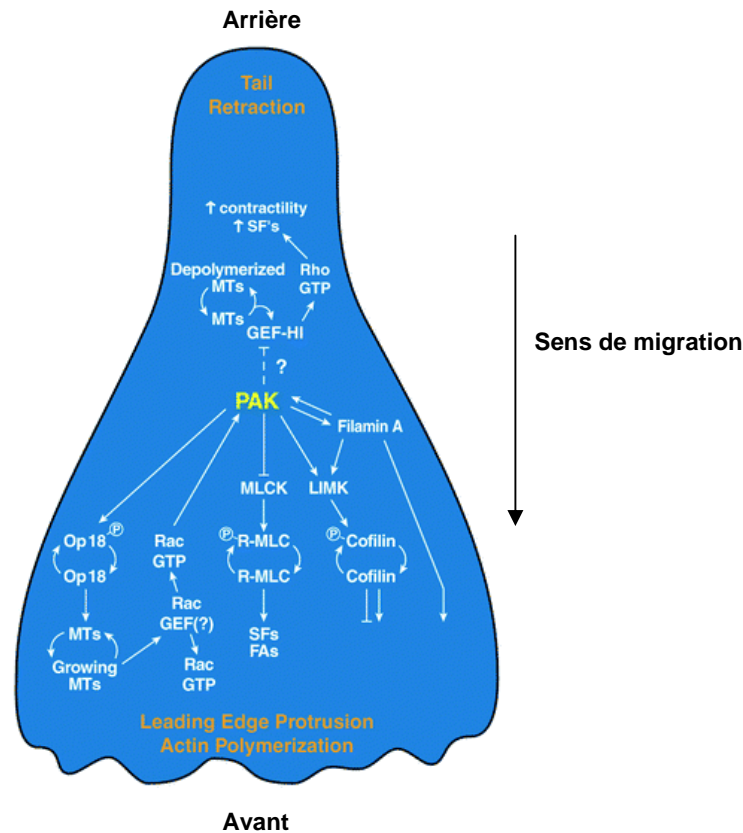


Figure 23. Modèle du rôle de PAK dans la migration cellulaire. FA : Adhésions focales, MT : microtubules, SF : Fibres de stress. Au niveau du bord migrant (avant), la contractilité est inhibée, les fibres de stress et les adhésions focales sont dissoutes et les microtubules s'assemblent pour renforcer la polarité de la cellule. A l'arrière de la cellule, en association avec l'activation de la GTPase Rho, la contractilité est renforcée et les microtubules sont dissous. Le facteur d'échange spécifique de Rho, GEF-H1 dont l'activité est régulée par les microtubules est phosphorylé par PAK et pourrait faire la jonction entre PAK et la contractilité. D'après Bokoch, 2003.

Lors de son développement embryonnaire, le cerveau des vertébrés présente des changements importants de taille et de forme, qui s'accompagnent de mouvements cellulaires de grande amplitude. La migration cellulaire des interneurons au niveau du cortex est un processus complexe qui implique de nombreuses protéines et une multitude de voies de signalisation régulées notamment par des facteurs de transcription. En utilisant des souris mutantes *Dlx1/2^{-/-}*, il a été montré que les facteurs de transcription *Dlx1* (distal-less homeobox) et *Dlx2* jouent un rôle essentiel dans la migration des interneurons GABAergique au niveau du cortex en réprimant l'expression d'un certain nombre de gènes impliqués dans la régulation du cytosquelette comme *PAK3* (Cobos et al., 2007 ; Guillemot, 2007). En effet, alors que l'expression de *PAK3* est faible ou absente dans les interneurons en migration, elle est fortement élevée dans les interneurons arrivés dans le cortex. De plus, la surexpression de la kinase est suffisante pour induire l'arrêt de la migration et une pousse neuritique prématurée.

5.2.2) Le guidage axonal

Pendant l'ontogenèse du cerveau, les axones des neurones parcourent de longues distances pour former des synapses avec leurs cellules cibles. La croissance des axones est guidée et orientée par des molécules situées dans l'environnement cellulaire que traverse l'axone.

L'extrémité en croissance d'un axone est le cône de croissance, composé de filopodes et lamellipodes qui explorent l'environnement extracellulaire en réponse à des molécules de guidage (Luo, 2002) (Figure 24). On distingue 4 types de molécules de guidage: les sémaphorines, les éphrines, les slits et les nétrines.

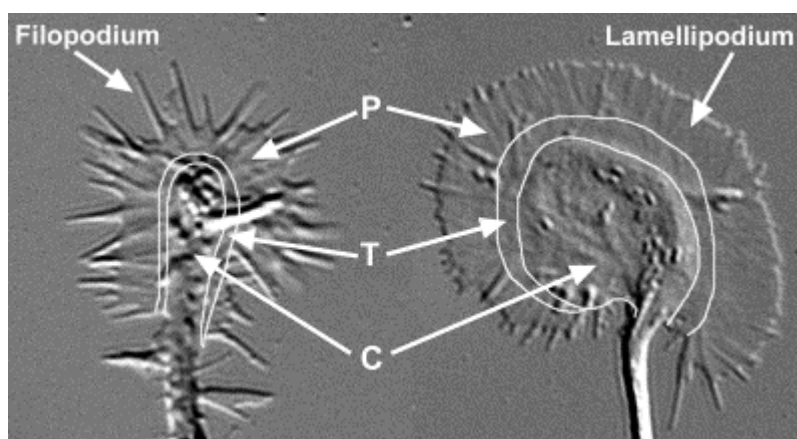


Figure 24. Organisation du cytosquelette d'un cône de croissance.

Les cônes de croissance présentent une grande variabilité de taille et de forme. On distingue une région périphérique (P), une région de transition (T) et une région centrale (C). D'après Dent et Gertler, 2003.

Les GTPases de la famille Rho jouent un rôle important dans le guidage axonal. Généralement, l'activation de RhoA réduit la motilité du cône de croissance et induit la rétraction des neurites alors que Rac1 et Cdc42 stimulent la formation de lamellipodes et des filopodes, et induit la formation des neurites (Govek et al., 2005).

Des études génétiques réalisées chez la drosophile ont permis de placer PAK et son adaptateur DOCK (Dreadlocks), homologue de Nck, au centre d'une voie de signalisation impliquée dans le guidage axonal (Hing et al., 1999). Les mutations de PAK et DOCK conduisent à une désorganisation des projections axonales des cellules photoréceptrices de la drosophile (Figure 25).

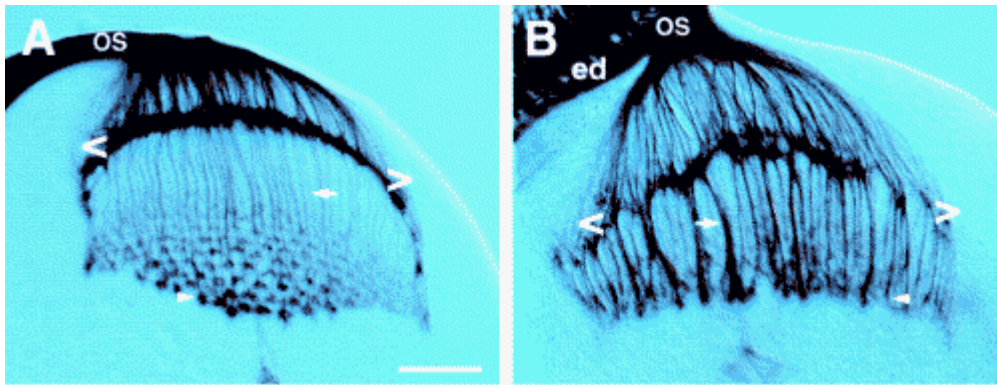


Figure 25. Projection des cellules photoréceptrices au niveau de la rétine de drosophile.

A. sauvage, **B.** Expression de PAK portant une mutation non sens. Dans les mouches sauvages, les axones de cellules photoréceptrices R1-R6 se terminent dans la lamina où les cônes de croissance forment une ligne médiane ($\langle \rangle$). Chez le mutant *PAK*, les axones des cellules R1-R6 continuent de projeter dans la médulla et présentent des morphologies anormales. Os : optic stalk, ed : eye disk. D'après Hing, 1999.

Les kinases PAK jouent un rôle à plusieurs niveaux pendant le guidage axonal (Figure 26). Elles entrent en compétition avec Rac1 pour sa liaison à la Plexine-B1, un récepteur des sémaphorines. La liaison de la Plexine-B1 à Rac inhibe l'activation de PAK par Rac (Vikis et al., 2002). De plus, il a été démontré que le collapse du cône de croissance, un des événements de base du guidage axonal induit par les sémaphorines, dépend de la phosphorylation de la Cofiline par la LIM kinase elle-même phosphorylée par la kinase PAK (Aizawa et al., 2001). Les protéines PAK participent aussi aux phénomènes de guidage axonal menés par les éphrines. PAK est activée via la GTPase Rac1 par l'ephexine, un facteur d'échange qui est lié constitutivement à certains récepteurs aux éphrines (EphA) impliqués dans la rétraction du cône de croissance lors du guidage axonal. Il a été montré que la

stimulation des EphA par les éphrines module l'activité de l'ephexine pour activer RhoA et inhiber Cdc42 et Rac1 (Shamah et al., 2001). Enfin, il a été montré que PAK est impliquée dans la signalisation de la molécule de guidage Slit. La stimulation du récepteur Robo (Roundabout) par Slit chez la drosophile recrute DOCK et PAK au niveau du récepteur et augmente l'activité de Rac pour réguler les effets répulsifs du guidage axonal dans le système nerveux central (Fan et al., 2003).

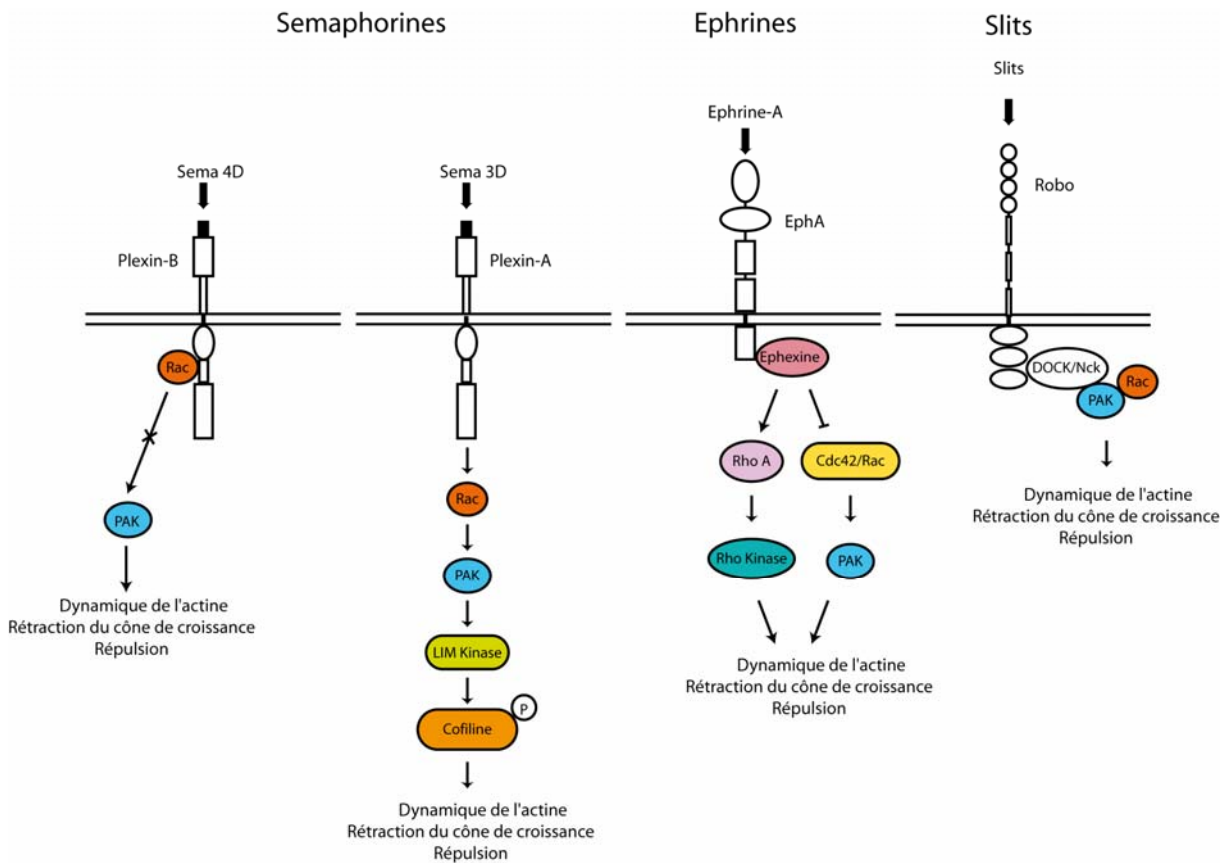


Figure 26. Implication des kinases PAK dans le guidage axonal mené par les sémaphorines, les éphrines et slits. Adapté de Govek et al., 2005.

Enfin, DSCAM est une protéine transmembranaire qui joue un rôle important dans la croissance et le guidage axonal chez la drosophile via l'adaptateur DOCK/Nck. Chez l'homme, DSCAM est localisée sur le chromosome 21, dans une région impliquée dans la trisomie 21. Elle interagit directement avec PAK1 permettant ainsi l'activation de la kinase (Li et Guyan, 2004). Outre le rôle de DSCAM dans le guidage axonal, le rôle de DSCAM dans la trisomie 21 reste encore peu compris.

5.2.3) La différenciation neuronale

PAK est impliquée dans le déterminisme et la différenciation cellulaire via la voie Notch. Suite au clivage du récepteur transmembranaire Notch, la partie intracellulaire de la protéine est transloquée dans le noyau. Notch active ensuite la transcription de gènes en levant l'inhibition de co-represseurs comme la protéine SHARP. La kinase PAK1 est responsable de la phosphorylation de SHARP en augmentant son effet répresseur (Vadlamudi et al., 2005). Par ailleurs, PAK3 est impliquée dans la sortie du cycle cellulaire lors de l'engagement neuronal au cours de l'embryogenèse chez le xénope (Souopgui et al., 2002). Une réduction de l'expression de *PAK3* dans des embryons de xénope est corrélée à une hyperprolifération et à une inhibition de la différenciation neuronale. Au contraire, une forme active de PAK3 induit un arrêt du cycle cellulaire et une différenciation neuronale précoce. De plus, l'activation de la voie Notch inhibe l'expression de *X-PAK3* au cours du développement de l'embryon (Souopgui et al., 2002). Par ailleurs, Cobos et al. ont montré que l'expression de *PAK3* est fortement augmentée dans les interneurons des éminences ganglionnaires médianes du télencéphale ventral après leur migration dans le cortex, pour permettre leur différenciation (Cobos et al., 2007).

6) Rôle des kinases PAK dans la prolifération cellulaire, l'apoptose et le cancer

Les kinases PAK participent au contrôle de la prolifération cellulaire et de la transformation cellulaire (Bokoch, 2003). Alors que la forme active de PAK1 n'est pas capable par elle-même d'induire la transformation, l'expression d'une forme dominante négative de *PAK* supprime la transformation induite par l'oncogène Ras (Tang et al., 1997). PAK régule la cascade des MAP kinases ERK par phosphorylation de Raf-1 et MEK1. Ces phosphorylations ne sont pas suffisantes en elles-mêmes pour activer Raf-1 et MEK1 mais sont requises pour leur activation par Ras et Raf-1 (Hofmann et al., 2004). Plusieurs études ont montré que PAK1 est essentiel à la transformation induite par Ras, Rac1, Rac3, et Cdc42 plaçant ainsi PAK1 au centre des voies de transformation induites par les petites protéines G (Kumar et al., 2006). Les kinases PAKs intègrent des signaux venant de plusieurs voies de signalisation car elles sont régulées par sept kinases régulatrices majeures Akt, PDK1, Cdk5, Cdc2, Src, Abl, et PKA (Bokoch, 2003). En aval, les kinases PAKs régulent plusieurs voies impliquées dans la prolifération cellulaire.

6.1) Régulation du cycle cellulaire

La division cellulaire dépend de la coordination d'événements clés nécessitant la dynamique des microtubules et la modulation du cytosquelette d'actine. Grâce à la présence de trois signaux de localisation nucléaire, PAK1 se localise dans le noyau pour s'associer à la chromatine et réguler la transcription (Singh et al., 2005). Les kinases PAK jouent un rôle important dans la progression du cycle cellulaire. En effet, contrairement à l'expression d'une forme constitutivement active, un dominant négatif de PAK1 inhibe la progression en phase G1 du cycle cellulaire (Thullberg et al., 2007). PAK1 se localise au niveau des chromosomes pendant la prophase, des centrosomes pendant la métaphase et de l'anneau contractile pendant la cytokinèse (Li et al., 2002). De plus elle interagit avec l'Histone H3 pour la phosphoryler et permettre la progression dans le cycle cellulaire. PAK1 stimule l'expression du gène de la cycline D1, un régulateur important du cycle cellulaire et l'expression du domaine auto-inhibiteur de *PAK1* inhibe la progression du cycle cellulaire notamment en réduisant l'expression de *cycline D1* (Balasenthil et al., 2004 ; Thullberg et al., 2007). Enfin, PAK3 pourrait avoir des fonctions spécifiques dans l'initiation de la phase S, comme cela a été montré dans des neurones post-mitotiques (voir IV §7.3) (McPhie et al., 2003).

6.2) La voie de l'apoptose et de la survie cellulaire

Il a été montré que PAK participe aux voies pro- et anti-apoptotique. La voie pro-apoptotique est spécifique de l'isoforme PAK2 qui régule les changements morphologiques des cellules apoptotiques. En réponse à des stimuli externes qui induisent l'apoptose, PAK2 est clivée par la caspase 3, ce qui permet d'activer la kinase indépendamment des GTPases (Rudel et al., 1997). L'activation pro-apoptotique de PAK2 apparaît dans une phase tardive de l'apoptose alors que l'activation précoce de PAK1 permet la survie cellulaire. En absence de facteurs de survie, la protéine pro-apoptotique BAD (Bcl-2 antagonist of cell death) interagit avec plusieurs partenaires comme Bcl-2 (B-cell lymphoma-2) ou Bcl-xL pour inhiber leur activité. La phosphorylation de BAD par PAK1 permet la dissociation des complexes BAD/Bcl-2 et BAD/Bcl-xL, libérant ainsi Bcl-2 et Bcl-xL qui peuvent alors exercer leur action anti-apoptotique (Schürman et al., 2000). Le pouvoir anti-apoptotique des kinases PAK est impliqué dans la physiopathologie lors de l'infection par le VIH (virus de l'immunodéficience). En effet Nef, qui est une protéine virale accessoire exprimée précocement dans le cycle répliatif du VIH, s'associe aux kinases PAK. Le complexe Nef/PAK phosphoryle la protéine BAD et empêche ainsi l'apoptose des cellules T (Wolf et al., 2001). Par ailleurs, la survie cellulaire par PAK passe par l'activation du facteur de

transcription NF κ B (nuclear factor kappa B), impliqué dans l'expression de gènes anti-apoptotiques (Frost et al., 2000).

6.3) PAK et Cancer

Les PAK sont impliquées dans le contrôle de la prolifération cellulaire, l'apoptose, la migration cellulaire, l'adhésion cellulaire et l'angiogenèse ; la dérégulation de l'une de ces étapes conduit à l'apparition de cancer (Kumar et al., 2006).

Il a été montré, dans de nombreuses situations expérimentales et physiopathologiques, que l'augmentation de l'activité des kinases PAK est corrélée à la progression tumorale et au caractère invasif des tumeurs, comme cela a été rapporté dans les cancers du sein (revue de Gururaj et al., 2005), les mélanomes (Jung et al., 2004), les cancers du poumon (Regala et al., 2005), les cancers colorectaux (Carter et al., 2004). PAK est aussi impliquée dans la régulation de Merlin, une protéine codée par *NF2* (Neurofibromatosis type 2) (Xiao et al., 2002). Il a été montré que la perte d'expression de *NF2* est responsable de tumeurs cérébrales. L'augmentation de l'activité de PAK dans les cancers peut être due à une altération de la régulation de la kinase ou bien à une augmentation de l'expression du gène (Kumar et al., 2006). De ce fait PAK est actuellement une cible thérapeutique dans le traitement du cancer.

Des mutations génétiques peuvent conférer un avantage prolifératif et être à l'origine de la croissance anormale des cellules cancéreuses. Alors que les kinases PAK1 et PAK4 ont été particulièrement bien étudiées dans la transformation cellulaire et la cancérisation (Kumar et al., 2006), l'analyse des mutations du kinome dans plusieurs centaines de tumeurs a permis d'identifier une mutation dans le gène *PAK3* (Greenman et al., 2007). Cette mutation située dans la boucle activatrice du domaine kinase de PAK3 pourrait l'activer de façon constitutive, faisant de PAK3 un nouvel oncogène potentiel.

7) PAK et plasticité

7.1) Les kinases PAK sont impliquées dans la plasticité synaptique

De plus en plus de données suggèrent que les kinases PAK jouent un rôle fondamental dans la plasticité synaptique et la morphogenèse des épines dendritiques. L'expression chez la souris d'un transgène du domaine auto-inhibiteur de *PAK* qui permet de bloquer l'activation des PAKs, diminue la densité des épines filopodiales et augmente la largeur des têtes et la largeur des PSD des épines de neurones corticaux (Hayashi et al., 2004). De plus, le nombre de

vésicules amarrées à la membrane présynaptique des neurones est fortement augmenté chez les souris transgéniques. Ceci suggère que les PAK agissent vraisemblablement aussi au niveau pré-synaptique et soulève la question du couplage morpho-fonctionnel entre les structures pré-synaptiques et post-synaptiques. L'ensemble de ces données est en accord avec l'augmentation de la transmission synaptique, augmentation de la LTP et la diminution de la LTD (Hayashi et al., 2004). Des anomalies dans la consolidation et la rétention de la mémoire ont aussi été observées chez ces souris. Il a été montré par le même groupe que l'expression de ce transgène chez des souris KO *FMRI* permet de sauver les défauts de morphologie des épines dendritiques (i.e. une augmentation de la densité des épines et une augmentation de la longueur), de sauver la diminution de la LTP ainsi que les anomalies de comportement (Hayashi et al., 2007). De plus, il a été montré au cours de cette étude que PAK1 interagit directement avec FMRP. Ces résultats suggèrent que FMRP joue un rôle d'antagoniste dans les voies de signalisation médiées par PAK en réprimant par exemple la traduction d'ARNm comme Rac1, un activateur de PAK, ou la traduction de PAK lui-même.

7.2) Plusieurs voies de signalisation impliquant les kinases PAK régulent la morphogenèse des épines

En amont de PAK, le facteur d'échange PIX joue un rôle important dans la forme des épines. En effet, la perte d'expression de α -PIX par Si-RNA entraîne une altération de la morphologie des épines avec une diminution des épines de type "mushroom" et une augmentation des épines de type filopodiales. Il a été montré que ces anomalies peuvent être restaurées par l'expression d'une forme constitutivement active de *PAK3*, suggérant que α -PIX et *PAK3* sont impliquées dans la même voie de signalisation qui régule la morphogenèse des épines (Nodé-Langlois et al., 2006). Renforçant cette idée, il a aussi été montré que les défauts de morphologie des épines associés à la perte d'expression de *PAK3* par Si-RNA, ne sont pas restaurés par l'expression de α -PIX.

En aval de PAK, se trouve la voie de régulation de la polymérisation de l'actine LIM Kinase-Cofiline. Les souris KO du gène de la LIM Kinase présentent des anomalies de morphologie des épines dendritiques avec une petite tête et un gros cou, sans modification de leur densité (Meng et al., 2002). Par ailleurs, une stimulation téτανique ou un traitement au BDNF (brain-derived neurotrophic factor), induisent la phosphorylation de la Cofiline et de la kinase PAK dans les épines suggérant que la voie de signalisation PAK/LIM Kinase/Cofiline régule la réorganisation du cytosquelette suite à l'induction de la LTP (Chen, 2007 ; Rex et al., 2007). Une autre voie de régulation de la dynamique du cytosquelette par PAK implique la

phosphorylation de la chaîne légère de la myosine II (myosine II regulatory light chain, MLC) qui permet d'augmenter l'activité ATPasique de la myosine et par conséquent la contraction cytoplasmique. Ainsi, la voie de signalisation GIT1/PIX/Rac/PAK régule la morphogénèse et la formation synaptique via la MLC (Zhang et al., 2005).

7.3) Déficit des kinases PAK et maladie d'Alzheimer

La maladie d'Alzheimer est caractérisée par une neurodégénérescence responsable de la perte progressive des fonctions cognitives des individus, s'accompagnant d'anomalies de morphologie d'épines et de défauts synaptiques (Jacobsen et al., 2006). La maladie d'Alzheimer peut avoir une origine sporadique, mais peut aussi être dans certains cas d'origine génétique. En effet, la maladie d'Alzheimer peut être liée à une copie supplémentaire du chromosome 21 ou à des mutations du gène *APP* (amyloid precursor protein) situé sur le chromosome 21 ou du gène de la Presenilin1 situé sur le chromosome 14. Le cerveau des patients atteint de la maladie d'Alzheimer présente deux types de lésions : les plaques amyloïdes et la dégénérescence neurofibrillaire. Les plaques amyloïdes correspondent à l'agrégation d'un peptide anormal, le peptide bêta-amyloïde constitué de 40 ou 42 acides aminés qui résulte du clivage de l'APP. La dégénérescence neurofibrillaire correspond à l'agrégation de la protéine tau sous forme de filaments pathologiques.

Le premier lien entre la maladie d'Alzheimer et PAK fut apporté par le laboratoire de Rachael Neve en 2003. Ils ont montré que la surexpression de *APP* sauvage dans les neurones conduit à de l'apoptose et l'expression de *APP* portant les mutations responsables de la forme familiale de la maladie d'Alzheimer (FAD : Familial Alzheimer Disease) entraîne la synthèse d'ADN et l'apoptose (McPhie et al., 2003). PAK3 interagit spécifiquement avec APP dans la région proche du PBD de PAK et une forme dominante négative de PAK3 mais pas de PAK1 ni de PAK2 inhibe l'apoptose et la synthèse d'ADN induite par l'expression de *APP* (McPhie et al., 2003). Ces résultats suggèrent que la kinase neuronale PAK3 est spécifiquement impliquée dans la réinitialisation de la synthèse d'ADN dans les neurones post-mitotiques, initiée par l'expression de gènes *APP* mutées liées aux formes familiales dominantes de la maladie d'Alzheimer (McPhie et al., 2003). Par ailleurs, la maladie d'Alzheimer s'accompagne de défaut dans l'expression, la distribution et la phosphorylation de protéines impliquées dans la régulation du cytosquelette d'actine comme la débrine, la Cofiline et PAK, ce qui pourrait être à l'origine des défauts synaptiques de la maladie d'Alzheimer (Zhao et al., 2006). L'ensemble de ces résultats pose la question de savoir si les troubles cognitifs associés

à la maladie d'Alzheimer ne pourraient pas être dus à une diminution de l'activité partielle ou totale des kinases PAK ou de PAK3 plus spécifiquement.

7.4) Un rôle spécifique de PAK3 dans la plasticité synaptique

PAK3 se distingue des autres kinases du groupe I notamment par son expression restreinte au système nerveux central et son implication dans le retard mental non syndromique. PAK3 est exprimée dans les neurones et est localisée au niveau du corps cellulaire et des dendrites, en particulier dans les épines dendritiques (Ong et al., 2002 ; Boda et al., 2004 ; Hayashi et al., 2004 ; Rex et al., 2007 ; Chen et al., 2007). Après stimulation des récepteurs NMDA, PAK3 sous sa forme active phosphorylée est particulièrement enrichie dans ces structures (Hayaschi et al., 2004 ; Meng et al., 2005 ; Chen et al., 2007). Plusieurs données montrent que les kinases PAK du groupe I et en particulier PAK3, jouent un rôle fondamental dans la formation de l'épine dendritique et la plasticité neuronale. La surexpression d'une forme de *PAK3* dépourvue d'activité kinase diminue la densité des épines dendritiques alors que la perte d'expression de *PAK3* par Si-RNA augmente le nombre d'épines filopodiales, diminue le nombre d'épines normales et diminue la LTP (Boda et al., 2004 ; Zhang et al., 2005) (Figure 27). Étonnamment, les souris knock-out de PAK3 ne présentent pas d'anomalie de morphologie des épines dendritiques (Meng et al., 2005). Pourtant les souris montrent des défauts d'apprentissage, de LTP tardive et la phosphorylation de CREB est réduite (ce point sera discuté dans la partie Discussion, §1.4.4).

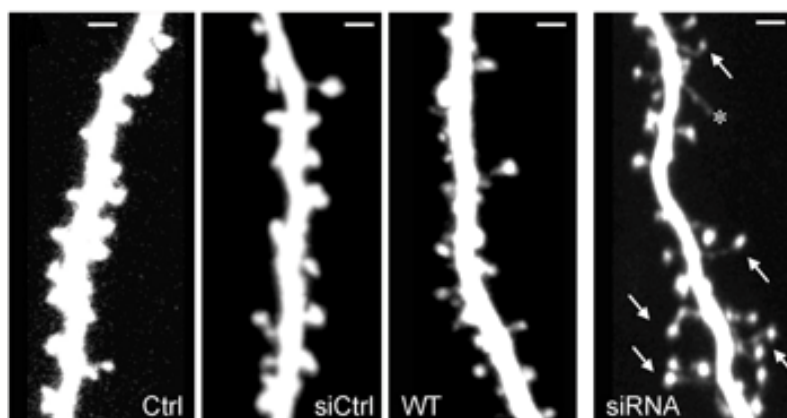


Figure 27. Modification de la morphologie des épines induite par la perte d'expression de PAK3 par Si-RNA. Les neurones d'hippocampe sont transfectés avec un vecteur contrôle (Ctrl), un oligo Si-RNA contrôle non sens (siCtrl), PAK3 wild-type (WT) et un oligo Si-RNA de PAK3 (si-RNA). D'après Boda et al., 2004.

V. L'épissage alternatif et les fonctions cognitives au cours de l'évolution

Le séquençage des génomes, notamment celui du génome humain, a révélé que le nombre de gènes par génome codant pour une protéine n'est pas corrélé à la complexité cellulaire de l'organisme. Pour moduler et diversifier les fonctions des gènes, différents mécanismes ont été mis en place au cours de l'évolution comme par exemple l'épissage alternatif.

1) Le chromosome X a joué un rôle déterminant dans l'évolution des fonctions des gènes chez les mammifères.

On retrouve sur le chromosome X un très grand nombre de gènes liés à la reproduction, aux caractères sexuels, ainsi que des gènes impliqués dans les fonctions cognitives (Zechner et al., 2001). Les chromosomes X et Y seraient probablement issus de chromosomes autosomiaux qui auraient évolués indépendamment l'un de l'autre jusqu'à ne plus être capable d'échanger d'information génétique (Check, 2005). De ce fait et de par son caractère dominant chez les mâles, le chromosome X a subi énormément de pression de sélection au cours de l'évolution pour acquérir de nouvelles fonctions.

Les trois gènes *ARHGEF6*, *OPHNI*, *PAK3*, responsables de retard mental lié au chromosome X, sont exprimés au niveau de l'hippocampe et des testicules chez les mammifères, mais ne sont pas retrouvés dans ces mêmes tissus chez les oiseaux (Kohn et al., 2007). Ceci suggère que les gènes du chromosome X ont acquis de nouvelles fonctions au cours de l'évolution notamment, lorsque l'hippocampe s'est développé chez les mammifères.

2) L'épissage alternatif est un des mécanismes qui a permis la complexification du génome des eucaryotes supérieurs.

2.1) Définition de l'épissage alternatif

Chez les eucaryotes, la plupart des gènes sont morcelés, c'est-à-dire constitués d'une suite de séquences codantes (exons) séparées par des séquences non codantes (introns). Lors de la transcription, un transcrit primaire appelé pré-ARNm, composé de copies d'exons et d'introns est synthétisé. Celui-ci est ensuite épissé pour donner un ARNm mature constitué des seuls exons. Cette réunion bout à bout des exons constitue un épissage constitutif. Il existe également des épissages appelés alternatifs qui permettent d'éliminer ou de maintenir alternativement un ou plusieurs exons (Figure 28). Ce mécanisme augmente la diversité

fonctionnelle associée à un gène. En effet, l'épissage alternatif fait qu'un gène code pour plusieurs ARNm différents et par conséquent, plusieurs protéines avec des domaines fonctionnels différents. Ainsi l'épissage alternatif donne la possibilité d'une combinaison spécifique de protéines au niveau d'un neurone par exemple. Différents types d'épissage alternatif sont illustrés dans la figure 28.

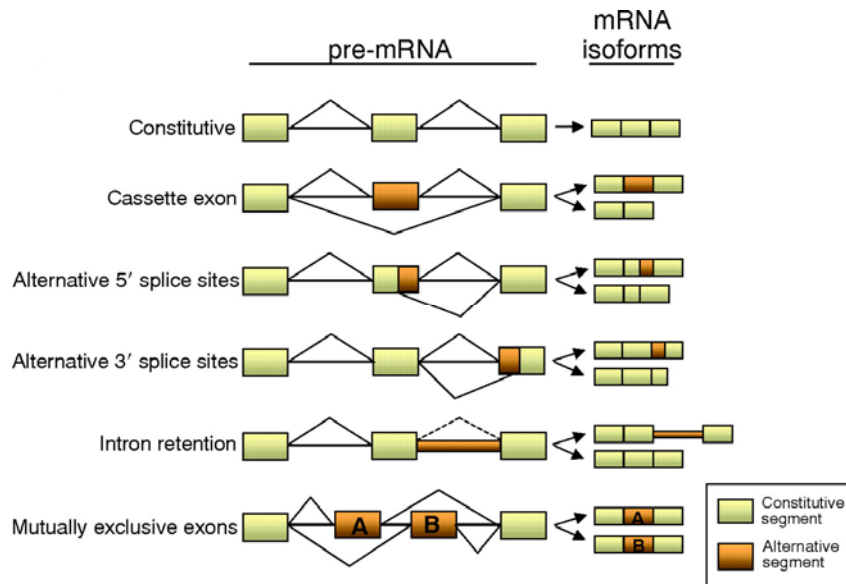


Figure 28. Différents modes d'épissage alternatifs. Le pré-ARNm subit plusieurs étapes de maturation dont l'épissage. Les introns sont excisés et les exons sont assemblés pour former un ARNm mature. D'après Srebrow et Kornblihtt, 2006.

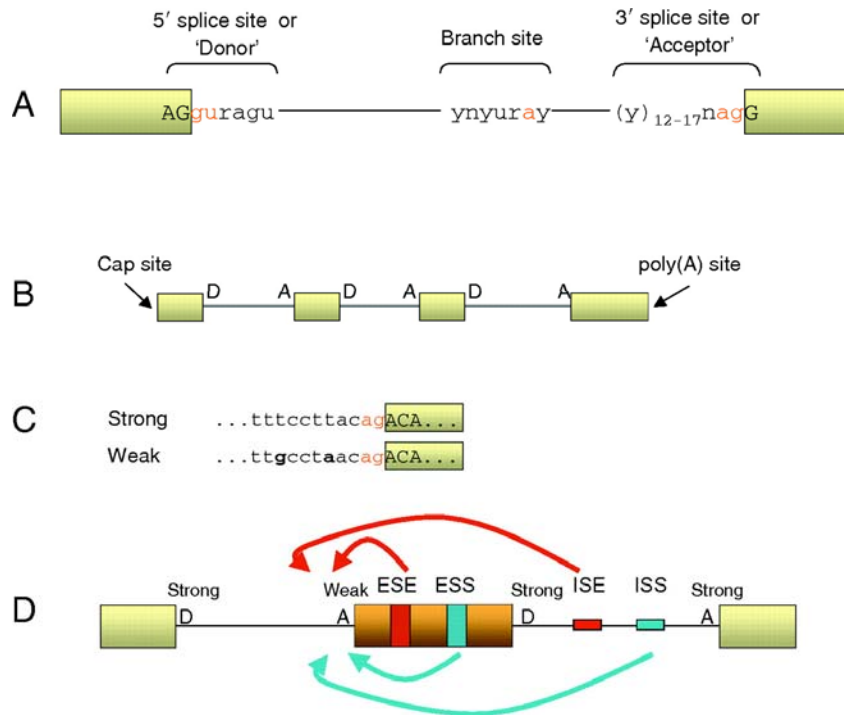


Figure 29. Schéma de la régulation de l'épissage alternatif. **A.** Séquences consensus donneur 5' et accepteur 3'. **B.** Organisation des sites accepteur (A) et donneur d'un gène eucaryote (D). A l'exception du 1^{er} et dernier exon, chaque exon interne est flanqué par des sites d'épissage en amont et en aval. **C.** Exemples d'une séquence accepteur forte (riche en pyrimidines) et faible (moins riche en pyrimidines). Les sites faibles ont une moindre affinité pour le spliceosome. **D.** Rôles schématiques des ESE (exonic splicing enhancer), ESS (exonic splicing silencer), ISE (intronic splicing enhancer) et ISS (intronic splicing silencer). Les flèches en rouge et en bleues indiquent respectivement l'activation ou la répression du mécanisme d'épissage. D'après Srebrow et Kornblihtt, 2006.

2.2) Le mécanisme d'épissage

L'épissage d'un pré-ARNm dépend de la présence de séquences spécifiques. Ces séquences, baptisées les éléments cis, comprennent : 1/ les dinucléotides GU et AG qui définissent les sites d'épissage en 5' et 3' respectivement (Figure 29A), 2/ la séquence de branchement localisée dans l'intron (Figure 29A), 3/ la séquence riche en pyrimidine située en amont du site d'épissage en 3' (Figure 29C) et 4/ les séquences régulatrices auxiliaires dans les exons appelées ESE (Exonic Splicing Enhancer) ou ESS (Exonic Splicing Silencer) et dans les introns appelées ISE (Intronic Splicing Enhancer) ou ISS (Intronic Splicing Silencer) (Blencowe, 2006) (Figure 29D). L'épissage d'un intron est réalisé en 2 étapes catalytiques (Figure 30A). La première étape consiste en la coupure du site d'épissage 5' de l'intron et la formation d'un intermédiaire branché appelé aussi "le lasso". Lors de la deuxième étape, suite à un clivage au niveau du site d'épissage en 3', cet intermédiaire est enlevé du transcrit et les deux exons sont assemblés. La première étape de l'épissage s'effectue par réaction entre une

adénine située dans le site de branchement de l'intron, 40 nucléotides avant le site receveur, et une guanine située en 5' de l'intron (Figure 30A). L'intron se sépare de l'exon 1 et une structure en lasso interne à l'intron se forme. Lors de la deuxième étape de l'épissage, l'extrémité 3' de l'exon 1 réagit avec l'extrémité 5' de l'exon 2 permettant l'épissage de l'intron et la libération du lasso qui sera dégradé par des ribonucléases. Les éléments cis, impliqués dans l'épissage sont reconnus par des composants du spliceosome (Figure 30B). Ce dernier est un complexe macromoléculaire de 250kDa composé de ribonucléoprotéines (snRNP) associées à des petits ARN (snRNA) de 100 à 300 nucléotides ainsi que plus de 200 protéines. Les snRNP U1, U2, U4, U5 et U6 ont une grande importance dans l'épissage de l'ARNm. U1 et U2 servent à la reconnaissance respectivement du site d'épissage GU en 5' et AG en 3'. Viennent ensuite se fixer U4, U5 et U6 pour former avec d'autres protéines régulatrices, le complexe catalytique. Les séquences ESE, ESS, ISE ou ISS sont des cibles spécifiques de protéines de liaison à l'ARN qui régulent en trans la répression ou l'activation de l'épissage (Figure 29D).

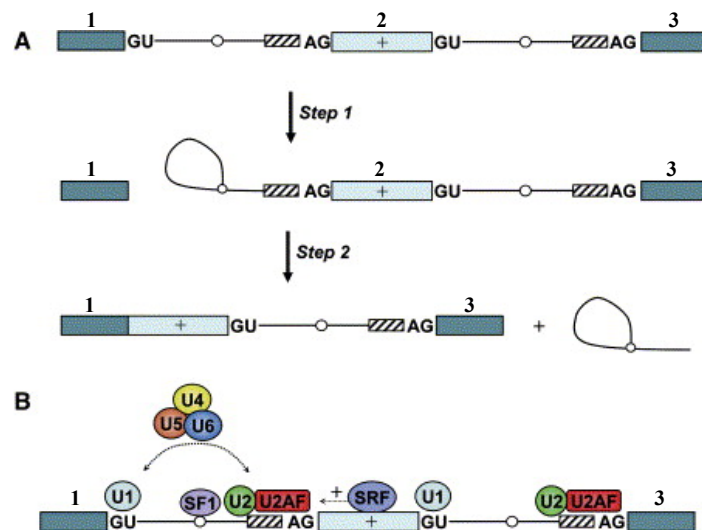


Figure 30. Schéma de l'épissage d'un pré-ARNm. **A.** L'épissage schématisé par 3 exons dépend d'éléments spécifiques en cis : les dinucléotides GU et AG en 5' et 3' respectivement, une séquence de branchement (cercle blancs), une séquence riche en pyrimidine (carrés hachurés) et un élément régulateur auxillaire (noté +). L'épissage se déroule en deux étapes. **B.** Les éléments cis sont reconnus par les composants du spliceosome. D'après Licatalosi et Darnell, 2006.

Au moins 60% des gènes humains subissent un épissage alternatif (Diane, 2005) et 15% des mutations responsables d'une maladie génétique humaine affectent l'épissage alternatif (Screbrow et Kornblihtt, 2006). Chez la Drosophile, l'épissage alternatif permet de générer

une très grande diversité protéique. C'est le cas pour le gène *DSCAM* qui pourrait générer théoriquement plus de 38 000 protéines.

2.3) Modèles d'évolution de l'épissage alternatif

L'épissage alternatif existe principalement chez les eucaryotes multicellulaires. En moyenne, un gène humain est composé de 8.8 exons d'environ 150 pb, séparés par 7.8 introns (Ast, 2004). Au cours de l'évolution, la taille des introns est fortement modifiée. Il existe deux processus pour créer un nouvel exon : la duplication de l'exon ou l'exonisation d'une séquence intronique (Ast, 2004). L'apparition de l'épissage alternatif au cours de l'évolution est basée sur deux modèles. Le premier modèle réside dans l'apparition de mutations dans la séquence d'ADN au niveau de sites spécifiques qui permettrait à la machinerie d'épissage de "sauter" un exon. Le deuxième modèle propose que l'évolution des facteurs de régulation d'épissage puisse permettre à un exon constitutif de devenir épissé.

2.4) La régulation de l'expression génique dans le cerveau

L'épissage alternatif est un phénomène fréquent et finement régulé dans le cerveau par rapport aux autres tissus (Yeo et al., 2004). Il permet de générer une combinaison spécifique de protéines pour moduler le fonctionnement des neurones et répondre efficacement à un stimulus. La régulation de l'expression des gènes et notamment l'épissage alternatif joue un rôle fondamental, bien que peu étudié dans la plasticité synaptique, notamment dans la phase tardive de la LTP. De nombreux canaux ioniques ou protéines synaptiques sont issus de l'épissage alternatif. Ce mécanisme permet de moduler au cours du développement et du temps la localisation d'une protéine, la liaison d'un récepteur à son ligand, la transduction du signal et les propriétés électrophysiologiques des neurones. C'est le cas notamment pour la PSD-95, les récepteurs AMPA, NMDA ou mGluR. L'épissage alternatif du récepteur *NMDA* est dépendante de l'activité synaptique et contrôle le trafic, la localisation et la phosphorylation des récepteurs à la synapse (Ule et Darnell, 2006). Le gène *PSD-95* code pour deux variants d'épissage, une forme courte qui contient un domaine de palmitoylation et une forme longue qui contient un domaine d'interaction protéique appelé L27. Ce domaine serait impliqué dans le trafic vésiculaire des protéines synaptiques (Chetkovich et al., 2002). Les molécules d'adhésions neurexines forment plus de 1000 variants d'épissage qui joueraient vraisemblablement un rôle important dans les contacts synaptiques (Dalva et al., 2007). Les protéines de liaison à l'ARN responsables de la régulation de la transcription et de la

traduction jouent aussi un rôle important dans la plasticité synaptique. Enfin, les protéines NOVA (Neuro-Oncological Ventral Antigen 1) ont été les premiers facteurs de régulation de l'épissage alternatif spécifique des neurones, identifiés chez les mammifères. Des mutations *NOVA* sont responsables de la pathologie POMA (paraneoplastic opsoclonus myoclonus ataxia) (Lipscombe, 2005).

2.5) L'épissage alternatif et les pathologies associées

Des altérations de l'épissage alternatif sont responsables de nombreuses maladies génétiques (Licatalosi et Darnell, 2006 ; Srebrow et Kornblihtt, 2006). Des travaux récents distinguent deux classes de mutations :

1) Des mutations provoquant des défauts d'épissage primaire (ou cis-acting splicing disorders). Ces mutations modifient le pré-ARNm au niveau de séquences essentielles pour un épissage correct. Elles renforcent ou affaiblissent les séquences enhancers ou silencers, suppriment des sites d'épissage, ou encore créent de nouvelles séquences d'épissage. La mutation ponctuelle d'une seule base dans le gène *ARHGEF6*, au niveau du premier intron entraîne la perte de l'exon 2 et une délétion de 28 acides aminés dans la protéine PIX. Cette mutation est responsable d'un retard mental non syndromique (Kutsche et al., 2000).

2) Des mutations de gènes codant des protéines de liaison à l'ARN ou des protéines de liaison au complexe du spliceosome, impliquées dans l'épissage alternatif (ou trans-acting splicing disorders). La protéine NOVA, associée à la pathologie POMA, a été identifiée comme une protéine essentielle dans l'épissage alternatif des pré-ARNm du système nerveux. Cette protéine lie plusieurs ARNs qui codent spécifiquement pour des protéines synaptiques (Lipscombe, 2005).

RESULTATS

Objectifs de ma thèse

Afin de mieux comprendre le rôle de PAK3 dans les mécanismes moléculaires de la plasticité synaptique, j'ai étudié l'effet des mutations responsables de retard mental sur les propriétés biochimiques et biologiques de la kinase (Partie I). Par ailleurs, au cours d'une étude de la structure du gène de PAK3, j'ai mis en évidence un nouvel exon alternatif qui est présent dans deux variants d'épissage qui ont la particularité d'être constitutivement actifs (Partie II). Afin de comprendre comment ces variants sont régulés, j'ai montré que la kinase PAK3 forme des hétérodimères avec PAK1 ce qui pourrait être à l'origine d'un nouveau mécanisme de régulation des variants d'épissage constitutivement actifs (Partie III). Enfin l'ensemble de ces résultats pose la question de l'implication des différents variants de PAK3 dans la physiopathologie neuronale notamment dans le retard mental et la maladie d'Alzheimer. Ainsi, j'ai recherché des mutations dans les exons alternatifs et j'ai étudié les variations de l'expression des protéines PAK3 chez des patients atteints de retard mental et de la maladie d'Alzheimer respectivement (Partie IV).

I

Etude des mutations de PAK3 responsables de retard mental non syndromique sur les propriétés biochimiques et biologiques de la kinase

Kreis P, et al., (2007) J Biol Chem 282:21497-21506

Afin de mieux comprendre l'implication de PAK3 dans les mécanismes moléculaires de la plasticité synaptique, j'ai introduit les trois mutations responsables de retard mental dans le gène PAK3 et j'ai étudié leurs effets sur les fonctions de la kinase. Dans un premier temps, j'ai identifié la GTPase qui lie et active le mieux PAK3. Par double hybride et par co-immunoprécipitation, j'ai montré que par rapport à la GTPase Rac1, Cdc42 est le meilleur activateur de PAK3. Cette liaison PAK3-Cdc42 est plus forte qu'avec PAK1. Dans un deuxième temps, j'ai étudié l'effet des mutations sur la liaison à Cdc42 et l'activité kinase de PAK3. Les mutations A365E et R419X suppriment totalement l'activité kinase de PAK3. La mutation R67C diminue fortement la liaison de PAK3 à la GTPase Cdc42 ainsi que son activation par celle-ci. L'expression des trois mutants de PAK3 dans des neurones d'hippocampe a permis de montrer que les mutations A365E et R419X affectent principalement la morphologie des épines dendritiques alors que la mutation R67C diminue fortement la densité des épines sans affecter leur longueur. De plus, j'ai montré que la présence des mutations n'affecte pas la localisation de PAK3 dans les épines dendritiques.

Supplemental Material can be found at:
<http://www.jbc.org/cgi/content/full/M703298200/DC1>

THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY VOL. 282, NO. 29, pp. 21497–21506, July 20, 2007
 © 2007 by The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc. Printed in the U.S.A.

The p21-activated Kinase 3 Implicated in Mental Retardation Regulates Spine Morphogenesis through a Cdc42-dependent Pathway^{*S}

Received for publication, April 19, 2007, and in revised form, May 29, 2007. Published, JBC Papers in Press, May 30, 2007, DOI 10.1074/jbc.M703298200

Patricia Kreis[‡], Emmanuel Thévenot[‡], Véronique Rousseau[‡], Bernadett Boda[§], Dominique Muller[§], and Jean-Vianney Barnier^{‡1}

From the [‡]CNRS, Institut de Neurobiologie Alfred Fessard, FRC2118, Laboratoire de Neurobiologie Cellulaire et Moléculaire, UPR9040, 1 avenue de la terrasse, Gif sur Yvette, F-91198, France and the [§]Department of Basic Neuroscience, Centre Medical Universitaire, 1211 Geneva 4, Switzerland

The p21-activated kinase 3 (PAK3) is one of the recently identified genes for which mutations lead to nonsyndromic mental retardation. PAK3 is implicated in dendritic spine morphogenesis and is a key regulator of synaptic functions. However, the underlying roles of PAK3 in these processes remain poorly understood. We report here that the three mutations R419X, A365E, and R67C, responsible for mental retardation have different effects on the biological functions of PAK3. The R419X and A365E mutations completely abrogate the kinase activity. The R67C mutation drastically decreases the binding of PAK3 to the small GTPase Cdc42 and impairs its subsequent activation by this GTPase. We also report that PAK3 binds significantly more Cdc42 than Rac1 and is selectively activated by endogenous Cdc42, suggesting that PAK3 is a specific effector of Cdc42. Interestingly, the expression of the three mutated proteins in hippocampal neurons affects spinogenesis differentially. Both kinase-dead mutants slightly decrease the number of spines but profoundly alter spine morphology, whereas expression of the R67C mutant drastically decreases spine density. These results demonstrate that the Cdc42/PAK3 is a key module in dendritic spine formation and synaptic plasticity.

The p21-activated kinase 3 (PAK3)² is one of these recently identified genes implicated in X-linked nonsyndromic forms of mental retardation, and three mutations have been identified in independent families (7–9). PAK3 is a member of the PAKs group I, which are effectors of Rac1 and Cdc42 GTPases. Interestingly, inhibition of PAKs by expression of an inhibitory peptide in postnatal forebrains impaired synaptic plasticity (10). PAKs also play a fundamental role in cognitive deficits in Alzheimer disease (11, 12). Recent evidence supports a role for PAKs in spine morphogenesis: indeed inhibition of PAKs decreased the number of spines and altered their morphology (10). Concerning PAK3, reduction of its expression or expression of a PAK3 kinase-dead mutant induced abnormal elongated dendritic spines and decreased mature spine synapses (13, 14). PAK3 knockdown and knock-out experiments induce abnormal long term potentiation, indicating a major role for PAK3 in synaptic plasticity (13, 15).

How PAK3 regulates spinogenesis and synaptic plasticity is still unknown. To address this question, we introduced the three identified mental retardation mutations into the PAK3 gene and analyzed their effects on the functions of PAK3. Two mutations, R419X and A365E, are located in the kinase domain, whereas the third one, R67C, is present in the regulatory domain, at the N-terminal end of the p21-GTPase-binding domain (PBD). We show that the two mutations R419X and A365E completely inactivate the catalytic function of the kinase. We also report that Cdc42 is the main activator of PAK3 and that the R67C mutation severely impairs PAK3 binding to Cdc42 and the subsequent activation of PAK3. Interestingly, whereas the mutated proteins are normally localized in dendritic spines, their expression in hippocampal neurons of organotypic slice cultures induces different phenotypes. Our data delineate a new pathway linking the Cdc42 GTPase to PAK3 in dendritic spine morphogenesis.

The number, shape, and structure of dendritic spines change in response to synaptic activity, and anomalies of spine morphogenesis are often associated with cognitive defects, such as mental retardation, Alzheimer disease, Down syndrome, autism, and schizophrenia (1, 2). Actin cytoskeleton, enriched in dendritic spines, plays a major role in spine dynamics and is under the control of Rho-GTPase signaling (3–5). Several genes that are implicated in nonsyndromic mental retardation are direct regulators or effectors of Rho GTPases (6).

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Antibodies—Antibodies to HA (12CA5) were purchased from Roche Diagnostics (Meylan, France). The anti-PAK3-N19

* This work was supported in part by grants from CNRS, Fondation Jérôme Lejeune, Association contre le Cancer, Ligue contre le Cancer-Essonne, Fédération pour la Recherche sur le Cerveau, by a fellowship from Fondation pour la Recherche Médicale (to P. K.), and by grants from the Swiss National Science Foundation, Telethon and Eagle Foundation (to D. M.). The Barnier team is a member of the CNRS research network GDR2823. The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

^S The on-line version of this article (available at <http://www.jbc.org>) contains supplemental Figs. S1–S3.

¹ To whom correspondence should be addressed: Tel.: 33-1-69823418; Fax: 33-1-69824141; E-mail: barnier@nbcn.cnrns-gif.fr.

² The abbreviations used are: PAK, p21-activated kinase; PBD, p21-binding domain; GFP, green fluorescent protein; EGFP, enhanced GFP; mRFP, monomeric red fluorescent protein; DIV, days *in vitro*; MBP, myelin basic protein; GEF, guanine exchange factor; HA, hemagglutinin; CMV, cytomegalovirus; siRNA, small interference RNA.

Cdc42/PAK3 Module Regulates Spine Formation

antibody directed against the 19 N-terminal amino acids and the GFP antibody were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Tebu, Le Perray en Yvelines, France); the monoclonal anti-HA-7-agarose conjugate and the polyclonal anti-FLAG (F7425) were purchased from Sigma-Aldrich, the monoclonal anti-Cdc42 and anti-Rac1 were obtained from BD Biosciences.

Plasmid Constructions—All PAK3 constructs were derived from the mouse PAK3 gene, without alternatively spliced exon, herein named as PAK3 (16). All of the PAK3 mutants were generated from the pHA-PAK3a plasmid previously described (16) with *Pfu* polymerase (Promega, Charbonnières, France), using procedures based upon the QuikChange protocol (Stratagene, Amsterdam, The Netherlands) and confirmed by sequencing. The mutations introduced into PAK3 include the three mutations responsible for mental retardation: R67C (oligonucleotide set: 5'-ccaataagaagaaagagaagagtcccagagatctctctcc-3' and 5'-ggaagagagatctctggcactcttctcttctctattgg-3') leading to the HA-PAK3a-R67C plasmid; A365E (oligonucleotide set: 5'-gtatgatgaaggacagatagaagctgtcttagagagtcc-3' and 5'-ggcactctctacagacagcttctatctgtcctcatccatc-3') leading to the HA-PAK3a-A365E plasmid; R419X (oligonucleotide set: 5'-cactctgagcaagtaaatgaagcactatggtgggaac-3' and 5'-gttccaccatagtgcttcattacttctgctcaggagt-3') leading to the HA-PAK3-R419X plasmid. The PAK3 double mutant H78L-H81L was generated with the oligonucleotide set: 5'-ctctcctcagacttggactcagattctgtgggtttgatgcagtcac-3' and 5'-gtgactcatcaaacccaagaatcgtgagctcaagctgaaggaagag-3', leading to the HA-PAK3-H78L-H81L plasmid. The HA-PAK3-K297L plasmid containing the mutation K297L leading to a kinase dead construct was previously described (16).

The BamHI/XbaI fragments of the different HA-tagged PAK3 constructs described above were subcloned into the BamHI/XbaI-linearized pEGFP vector (Clontech, Ozyme, St. Quentin en Yvelines, France), to obtain GFP-tagged PAK3 plasmids named GFP-PAK3-wt, GFP-PAK3-R67C, GFP-PAK3-A365E, GFP-PAK3-R419X, GFP-PAK3-H78L-H81L, and GFP-PAK3-K297L. The p3x-FLAG-Tiam1-C580 was obtained by subcloning Tiam1 C580 insert, corresponding to the DH-PH domain, from pUT SV1-Tiam1 C580 (a gift from J. Collard, The Netherlands Cancer Institute, Amsterdam, The Netherlands) into the p3xFLAG-myc-CMV-24 expression vector (Sigma-Aldrich) using NotI restriction sites. Yeast expression plasmids containing the PAK3-wt, PAK3-H78L-H81L, or PAK3-R67C cDNAs fused in-frame to the Gal4-activation domain were obtained by ligation into vector pGAD3S2X (a gift from J. Camonis, Institut Curie, Paris, France) after BamHI/XbaI digestion. The GTPase plasmids in GFP and LexA vectors were kindly provided by P. Fort (Centre de Recherche de Biochimie Macromoléculaire (CRBM), Montpellier, France) and in the latter constructs, the coding sequences were modified to allow nuclear localization of GTPases. The plasmid coding for the Intersectin DH-PH domain, pCGN-ITSN1L(DH-PH), was kindly provided by J. O'Bryan (University of Illinois College of Medicine, Chicago, IL). The red fluorescent protein (mRFP1)-actin plasmid was a gift from C. Gauthier-Rouvière (CRBM), and mRFP1 was a gift from R.Y. Tsien (Howard Hughes Medical Institute Laboratories, San Diego, CA).

Cell Culture, Transfection, and Confocal Imaging for COS7 Cells and Dissociated Hippocampal Neurons—Culture and transfection of COS7 cells were done as previously described (16). Plasmid expression was limited to 30 h to avoid protein over expression. Primary cultures of dissociated hippocampal neurons were prepared from embryonic day 18 (E18) rats as reported by Goslin and Banker (17). Cultures were transfected using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) at 7 days *in vitro* (DIV) and fixed at DIV 21. Alternatively, transfection at DIV 18 gave rise to the same results. The neurons, cultured DIV 21, display spines that possess the characteristics of mature synapses. Indeed, in these cultures, we observed actin concentration in spines, PSD-95 aggregates in the spine head, and electrophysiological recordings show functional synaptic transmission (18). Simultaneous transfection of the RFP-actin plasmid was used to confirm the presence of spines in transfected neurons. RFP-actin and tagged GFP wild-type or mutant PAK3 cDNA expression plasmids were co-transfected at a ratio of 1:2. Imaging was carried out with a Leica (Mannheim, Germany) confocal microscope using the 488 nm band of an argon laser and the 561 nm band of a diode-pumped solid-state laser for excitation of GFP or RFP, respectively. Well differentiated and simultaneous transfected neurons were chosen, and images were acquired with a 63× objective (1.4 numerical aperture). Because dendritic spines often cross several z planes, we took z series stacks of 1–1.5 μm (typically 5–8 frames) from the bottom to the top of dendrites and used Image J software to generate image projections.

Hippocampal Slice Cultures, Transfection, Image Acquisition, and Analysis—Rat organotypic hippocampal slice cultures were prepared as described by Stoppini *et al.* (19). Cultures were maintained 11–12 days *in vitro* and transfected using a gene gun (Bio-Rad) technique according to the manufacturer's instructions. Plasmid DNAs at a ratio of 20 μg of pcDNA3.1-EGFP to 40 μg of HA-PAK3 constructs were precipitated onto 10 mg of 1.6-μm gold microcarriers. Transfection of 10–30 cells per slice culture was reproducibly obtained, and expression was stable until 7–8 days. Control experiments showed that cells co-transfected with EGFP and DsRed constructs expressed green and red fluorescence in all cases (*n* = 7). Two days after transfection hippocampal organotypic cultures were submerged in a chamber perfused with an extracellular medium containing (in mM): 124 NaCl, 1.6 KCl, 2.5 CaCl₂, 1.5 MgCl₂, 24 NaHCO₃, 1.2 KH₂PO₄, 10 glucose, and 2 ascorbic acid, saturated with 95% O₂ and 5% CO₂, pH 7.4, temperature of 33 °C. Imaging of dendritic segments was performed through a 60× water immersion objective using a VisiTron (Puchheim, Germany) spinning disk confocal system. Control experiments showed that repetitive imaging under those conditions did not affect the morphology or viability of transfected cells. Z-stacks of 50- to 200-μm-long dendritic segments were taken on secondary and tertiary dendrites of pyramidal neurons, and the characteristics of dendritic protrusions were measured using Metamorph software (Universal Imaging Corp., Downingtown, PA). The parameters analyzed were protrusion (spines and filopodia) density and length, measured from the limit of the dendrite to the tip of the protrusion.

Cdc42/PAK3 Module Regulates Spine Formation

Cell Lysis, Immunoprecipitation, Kinase Assay, Pulldown, and Immunoblotting Analysis—Transfected cells were lysed as previously described (16). In some experiments, to activate the kinase, cleared cell extracts of PAK3-transfected cells were incubated with increasing amounts of recombinant Cdc42-V12 in the presence of 25 μ M ATP during 30 min at room temperature. Extracts were then immunoprecipitated by incubating them with 4 μ l of 12CA5 anti-HA antibody and 50 μ l of protein G-agarose (Sigma-Aldrich) overnight at 4 °C. After washing the immunocomplexes, aliquots were subjected to immunoblotting to ensure that PAK proteins were correctly expressed and immunoprecipitated. Protein samples were separated by 10% SDS-PAGE and transferred to a polyvinylidene difluoride membrane (Amersham Biosciences, GE Healthcare Europe, Orsay, France). Immunodetection was performed using the SuperSignal chemiluminescent reagent (Pierce, Perbio Science, Bières, France). Quantification of chemiluminescence was performed after acquisition with a charge-coupled device camera GeneGnome (Syngene, Ozyme, Voisin le Bretonneux, France) using quantification software (GeneSnap and GeneTools, Syngene, Ozyme). GST-Cdc42-V12 recombinant proteins were expressed in *Escherichia coli* -BL21LysS and purified on glutathione-agarose beads as described by the manufacturer (Amersham Biosciences, GE Healthcare Europe).

For kinase reactions, immunoprecipitates were washed one more time in the kinase buffer (25 mM HEPES, pH 7.4, 25 mM MgCl₂, 25 mM β -glycerophosphate, 2 mM dithiothreitol, 0.1 mM orthovanadate). Immunoprecipitates were then incubated in the kinase buffer containing 20 μ M ATP and 5 μ Ci of [γ -³²P]ATP (Amersham Biosciences, GE Healthcare Europe) for 20 min at 30 °C, in the absence or in the presence of 3 μ g of H2B (Sigma-Aldrich) or 3 μ g of myelin basic protein (MBP) (Sigma) as a substrate. Boiling in SDS-Laemmli sample buffer stopped the reaction, and the products were resolved by SDS-PAGE. The incorporation of ³²P was quantified using a PhosphorImager (Amersham Biosciences).

Co-immunoprecipitation was performed as previously described (16). Briefly, COS7 cells were transfected with 5 μ g of active GFP-tagged Rac1 or Cdc42 along with 5 μ g of HA-tagged PAK3 constructs. Cell lysates in Robert's lysis buffer were immunoprecipitated overnight with anti-HA-agarose conjugate. Immune complexes were separated by electrophoresis and transferred to polyvinylidene difluoride membranes. Western blotting analysis was performed with anti-PAK3 N19 antibodies to detect PAK3, anti-HA (12CA5) to identify HA-PAK3 and HA-ITSN proteins, anti-GFP antibodies to detect co-precipitated Cdc42 or Rac1 proteins, and anti-FLAG (F7425 from Sigma) to reveal FLAG-Tiam1. Pulldown assays to determine the active Cdc42 and Rac1 levels in cell lysates expressing intersectin or Tiam1 were performed using GST-PBD-PAK3 as described (16).

Two-hybrid Analysis—Transformants were grown on tryptophan/leucine drop-out agar plates (Clontech, San Francisco, CA) for 3 days at 30 °C. The interactions were assessed using liquid culture β -galactosidase assays with *O*-nitrophenyl β -D-galactopyranoside (Sigma-Aldrich) as the substrate, according to the Clontech protocol. β -Galactosidase activity was quantified by spectrophotometer readings and converted to β -galac-

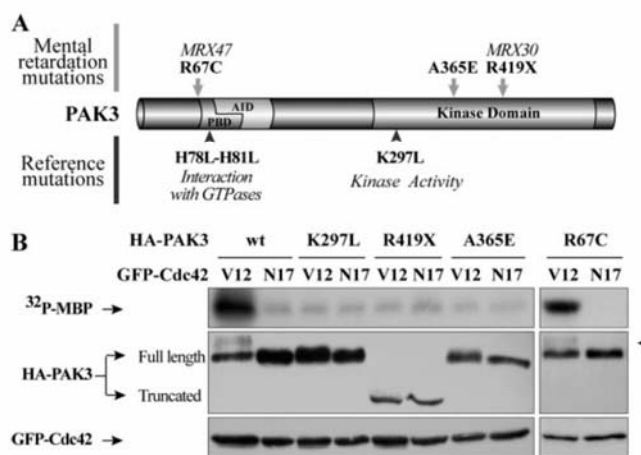


FIGURE 1. Mental retardation mutations of PAK3 differentially affect the kinase activity. A, PAK3 possesses the classic structure of the PAKs of the group I, i.e. a C-terminal kinase domain, a p21-binding domain (PBD) that interacts with Rho GTPases and, overlapping with this domain, an auto-inhibitory domain (AID) that inhibits the kinase activity in resting cells. The binding of the GTPases leads to the activation of the catalytic domain. Arrows indicate the localization of the three mutations R67C, A365E, and R419X, responsible for mental retardation, whereas arrowheads indicate mutations described in the literature: the H78L-H81L mutation located in the PBD disrupts the binding to GTPases, and the K297L mutation disorganizes the ATP binding pocket in the catalytic domain. Amino acid numeration is based on the mouse PAK3 sequence that we have previously cloned (accession number AJ496262). MRX30 and MRX47 correspond to the families identified by the X-Linked Mental Retardation Consortium. B, R419X and A365E mutations abolish kinase activity, whereas R67C mutation has no effect on the kinase activity. PAK3 constructs: wt, K297L kinase-dead mutant, and the three mental retardation mutants (R419X, A365E, and R67C) were co-transfected in COS7 cells with active V12 or inactive N17 mutants of GFP-Cdc42 constructs. PAK3 proteins were HA-immunoprecipitated 30 h later and tested in a kinase assay using MBP as a substrate (upper panel). Immunoprecipitated PAK3 proteins and expression of GTPases were controlled by immunoblotting using anti-PAK3 N19 and GFP antibodies (middle and lower panels, respectively). Data shown are representative of three independent experiments. Note the electrophoretic shift (arrowhead) of the Cdc42-activated PAK3 wild-type and R67C proteins due to autophosphorylation (middle panel).

tosidase units by normalizing to the number of cells. The interaction of PAK3-wt with Cdc42-V12 was defined to be 100%. Experiments were repeated three times in triplicate.

RESULTS

Differential Effects of PAK3 Mental Retardation Mutations on Its Kinase Activity—The three mutations responsible for mental retardation are located in different functional regions of the PAK3 protein (Fig. 1A). The first mutation, located in the catalytic domain, generates a stop codon TGA at the position coding for arginine 419 (R419X), leading to a truncated protein, which is devoid of kinase activity (7). The second mutation, in the kinase domain, corresponds to a substitution of a conserved alanine residue to a glutamate (A365E) (9). The third mutation present at the extremity of the PBD domain mutates the arginine 67 to a cysteine residue (R67C) (8). The molecular defects associated with the A365E and R67C mutations have not yet been described. To assess the effects of the three mutations R419X, A365E, and R67C, on the biochemical properties of PAK3, we introduced them into the coding sequence of the PAK3 gene. We compared these new mutated forms to two well described PAK mutants: the kinase-dead mutant PAK3-K297L and a GTPase-deficient binding mutant PAK3-H78L-H81L (20, 21).

Cdc42/PAK3 Module Regulates Spine Formation

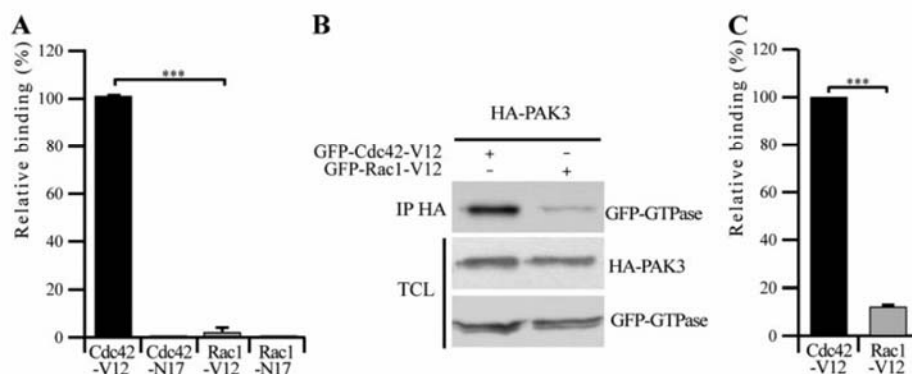


FIGURE 2. PAK3 has the highest affinity for the active Cdc42 GTPase. *A*, two-hybrid interaction of full-length wild-type PAK3 protein with Rac1 and Cdc42 GTPases deleted for membrane-targeting sequences. Yeast cells were co-transformed with the full-length PAK3-wt construct and active V12 or inactive N17 forms of Cdc42 or Rac1. Measurements of β -galactosidase activity in transformants identified the strength of the interaction between bait and prey. Relative β -galactosidase activity is given per A_{600} unit (relative light units/ A_{600}). The figure shows the mean value of at least three independent colonies in triplicate. Comparison with Student's *t* test: ***, $p < 0.001$. *B*, co-immunoprecipitation of full-length kinase-dead HA-PAK3 proteins with active forms of GFP-tagged Cdc42 or Rac1 GTPases co-expressed in COS7 cells. Presence of GFP-tagged GTPases in the immune complexes was revealed by anti-GFP Western blotting (upper panel). Levels of HA-PAKs and GFP-GTPases, in total cell lysates (TCL) were controlled by anti-HA and anti-GFP immunoblotting (middle and lower panels, respectively). Data shown are representative of three independent experiments. *C*, quantifications of co-immunoprecipitation from three independent experiments were averaged after acquisition of the chemiluminescence with a charge-coupled device camera (histogram on the right panel). Comparison with Student's *t* test: ***, $p < 0.001$, $n = 3$.

To analyze their respective kinase activity, the different PAK3 mutants were co-expressed in COS7 cells with constitutively active V12 or inactive N17 forms of Cdc42. Kinase assay were performed with HA-immunoprecipitated PAK3 proteins using the MBP as substrate (Fig. 1B). The wild-type PAK3 protein is strongly activated when co-expressed with Cdc42-V12, whereas no activity is detected when co-expressed with the inactive N17 form of the GTPase. As expected, the PAK3-K297L and the PAK3-R419X proteins had no detectable kinase activity. We also report here that the A365E mutation completely abolished the kinase activity of PAK3. Surprisingly, the PAK3-R67C protein showed the same kinase activity as the wild-type protein when it was co-expressed with Cdc42-V12 (R67C: $110 \pm 12.4\%$ compared with wild-type). Kinase assays measured by autophosphorylation confirmed these results (supplemental Fig. S1A). We observed similar activation of wild-type PAK3 and PAK3-R67C when they were co-expressed with Rac1-V12 (supplemental Fig. S1B). Thus, contrary to the R419X and A365E mutants, which are devoid of kinase activity, the kinase activity of the R67C mutant is similar to that of the wild-type PAK3 protein, in these experimental conditions.

PAK3 Binds More Efficiently Cdc42 than Rac1—Despite its full activation when Cdc42 was overexpressed, the location of the R67C substitution at the NH₂ extremity of the PBD suggested that this mutation may impair the binding of PAK3 to the GTPases and its activation. We first quantitatively compared the interaction of constitutively active or inactive Rac1 and Cdc42 to the wild-type PAK3 protein using a liquid β -galactosidase two-hybrid assay (Fig. 2A). We verified that inactive forms N17 of Rac1 and Cdc42 did not bind PAK3 (Fig. 2A and supplemental Fig. S2). We also verified that the PAK3-H78L-H81L protein, impaired in GTPase binding, did not interact with Cdc42-V12 or Rac1-V12 (supplemental Fig. S2). As shown in Fig. 2A, the wild-type PAK3 protein interacts strongly with

the active Cdc42 bait. In contrast, the interaction with the active form of Rac1 is very faint, $\sim 2\%$ of the interaction between PAK3 and Cdc42. Quantification of these different interactions are presented in supplementary data (supplemental Fig. S2C).

To confirm that the PAK3 protein binds more strongly Cdc42 than Rac1, HA-PAK3 co-expressed with active forms of GFP-Rac1 and GFP-Cdc42 were immunoprecipitated, and isolated complexes were analyzed for the presence of the associated GTPases (Fig. 2B). Because the interaction of PAK proteins with the GTPases could be regulated by autophosphorylation, we used kinase-dead mutants of PAK3 (K297L) (22). Quantification of co-immunoprecipitated GTPases showed that the amount of Cdc42 bound to PAK3 is 10-fold higher

than Rac1 (the interaction with Rac1 reached $11 \pm 0.58\%$ of the normalized interaction with Cdc42) (Fig. 2C).

The R67C Mutation Decreases Cdc42 Binding to PAK3—We next analyzed the interaction of the PAK3-R67C protein with Rac1 and Cdc42 GTPases using the liquid β -galactosidase two-hybrid assay and co-immunoprecipitation. Interestingly, we show that the R67C mutation decreased the binding of PAK3 to Cdc42 (Fig. 3A). This interaction decreased to 70% compared with the interaction with wild-type PAK3. However, the binding of PAK3-R67C to Rac1 was not significantly different from PAK3-wt and remained faint.

To confirm this result, we examined GTPase co-immunoprecipitation with PAK3 proteins from co-transfected COS7 cells. We verified that Cdc42-V12 and Rac1-V12 did not bind the PAK3-H78L-H81L protein (Fig. 3, B and D). In agreement with the two-hybrid assays, we found a strong decrease of the amount of Cdc42 co-immunoprecipitated with PAK3-R67C (down to 40%) (Fig. 3C). However, in these conditions PAK3-R67C binds five times more Rac1 than the wild-type PAK3 protein does (Fig. 3, D and E). We also analyzed by co-immunoprecipitation the interaction of Cdc42 with the three kinase-dead mutants PAK3-K297L, PAK3-R419X, and PAK3-A365E. We found that these mutations did not impair the binding of PAK3 with this GTPase in agreement with the first characterization of the interaction of PAK3 with Cdc42 (supplemental Fig. S3) (7, 23). Altogether our results demonstrate that PAK3 binds Cdc42 more efficiently than Rac1 and that the R67C mutation significantly decreased the binding of PAK3 to Cdc42 and increased the binding to Rac1.

R67C Mutation Impairs Kinase Activation by Cdc42—Although the R67C protein is activated when Cdc42-V12 is co-expressed in COS7 cells (Fig. 1B), the interaction with this GTPase is weak (Fig. 3, A and B). This apparent discrepancy could be explained by the high expression level of Cdc42-V12,

Cdc42/PAK3 Module Regulates Spine Formation

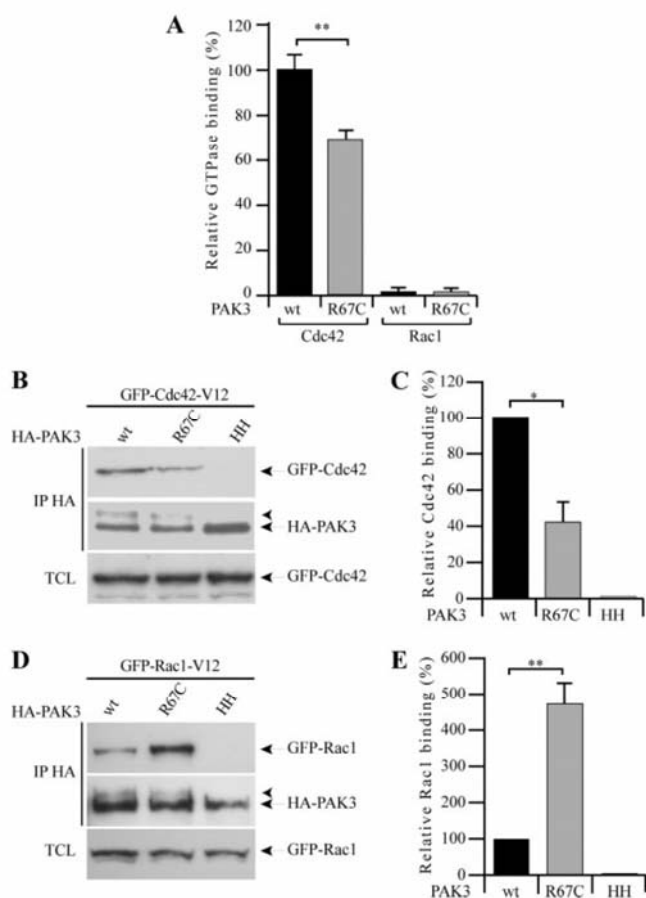


FIGURE 3. The R67C mutation decreased interactions of PAK3 with Cdc42 but increased interactions with Rac1. *A*, two-hybrid interaction of Cdc42-V12 and Rac1-V12 with full-length wild-type PAK3 and R67C mutant. Interactions were measured and quantified as described in Fig. 2*A*. The figure shows the mean value of at least three independent colonies in triplicate. Comparison with Student's *t* test: **, $p < 0.01$. *B*, *in vivo* interaction of active Cdc42 with PAK3 proteins. HA-tagged PAK3 proteins (wt, R67C, or H78L-H81L) were co-expressed in COS7 cells with active GFP-tagged Cdc42. Presence of the GFP-tagged Cdc42 protein in the immune HA-complexes was revealed by anti-GFP Western blotting (upper panel). PAK3 proteins were immunoprecipitated (IP) using anti-HA antibodies, and the amount of immunoprecipitated PAK3 proteins was controlled by using anti-PAK3 N19 immunoblotting (middle panel). The presence of GFP-GTPases in total cell lysates (TCL) was controlled by anti-GFP immunoblotting (lower panel). As noted in Fig. 1*B*, co-transfection of PAK3-wt and PAK3-R67C with Cdc42-V12 induces an electrophoretic shift (arrowhead). Data shown are representative of three independent experiments. *C*, quantifications of co-immunoprecipitation with Cdc42 from three independent experiments were standardized after acquisition of chemiluminescence with a charge-coupled device camera (histogram). Comparison with Student's *t* test: *, $p < 0.05$. *D*, co-immunoprecipitation of active GFP-tagged Rac1 with HA-tagged PAK3 proteins was performed as described in Fig. 2*B*. Presence of GFP-tagged Rac1 protein in the immune complexes was revealed by anti-GFP Western blotting (upper panel). PAK3 proteins were immunoprecipitated (IP) using anti-HA antibodies and amount of immunoprecipitated PAK3 proteins was assessed by anti-PAK3 N19 immunoblotting (middle panel). Presence of GFP-GTPases in total cell lysates (TCL) was assessed by anti-GFP immunoblotting (lower panel). Note the electrophoretic shift when Rac1-V12 was overexpressed with PAK3-wt and PAK3-R67C (arrowhead). Data shown are representative of three independent experiments. *E*, quantifications of co-immunoprecipitation with Rac1 from three independent experiments were standardized after acquisition of chemiluminescence with a charge-coupled device camera (histogram). Comparison with Student's *t* test: **, $p < 0.01$.

which may bypass the loss of affinity of PAK3-R67C for Cdc42-V12. To more precisely control the amount of Cdc42 used to activate PAK3, we performed an *in vitro* kinase assay, by adding

increasing amounts of GST-Cdc42-V12 to transfected cell lysates. Hence, lysates of COS7 cells expressing PAK3-wt or PAK3-R67C were incubated without Cdc42 or with a precise amount of GST-Cdc42-V12 protein before performing the kinase assay. As shown in Fig. 4*A*, PAK3-R67C is significantly less activated by Cdc42-V12 than the wild-type protein, under these conditions.

To analyze the *in vivo* activation of PAK3 by endogenous Cdc42 and Rac1, we took advantage of the ability of the guanine exchange factors (GEFs), intersectin and Tiam1, to promote specific activation of Cdc42 and Rac1, respectively (24, 25). We verified the specificity of the GEFs by monitoring the levels of active Cdc42 and Rac1 in a pull-down assay using GST-PBD-PAK3 to sequester active GTP-bound GTPases. The overexpression of Tiam1 caused an increase in endogenous levels of Rac1-GTP but not Cdc42-GTP, whereas the expression of intersectin stimulated the production of Cdc42-GTP and to a lesser extent Rac1-GTP (Fig. 4*B*). The activation of Rac1 by intersectin is due to an endogenous activation of Rac1 by Cdc42 (26). To analyze the activation of PAK3 by intersectin and Tiam1, we performed kinase assays with the standard substrate MBP (data not shown). We observed that the co-transfection of PAK3 wild type with the constitutively active form of intersectin induced an increase of its kinase activity. Interestingly, the R67C-mutated protein was not activated in these conditions (Fig. 4, *C* and *D*). However, the expression of the constitutively active form of Tiam1 did not activate either PAK3 wild-type or R67C mutant (Fig. 4, *E* and *F*). Taken together, our results prove that PAK3 is mainly activated by the intersectin-Cdc42 module and that the R67C mutation, which inhibits the binding of PAK3 to Cdc42, impairs PAK3 activation. Moreover, although the R67C mutation increases the binding of PAK3 to Rac1 (Fig. 3*D*), it doesn't allow an activation of PAK3 by the Tiam1-Rac1 module. Thus, the main molecular defect of the R67C protein is its absence of activation by Cdc42 due to a decrease of its affinity to this GTPase.

PAK3 Mental Retardation Mutations Do Not Affect PAK3 Localization in Dendritic Spines—Because PAK3 is expressed in neurons (7, 13, 27) and several authors have reported its localization in dendritic spines (10, 28), we tested the hypothesis that PAK3 mutations may induce a mislocalization of the protein in dendritic spines of neurons. It has been reported that expression of a kinase-dead PAK3 protein in dissociated hippocampal neurons induces a dramatic impairment in dendritic spine formation (14). Indeed, we also observed a strong decrease in spine density in 21-day-old neurons expressing the kinase-dead PAK3-K297L mutant (Fig. 5*A*), and this impeded our study of spine localization of PAK3 mutants.

It has recently been shown that the overexpression of actin in hippocampal organotypic culture of neurons increases spine density (29). Therefore, we expressed actin to bypass the inhibition of spinogenesis induced by the expression of mutated PAK3 proteins and thereby we could determine the localization of PAK3 proteins in spines. GFP-tagged PAK3 wild-type or mutants were co-expressed in dissociated hippocampal neurons with the RFP-actin (Fig. 5*B*). The expression of RFP-actin also allows the visualization of the morphology of dendritic spines in

Cdc42/PAK3 Module Regulates Spine Formation

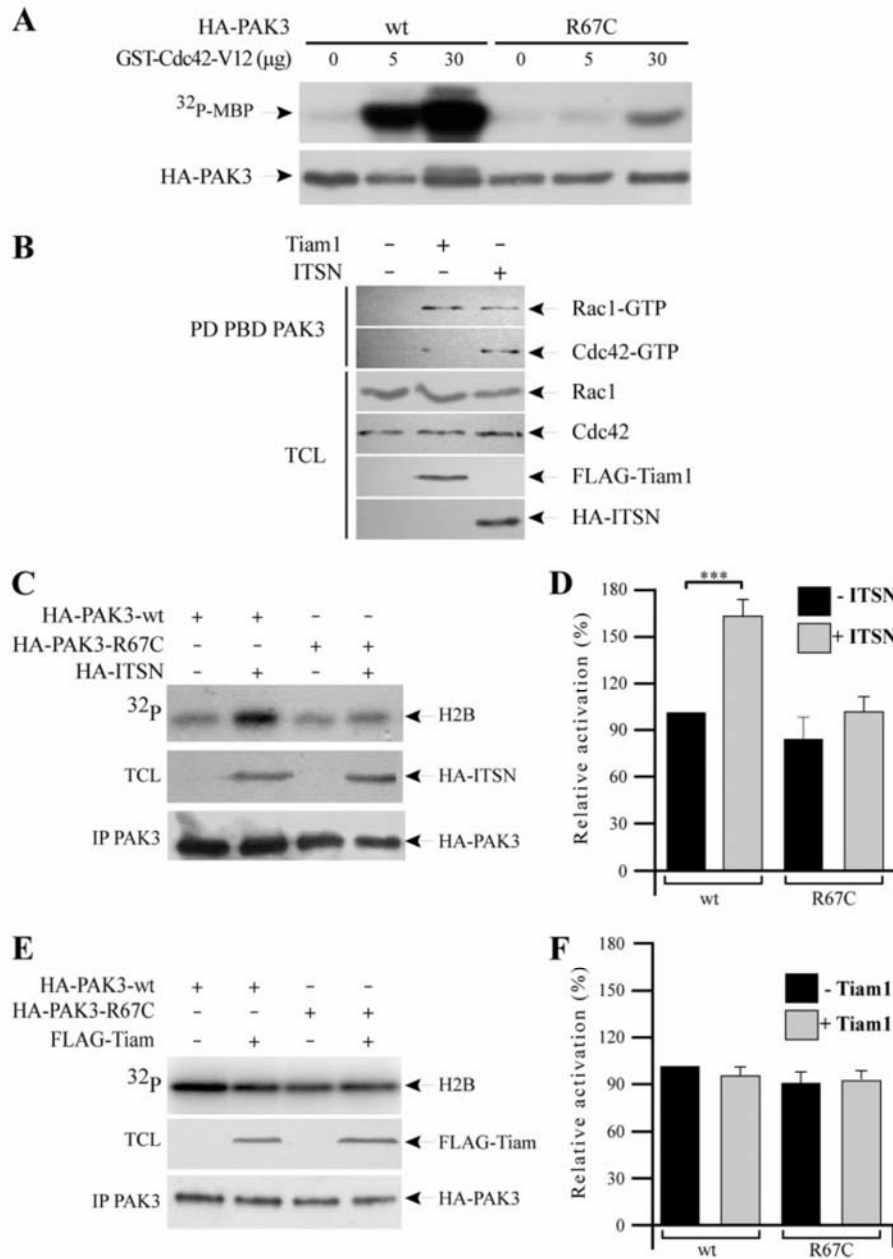


FIGURE 4. Defects of PAK3-R67C activation by Cdc42. *A*, R67C mutation decreased *in vitro* activation of PAK3. Transfected COS7 cell extracts were incubated with increasing amounts of recombinant GST-Cdc42-V12 protein. PAK3-wt or PAK3-R67C was HA-immunoprecipitated, and a kinase assay using MBP as substrate was performed (upper panel). Immunoprecipitated PAK3 proteins were controlled by Western blot using anti-PAK3 N19 (lower panel). *B*, activation of endogenous Cdc42 and Rac1 by their specific GEFs, intersectin (ITSN) and Tiam1, respectively. Lysates of COS7 cells, transfected with intersectin or Tiam1, were incubated with GST-PBD-PAK3 beads. Presence of endogenous active Rac1 and Cdc42 was detected by anti-Cdc42 or anti-Rac1 antibodies in a pull-down assay (PD PBD PAK3). Levels of endogenous Rac1, Cdc42, and overexpressed FLAG-tagged Tiam1, and HA-tagged intersectin in total cell lysates (TCL) were assessed by Western blot. *C*, defect of PAK3-R67C activation by a constitutively active form of intersectin. COS7 cells were co-transfected with either PAK3 wild-type or R67C and intersectin plasmids. PAK3 proteins were immunoprecipitated with N19 antibodies, and kinase activity was measured with the H2B substrate. *E*, PAK3-wt and PAK3-R67C are not activated by a constitutively active Tiam1. COS7 cells were co-transfected with either PAK3 wild-type or R67C and Tiam1 plasmids. PAK3 proteins were immunoprecipitated with N19 antibodies and kinase activity was measured with the substrate H2B. *D–F*, the incorporation of ³²P was quantified from three independent experiments using a PhosphorImager. Comparison with Student's *t* test: ***, *p* < 0.001, *n* = 3.

GFP-PAK3 expressing neurons. In these experimental conditions, the expression of the kinase-dead PAK3-K297L mutant does not inhibit dendritic spine formation (Fig. 5*B*, second line).

We observed a heterogeneous localization of GFP-PAK3-wt in the dendritic shaft and in the head of spines, where it partially co-localizes with RFP-actin (Fig. 5*B*). The three kinase-dead proteins K297L, R419X, and A365E and the two mutants affecting GTPase binding, H78L-H81L and R67C, displayed the same subcellular localization as the PAK3-wt protein. In these experimental conditions, we did not observe any defects or differences in the spine morphology and density. We conclude that the kinase activity and the binding to GTPases are not required for PAK3 spine localization and that the PAK3 mutations do not alter the targeting of the protein to spines.

Expression of Mutated PAK3 Proteins Differentially Affects Dendritic Spine Morphogenesis—We then analyzed the effects of expressing these different PAK3 mutants in pyramidal cells of hippocampal organotypic slice cultures, a model that is closer to the *in situ* situation for analysis of spine morphogenesis. For this, R419X, A365E, and R67C mutants were co-expressed with EGFP in pyramidal cells through biolistic transfection. Two parameters were analyzed using confocal microscopy; the density of dendritic protrusions (spine and filopodia) and protrusion length (measured from the limit of the dendrite to the tip of the protrusion). We verified the expression of HA-PAK3 proteins in GFP-positive neurons by HA immunofluorescence as previously described (data not shown; 13). As shown in Fig. 6*B* and consistent with previous results (13), expression of PAK3 carrying the R419X kinase-dead mutation resulted in a phenotype characterized by a loss of regular mushroom type spines and an increase in immature, elongated spines and filopodia-like protrusions (13). Overall, the protrusion density was only slightly, but not significantly reduced in these cells when compared with control, EGFP-transfected neurons (Fig. 6*E*; 0.81 ± 0.04 versus 0.90 ± 0.03 ; *n* = 7–32; *p* > 0.05) and the shift in protrusion length illustrated in Fig. 6*F* clearly indicated the

Cdc42/PAK3 Module Regulates Spine Formation

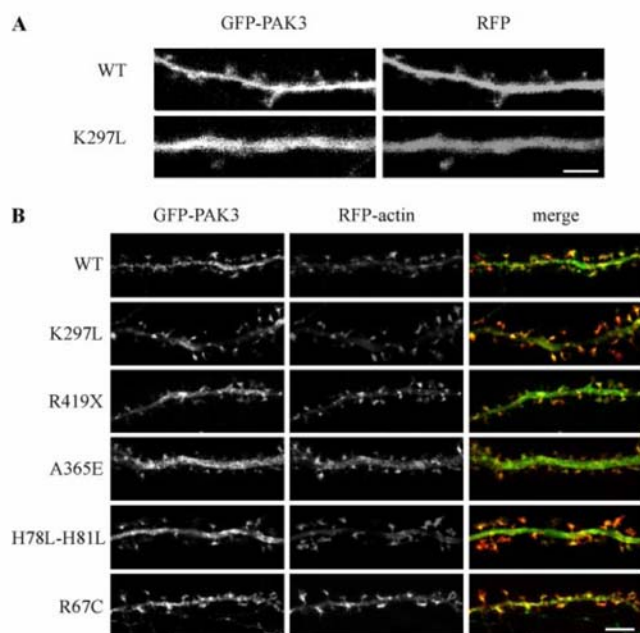


FIGURE 5. Subcellular localization of PAK3 proteins in dendritic spines of hippocampal neurons. *A*, expression of the PAK3 mutant devoid of kinase activity (K297L) inhibits the formation of dendritic spines. GFP-PAK3 proteins (*left panel*) were co-transfected with mRFP (*right panel*) in dissociated hippocampal neurons at DIV18 and fixed at DIV21. Scale bar, 5 μ m. *B*, the PAK3 mental retardation mutations do not induce any mislocalization of PAK3 proteins in dendritic spines of hippocampal neurons. GFP-PAK3 constructs: wild-type, K297L kinase-dead mutant, H78L-H81L GTPase-binding mutant, and the three mental retardation mutants R419X, A365E, and R67C (*left panel*, green fluorescence) were co-transfected in hippocampal neurons with a mRFP-actin plasmid (*red* in the *middle panel*) at DIV 18 and fixed at DIV 21. Scale bar, 5 μ m. 10–15 transfected neurons were randomly selected in each experiment ($n = 3$).

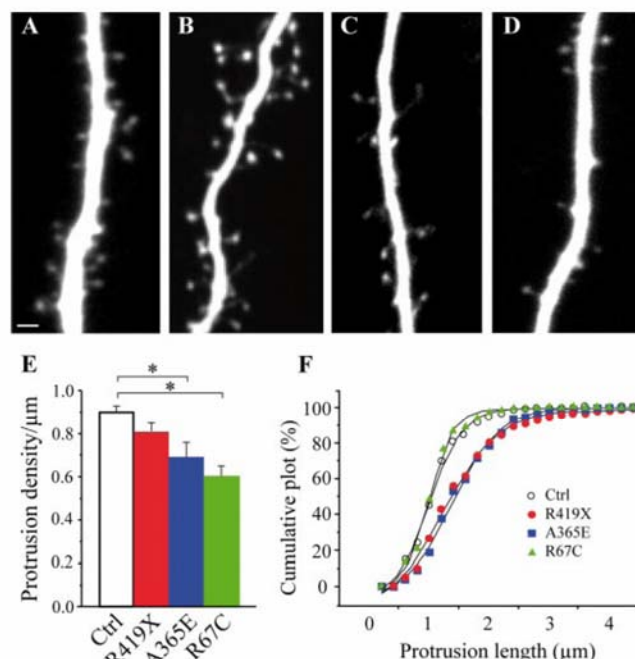


FIGURE 6. Dendritic spine alterations associated with expression of PAK3 mutants in transfected pyramidal neurons. *A–D*, spine morphology obtained from neurons co-transfected with EGFP and either an empty vector (*A*) or PAK3-R419X (*B*), PAK3-A365E (*C*), and PAK3-R67C (*D*); scale bar: 2 μ m. *E*, decrease in protrusion density in pyramidal neurons transfected with the three PAK3 mutants. Data are mean \pm S.E. of measurements obtained from 7–32 cells (length of dendrite analyzed: 50–200 μ m/cell). *F*, formation of elongated, immature protrusions analyzed by measuring the protrusion length in cells transfected with an EGFP vector (*Ctrl*) or PAK3 mutants (R419X, A365E, and R67C). Data represent cumulative plots of the distribution of spine length measured in 7–32 cells (370–1270 protrusions analyzed).

increased proportion of immature, elongated protrusions (mean length of protrusions: 1.52 ± 0.09 versus 1.14 ± 0.03 μ m, $n = 8–12$; $p < 0.01$). Interestingly, expression of the A365E mutant (Fig. 6C) produced a phenotype comparable to the R419X mutant, although with a slightly different balance between the two types of alterations. As illustrated in Fig. 6E, the reduction in protrusion density was more marked in most A365E-transfected cells than had been observed with the R419X mutation (0.69 ± 0.07 protrusions/ μ m; $n = 8$; $p < 0.05$), whereas the increase in elongated immature protrusions was comparable, as indicated by the shift observed in the distribution of protrusion length (Fig. 6F; mean length: 1.50 ± 0.07 versus 1.14 ± 0.03 μ m, $n = 8–12$; $p < 0.05$). Finally and most interestingly, expression of the R67C mutant, which affected the GTPase-binding region, resulted in a marked reduction in the spine density (Fig. 6, D and E; 0.60 ± 0.05 protrusions/ μ m; $n = 8$; $p < 0.01$) without any changes in spine morphological characteristics and no shift in the distribution of spine length (Fig. 6F; mean length: 1.07 ± 0.03 μ m). In these conditions, the presence of filopodia was very rare and nearly all protrusions were spines. Thus expression of the mental retardation PAK3 mutants differentially affected the mechanisms of spine morphogenesis.

DISCUSSION

PAK3 Mutations Responsible for Mental Retardation Affect Different Properties of the PAK3 Protein—One way to investigate how learning occurs and how memories are formed and

sustained is through the identification of mutated genes associated with mental retardation (30). Defining the molecular and cellular consequences of mental retardation mutations is a step further toward understanding the mechanisms that are required for normal cognitive functions. We report here the characterization of three PAK3 proteins bearing mutations responsible for mental retardation, and we show that these mutations affect differently PAK3 functions.

The two mutations R419X and A365E, located in the catalytic domain inactivate the kinase activity. This result was previously reported for the R419X-truncated protein, but was unpredicted for the A365E mutant (7, 9). This A365E mutation is located in a conserved subdomain named VIa inside the α helix E of the large lobe of the kinases (31). Several mutations associated with human pathologies were identified in this subdomain (see the KinMutBase web site) (32). We report here for the first time that a disease-associated mutation in this subdomain suppresses the kinase activity.

The Arg-67 residue is perfectly conserved in the PAK3 gene of vertebrates, i.e. in all mammalian, avian, amphibian, and fish genes analyzed. This arginine residue is also present in the two other PAKs of the group I (arginine 72 in PAK1 and 71 in PAK2), in PAK4 and -6, and corresponds to a conserved lysine in PAK5. It is located in the overlapping sequence of the polybasic region extending from Lys-58 to Arg-67 and the PBD domain covering residues from Lys-62 to Thr-108 (33). Several

Cdc42/PAK3 Module Regulates Spine Formation

mutations in the PBD domain abolish the binding to Rac1 and Cdc42 (34). Mutations in the polybasic region of the PAK1 protein have complex effects: neutral mutations of all three lysine residues Lys-66, Lys-67, and Lys-68 decrease the affinity toward Rac1 but not toward Cdc42, and reduce PAK1 activation by Cdc42 and Rac1 (35). In contrast, their mutation to basic residues has no effect. Importantly, it has been shown that the homologous residue of arginine Arg-67 in different GTPase effectors plays an important role in Cdc42 interaction (36). In this report, we show that the R67C mutation decreases the interaction with Cdc42 and, as a consequence, reduces the activation by Cdc42. We have observed that R67C mutation does not modify the two-hybrid binding to Rac1, whereas the same mutation increases the co-immunoprecipitation of PAK3 with this GTPase in COS7 cells. One explanation we propose is that the loss of Cdc42 binding to PAK3 could induce an increase of Rac1 interaction. Although this mutation increases the binding to Rac1, it does not induce the activation of PAK3 by a specific GEF for Rac1. This result is in agreement with published data showing that the binding of GTPases to PAK is not sufficient to trigger PAK activation (35).

Our results show that the C-terminal residue of the polybasic region governs PAK3 specificities toward GTPases, possibly by playing a role in the structural contacts between the PBD and the GTPases. Finally, the R67C mutation is responsible for a more severe phenotype than the two other mutations of PAK3 suggesting that the interaction of PAK3 with Cdc42 is crucial for synaptic plasticity. Indeed, PAK3 could have kinase-independent functions, such as playing a scaffolding role (37), and kinase-dependent functions, both depending on Cdc42 binding.

Cdc42 Is the Main Activator of PAK3—PAK3 was believed to be activated by both Cdc42 and Rac1 GTPases (23, 38). In agreement with this, we found that co-transfection of PAK3 with either Cdc42-V12 or Rac1-V12 induced a strong activation of the kinase. However, when we activated PAK3 by endogenous GTPases, we found that only Cdc42 was able to activate PAK3. Indeed intersectin, a specific GEF for Cdc42, activated PAK3 via the endogenous Cdc42 GTPase, whereas Tiam1, a specific GEF for Rac1, did not. The discrepancy observed between endogenous activation *versus* co-transfection, may be caused by the exogenous GTPase expression in the latter condition, which overrides the weak affinity of PAK3 for Rac1. We report here that the wild-type PAK3 protein binds efficiently Cdc42 and faintly Rac1, which is in agreement with the notion that GTPase interaction is necessary for PAK activation (39). Excitingly, we found that the mental retardation R67C mutation inhibits its activation by the intersectin/Cdc42 pathway confirming that the Cdc42/PAK3 module is the one implicated in cognitive functions.

PAK3 Mental Retardation Mutations Do Not Alter Spine Localization of the PAK3 Protein—Because PAK3 mutations may induce a mislocalization of PAK3 responsible for synaptic defects, we analyzed the localization of the mental retardation PAK3 mutants in mature differentiated neurons. Interestingly, we demonstrate here that none of the kinase-dead PAK3 mutants presented defects in spine and dendritic localization, suggesting that spine localization is independent of kinase

activity. However, the presence of phosphorylated, *i.e.* active PAK3, in dendritic spines was demonstrated both by histochemical methods and after isolation of post-synaptic densities (10, 14). Thus, we propose that PAK3 phosphorylation is not required for proper targeting. We also show that interaction with GTPases is not necessary for spine localization, because the R67C mutant and the H78L-H81L proteins display the same localization as the wild-type protein. PAK3 may be recruited to spines through interaction with other partners, such as the PIX-GIT complex (14). To conclude, we demonstrate for the first time that mental retardation PAK3 mutations do not induce protein mislocalization in spines, suggesting that cognitive defects in mental retardation patients, associated with PAK3 mutations, are mainly due to a functional defect of PAK3.

Role of a Cdc42/PAK3 Pathway in Spine Formation—It was previously shown that the kinase activity of PAK3 is required for the formation of mature dendritic spines (13, 14). Expression of PAK3-R419X and PAK3-siRNA in rat hippocampal organotypic slice culture resulted in the formation of morphologically abnormal spines, with a decrease of mature dendritic spines and an increase in elongated, immature protrusions (13). We report here that expression of the kinase-dead PAK3-A365E mutant induced a similar phenotype, whereas expression of PAK3-R67C, defective in Cdc42 binding and in activation by Cdc42, led to a pronounced decrease of spine density. Altogether these results show that both inactivation of the kinase activity (R419X and A365E) and defect of binding and activation by Cdc42 (R67C) led to spine anomalies, suggesting that PAK3 binding to Cdc42 and PAK3 kinase activity are both necessary for spinogenesis. The R67C mutation only affects spine density suggesting that this mutation could alter different mechanisms in spine number regulation, *i.e.* spine initiation or stabilization of newly formed spines. Concerning the second hypothesis, the protrusions would present morphological anomalies or appear as remnant structures, because the spine maintenance is perturbed. However, we did not observe such anomalies, and thus we favor the hypothesis that the R67C mutation impairs spine initiation.

We propose a model in which PAK3 may act at two different steps during spine formation, at the initiation of spines and at spine maturation (Fig. 7). The binding of Cdc42 to PAK3 could contribute to the formation of a signaling complex involved in the initiation of the growth of new protrusions. It is well known that Cdc42 governs filopodia formation in several cell types, and because PAK3 is implicated in spinogenesis, we could hypothesize that Cdc42 initiates filopodia formation via the activation of PAK3 (40). On the other hand, the kinase activity might be necessary for the stabilization and maturation of newly formed protrusions, as also suggested by the small size of the post-synaptic densities found on immature spines (13). The elongated filopodia observed in neurons expressing kinase-dead mutants may correspond to precursors of spines blocked in spine maturation and could represent a transitory step in a dynamic process (41). The role of Cdc42 in spine formation is poorly understood (4, 5). However, in addition to PAK3, Cdc42 has several effectors implicated in spine morphogenesis such as IRSp53 or N-WASP (42, 43). The study of Cdc42 in the PAK3

Cdc42/PAK3 Module Regulates Spine Formation

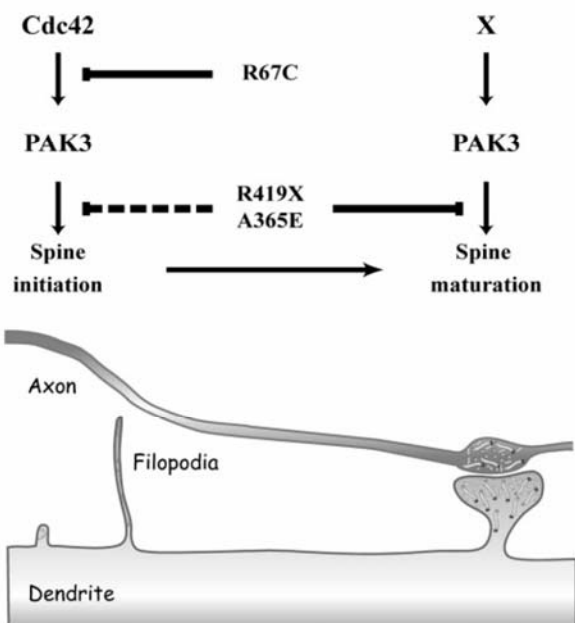


FIGURE 7. Model of the Cdc42/PAK3 pathway in spinogenesis. During spine development, filopodia have been proposed to serve as precursors of spines by capturing an axonal terminal and forming a mature synapse. The Cdc42 GTPase, known to be the key regulator of filopodia formation in fibroblasts, could have the same function in neurons. We report here that Cdc42 is the main activator of PAK3, which is implicated in spinogenesis. Altogether this suggests that the Cdc42/PAK3 module governs the first steps in spinogenesis probably through filopodia initiation. The R67C mutation, which inhibits PAK3 activation by Cdc42, decreases spine density without affecting spine morphology. On the other hand, PAK3 could also regulate spine maturation as illustrated by the effect of kinase-dead PAK3 mutated proteins on spinogenesis.

signaling pathway involved in spine formation, using pharmacological approaches or active and inactive Cdc42 mutants, has not been possible, because other effectors than PAK3 would also be affected. However, a PAK3 mutant such as the R67C mutant we described here, selectively defective in Cdc42 binding, constitutes a powerful tool to study the role of Cdc42/PAK3 module in spinogenesis. The identification of upstream regulators and downstream targets of the Cdc42/PAK3 module will be of major interest to understand how this pathway regulates synaptic plasticity and how it is impaired in mental retardation associated disease. Finally, in patients with mental retardation, the loss of PAK3 function is not compensated by the other PAK proteins, comforting the idea of a specific role of PAK3 in synaptic plasticity. The identification of these PAK3-specific functions constitutes a challenge to understand the signaling pathways of neuronal plasticity.

Acknowledgments—We thank John Collard, Philippe Fort, Cécile Gauthier-Rouvière, John O'Bryan, and Roger Tsien for plasmids, Jacques Camonis for help in two hybrid experiments, Bénédicte Dargent for help in hippocampal cell cultures, and Sandrine Poëa-Guyon for technical assistance. Confocal microscopy imaging was performed with the expert support of Suzanne Bolte and Spencer Brown (The Imaging and Cell Biology facility of the IFR87 (Gifsur Yvette). We also thank Nicolas Morel and Seana O'Regan for helpful comments on the manuscript.

REFERENCES

- Purpura, D. P. (1974) *Science* **186**, 1126–1128
- Fiala, J. C., Spacek, J., and Harris, K. M. (2002) *Brain Res. Brain Res. Rev.* **39**, 29–54
- Matus, A. (2000) *Science* **290**, 754–758
- Govek, E. E., Newey, S. E., and Van Aelst, L. (2005) *Genes Dev.* **19**, 1–49
- Tada, T., and Sheng, M. (2006) *Curr. Opin. Neurobiol.* **16**, 95–101
- Van Galen, E. J. M., and Ramakers, G. J. (2005) *Prog. Brain Res.* **147**, 295–317
- Allen, K. M., Gleeson, J. G., Bagrodia, S., Partington, M. W., MacMillan, J. C., Cerione, R. A., Mulley, J. C., and Walsh, C. A. (1998) *Nat. Genet.* **20**, 25–30
- Bienvenu, T., des Portes, V., McDonnell, N., Carrie, A., Zemni, R., Couvert, P., Ropers, H. H., Moraine, C., van Bokhoven, H., Fryns, J. P., Allen, K., Walsh, C. A., Boue, J., Kahn, A., Chelly, J., and Beldjord, C. (2000) *Am. J. Med. Genet.* **93**, 294–298
- Gedeon, A. K., Nelson, J., Gecz, J., and Mulley, J. C. (2003) *Am. J. Med. Genet.* **120A**, 509–517
- Hayashi, M. L., Choi, S. Y., Rao, B. S., Jung, H. Y., Lee, H. K., Zhang, D., Chattarji, S., Kirkwood, A., and Tonegawa, S. (2004) *Neuron* **42**, 773–787
- McPhie, D. L., Coopersmith, R., Hines-Peralta, A., Chen, Y., Ivins, K. J., Manly, S. P., Kozlowski, M. R., Neve, K. A., and Neve, R. L. (2003) *J. Neurosci.* **23**, 6914–6927
- Zhao, L., Ma, Q. L., Calon, F., Harris-White, M. E., Yang, F., Lim, G. P., Morihara, T., Ubeda, O. J., Ambegaokar, S., Hansen, J. E., Weisbart, R. H., Teter, B., Frautschy, S. A., and Cole, G. M. (2006) *Nat. Neurosci.* **9**, 234–242
- Boda, B., Alberi, S., Nikonenko, I., Node-Langlois, R., Jourdain, P., Moosmayer, M., Parisi-Jourdain, L., and Muller, D. (2004) *J. Neurosci.* **24**, 10816–10825
- Zhang, H., Webb, D. J., Asmussen, H., Niu, S., and Horwitz, A. F. (2005) *J. Neurosci.* **25**, 3379–3388
- Meng, J., Meng, Y., Hanna, A., Janus, C., and Jia, Z. (2005) *J. Neurosci.* **25**, 6641–6650
- Rousseau, V., Goupille, O., Morin, N., and Barnier, J. V. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 3912–3920
- Goslin, K., Asmussen, H., and Banker, G. (1998) *Culturing Nerve Cells*, 2nd Ed., MIT Press, Cambridge, MA, pp. 339–370
- Poea-Guyon, S., Amar, M., Fossier, P., and Morel, N. (2006) *J. Biol. Chem.* **281**, 17164–17172
- Stoppini, L., Buchs, P. A., and Muller, D. (1991) *J. Neurosci. Methods* **37**, 173–182
- Sells, M. A., Knaus, U. G., Bagrodia, S., Ambrose, D. M., Bokoch, G. M., and Chernoff, J. (1997) *Curr. Biol.* **7**, 202–210
- Frost, J. A., Khokhlatchev, A., Stippec, S., White, M. A., and Cobb, M. H. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 28191–28198
- Jung, J. H., and Traugh, J. A. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 40025–40031
- Manser, E., Chong, C., Zhao, Z. S., Leung, T., Michael, G., Hall, C., and Lim, L. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 25070–25078
- Michiels, F., Habets, G. G., Stam, J. C., van der Kammen, R. A., and Collard, J. G. (1995) *Nature* **375**, 338–340
- Hussain, N. K., Jenna, S., Glogauer, M., Quinn, C. C., Wasiak, S., Guipponi, M., Antonarakis, S. E., Kay, B. K., Stosel, T. P., Lamarche-Vane, N., and McPherson, P. S. (2001) *Nat. Cell Biol.* **3**, 927–932
- Czuchra, A., Wu, X., Meyer, H., van Hengel, J., Schroeder, T., Geffers, R., Rottner, K., and Brakebusch, C. (2005) *Mol. Biol. Cell* **16**, 4473–4484
- Ong, W. Y., Wang, X. S., and Manser, E. (2002) *Exp. Brain Res.* **144**, 189–199
- Rex, C. S., Lin, C. Y., Kramar, E. A., Chen, L. Y., Gall, C. M., and Lynch, G. (2007) *J. Neurosci.* **27**, 3017–3029
- Johnson, O. L., and Ouimet, C. C. (2006) *Brain Res.* **1113**, 1–9
- Chelly, J., and Mandel, J. L. (2001) *Nat. Rev. Genet.* **2**, 669–680
- Hanks, S. K. (2003) *Genome Biol.* **4**, 111
- Ortutay, C., Valiaho, J., Stenberg, K., and Vihinen, M. (2005) *Hum. Mutat.* **25**, 435–442
- Bokoch, G. M. (2003) *Annu. Rev. Biochem.* **72**, 743–781
- Zhao, Z. S., Manser, E., Chen, X. Q., Chong, C., Leung, T., and Lim, L.

Cdc42/PAK3 Module Regulates Spine Formation

- (1998) *Mol. Cell Biol.* **18**, 2153–2163
35. Knaus, U. G., and Bokoch, G. M. (1998) *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **30**, 857–862
36. Lei, M., Lu, W., Meng, W., Parrini, M. C., Eck, M. J., Mayer, B. J., and Harrison, S. C. (2000) *Cell* **102**, 387–397
37. Obermeier, A., Ahmed, S., Manser, E., Yen, S. C., Hall, C., and Lim, L. (1998) *EMBO J.* **17**, 4328–4339
38. Bagrodia, S., Taylor, S. J., Creasy, C. L., Chernoff, J., and Cerione, R. A. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 22731–22737
39. Manser, E., Leung, T., Salihuddin, H., Zhao, Z. S., and Lim, L. (1994) *Nature* **367**, 40–46
40. Faix, J., and Rottner, K. (2006) *Curr. Opin. Cell Biol.* **18**, 18–25
41. Yuste, R., and Bonhoeffer, T. (2004) *Nat. Rev. Neurosci.* **5**, 24–34
42. Choi, J., Ko, J., Racz, B., Burette, A., Lee, J. R., Kim, S., Na, M., Lee, H. W., Kim, K., Weinberg, R. J., and Kim, E. (2005) *J. Neurosci.* **25**, 869–879
43. Irie, F., and Yamaguchi, Y. (2002) *Nat. Neurosci.* **5**, 1117–1118



2) La kinase PAK3 lie mieux Cdc42 que PAK1

Dans l'article "The p21-activated kinase 3 implicated in mental retardation regulates spine morphogenesis through a Cdc42-dependent pathway", j'ai montré que Cdc42 est un meilleur activateur de PAK3 comparé à Rac1 (voir Figures 2, p70 et 4, p72). J'ai aussi comparé la liaison des deux GTPases Cdc42 et Rac1 à PAK3 et PAK1 par double hybride et par co-immunoprécipitation (Figure 31). Par double hybride, en utilisant les régions amino-terminales de PAK1 et PAK3, j'ai montré que PAK3 lie deux fois mieux les deux GTPases testées par rapport à PAK1 et lie beaucoup mieux Cdc42 que Rac1 (Figure 31A). De la même façon, lorsque des cellules COS-7 sont transfectées avec les formes entières de PAK1 et PAK3, j'ai montré que deux fois plus de Cdc42 co-immunoprécipite avec PAK3 qu'avec PAK1 et que la liaison à Rac1 est très faible pour les deux PAKs (figure 31B et C). Ainsi, PAK3 lie Cdc42 non seulement avec une meilleure affinité que Rac1 comme je l'ai montré dans l'article mais aussi bien plus fortement que PAK1 ne lie cette GTPase. Ces résultats confirment que Cdc42 est l'activateur physiologique préférentiel de PAK3 (voir Figure 4, p72).

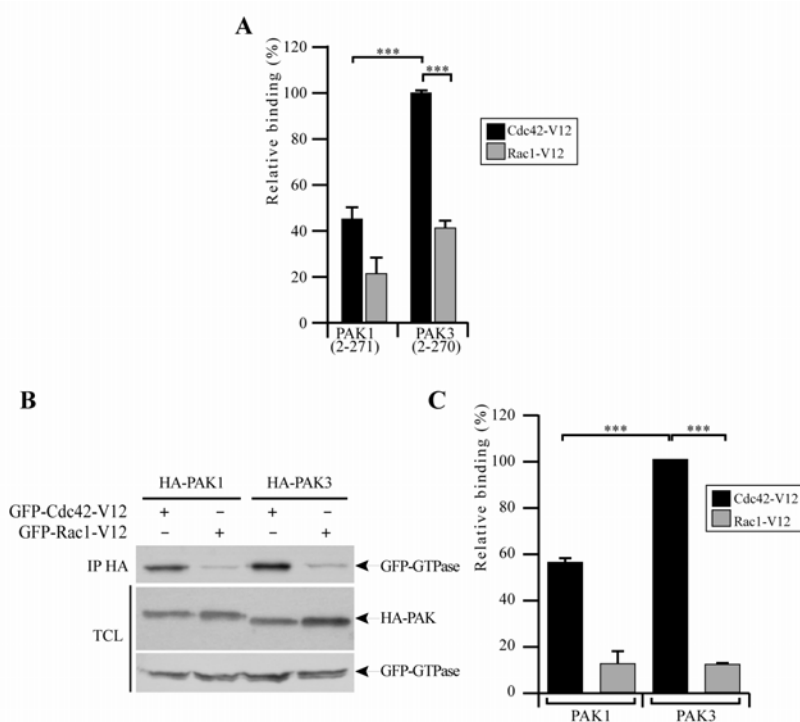


Figure 31. Etude de la liaison de Cdc42 et Rac1 à PAK1 et PAK3. **A.** Interaction par double hybride entre des formes amino-terminales des PAKs et les GTPases. Les levures sont co-transformées avec les constructions PAK et les GTPases constitutivement actives. L'activité β -galactosidase mesure l'interaction entre la proie et l'appât et son activité relative est donnée par unité d'absorbance (A_{460}/A_{600}). L'expérience a été réalisée 3 fois. Comparaison avec le test t de Student's : ***, $p < 0.001$ **B.** Co-immunoprécipitation des GFP-GTPases constitutivement actives avec des formes entières HA-PAK (IP HA) dépourvues d'activité kinase co-exprimées dans les cellules COS-7. La présence des GFP-GTPases dans l'immunoprécipitat est révélée par Western blot anti-GFP (panneau du haut). Les quantités de HA-PAK et GFP-GTPase dans le lysat cellulaire (TCL) sont contrôlées par Western blot anti-GFP et anti-HA (panneau du bas). **C.** Quantification des co-immunoprécipitations de trois expériences indépendantes. Comparaison avec le test t de student : ***, $p < 0.001$.

3) Localisation des mutants de PAK3 dans les cellules COS-7 et leurs effets sur la morphologie cellulaire

Dans les fibroblastes, les kinases PAK se localisent au niveau du bord migrant des filopodes et lamellipodes mais aussi au niveau des adhésions focales (Dharmawardhane et al., 1997, Sells et al., 2000). La paxilline est une protéine qui s'associe aux adhésions focales. Grâce à ses domaines d'interactions protéiques, la paxilline joue un rôle de protéine d'échafaudage pour permettre le recrutement de nombreuses protéines au niveau de ces structures (Schaller, 2001). La paxilline s'associe indirectement avec PAK3 par l'intermédiaire du complexe GIT/PIX et directement avec la partie N-terminale de PAK3 (Hashimoto et al., 2001). De plus, PAK3 peut phosphoryler la paxilline sur la sérine 273 et jouer ainsi un rôle important dans la dynamique des adhésions focales (Nayal et al., 2006). Plusieurs études montrent qu'un dominant négatif de PAK1 ou PAK3 augmente la formation des fibres de stress et entraîne la présence de grosses adhésions focales qui se dissocient lentement (Kiosses et al., 1999 ; Nayal et al., 2006). Au contraire, une forme constitutivement active de PAK entraîne une dissociation des fibres de stress et des adhésions focales (Sells et al., 1997; Manser et al., 1997).

Au cours de l'étude des mutants de PAK3 responsables de retard mental, j'ai analysé la localisation des protéines portant les différentes mutations dans des fibroblastes et leur effet sur la morphologie de la cellule (Figure 32). Les cellules COS-7 sont co-transfectées avec les constructions GFP-PAK3 et RFP-actine puis fixées et marquées avec un anticorps dirigé contre la paxilline et imagées par microscopie confocale. Les cellules transfectées avec PAK3 sauvage ont des extensions cellulaires, des fibres de stress bien visible par RFP-actine et les adhésions focales marquées avec la paxilline sont petites. Les cellules transfectées avec PAK3 dépourvue d'activité kinase (K297L) ont une forme plus ronde, sont plus étalées, les adhésions focales sont larges et les fibres de stress sont bien renforcées. Les cellules transfectées avec les mutants retard mental dépourvus d'activité kinase PAK3-A365E et PAK3-R419X, ont des caractéristiques proches des cellules transfectées avec PAK3-K297L : les adhésions focales sont larges, les fibres de stress bien marquées et la cellule présente peu d'extensions cellulaires. Enfin, la transfection du mutant PAK3-R67C qui a un domaine kinase intact, entraîne la formation de petites adhésions focales avec des fibres de stress peu marquées.

En ce qui concerne la localisation de PAK3, la kinase sauvage se localise de façon diffuse dans la cellule. Elle est faiblement présente dans les adhésions focales et au niveau des fibres de stress. De la même façon, PAK3-R67C se localise très peu au niveau de ces structures mais

contrairement à la forme sauvage, elle se localise fortement dans les repliements membranaires aux bords de la cellule. Le mutant dépourvu d'activité kinase PAK3-K297L est fortement localisé dans les adhésions focales et à la périphérie de la cellule. Les mutants R419X et A365E se localisent aussi fortement dans ces structures.

Ainsi, nous montrons qu'il existe une corrélation entre activité kinase et localisation de PAK3 dans les cellules ainsi qu'une corrélation entre activité kinase et morphologie des adhésions focales. Ces résultats corroborent ceux préalablement obtenus avec la kinase PAK1 (Manser et al., 1997; Kiosses et al., 1999 ; Nayal et al., 2006).

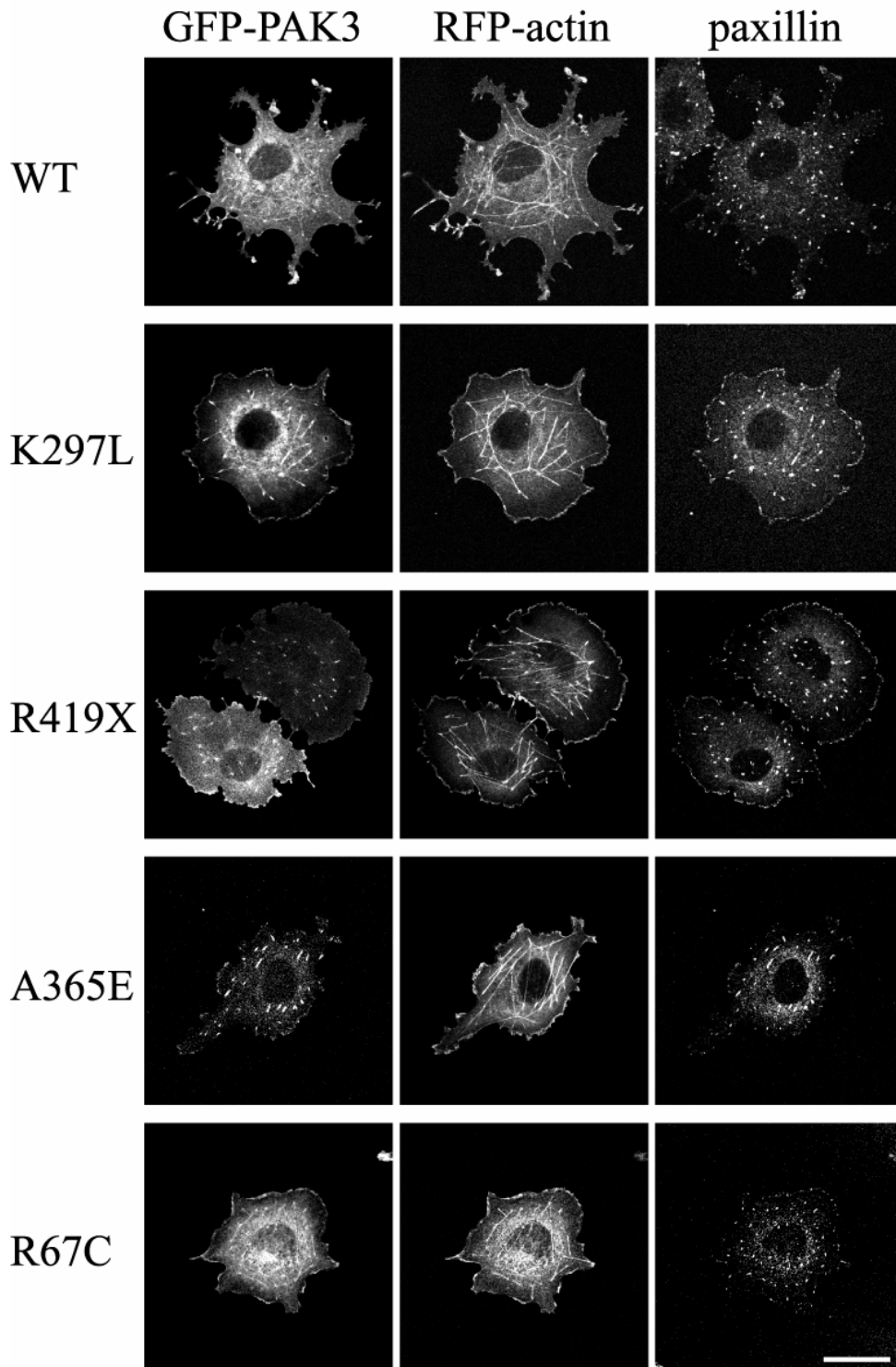


Figure 32. Etude de la localisation des mutants de PAK3 dans les cellules COS et leur effet sur la morphologie cellulaire. Les cellules COS sont transfectées avec les plasmides GFP-PAK3 et RFP-actine puis sont marquées avec un anticorps dirigé contre la paxilline (Alexa 633). Les acquisitions sont effectuées séquentiellement avec un objectif 63x sur un microscope confocal en utilisant les raies laser Ar 488nm, DPSS 561nm, He-Ne 633nm pour l'excitation de la GFP, de la RFP et du fluorochrome Alexa 633 respectivement. Des empilements en z de 1-1.5µm ont été réalisés et les images présentées sont des projections en z d'une dizaine de coupes. Echelle : 30 µm

II

**Le gène PAK3 code pour quatre variants
d'épissage qui possèdent de nouvelles propriétés
(article soumis)**

Au cours de la caractérisation de PAK3, j'ai mis en évidence un nouvel exon alternatif appelé exon c localisé en amont de l'exon b déjà caractérisé (Rousseau et al., 2003). Cet exon est retrouvé dans deux nouveaux variants d'épissage : PAK3c et PAK3cb qui sont constitutivement actifs et non régulés par la GTPase Cdc42. L'étude phylogénique a permis de montrer que l'exon b et l'exon c sont absents des poissons, l'exon b est présent chez les tétrapodes alors que l'exon c n'est détecté que chez les mammifères (voir Figure 33 pour la position phylogénique des différentes espèces citées dans l'article qui suit). L'ensemble de ces résultats suggère que l'augmentation de la complexité de la structure du gène PAK3 participe au rôle spécifique de PAK3, notamment dans les fonctions cognitives.

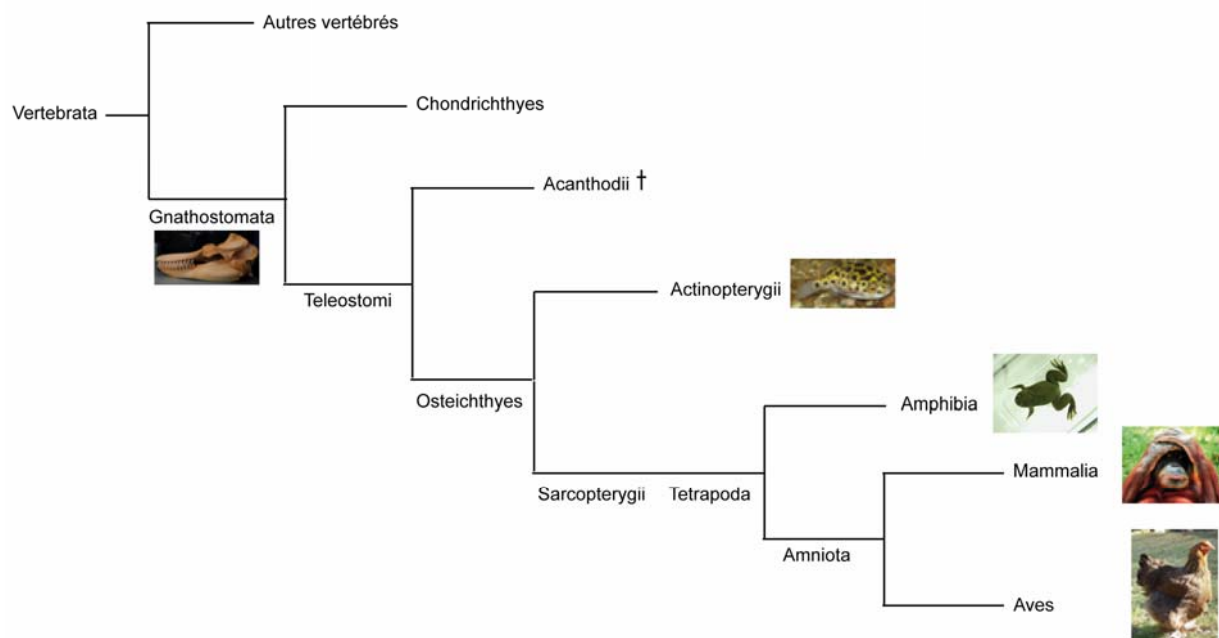


Figure 33. Arbre phylogénique de la division des vertébrés. La longueur des branches ne reflète pas la distance entre les différentes espèces. Le taxon noté † s'est éteint. Les "tetrapoda" constituent un clade sans rang au sein des "sarcopterygii".

**THE MAMMALIAN PAK3 GENE ENCODES FOUR SPLICE VARIANTS WITH
DISTINCT BIOLOGICAL PROPERTIES***

Patricia Kreis[‡], Véronique Rousseau[‡], Emmanuel Thévenot[‡], and Jean-Vianney Barnier^{‡1}

From the [‡]CNRS, Institut de Neurobiologie Alfred Fessard – FRC2118, Laboratoire de Neurobiologie Cellulaire et Moléculaire – UPR9040, Gif sur Yvette, F-91198, France.

Running title: New PAK3 splice variants are specific for mammals

¹ Address correspondence to: J-V. Barnier, Laboratoire de Neurobiologie Cellulaire et Moléculaire, UPR9040 CNRS, 1 avenue de la terrasse, 91198 Gif sur Yvette, France. Tel: 33-1-69823418, Fax: 33-1-69824141; E-mail: barnier@nbcn.cnrs-gif.fr

The p21-activated kinases PAK1, PAK2, and PAK3 are members of the PAK group I and share high sequence identity and common biochemical properties. PAK3 is specifically implicated in neuronal plasticity and also regulates cell cycle progression, neuronal migration and neuronal apoptosis. Loss of function of PAK3 is responsible for X-linked non-syndromic mental retardation whereas gain of PAK3 function is associated with cancer. In order to understand the functional specificities of PAK3, we analyzed the structure of PAK3 gene products. We report here the characterization of a new alternatively spliced exon called c located upstream of the previously identified exon b. Mammalian PAK3 genes encode four splice variants and the corresponding proteins were detected with specific antibodies in brain extracts. All PAK3 transcripts are expressed in neurons, but not in glial cells. The presence of the exons b and c renders the kinase constitutively active and decreases interaction with GTPases. We show that whereas exon b is detected in all tetrapods and not in fish, exon c is only present in mammals. We propose that the appearance of new alternatively spliced exons during evolution and the resulting increase of complexity of PAK3 gene products may contribute to the specific roles of this kinase in neuronal signalling.

p21-activated kinases (PAK) kinases are divided into two groups. In mammals, group I includes PAK1, PAK2, PAK3 and group II includes PAK4, PAK5, PAK6, whereas invertebrates such as *Drosophila* and *Caenorhabditis* contain only one member per group (1). PAKs contain a highly conserved C-terminal kinase domain but a variable N-terminal regulatory domain responsible for their implication in a variety of

intracellular signalling pathways (2). Both groups bind Cdc42 and Rac1 GTPases through their p21 GTPase-binding domain (PBD) (3) but only the PAKs of group I are activated by this interaction (4). PAKs of group I also contain an autoinhibitory domain (AID) which partially overlaps with the PBD and interacts with the kinase domain in resting cells (5, 6). Interaction of active GTPases with the PBD triggers conformational changes responsible for autophosphorylation and subsequent activation. PAKs play important roles in cell physiology and are key regulators of several signalling pathways including actin cytoskeleton dynamics and cell cycle progression (2). Indeed they are implicated in cell transformation and cancer development (7). Moreover, in addition to their roles in cytoskeleton and proliferation regulation, PAKs play an important role in neuronal development (4, 8) and in synaptic plasticity and spine morphogenesis (9-14). Inhibition of group I PAKs in cortical and hippocampal neurons led to cognitive defects (9) and impairments of PAK function are associated with cognitive deficits in Alzheimer disease (15). Despite their high sequence identity, the three group I kinases are involved in different biological processes, as indicated by the phenotype of their respective knock outs (4). However, the functions of each PAK in cell physiology and the molecular mechanisms supporting these functions are poorly understood.

Some recent data show that PAK3, whose expression is restricted to the central nervous system (16, 17) is specifically implicated in the pathophysiology of mental retardation and in some cancers. Indeed four mutations have been identified in patients with non syndromic mental retardation, showing the importance of PAK3 in cognitive processes (18-21). The absence of functional complementation by the other PAKs in PAK3-mutated patients with mental

retardation strongly suggests a specific role for PAK3 in synaptic plasticity. Manipulation of PAK3 expression in neurons and expression of PAK3 proteins with mental retardation mutations led to abnormal spinogenesis and synaptic plasticity in different experimental models (11, 12, 14, 22). Other data suggest a specific role of PAK3 in cell cycle initiation (23), cell cycle progression (24), and neuronal migration (25). Interestingly several point mutations were identified in the PAK3 gene in human cancers during a large screening study of somatic mutations in kinase genes (26).

Searching for PAK3 specific features, we have previously identified PAK3 as a specific Cdc42 effector (14). We also reported the presence of an alternatively spliced exon b in the regulatory domain of PAK3 (27). Here, we report the identification of a new alternatively spliced exon of the PAK3 gene located in the AID/PBD upstream of the previously identified exon b. This insert named c is present in two new transcripts PAK3c and PAK3cb. We identified in mammals the four PAK3 mRNAs and the four corresponding splice variants with specific antibodies that we have generated. We also report that PAK3 and its different splice variants are expressed in neurons, but not in glial cells. Interestingly, these inserts which are located in the regulatory region, strongly increase the kinase activity and modify the GTPase binding. We performed a phylogenetic analysis for the presence of the c and b inserts in different species to characterize their evolution. Thus far, PAK3 is unique in its protein complexity among the PAK family.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Plasmid constructions and RT-PCR—The list of the primers used in this study and their sequences are recapitulated in supplementary table 1. The purified PCR products were amplified from mouse brain cDNAs with the primer set M1-M3 using a high fidelity *Pfu* polymerase (Promega, Charbonnières, France) and cloned into TOPO 2.1 vector (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) following the manufacturer's instructions and sequenced. To construct full-length PAK3 splice variants, the plasmids containing the exons c and b, or c alone, were digested with *EcoRI* and the purified fragments of 118 bp and 55 bp were inserted in pcDNA3-HA-PAK3a in order to obtain respectively the pcDNA3-HA-PAK3cb and pcDNA3-HA-PAK3c plasmids. pcDNA3-HA-

PAK3a and pcDNA3-HA-PAK3b were previously described (27). Extraction and purification of RNAs from different mouse tissues were previously described (28). RNAs from adult brains of mouse, rat, chicken, tetraodon, medaka and from 32-cell stage xenopus embryos were extracted using TRIzol (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) and reverse transcribed as described (27). RNAs were purified from rat glial primary cells and neuronal primary cells at different days *in vitro*. Primary cell cultures of hippocampal neurons were prepared from embryonic day 18 rats as described by Gosselin et al. (29). The correct conditions to amplify specifically each splice variant with the junction primers were established using 50 ng of the plasmids pcDNA3-HA-PAK3a, pcDNA3-HA-PAK3b, pcDNA3-HA-PAK3c, pcDNA3-HA-PAK3cb. The annealing temperature of the primer set M1-M10 and M1-M11 was 64°C, M1-M12: 59°C, M1-M13: 60°C. To confirm successful reverse transcription and to normalize the samples during semi-quantitative RT-PCR, β -actin was amplified in parallel with the primer set A1-A2 which matches both to rat and mouse sequences. Amino-acid numbering refers to the human PAK3 sequence and the exon numbering starts arbitrarily at the first coding exon.

Phylogenetic analysis—Search of PAK3 sequences were performed using BlastN program and Ensembl database. Multiple sequences were aligned using ClustalW, with manual optimization. Regions of ambiguous homology were removed and fish sequences located at the exons junctions of homologous mammalian exon junctions and corresponding most probably to introns, were eliminated. For tree reconstruction, we calculated the maximum likelihood trees using PHYML (30). The robustness of the maximum likelihood trees was estimated by 100 bootstrap replications.

Antibodies—Antibodies to HA (12CA5) were purchased from Roche Molecular Biochemicals (Meylan, France). The anti-PAK3-N19 antibody (N19) directed against the 19 N-terminal amino acids was purchased from Santa Cruz Biotechnology (Tebu, Le Perray, France). A rabbit polyclonal antiserum was raised against the exon c-encoded synthetic peptide CPFQTSRPVTVASSQSEGKM conjugated to keyhole limpet hemocyanin (Neosystem, Strasbourg, France). Antibodies were affinity-

purified by Ultralink column chromatography (Perbio Science, Brebières, France) after covalent attachment of the corresponding peptide, following the manufacturer's instructions. The serum anti-exon b was previously described (27).

Cell culture, transfection, cell lysis, immunoprecipitation, kinase assay and immunoblotting analysis—COS-7 cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal bovine serum, 2 mM glutamine, 100 units/ml penicillin, and 100 µg/ml streptomycin (Invitrogen). Plasmid DNA (10 µg) was transfected into 4×10^6 COS-7 cells using the electroporation method with an electroporator (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France).

Transfected cells were washed twice with ice-cold phosphate-buffered saline and lysed in 1.8 ml of cold lysis buffer containing 50 mM Tris-HCl, 1% Triton X-100, 100 mM NaCl, 50 mM NaF, 10 mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$, 5 mM EDTA, 1% aprotinin, 1 mM 4-(2-aminoethyl)-benzenesulfonylfluoride (Pefabloc SC, Interchim), pH 7.5, and then clarified by centrifugation (13,000 g, 15 min). Adult mouse tissues from 3 weeks to 2-month-old animals were dissected, homogenized in lysis buffer, and clarified by ultracentrifugation (100,000 \times g, 30 min).

In order to activate the kinase, cleared cell extracts of PAK3-transfected cells were incubated with 5 µg of recombinant GST-Cdc42-V12 in the presence of 25 µM ATP during 30 min at room temperature. Extracts were then immunoprecipitated by incubating them with 4 µl of 12CA5 anti-HA antibody and 50 µl of Pansorbin (Merck, Nottingham, UK) overnight at 4°C. After washing the immunocomplexes, aliquots were subjected to immunoblotting to ensure that PAK proteins were correctly expressed and immunoprecipitated. Protein samples were separated by 10% SDS-PAGE and transferred to a polyvinylidene difluoride membrane (Amersham Biosciences, Orsay, France). Immunodetection was performed using SuperSignal chemiluminescent reagent (Pierce, Perbio Science). GST-Cdc42-V12 recombinant proteins were expressed in *Escherichia coli*-BL21LysS and purified on glutathione-agarose beads as described by the manufacturer (Amersham). For kinase reactions, immunoprecipitates were washed one more time

in the kinase buffer (25 mM HEPES, pH 7.4, 25 mM MgCl_2 , 25 mM β -glycerophosphate, 2 mM dithiothreitol). Immunoprecipitates were then incubated in the kinase buffer containing 20 µM ATP and 5 µCi of [γ - ^{32}P] ATP (MP Biomedicals, Vannes, France) for 20 min at 30°C. Boiling in SDS-Laemmli sample buffer stopped the reaction and the products were resolved by SDS-PAGE. The incorporation of ^{32}P in PAK3 proteins measuring autophosphorylation was quantified with a PhosphorImager (Molecular Dynamics, GE Healthcare Europe, Orsay, France) using Image Quant Software. Similar results are obtained with MBP or H2B as substrates (14, 27).

Immunoprecipitations of endogenous PAKs was performed on mouse brain extracts in the presence of 15 µl of anti-PAK3-N19 and 100 µl of protein G-agarose (Sigma-Aldrich, Lyon, France) incubated overnight at 4°C.

Co-immunoprecipitation of GTPases was performed as described (27). Briefly, COS-7 cells were transfected with 5 µg of active GFP-tagged Cdc42 along with 5 µg of HA-tagged PAK3 constructs. Cells were lysed in Robert's buffer (1% Nonidet P-40, 10% glycerol, 20mM Tris, pH 8, 137 mM NaCl, 50 mM NaF, 10 mM β -glycerol phosphate, 10 mM phenylmethylsulfonylfluoride, 10 µg/ml aprotinin, 10 mM sodium orthovanadate) 30h after transfection and lysates were immunoprecipitated overnight with anti-HA agarose-conjugate (Sigma-Aldrich). Immune complexes were separated by electrophoresis and transferred to PDVF membranes, before Western blotting analysis, with anti-PAK3-N19 antibodies to detect PAK3 spliced variants or with anti-GFP antibodies to detect coprecipitated Cdc42 protein. Quantification of chemiluminescence was performed after acquisition with a CDD camera and quantification software (GeneSnap and GeneTools, SynGene, Ozyme).

RESULTS

Identification of a new PAK3 alternatively spliced exon present in two splice variants—Amplification of cDNAs from adult mouse brain mRNAs using specific primers (M1-M3) for PAK3 exons 1 and 5 led to three bands (Fig. 1A, first lane). The sizes of the two smaller fragments correspond to the amplification of previously identified transcripts PAK3a, without alternatively spliced exon, and PAK3b which contains the 45 bp-exon b insert (27). The

unexpected larger fragment of 470 bp, marked with an asterisk, was subcloned and its sequence revealed the presence of an additional in-frame 63 bp sequence, we named exon c, located between exon 2 and exon b (Fig. 1, A-C). We showed, using specific primers for exons 1, 5, b, and c that this insert is either associated with the exon b or directly fused to the exon 3 (Fig. 1, A and B). Indeed, this sequence was present, associated with the 45 bp-exon b, in a mouse expressed sequence tag (AU080098). Thus, the mouse PAK3 gene codes for four transcripts (Fig. 1D). We obtained by RT-PCR similar results from human and rat adult brain RNAs and from RNAs of a human neuroblastoma cell line SKNSH RNAs (data not shown). The amino acid sequences deduced from mouse or human exon c are identical and do not possess any identity with protein sequences in databases (Fig. 1C). Gene structure analysis showed that the mouse and the human PAK3 gene are located on the X chromosome and possess the same genomic structure which consists of 16 coding exons in which two are alternatively spliced. In the region of the insertions, the size of the exons between human and mouse is totally conserved and the size of introns is similar in each species (Fig. 1E). The flanking sequences of the 63 bp exons in both species are in good agreement with the consensus for donor and acceptor splicing sites (data not shown).

We investigated the presence of the two PAK3 exons b and c in genomic databases of mammalian genomes and found both exons in the nine different mammalian species that we analyzed, including human (*Homo sapiens*), chimpanzee (*Pan troglodytes*), macaque (*Macaca mulatta*), cow (*Bos taurus*), dog (*Canis familiaris*), cat (*Felis catus*), rabbit (*Oryctolagus cuniculus*), rat (*Rattus norvegicus*), and mouse (*Mus musculus*). Information about the *in silico* data is listed in supplementary data 2 and alignment is shown in supplementary data 3. We also identified these sequences in EST/cDNA databases and found exon b alone for three species (human, chimpanzee, and mouse) or associated with exon c in two species (macaque, mouse) (supplementary table 2). The deduced amino acid sequences encoded by the exons b and c are totally conserved between these mammalian species except for one amino acid substitution, located in the exon c of *Pan troglodytes* (Fig. 1C). Thus mammalian PAK3 genes are transcribed in four mRNAs

corresponding to PAK3a, PAK3b, PAK3c, and PAK3cb (Fig. 1D).

The two new PAK3c and PAK3cb proteins are detected in mouse brain—The c and b exons encode peptide inserts of 21 and 15 amino acids, respectively, located inside the PBD/AID of the PAK3 protein between amino acids 92-93 (Fig. 2A). In order to identify the two new splice variants of PAK3 in mouse brain, we developed a serum directed against the insert c peptide. We also constructed eukaryote expression plasmids coding for HA-PAK3c and HA-PAK3cb (see experimental procedures). We verified the specificity of the purified antibodies on lysates of COS-7 cells transfected with the different HA-tagged PAK3 splice variants (Fig. 2B). The anti-Eb antibodies, previously developed in our laboratory (27), recognized PAK3b and PAK3cb whereas the anti-Ec antibodies recognized PAK3c and PAK3cb. We then used these sera to identify the two new splice variant proteins in mouse brain. To do so, we carried out immunoprecipitation of all PAK3 proteins on mouse brain lysates using an antibody that recognizes the common 19 N-terminal amino acids of PAK3. Immunoprecipitates were analyzed by Western blot using the anti-N19, anti-Eb, and anti-Ec sera. Two proteins of 68 and 72 kDa were detected by the Eb antibodies (Fig. 2C Eb), corresponding to PAK3b and PAK3cb respectively and two proteins of 69 and 72 kDa were detected by the Ec antibodies (Fig. 2C Ec), corresponding to PAK3c and PAK3cb, respectively. The two splice variants PAK3b and PAK3c have very close molecular weights, leading to the detection of only three bands with anti-N19 (Fig. 2C N19), the lowest band corresponding to PAK3a, the intermediate protein band corresponding to the merge of PAK3b and PAK3c, and the highest to PAK3cb. These results allowed us to estimate the relative amount of each splice variant in adult rat brain. PAK3c is far less abundant than PAK3cb (Fig. 2C Ec) while the amount of PAK3b is greater than PAK3cb (Fig. 2C Eb). Thus, the quantity of PAK3c in the intermediate band of N19 is weak compared to the amount of PAK3b suggesting that similar amount of PAK3a and PAK3b are present in mouse brain (Fig. 2D).

The four PAK3 splice variants are neuron specific—Previous RT-PCR analysis showed that PAK3a and PAK3b are highly expressed in brain, with an additional expression of PAK3 in

testis (27). We asked whether the two new transcripts, PAK3c and PAK3cb, have restricted pattern of expression in brain. In order to amplify individually each transcript, we designed primers overlapping adjacent regions of contiguous exons, restricting amplification to a unique transcript (Fig. 3A). As an example, the reverse primer M10 matches the 3' extremity of the second exon and the 5' region of the third exon and is specific for the PAK3a transcripts (Fig. 3A, first line; 3B, first panel). The sequences of these specific primers are listed in the supplementary table 1. The specificity of each primer set toward a unique RNA molecule was verified using plasmids coding for PAK3a, PAK3b, PAK3c and PAK3cb (Fig. 3B). The expression of the four PAK3 transcripts was studied by semi-quantitative RT-PCR in various brain regions, in testis and liver (Fig. 3C). As previously shown (27), no expression of PAK3 was detected in liver (Fig. 3C) or in kidney tissues (Fig. 3D). Each splice variant was expressed in every brain region analyzed, with a higher expression of PAK3b in cerebral hemisphere and of PAK3c in spinal cord. Only the PAK3c transcript was expressed in testis. As well as the four PAK3s, PAK1 and PAK2 transcripts are expressed in brain (Fig. 3D). PAK2 is strongly expressed in kidney, less so in hippocampal neurons in culture and only at a very low level in glial cells. PAK1 is strongly expressed in neurons but also in glial cells and kidney tissue. However, all four PAK3 transcripts were expressed in neurons but not in glial cells. These results show that contrary to PAK1 and PAK2, the different splice variants of PAK3 are neuron specific.

Exons c and b confer constitutive kinase activity and decrease GTPase binding—We previously showed that the presence of the insert b in the N-terminal regulatory domain of PAK3b renders the kinase constitutively active and not further activated by active GTPases (27). We also previously demonstrated that this insert decreases the binding of PAK3 to Rac1 and Cdc42. In a first step, we investigated whether the presence of exon c alone or associated with exon b induced the same constitutive kinase activity. COS-7 cells were transfected with plasmids coding for HA-tagged PAK3 splice variants, the lysates were incubated in the absence or in the presence of the active Cdc42-V12 and the HA-immunoprecipitates were subjected to an *in vitro* kinase assay. In resting

conditions, in the absence of active Cdc42, the PAK3a protein displayed a very low basal kinase activity, often undetectable. Incubation with active Cdc42 led to strong kinase activation (Fig. 4A). In contrast, PAK3b and the new splice variants PAK3c and PAK3cb possessed a high kinase activity with or without active Cdc42. Quantification of the kinase activity did not show any significant difference between the activated PAK3a and the three other splice variants (Fig. 4B). These results demonstrate that like PAK3b, the new PAK3c and PAK3cb splice variants are constitutively active. In a second step, we analyzed the interaction between Cdc42 and the four splice variants to see if the presence of the exon c alone or in association with the exon b could modify the binding to its activator Cdc42. HA-tagged PAK3 splice variants and GFP-tagged active Cdc42-V12 or inactive Cdc42-N17 were co-expressed in COS-7 cells. PAK3 proteins were immunoprecipitated using anti-HA antibodies and the isolated complexes were analyzed for the presence of associated Cdc42. We show that the active GTPase Cdc42 binds the four PAK3 splice variants (Fig. 5A upper panel). We verified that the Cdc42-N17 GTPase did not bind to PAK3. As expected, the quantification of the relative binding of Cdc42 to PAK3b revealed that the presence of the insert b decreases the interaction with this GTPase (Fig. 5B). In addition, we show that the new insert c alone or in association with the insert b also significantly decreases the binding to Cdc42.

Exon c is mammalian specific—Except for the identification of PAK3 in *Xenopus laevis*, PAK3 genes have not been previously studied in other species than mammals (24). This prompted us to search for PAK3 alternatively spliced exons in more distant taxons to mammals such as birds, amphibians and fishes. We identified exon b in the chicken (*Gallus gallus*) PAK3 gene at the genomic level using the blast program (supplementary data 2). Compared to mammals, the peptide sequence of exon b in *Gallus* shows one amino acid substitution (Fig. 6C). Using two specific primers (set G1-G2), the first in exon 1 and the second covering exons 4 and 5, we detected one major band by RT-PCR on chicken brain RNAs (Fig. 6A). The amplified fragment corresponds to the size of PAK3a messengers. A minor upper band was also detected and could correspond to PAK3b. Using a specific reverse primer or a specific forward primer in the exon b

(G3 and G4 respectively), we obtained one fragment for each amplification showing that the chicken PAK3 gene only contains the exon b whose transcript is faintly expressed. We did not detect any other alternatively spliced exon by RT-PCR (Fig. 6A) and *in silico* genomic analysis confirms the absence of exon c in the chicken PAK3 gene.

PAK3b was previously identified in *Xenopus laevis* in a screen for proneural genes during primary neurogenesis (24). However no other PAK3 transcript was identified in this analysis leading to the possibility that the exon b is not alternatively spliced but may correspond to a constitutive exon. To analyze this hypothesis, we performed RT-PCR on *Xenopus laevis* brain mRNAs using primer set X1-X2 and identified a fragment corresponding to the size of the PAK3a amplification product (Fig. 6B). The sequence of the PCR product confirmed that it corresponded to PAK3a. The fragment corresponding to PAK3b is not detectable, showing that the PAK3b transcript is not abundant compared to PAK3a. The peptide sequence of exon b in *Xenopus* shows three amino acid substitutions compared to the mammalian exon b sequence (Fig. 6C). To identify PAK3b transcripts, we performed PCR with a specific primer (X3) for exon b. In this condition, we amplified a fragment corresponding to PAK3b and another transcript containing an additional new 30 bp sequence. This insert we named XI-Exon d, is located between exon 2 and exon b, and corresponds to another alternatively spliced exon (Fig. 6B). The sequence of the exon d is totally conserved in another frog species, *Xenopus tropicalis* (data not shown) but does not present any identity with the sequence of the mammalian exon c (Fig. 6C). This insert is a distinct feature to *Xenopus* since it was not identified in any of the other species analyzed. We conclude that in remote tetrapods, i.e. in amphibian and birds, PAK3 gene encodes two highly conserved splice variants PAK3a and PAK3b. Thus the PAK3 exon c appears to be specific for mammals (Fig. 6D).

Exon b is tetrapoda specific— To study PAK3 alternatively spliced exons in more distant phyla, we searched for PAK sequences in five actinopterygian fish databases using Ensembl data base: fugu (*Takifugu rubripes*), tetraodon (*Tetraodon nigroviridis*), medaka (*Oryzias latipes*), stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) and zebrafish (*Danio rerio*) (Supplementary data

2). Three PAK sequences were found in tetraodon, stickleback and zebrafish and four PAK sequences were found in fugu and medaka. The alignment of the predicted amino-acid sequences of these genes with human PAK1-3 protein sequences allowed the establishment of a phylogenetic tree which clearly identified the mammalian PAK3 orthologue in four fish species: fugu, tetraodon, medaka, and stickleback (Fig. 7A). We did not identify any PAK3 sequences in the zebra fish (*Danio rerio*). The predicted coding sequences of the four PAK3 actinopterygii deduced from genomic data gave additional inserts (i) between exon 2 and exon 3. However, we did not find any ESTs covering the PAK3 amino region for these fishes. In order to understand the structure of the PAK3 gene in actinopterygii, we performed RT-PCR on tetraodon and medaka brain mRNA. One fragment was amplified in medaka using primers in exon 1 and 3 and no fragment was amplified using a primer specific of the putative predicted insert between exon 2 and 3 (Fig. 7B). The results strongly suggest the absence of any coding sequence between the exons 2 and 3 and therefore indicate that the reported fish sequences between these exons are intronic (Fig. 7C). Similar results were obtained on tetraodon RNAs (data not shown). We conclude that fish PAK3 genes encode a single mRNA molecule without any alternative exon between exons 2 and 3. Thus, the PAK3 exon b is specific for tetrapods.

In more distant species, such as *Drosophila melanogaster* (Dm), *Caenorhabditis elegans* (Ce) and *Ciona intestinalis* (Ci) which only contain one PAK per group, the sequence comparisons do not affiliate them with a specific mammalian PAK paralogues (data not shown). This suggests that the three PAK of the group I diverge during genomic duplication which occurs with vertebrate speciation, from a common ancestral PAK gene. Although the limits of exons 2 and 3 are located at the homologous position in Dm-PAK, Ce-PAK, and in Ci-PAK, no additional exon was found in EST sequences at this junction. In conclusion, PAK3 exons c and b were found in different phyla suggesting that they appear at different moments during evolution: exon b appears with the tetrapods, whereas exon c appears later with mammals (Fig. 6D and 7C).

DISCUSSION

Alternative splicing plays an important role through evolution by creating transcriptome diversification possibly leading to speciation with the introduction of new characteristics (31). Moreover, alternative splicing is in part responsible for proteomic diversity. It plays an important function in the regulation of synaptic plasticity (32) and its defect is associated with several diseases such as cancers and neurodegenerative diseases (33).

Alternative spliced exons b and c are unique to PAK3—In the present study, we report the existence of a novel alternatively spliced exon named exon c in the mammalian PAK3 gene in addition to the previously identified exon b. These two alternatively spliced exons are located between exon 2 and exon 3. We demonstrate that the mammalian PAK3 gene is transcribed as four mRNAs encoding four detected proteins, two of which contain the insert c. PAK3 is member of the group I PAKs which share high sequence identity in particular in the PBD/AID of the regulatory region. Comparative analysis of the three human PAK genes showed that they have the same genomic organization with similar intron localizations, leading to the possibility that alternative splicing may also exist between exons 2 and 3 for the other PAK genes. To examine this hypothesis, we searched for the presence of additional sequences at the junction of the exons 2 and 3 in PAK1 and PAK2 ESTs in databases. We did not find any evidence of inserts, suggesting that neither PAK1 nor PAK2 are subject to alternative splicing in this region. Moreover, although the junction sequence is conserved between exons 2 and 3 in the PAK common orthologues in invertebrate species such as fruit fly and nematode, we did not find any insert in this region. Altogether this suggests that the alternative spliced exons b and c located between exon 2 and 3 are unique to PAK3.

Alternatively spliced exons appear independently during evolution—Since PAK3 plays an important role in integrating neuronal functions, during development through the determination of neuronal cell fate (24), through the control of interneuron migration (25) and in adulthood by regulating synaptic plasticity (34), we sought to analyze the phylogenetic history of new PAK3 alternatively spliced exons. The identification of PAK3 was evident for tetrapods, but needed detailed analysis in remote taxons. We asked if the putative PAK3 fish genes were located in a conserved synteny which

defines chromosomic regions of ancestral chromosomes maintained through evolution and found that the synteny around PAK3 is not conserved between human and fish. Alignment of the peptide sequences of the PAK3 proteins from different vertebrates, with human PAK1 and PAK2 sequences allowed us to identify several amino acid residues specific to PAK3 (Supplementary data 3). Out of the 544 residues of PAK3 we identified 364 residues conserved in all PAK proteins and 44 residues specific for PAK3 (Supplementary data 4). As examples, the N₁₉ residue located after the first proline-rich sequence (PPAPPXR) and the I₉₄ residue at the beginning of the third coding exon are specific of the PAK3 proteins. These 44 amino acids were found in the fish PAK3 proteins of four species medaka, fugu, tetraodon and stickleback confirming their orthologous relationship (Supplementary data 3). We clearly showed that in fish, the small sequence between exons 2 and 3, reported as a coding sequence in databases, is actually an intronic sequence.

To resume, our results suggest that c and b exons appear at different moments during evolution: exon b is absent in fish, present in frog and in bird, and is totally conserved in all mammals whereas exon c is only present in mammals. This powerful approach associating *in silico* and experimental analyses allowed us to identify new alternative exons in vertebrate species, and we propose that exon b appears concomitantly with tetrapods whereas exon c appears with mammals.

Alternatively spliced exons are associated with new biochemical properties—The amino acid inserts b and c are located inside the inhibitory switch domain, a highly conserved sub-region of the AID of group I PAKs. This domain was previously described as controlling the transition between a compact inhibited conformation to an open active one. We show that these new splice variants are constitutively active. The insert c which may deform the AID structure, could suppress the inhibition of the kinase by the AID, as we demonstrated for PAK3b (27). The integrity of this AID is required for inhibition, since mutations located in this domain also induce a constitutive activity (35). In some cases, alternative splicing modulates kinase activity as was reported for the focal adhesion kinase FAK (36) or for the B-Raf (37). In some rare cases, splice variants may have an antagonist effect and act as dominant negative enzymes as it was reported for IRAK (38) or ERK5 (39). In other

rare cases, alternative splicing generates constitutively active variants, i.e. they display *in vitro* high kinase activity in absence of activation by their respective activators, and display *in vivo* characteristics of activated kinases, as it was reported for JNK2 (40). We report here the first characterization of constitutively active splice variants due to insertions in the regulatory domain. However, activity of kinases should be regulated, and the function of constitutively active splice variants could still be regulated by differential expression, by degradation, or by subcellular delocalisation. Moreover, the b and c encoded inserts are located in the PBD which overlaps with the AID, and we show that like PAK3b, PAK3c and PAK3cb bind significantly less Cdc42 than PAK3a does. We recently demonstrated that Cdc42 is the main activator of PAK3 compared to Rac1 and we show that the Cdc42-PAK3 module plays important role in spinogenesis (14). One hypothesis is that the alternatively spliced exons b and c redirect PAK3 to other GTPases of the Cdc42-Rac family.

Thus the new PAK3 splice variants have original biochemical properties among the

kinases of the group I PAKs. The high degree of conservation of PAK3 alternatively spliced exon sequences suggests that these splice variants play important functions in neuronal signalling. The regulatory region of PAK is implicated in the interaction with several partners (2) and the presence of the inserts could bring new specificities to PAK3 in terms of new partners. PAK3 is also associated with different pathophysiologies. The four mutations responsible for mental retardation identified in PAK3 are located in common regions of PAK3. Thus, mental retardation phenotype may be due in part to loss of function of the PAK3 splice variants. In addition PAK3 is associated with cell growth and transformation. Indeed, PAK3 is responsible for DNA synthesis initiation during neuronal apoptosis induced by the expression of mutated forms of amyloid precursor protein (23). Recently, the sequencing of kinase genes in cancer genomes led to the identification of PAK3 as a cancer gene (26). Thus, it will be of broad interest to analyze the implications of the new splice variants in the specific neuronal functions of PAK3 and its implication in human pathologies.

REFERENCES

1. Dan, I., Watanabe, N. M., and Kusumi, A. (2001) Trends Cell Biol 11, 220-230
2. Bokoch, G. M. (2003) Annu Rev Biochem 72, 743-781
3. Burbelo, P. D., Drechsel, D., and Hall, A. (1995) J Biol Chem 270, 29071-29074.
4. Hofmann, C., Shepelev, M., and Chernoff, J. (2004) J Cell Sci 117, 4343-4354
5. Zhao, Z. S., Manser, E., Chen, X. Q., Chong, C., Leung, T., and Lim, L. (1998) Mol Cell Biol 18, 2153-2163
6. Lei, M., Lu, W., Meng, W., Parrini, M. C., Eck, M. J., Mayer, B. J., and Harrison, S. C. (2000) Cell 102, 387-397.
7. Kumar, R., Gururaj, A. E., and Barnes, C. J. (2006) Nat Rev Cancer 6, 459-471
8. Govek, E. E., Newey, S. E., and Van Aelst, L. (2005) Genes Dev 19, 1-49
9. Hayashi, M. L., Choi, S. Y., Rao, B. S., Jung, H. Y., Lee, H. K., Zhang, D., Chattarji, S., Kirkwood, A., and Tonegawa, S. (2004) Neuron 42, 773-787
10. Bryan, B., Kumar, V., Stafford, L. J., Cai, Y., Wu, G., and Liu, M. (2004) J Biol Chem 279, 45824-45832
11. Zhang, H., Webb, D. J., Asmussen, H., Niu, S., and Horwitz, A. F. (2005) J Neurosci 25, 3379-3388
12. Boda, B., Alberi, S., Nikonenko, I., Node-Langlois, R., Jourdain, P., Moosmayer, M., Parisi-Jourdain, L., and Muller, D. (2004) J Neurosci 24, 10816-10825
13. Hayashi, K., Ohshima, T., Hashimoto, M., and Mikoshiba, K. (2007) Dev Neurobiol 67, 655-669
14. Kreis, P., Thevenot, E., Rousseau, V., Boda, B., Muller, D., and Barnier, J. V. (2007) J Biol Chem 282, 21497-21506
15. Zhao, L., Ma, Q. L., Calon, F., Harris-White, M. E., Yang, F., Lim, G. P., Morihara, T., Ubeda, O. J., Ambegaokar, S., Hansen, J. E., Weisbart, R. H., Teter, B., Frautschy, S. A., and Cole, G. M. (2006) Nat Neurosci 9, 234-242

16. Bagrodia, S., Taylor, S. J., Creasy, C. L., Chernoff, J., and Cerione, R. A. (1995) *J Biol Chem* 270, 22731-22737
17. Manser, E., Chong, C., Zhao, Z. S., Leung, T., Michael, G., Hall, C., and Lim, L. (1995) *J Biol Chem* 270, 25070-25078
18. Allen, K. M., Gleeson, J. G., Bagrodia, S., Partington, M. W., MacMillan, J. C., Cerione, R. A., Mulley, J. C., and Walsh, C. A. (1998) *Nat Genet* 20, 25-30
19. Bienvenu, T., des Portes, V., McDonnell, N., Carrie, A., Zemni, R., Couvert, P., Ropers, H. H., Moraine, C., van Bokhoven, H., Fryns, J. P., Allen, K., Walsh, C. A., Boue, J., Kahn, A., Chelly, J., and Beldjord, C. (2000) *Am J Med Genet* 93, 294-298.
20. Gedeon, A. K., Nelson, J., Gecz, J., and Mulley, J. C. (2003) *Am J Med Genet* 120A, 509-517
21. Peippo, M., Koivisto, A. M., Sarkamo, T., Sipponen, M., von Koskull, H., Ylisaukko-Oja, T., Rehnstrom, K., Froyen, G., Ignatius, J., and Jarvela, I. (2007) *Am J Med Genet A*
22. Meng, J., Meng, Y., Hanna, A., Janus, C., and Jia, Z. (2005) *J Neurosci* 25, 6641-6650
23. McPhie, D. L., Coopersmith, R., Hines-Peralta, A., Chen, Y., Ivins, K. J., Manly, S. P., Kozlowski, M. R., Neve, K. A., and Neve, R. L. (2003) *J Neurosci* 23, 6914-6927
24. Souopgui, J., Solter, M., and Pieler, T. (2002) *Embo J* 21, 6429-6439.
25. Cobos, I., Borello, U., and Rubenstein, J. L. (2007) *Neuron* 54, 873-888
26. Greenman, C., Stephens, P., Smith, R., Dalgliesh, G. L., Hunter, C., Bignell, G., Davies, H., Teague, J., Butler, A., Stevens, C., Edkins, S., O'Meara, S., Vastrik, I., Schmidt, E. E., Avis, T., Barthorpe, S., Bhamra, G., Buck, G., Choudhury, B., Clements, J., Cole, J., Dicks, E., Forbes, S., Gray, K., Halliday, K., Harrison, R., Hills, K., Hinton, J., Jenkinson, A., Jones, D., Menzies, A., Mironenko, T., Perry, J., Raine, K., Richardson, D., Shepherd, R., Small, A., Tofts, C., Varian, J., Webb, T., West, S., Widaa, S., Yates, A., Cahill, D. P., Louis, D. N., Goldstraw, P., Nicholson, A. G., Brasseur, F., Looijenga, L., Weber, B. L., Chiew, Y. E., DeFazio, A., Greaves, M. F., Green, A. R., Campbell, P., Birney, E., Easton, D. F., Chenevix-Trench, G., Tan, M. H., Khoo, S. K., Teh, B. T., Yuen, S. T., Leung, S. Y., Wooster, R., Futreal, P. A., and Stratton, M. R. (2007) *Nature* 446, 153-158
27. Rousseau, V., Goupille, O., Morin, N., and Barnier, J. V. (2003) *J Biol Chem* 278, 3912-3920.
28. Barnier, J. V., Papin, C., Eychene, A., Lecoq, O., and Calothy, G. (1995) *J Biol Chem* 270, 23381-23389.
29. Goslin, K., Asmussen, H., and Banker, G. (1998) 2nd Ed., MIT Press, Cambridge, MA, pp. 339-370
30. Guindon, S., and Gascuel, O. (2003) *Syst Biol* 52, 696-704
31. Ast, G. (2004) *Nat Rev Genet* 5, 773-782
32. Ule, J., and Darnell, R. B. (2006) *Curr Opin Neurobiol* 16, 102-110
33. Licatalosi, D. D., and Darnell, R. B. (2006) *Neuron* 52, 93-101
34. Boda, B., Nikonenko, I., Alberi, S., and Muller, D. (2006) *Mol Neurobiol* 34, 67-80
35. Tu, H., and Wigler, M. (1999) *Mol Cell Biol* 19, 602-611.
36. Toutant, M., Costa, A., Studler, J. M., Kadare, G., Carnaud, M., and Girault, J. A. (2002) *Mol Cell Biol* 22, 7731-7743
37. Papin, C., Denouel-Galy, A., Laugier, D., Calothy, G., and Eychene, A. (1998) *J Biol Chem* 273, 24939-24947
38. Rao, N., Nguyen, S., Ngo, K., and Fung-Leung, W. P. (2005) *Mol Cell Biol* 25, 6521-6532
39. McCawley, L. J., Li, S., Wattenberg, E. V., and Hudson, L. G. (1999) *J Biol Chem* 274, 4347-4353
40. Tsuiki, H., Tnani, M., Okamoto, I., Kenyon, L. C., Emllet, D. R., Holgado-Madruga, M., Lanham, I. S., Joynes, C. J., Vo, K. T., and Wong, A. J. (2003) *Cancer Res* 63, 250-255

FOOTNOTES

Acknowledgments: We thank Sylvie Rétaux, Baptiste Vernier and Alessandro Alunni for the gift of RNAs from xenopus, chicken, and medaka respectively and Charles Duyckaerts for human brain biopsies. We thank Seana O'Regan and Nicolas Morel for helpful comments on the manuscript and Jean-Stéphane Joly for helpful discussions on the phylogenesis analysis.

Accession numbers :

Accession numbers of the sequenced PCR-products are listed below:

-Human: Hs-PAK3b xxxxxxxx, Hs-PAK3c xxxxxxxx, Hs-PAK3cb xxxxxxxx,

-Mouse: Mm-PAK3c xxxxxxxx, Mm-PAK3cb xxxxxxxx,

-Xenope: Xl-PAK3d xxxxxxxx, Xl-PAK3db xxxxxxxx,

* This work was supported in part by grants from Fondation Jérôme Lejeune, Association pour la recherche sur le Cancer, Ligue contre le Cancer-Essonne, Fédération pour la Recherche sur le Cerveau, by a fellowship from Fondation pour la Recherche Médicale (P.K.).

Keywords: p21-activated kinase 3, splice variant, mental retardation, cancer, phylogenesis.

Abbreviations: PAK: p21-activated kinase; PBD: p21-binding domain; AID: auto-inhibitory domain

Figure 1

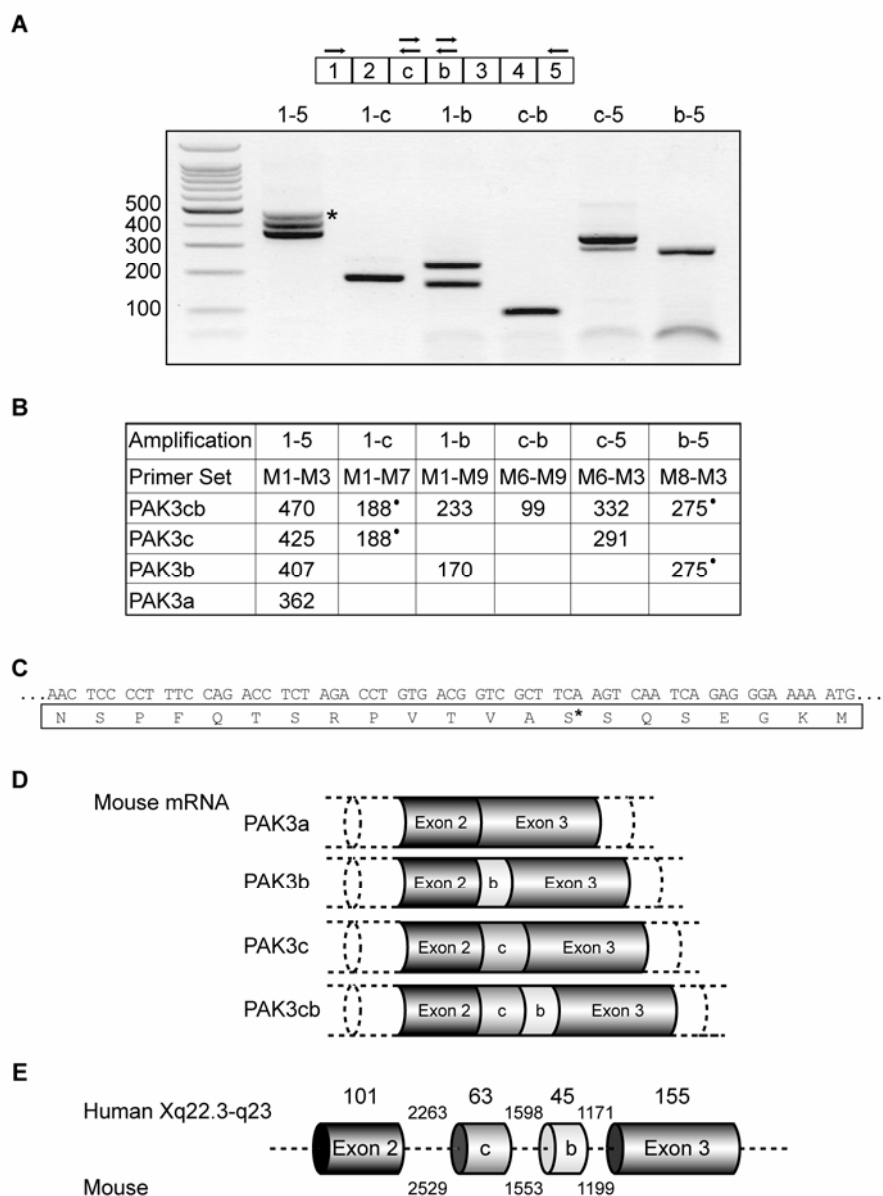


FIGURE 1. Identification of the mammalian PAK3 alternatively spliced exon c. *A*, Identification of four PAK3 transcripts by RT-PCR analysis in adult mouse brain. Lane 1: amplification from exon 1 to exon 5 (primers: M1-M3). Lane 2: amplification from exon 1 to exon c (primers: M1-M7). Lane 3: amplification from exon 1 to exon b (primers: M1-M9). Lane 4: amplification from exon c to exon b (primers: M6-M9). Lane 5: amplification from exon c to exon 5 (primers: M6-M3). Lane 6: amplification from exon b to exon 5 (primers: M8-M3). Size markers are indicated in bp. Localization of primers used are indicated on the upper schematic representation of PAK3 cDNA. *B*, Theoretical sizes in bp of the fragments amplified by RT-PCR on mouse brain using the different primer sets mentioned in (A). Dots indicate the fragments that correspond to the amplification of two types of transcripts. *C*, Nucleotide and predicted amino acid sequences of the new mouse PAK3 exon c. Note that the peptidic sequence is relatively rich in serine and threonine (7/21). The serine shown with an asterisk is substituted by an alanine in *Pan troglodytes*. *D*, mRNA structure of the four PAK3 mouse transcripts. *E*, Partial structure of the human and mouse PAK3 genomic loci. The size of the exons and introns of both human and mouse PAK3 are indicated in bp.

Figure 2

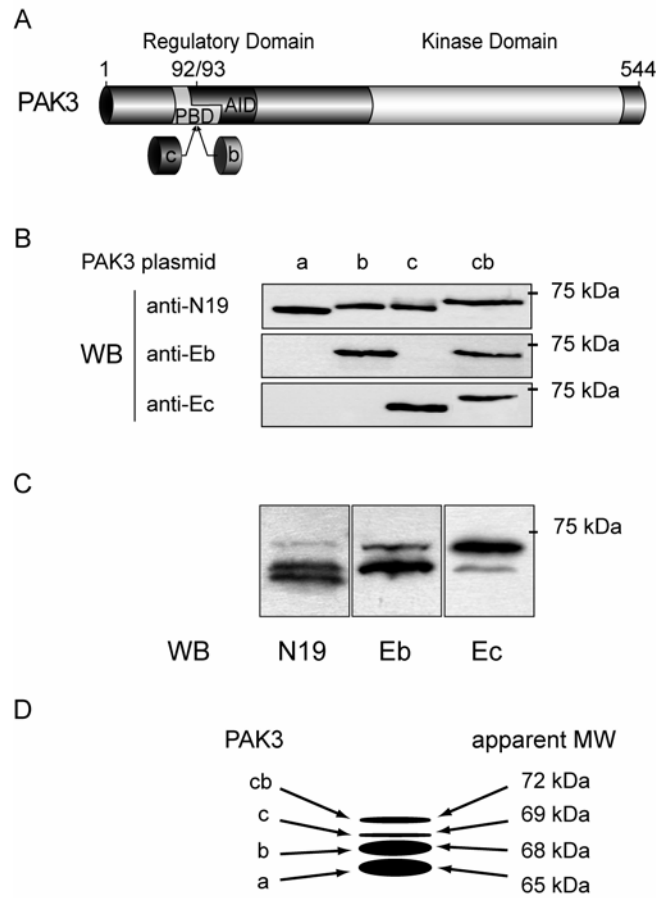


FIGURE 2. Identification of the four PAK3 splice variants in adult mouse brain. *A*, PAK3 protein structure and localization of the c and b inserts in the overlapping PBD (p21-binding domain)/AID (autoinhibitory domain). *B*, Characterization of the Ec antibodies. Lysates of COS-7 cells transfected with PAK3 plasmids were analyzed after Western blotting (WB) with antibodies directed against the PAK3-N terminal region (N19), the insert b (Eb) or the insert c (Ec). *C*, Mouse brain extracts were immunoprecipitated with the N19 antibodies and resolved by Western blotting (WB) with the N19 antibodies (N19), Eb antibodies (Eb) or Ec antibodies (Ec). *D*, Schematic representation of the relative amount of each splice variant deduced from the Western blot in panel C.

Figure 3

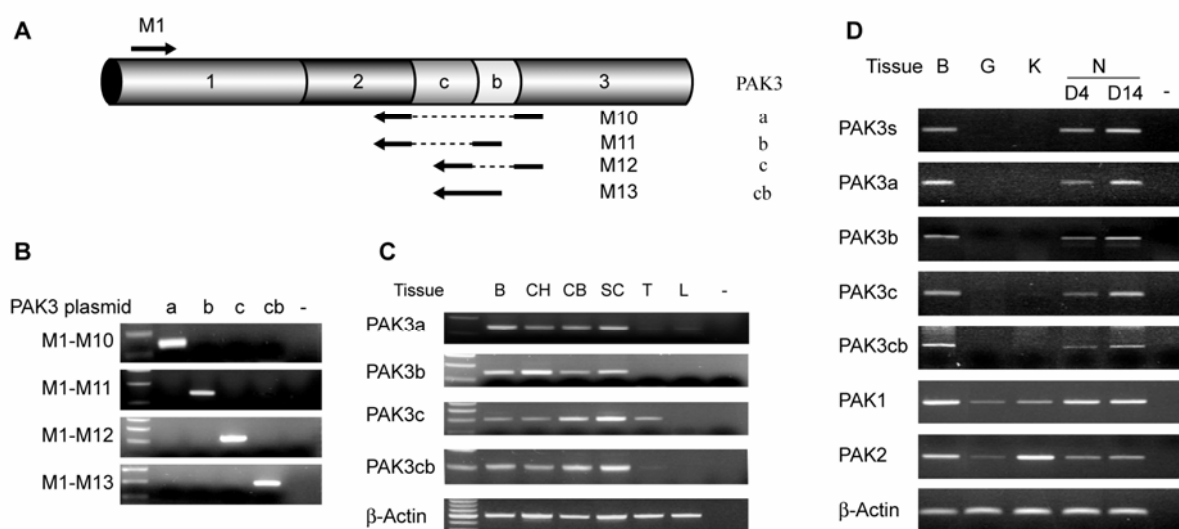


FIGURE 3. RT-PCR analysis of mouse PAK3 alternatively spliced transcripts. *A*, Localisation of the junction primers used to amplify specifically each splice variant. *B*, Verification of the specificity of the PAK3 junction primers. PCR analyses were performed on plasmids coding for PAK3a, b, c and cb. PAK3a was amplified using primers M1/M10, PAK3b using M1/M11, PAK3c using M1/M12 and PAK3cb using M1/M13. *C*, RT-PCR was performed using the PAK3 specific primers mentioned in panel (A), from RNAs isolated from total brain (B), cerebral hemisphere (CH), cerebellum (CB), spinal cord (SC), testis (T), liver (L). β-actin was amplified for normalization with primers A1/A2. *D*, RT-PCR was performed from total brain (B), glial cells in primary culture (G), kidney (K), hippocampal neurons in primary culture (N) at day *in vitro* 4 (D4) and day *in vitro* 14 (D14). All PAK3 splice variants were amplified together using

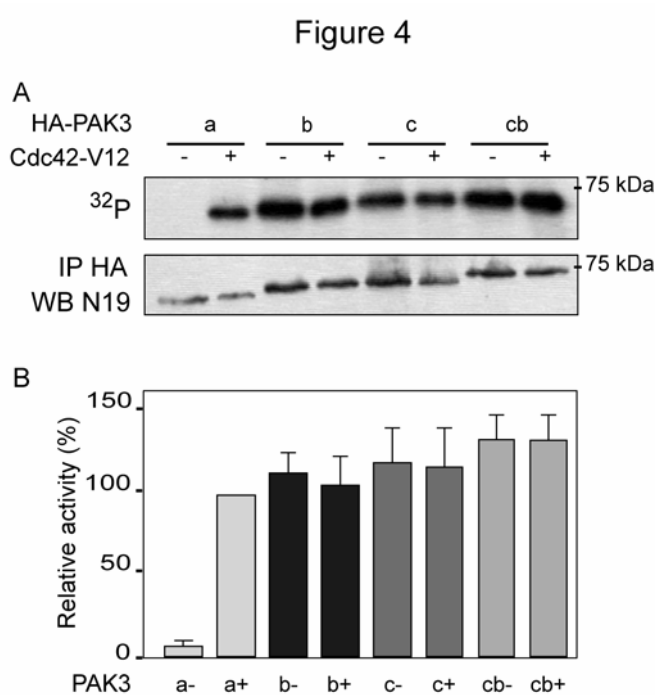


FIGURE 4. Kinase activity of the PAK3 splice variants. *A*, COS-7 cells were transfected with plasmids encoding HA-tagged PAK3 splice variants. Cells lysates were incubated in the absence (-) or presence (+) of the active Cdc42-V12 and immunoprecipitated with anti-HA antibodies (IP HA). The immunoprecipitates were subjected to a kinase assay. The phosphorylated proteins were resolved by SDS-PAGE and the gel was autoradiographed (upper panel). PAK3 proteins were controlled by using anti-PAK3 N19 immunoblotting (WB N19) (lower panel). *B*, The histograms shown represent an average of the quantification of three independent experiments. The results are expressed as a percentage of the Cdc42-activated PAK3a kinase activity.

Figure 5

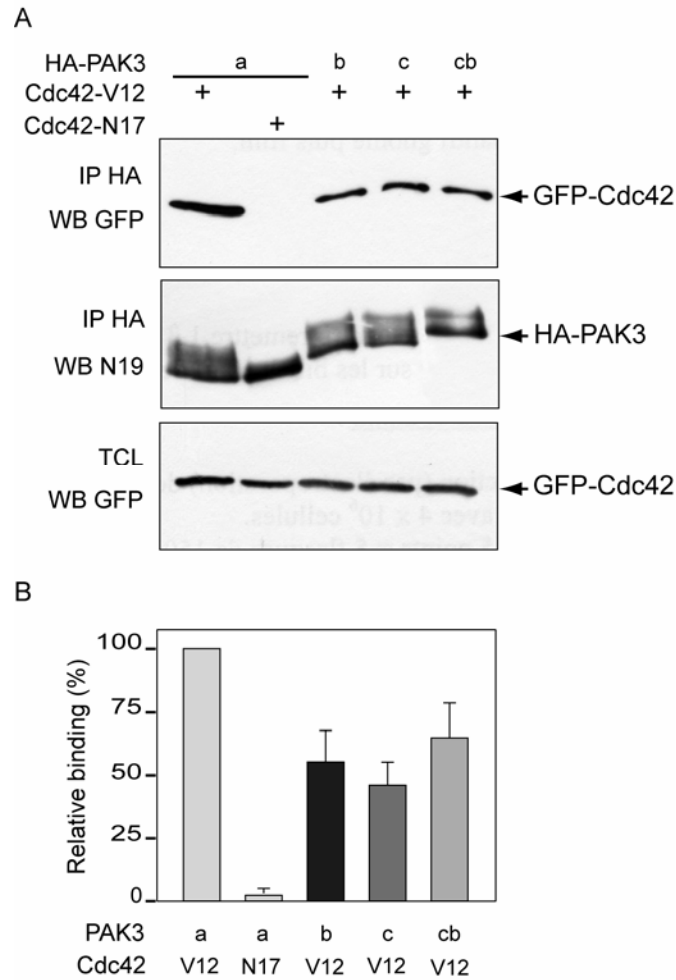


FIGURE 5. *In vivo* interaction of Cdc42 with PAK3 isoforms. *A*, HA-tagged PAK3 isoforms were co-expressed into COS-7 cells with either inactive (N17) as control or active (V12), GFP-tagged Cdc42. PAK3 proteins were immunoprecipitated using anti-HA antibodies (IP HA) and immune complexes were separated by electrophoresis and transferred to PDVF membranes. Upper panel: the presence of the GFP-tagged Cdc42 protein in the immune complexes was revealed by anti-GFP Western blotting. Middle panel: the amount of immunoprecipitated PAK3 proteins was controlled using anti-PAK3 N19 immunoblotting. Lower panel: the presence of GFP-GTPase in the cell lysates (TCL) was controlled by anti-GFP immunoblotting. Data shown are representative of a typical experiment. *B*, The histograms represent the relative binding of active Cdc42 to each variant, compared to the binding of the GTPase to PAK3a. Quantification from three independent experiments was averaged after acquisition of the chemiluminescence with a CDD camera.

Figure 6

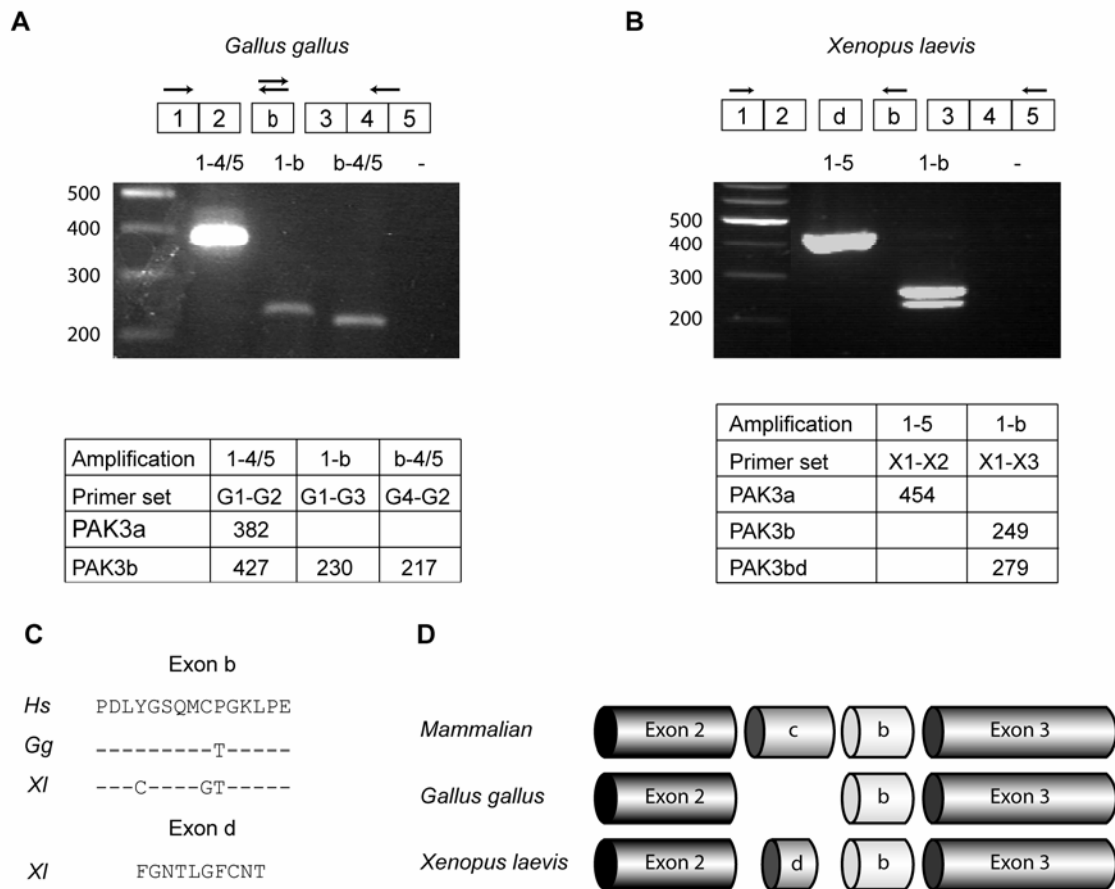


FIGURE 6. PAK3 splice variants in tetrapods. Analysis by RT-PCR for the presence of alternatively spliced exons between exon 2 and 3 in *Gallus gallus* (A) and *Xenopus laevis* (B). The theoretical sizes of the fragments amplified are indicated in bp in the associated table for each species. A, Amplifications were performed on *Gallus gallus* cDNA between exons 1-4/5, 1-b and b-4/5 using the primer sets (G1-G2), (G1-G3), and (G4-G2) respectively. B, Amplifications were performed on *Xenopus laevis* cDNA between exons 1-5 and 1-b using the primer sets (X1-X2) and (X1-X3), respectively. C, Amino acid sequences of PAK3 insert b deduced from the nucleotide sequences of the alternatively spliced exon b in *Homo sapiens* (Hs), *Gallus gallus* (Gg), *Xenopus laevis* (Xl) and amino acid sequence of insert d deduced from the alternatively spliced exon d specific to *Xenopus laevis*. D, Schematic representation of the partial gene structure of PAK3 in tetrapods.

Figure 7

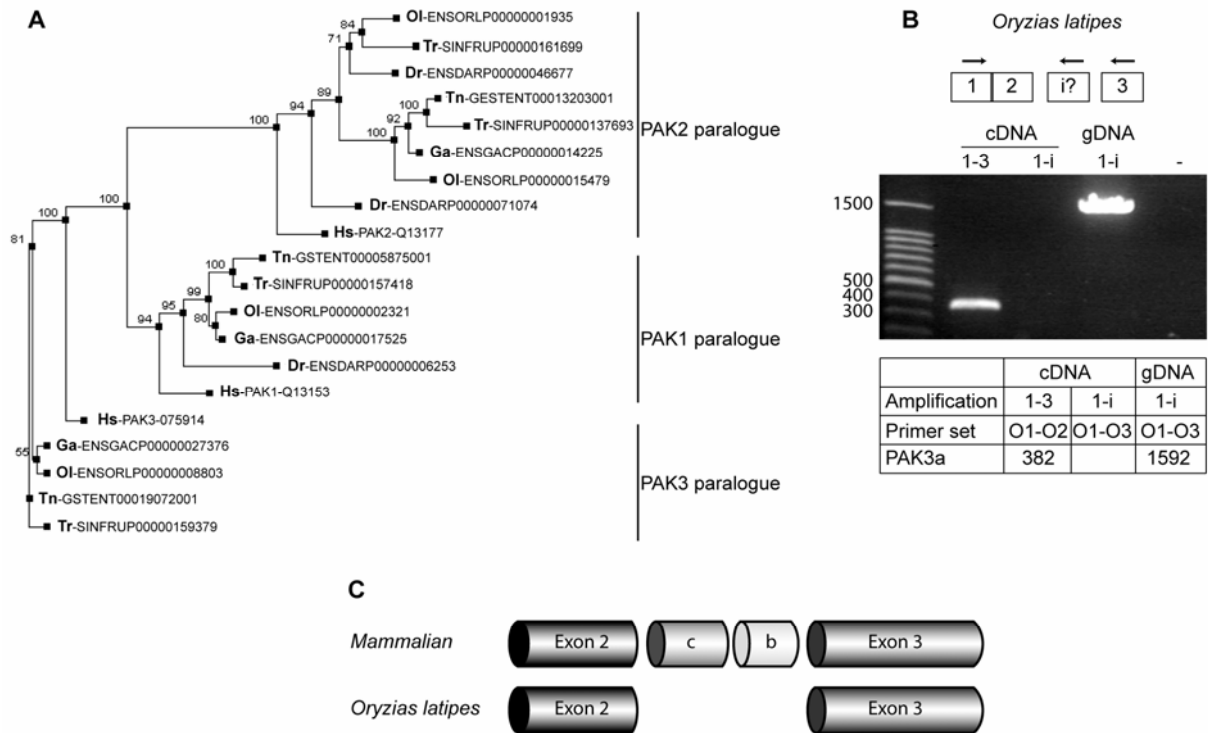


FIGURE 7. PAK3 characterization in fish. *A*, Phylogenetic analysis of PAK in fishes: *Oryzias latipes* (Ol), *Tetraodon nigroviridis* (Tn), *Takifugu rubripes* (Tn), *Gasterosteus aculeatus* (Ga), and *Danio rerio* (Dr), and *Homo sapiens* (Hs). The branch lengths of the tree are proportional to differences between species. Numbers beside branch points indicate the confidence level for the relationship of the paired sequences as determined by bootstrap statistical analysis (100 replicates). The phylogenetic tree identified a PAK3 paralogue in 4 fishes (Ol, Tn, Tr, Ga) with strong sequence identity with *Homo sapiens* PAK3. *B*, Amplifications were performed on *Oryzias latipes* cDNA between exons 1-3 using the primer set (O1-O2) and between exon 1 and the hypothetical insert i using primers (O1-O3). Genomic DNA was used as control (gDNA). The theoretical sizes of the fragments for each amplification are indicated in bp in a table. *C*, Schematic representation of the partial gene structure of fish and mammalian PAK3.

Résultats

Supplementary data 1

Name	Gene	Localization	Species	Sequence
M1	PAK3	exon 1-F	<i>Homo s./Mus m.</i>	5'-CGCTCTATCTTCCCAGGAGG-3'
M2	PAK3	exon 3-F	<i>Mus m.</i>	5'-TGAGCAATGGGCACGACTAC-3'
M3	PAK3	exon 5-R	<i>Mus m.</i>	5'-GGAGGAGCCAAAGGAGGTTC-3'
M4	PAK3	exon 5-R	<i>Mus m.</i>	5'-CTTGGTGCAATGACAGGCGG-3'
M5	PAK3	exon 4-R	<i>Homo s.</i>	5'-GGAGGGGCCAATGGAGGC-3'
M6	PAK3	exon c-F	mammal	5'-CTCCCCTTTCCAGACCTCTAG-3'
M7	PAK3	exon c-R	mammal	5'-CCCTCTGATTGACTTGAAGC-3'
M8	PAK3	exon b-F	mammal	5'-CCAGATCTCTATGGCTCACAG-3'
M9	PAK3	exon b-R	mammal	5'-AGCTTCCCTGGGCACATCTG-3'
M10	PAK3	PAK3a-R	<i>Mus m.</i>	5'- CAGGAATTCCAGTGAATTCCCC-3'
M11	PAK3	PAK3b-R	<i>Mus m.</i>	5'-CATAGAGATCTGGAGTGAATTCC-3'
M12	PAK3	PAK3c-R	<i>Mus m.</i>	5'-CAGGGATTCCCATTTTTCCC-3'
M13	PAK3	PAK3cb-R	<i>Mus m.</i>	5'-GAGATCTGGCATTTTTTCCC-3'
R1	PAK1	PAK1-F	<i>Rattus n.</i>	5'-CCCCTCCGATGAGAAACACC-3'
R2	PAK1	PAK1-R	<i>Rattus n.</i>	5'-CTGGCATCCCCGTAAACTCC-3'
R3	PAK2	PAK2-F	<i>Rattus n.</i>	5'-CTACACAAGGTCTGTTCATCGACC-3'
R4	PAK2	PAK2-R	<i>Rattus n.</i>	5'-GCTTGATAGCAACCTCTTGCCC-3'
G1	PAK3	exon 1-F	<i>Gallus g.</i>	5'-GCTCCAAACCACTCCCCATG-3'
G2	PAK3	exon 4/5-R	<i>Gallus g.</i>	5'-GTGCTCGAAGGATGGGCTTC-3'
G3	PAK3	exon b-R	<i>Gallus g.</i>	5'-CTCTGGGAGCTTCCCTGTGC-3'
G4	PAK3	exon b-F	<i>Gallus g.</i>	5'-GCACAGGGAAGCTCCCAGAG-3'
X1	PAK3	exon 1-F	<i>Xenopus l.</i>	5'-CGATTCTTCTGCATTGAATC-3'
X2	PAK3	exon 5-R	<i>Xenopus l.</i>	5'-CTCTTCTCTGAAACTGGAG-3'
X3	PAK3	exon b-R	<i>Xenopus l.</i>	5'-GGGAGTTTCCCTGTGCCCATC-3'
T1	PAK3	exon 1-F	<i>Tetraodon n.</i>	5'-CACGCCTCCAAACCACTTCC-3'
T2	PAK3	exon 4-R	<i>Tetraodon n.</i>	5'-GCTGCTATGTACCCATGAGC-3'
T3	PAK3	intron 2/3	<i>Tetraodon n.</i>	5'-CCACAAGATGACCAGACC-3'
O1	PAK3	exon 1-F	<i>Oryzias l.</i>	5'-GAGAATGAACAGTAGTTCC-3'
O2	PAK3	exon 3-R	<i>Oryzias l.</i>	5'-CCTGAAGTGAAGCTCATGTAC-3'
O3	PAK3	intron 2/3	<i>Oryzias l.</i>	5'-CTGGGTTTCCACGTAGGTC-3'
A1	β -actin	β -actin-F	<i>Mus m.</i>	5'-CCAACCGTGAAAAGATGACC-3'
A2	β -actin	β -actin-R	<i>Mus m.</i>	5'-AATTGAATGTAGTTTCATGGATG-3'

Table SD1. Sequences and characteristics of the primers used in the RT-PCR experiments

Vertebrata									
Tetrapoda									
species	Presence	Exon b			Exon c			Exon c and Exon b	
		Method	Acc Num	Presence	Method	Acc Num	Presence	Method	Acc Num
<i>Homo sapiens</i>	+	RT-PCR* EST	DB636615	+	RT-PCR*	+	RT-PCR*		
<i>Pan Troglodytes</i>	+	cDNA	AB102660.1	+		+			
<i>Macaca mulatta</i>	+			+		+	EST	CN647134	
<i>Canis familiaris</i>	+			+					XM_858440
<i>Felis catus</i>	+			+					ENSFCAP00000010689
<i>Bos taurus</i>	+			+					ENSBTAP00000020814
<i>Oryctolagus cuniculus</i>	+			+					ENSOCUP00000006085
<i>Mus musculus</i>	+	RT-PCR cDNA	AJ496263	+	RT-PCR*	+	RT-PCR*		
	+	EST	BY276260.1	+		+	EST	AU080098	
<i>Rattus norvegicus</i>	+	RT-PCR		+	RT-PCR	+	RT-PCR		AL691499.7
<i>Gallus gallus</i>	+	RT-PCR							ENSRNOP00000029906
<i>Xenopus tropicalis</i>	+								XP_420314
<i>Xenopus laevis</i>	+	RT-PCR* cDNA	AF485330**						ENSXETP00000027154
<i>Tetraodon nigroviridis</i>	-	RT-PCR		-	RT-PCR				CAG00592
<i>Takifugu rubripes</i>	-			-					SINFRUP000000159379
<i>Gasterosteus aculeatus</i>	-			-					ENSGACG00000020703
<i>Orzias latipes</i>	-	RT-PCR		-	RT-PCR				ENSORLFP00000008803

Table SD2. Identification of exon b and exon c sequences in databases. The accession number of each cDNA, EST or genomic sequence of PAK3 containing or not exon b or exon c was reported in the corresponding column. RT-PCRs that we performed were indicated in the corresponding column.

* The accession numbers of the new cDNAs will be given in the final version of the manuscript.

** The sequence reported as PAK3 actually corresponds to PAK3b transcript (Souopgui et al., 2003).

Résultats

Supplementary data 3

Hs3	MSDG-LDNEEKPPAPPLR-----MNSNNRDSSALNHSSKPLPMAPEEKNKKAR-LRSIFP	53
Pp	MSDG-LDNEEKPPAPPLR-----MNSNNRDSSALNHSSKPLPMAPEEKNKKAR-LRSIFP	53
Pt	MSDG-LDNEEKPPAPPLR-----MNSNNRDSSALNHSSKPLPMAPEEKNKKAR-LRSIFP	53
Cl	MSDS-LDNEEKPPAPPLR-----MNSNNRDSSALNHSSKPLPMAPEEKNKKAR-LRSIFP	53
Ec	MSDG-LDNEEKPPAPPLR-----MNSNNRDSSALNHSSKPLPMAPEEKNKKAR-LRSIFP	53
Mm	MSDS-LDNEEKPPAPPLR-----MNSNNRDSSALNHSSKPLPMAPEEKNKKAR-LRSIFP	53
Rn	MSDS-LDNEEKPPAPPLR-----MNSNNRDSSALNHSSKPLPMAPEEKNKKAR-LRSIFP	53
Cf	MSDS-LDNEEKPPAPPLR-----MNSNNRDSSALNHSSKPLPMAPEEKNKKAR-LRSIFP	53
Gg	MSDS-LDVEEKPPAPPLR-----MNSNNRDSSALNHSSKPLPMAPEEKNKKAR-LRSIFP	53
Xl	MSDS-VDIEEKPPAPPLR-----MNSNNRDSSALNHCSKPLPMAPEEKNKKAR-LRSIFP	53
Tr	MSDS-VDIEEKPPAPPLR-----MNSSRDSSSLNHASKPLPMAPEEKNKKV-R-LRSIFP	53
Tn	MSDS-VDIEEKPPAPPLR-----MNSSRDSSSLNHASKPLPMAPEEKNKKV-R-LRSIFP	53
Ol	MSDS-VDIEEKPPAPPLR-----MNSSRDSSSVNHASKPLPMAPEEKNKKV-R-LRSIFP	53
Ga	MSDS-VDIEEKPPAPPLR-----MNSSRDSSSLNHASKPLPMAPEEKNKKV-R-LRSIFP	53
Hs1	MSNGLDIQDKPPAPPMRNTSTMIGAGSKDAGTLNHGSKPLPPNPEEKKKDRFYRSILP	60
Hs2	MSDN-GELEDKPPAPPVMSSTIFSTGGKDP L SANHSLKPLPSVP EEK KPRHK-IISIFS	58
	*** * ***** ** ** * ** ** ** **	
Hs3	GGGDKTNKKKEKERPEISLPSDFEHTIHVGFD AVTGEFTGIPEQWARLLQTSNITKLEQK	113
Pp	GGGDKTNKKKEKERPEISLPSDFEHTIHVGFD AVTGEFTGIPEQWARLLQTSNITKLEQK	113
Pt	GGGDKTNKKKEKERPEISLPSDFEHTIHVGFD AVTGEFTGIPEQWARLLQTSNITKLEQK	113
Cl	GGGDKTNKKKEKERPEISLPSDFEHTIHVGFD AVTGEFTGIPEQWARLLQTSNITKLEQK	113
Ec	GGGDKTNKKKEKERPEISLPSDFEHTIHVGFD AVTGEFTGIPEQWARLLQTSNITKLEQK	113
Mm	GGGDKTNKKKEKERPEISLPSDFEHTIHVGFD AVTGEFTGIPEQWARLLQTSNITKLEQK	113
Rn	GGGDKTNKKKEKERPEISLPSDFEHTIHVGFD AVTGEFTGIPEQWARLLQTSNITKLEQK	113
Cf	GGGDKTNKKKEKERPEISLPSDFEHTIHVGFD AVTGEFTGIPEQWARLLQTSNITKLEQK	113
Gg	GGGDKTNKKKEKERPEISLPSDFEHTIHVGFD AVTGEFTGIPEQWARLLQTSNITKLEQK	113
Xl	GGGDKTNKKKEKERPEISLPSDFEHTIHVGFD AVTGEFTGIPEQWARLLQTSNITKLEQK	113
Tr	GG-DKTNKKKEKERPEISLPSDFEHTIHVGFD AVTGEFTGIPEQWARLLQTSNITKLEQK	112
Tn	GG-DKTNKKKEKERPEISLPSDFEHTIHVGFD AVTGEFTGIPEQWARLLQTSNITKLEQK	112
Ol	GG-DKTNKKKEKERPEISLPSDFEHTIHVGFD AVTGEFTGIPEQWARLLQTSNITKLEQK	112
Ga	GG-DKTNKKKEKERPEISLPSDFEHTIHVGFD AVTGEFTGIPEQWARLLQTSNITKLEQK	112
Hs1	GD--KTNKKKEKERPEISLPSDFEHTIHVGFD AVTGEFTGMPEQWARLLQTSNITKSEQK	118
Hs2	GT-EKGSKKKEKERPEISPPSDFEHTIHVGFD AVTGEFTGMPEQWARLLQTSNITKLEQK	117
	** * ** ** ** **	
Hs3	KNPQAVLDVLKIFYDSKETVNNQKYMSFTSG--DKSAHGYIAAHP S S TKTASE--PPLAPP	169
Pp	KNPQAVLDVLKIFYDSKETVNNQKYMSFTSG--DKSAHGYIAAHP S S TKTASE--PPLAPP	169
Pt	KNPQAVLDVLKIFYDSKETVNNQKYMSFTSG--DKSAHGYIAAHP S S TKTASE--PPLAPP	169
Cl	KNPQAVLDVLKIFYDSKETVNNQKYMSFTSG--DKSAHGYIAAHP S S TKTASE--PPLAPP	169
Ec	KNPQAVLDVLKIFYDSKETVNNQKYMSFTSG--DKSAHGYIAAHP S S TKTASE--PPLAPP	169
Mm	KNPQAVLDVLKIFYDSKETVNNQKYMSFTSG--DKSAHGYIAAHP S S TKTASE--PPLAPP	169
Rn	KNPQAVLDVLKIFYDSKETVNNQKYMSFTSG--DKSAHGYIAAHP S S TKTASE--PPLAPP	169
Cf	KNPQAVLDVLKIFYDSKETVNNQKYMSFTSG--DKSAHGYIAAHP S S TKTASE--PPLAPP	169
Gg	KNPQAVLDVLKIFYDSKETVNNQKYMSFTSG--DKSAHGYIEAHP S S TKTASE--PPLAPP	169
Xl	KNPQAVLDVLKIFYDSKETVNNQKYMSFTSG--DKSAHGYIAAHP S S TKTASE--PPLAPP	169
Tr	KNPQAVLDVLKIFYDSKETVNNQKYMSFTSG--DKSAHGYIAAHP S S TKTASE--PPLAPP	169
Tn	KNPQAVLDVLKIFYDSKETVNNQKYMSFTSG--DKSAHGYIAAHP S S TKTASE--PPLAPP	169
Ol	KNPQAVLDVLKIFYDSKETVNNQKYMSFTSG--DKSAHGYIAAHP S S TKTASE--PPLAPP	169
Ga	KNPQAVLDVLKIFYDSKETVNNQKYMSFTSG--DKSAHGYIAAHP S S TKTASE--PPLAPP	169
Hs1	KNPQAVLDVLEFYNSKKTSSNSQKYMSFTDK----SAEDYNSSNALNVKAVSE--TPAVPP	172
Hs2	KNPQAVLDVLKIFYDSN--TVKQK Y L S F T P P----EKDGLPSGTPALNAKGTE-----APA	166
	***** * ** ** ** **	

Résultats

Hs3	VSEEEDEEEEEEE-----DENEPPIVIAPRPEHTKSIYTRSVVESIASPAVPNKEVTP	222
Pp	VSEEEDEEEEEEE-----DENEPPIVIAPRPEHTKSIYTRSVVESIASPAVPNKEVTP	222
Pt	VSEEEDEEEEEEE-----DENEPPIVIAPRPEHTKSIYTRSVVESIASPAVPNKEVTP	222
Cl	VSGE-DEEEEEEE-----DDNEPP-----IYTRSVLESIASPAAPNKEVAP	209
Ec	VSEEEDEEEEEEE-----DDNEPPVIAPRPEHTKSIYTRSVVESIASPAAPNKEVTP	222
Mm	VSEEEDEEEEEEE-----DDNEPPVIAPRPEHTKSIYTRSVVESIASPAAPNKEVTP	222
Rn	VSEEEDEEEEEEE-----DDNEPPVIAPRPEHTKSIYTRSVVESIASPAAPNKEVTP	222
Cf	V-----DNEPPVIAPRPEHTKSIYTRSVLESIASPAAPNKEVAP	209
Gg	VSEEEDEEEEEEE-----DDNEPPVIAPRPEHTKSIYTRSVVIEPVAAP-APAKEATT	221
Xl	VSEEEDEEEEEEE-----DDNEPPVIAPRPEHTKSIYTRSVIEPVALT-APAKEAST	221
Tr	VIPGAQVR-----AFTRAPLTFQSIYTRSVMDLPKPPPTPVKEVSTP	210
Tn	VSEEEDEEEEEDEEEEEDEEDEDEDELPPVIAPRPEHTKSIYTRSVMDPPKPPPTPVKEVSTP	229
Ol	VSDDELPP-----VIAPRPEHTKSIYTRSVMDPPKPPSPVKEVSTP	211
Ga	VSDDELPP-----PVIAPRPEHTKSIYTRSVLEP-KLPAPAKEVSTP	212
Hs1	VSEDEDDDDDDAT-----PPPVIAPRPEHTKSVYTRSVIEPLPVTPTRDVATSP	221
Hs2	VVTEEDDDEETA-----PPVIAPRPHDHTKSIYTRSVIDPVPAPVGDSDHVDGA	214
*	*****	

Variable acidic region

Hs3	----PSAENANS--STLYRNTDRQRKSKMTDEEILEKLRSIVSVGDPKKKYTRFEKIGQ	276
Pp	----PSAENANS--STLYRNTDRQRKSKMTDEEILEKLRSIVSVGDPKKKYTRFEKIGQ	276
Pt	----PSAENANS--STLYRNTDRQRKSKMTDEEILEKLRSIVSVGDPKKKYTRFEKIGQ	276
Cl	----RSAENANS--STLYRNTDRQRKSKMTDEEILEKLRSIVSVGDPKKKYTRFEKIGQ	263
Ec	----PSAENANS--STLYRNTDRQRKSKMTDEEILEKLRSIVSVGDPKKKYTRFEKIGQ	276
Mm	----PSAENANS--TTLYRNTDRQRKSKMTDEEILEKLRSIVSVGDPKKKYTRFEKIGQ	276
Rn	----PSAENANS--STLYRNTDRQRKSKMTDEEILEKLRSIVSVGDPKKKYTRFEKIGQ	276
Cf	----PSAENANS--STLYRNTDRQRKSKMTDEEILEKLRSIVSVGDPKKKYTRFEKIGQ	263
Gg	----PQPENSNT--NTLYRNTDRQRKSKMTDEEILEKLRSIVSVXXXXXXXXXXXXXXXXXX	275
Xl	SPVTPQPENSNSSTSTLYRNTDRQRKSKMTDEEILEKLRSIVSVGDPKKKYTRFEKIGQ	281
Tr	PESQVQPENTSN---TMYRHTDRQRKSKMTDEEILERLRSIVSVGDPKKKYTRFEKIGQ	267
Tn	PESQVQPENTSN---TMYRHTDRQRKSKMTDEEILERLRSIVSVGDPKKKYTRFEKIGQ	286
Ol	PESQVQPENTSN---TMYRHTDRQRKSKMTDEEILEKLRSIVSVGDPKKKYTRFEKIGQ	268
Ga	PESQVQPDNTSD---TMYRHTDRQRKSKMTDEEILERLRSIVSVGDPKKKYTRFEKIGQ	269
Hs1	---ISPTENNTTPDALTLNTEKQKKKPKMSDEEILEKLRSIVSVGDPKKKYTRFEKIGQ	278
Hs2	-----AKSLDKQKKKPKMTDEEIMEKLRITIVSIGDPKKKYTRYEKIGQ	257
*	* ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *	

Hs3	GASGTVYTALDIATGQEVAIKQMNLLQQQPKKELINEILVMRENKNPNIVNYLDSYLVGD	336
Pp	GASGTVYTALDIATGQEVAIKQMNLLQQQPKKELINEILVMRENKNPNIVNYLDSYLVGD	336
Pt	GASGTVYTALDIATGQEVAIKQMNLLQQQPKKELINEILVMRENKNPNIVNYLDSYLVGD	336
Cl	-----VAIKQMNLLQQQPKKELINEILVMRENKNPNIVNYLDSYLVGD	306
Ec	GASGTVYTALDIATGQEVAIKQMNLLQQQPKKELINEILVMRENKNPNIVNYLDSYLVGD	336
Mm	GASGTVYTALDIATGQEVAIKQMNLLQQQPKKELINEILVMRENKNPNIVNYLDSYLVGD	336
Rn	GASGTVYTALDIATGQEVAIKQMNLLQQQPKKELINEILVMRENKNPNIVNYLDSYLVGD	336
Cf	GASGTVYTALDIATGQEVAIKQMNLLQQQPKKELINEILVMRENKNPNIVNYLDSYLVGD	323
Gg	XASGTVYTAIDIATGQEVAIKQMNLLQQQPKKELINEILVMRENKNPNIVNYLDSYLVGD	335
Xl	GASGTVYTAIDIATGQEVAIKQMNLLQQQPKKELINEILVMRENKNPNIVNYLDSYLVGD	341
Tr	GASGTVYTAIDIATGQEVAIKQMNLLQQQPKKELINEILVMRENKNSNIVNYLDSYLVGD	327
Tn	GASGTVYTAIDIATGQEVAIKQMNLLQQQPKKELINEILVMRENKNSNIVNYLDSYLVGD	346
Ol	GASGTVYTAIDVATGQEVAIKQMNLLQQQPKKELINEILVMRENKNSNIVNYLDSYLVGD	328
Ga	GASGTVYTAIDIATGQEVAIKQMNLLQQQPKKELINEILVMRENKNSNIVNYLDSYLVGD	329
Hs1	GASGTVYTAMDVATGQEVAIKQMNLLQQQPKKELINEILVMRENKNPNIVNYLDSYLVGD	338
Hs2	GASGTVFTATDVALGQEVAIKQINLQKQPKKELINEILVMKELKNPNIVNFLDSYLVGD	317
*	***** ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *	

Résultats

Hs3	ELWVMEYLAGGSLTDVVTET-CMDEGQIAAVCRECLQALDFLHSNQVIHRDIKSDNILL	395
Pp	ELWVMEYLAGGSLTDVVTET-CMDEGQIAAVCRECLQALDFLHSNQVIHRDIKSDNILL	395
Pt	ELWVMEYLAGGSLTDVVTET-CMDEGQIAAVCRECLQALDFLHSNQVIHRDIKSDNILL	395
Cl	ELWVMEYLAGGSLTDVVTET-CMDEGQIAAVCRECLQALDFLHSNQVIHRDIKSDNILL	365
Ec	ELWVMEYLAGGSLTDVVTET-CMDEGQIAAVCRECLQALDFLHSNQVIHRDIKSDNILL	395
Mm	ELWVMEYLAGGSLTDVVTET-CMDEGQIAAVCRECLQALDFLHSNQVIHRDIKSDNILL	395
Rn	ELWVMEYLAGGSLTDVVTET-CMDEGQIAAVCRECLQALDFLHSNQVIHRDIKSDNILL	395
Cf	ELWVMEYLAGGSLTDVVTET-CMDEGQIAAVCRECLQALDFLHSNQVIHRDIKSDNILL	382
Gg	ELWVMEYLAGGSLTDVVTET-CMDEGQIAAVCRECLQALDFLHSNQVIHRDIKSDNILL	394
Xl	ELWVMEYLAGGSLTDVVTET-CMDEGQIAAVCRECLQALDFLHSNQVIHRDIKSDNILL	400
Tr	ELWVMEYLAGGSLTDVVTET-CMDEGQIAAVCRECLQALDFLHSNQVIHRDIKSDNILL	386
Tn	ELWVMEYLAGGSLTDVVTET-CMDEGQIAAVCRQCLQALDFLHSNQVIHRDIKSDNILL	405
Ol	ELWVMEYLAGGSLTDVVTET-CMDEGQIAAVCRECLQALDFLHSNQVIHRDIKSDNILL	387
Ga	ELWVMEYLAGGSLTDVVTET-CMDEGQIAAVCRECLQALDFLHSNQVIHRDIKSDNILL	388
Hs1	ELWVMEYLAGGSLTDVVTET-CMDEGQIAAVCRECLQALESLHSNQVIHRDIKSDNILL	397
Hs2	ELFVMEYLAGGSLTDVVTETACMDEAQIAAVCRECLQALEFLHANQVIHRDIKSDNVLL	377
	*** *****	
Hs3	GMDGSVKLTDGFGCAQITPEQSKRSTMVGTPTYWMAPEVVTRKAYGPKVDIWSLGIMAIEM	455
Pp	GMDGSVKLTDGFGCAQITPEQSKRSTMVGTPTYWMAPEVVTRKAYGPKVDIWSLGIMAIEM	455
Pt	GMDGSVKLTDGFGCAQITPEQSKRSTMVGTPTYWMAPEVVTRKAYGPKVDIWSLGIMAIEM	455
Cl	GMDGSVKLTDGFGCAQITPEQSKRSTMVGTPTYWMAPEVVTRKAYGPKVDIWSLGIMAIEM	425
Ec	GMDGSVKLTDGFGCAQITPEQSKRSTMVGTPTYWMAPEVVTRKAYGPKVDIWSLGIMAIEM	455
Mm	GMDGSVKLTDGFGCAQITPEQSKRSTMVGTPTYWMAPEVVTRKAYGPKVDIWSLGIMAIEM	455
Rn	GMDGSVKLTDGFGCAQITPEQSKRSTMVGTPTYWMAPEVVTRKAYGPKVDIWSLGIMAIEM	455
Cf	GMDGSVKLTDGFGCAQITPEQSKRSTMVGTPTYWMAPEVVTRKAYGPKVDIWSLGIMAIEM	442
Gg	GMDGSVKLTDGFGCAQITPEQSKRSTMVGTPTYWMAPEVVTRKAYGPKVDIWSLGIMAIEM	454
Xl	GMDGSVKLTDGFGCAQITPEQSKRSTMVGTPTYWMAPEVVTRKAYGPKVDIWSLGIMAIEM	460
Tr	GMDGSVKLTDGFGCAQITPEQSKRSTMVGTPTYWMAPEVVTRKAYGPKVDIWSLGIMAIEM	446
Tn	GMDGSVKLTDGFGCAQITPEQSKRSTMVGTPTYWMAPEVVTRKAYGPKVDIWSLGIMAIEM	465
Ol	GMDGSVKLTDGFGCAQITPEQSKRSTMVGTPTYWMAPEVVTRKAYGPKVDIWSLGIMAIEM	447
Ga	GMDGSVKLTDGFGCAQITPEQSKRSTMVGTPTYWMAPEVVTRKAYGPKVDIWSLGIMAIEM	448
Hs1	GMDGSVKLTDGFGCAQITPEQSKRSTMVGTPTYWMAPEVVTRKAYGPKVDIWSLGIMAIEM	457
Hs2	GMEGSVKLTDGFGCAQITPEQSKRSTMVGTPTYWMAPEVVTRKAYGPKVDIWSLGIMAIEM	437
	*** *****	
Hs3	VEGEPPYLNENPLRALYLIATNGTPELQNERLSAVFRDFLNRCEMDVDRRGSAKELLQ	515
Pp	VEGEPPYLNENPLRALYLIATNGTPELQNERLSAVFRDFLNRCEMDVDRRGSAKELLQ	515
Pt	VEGEPPYLNENPLRALYLIATNGTPELQNERLSAVFRDFLNRCEMDVDRRGSAKELLQ	515
Cl	VEGEPPYLNENPLRALYLIATNGTPELQNERLSAVFRDFLNRCEMDVDRRGSAKELLQ	485
Ec	VEGEPPYLNENPLRALYLIATNGTPELQNERLSAVFRDFLNRCEMDVDRRGSAKELLQ	515
Mm	VEGEPPYLNENPLRALYLIATNGTPELQNERLSAVFRDFLNRCEMDVDRRGSAKELLQ	515
Rn	VEGEPPYLNENPLRALYLIATNGTPELQNERLSAVFRDFLNRCEMDVDRRGSAKELLQ	515
Cf	VEGEPPYLNENPLRALYLIATNGTPELQNERLSAVFRDFLNRCEMDVDRRGSAKELLQ	502
Gg	VEGEPPYLNENPLRALYLIATNGTPELQNERLSAVFRDFLNRCEMDVDRRGSAKELLQ	514
Xl	VEGEPPYLNENPLRALYLIATNGTPELQNERLSAIFRDFLNRCEMDVDRRGSAKELLQ	520
Tr	VEGEPPYLNENPLRALYLIATNGTPELQNERLSSVFRDFLNRCEMDVDRRGSAKELLQ	506
Tn	VEGEPPYLNENPLRALYLIATNGTPELQNERLSSVFRDFLNRCEMDVDRRGSAKELLQ	525
Ol	VEGEPPYLNENPLRALYLIATNGTPELQNERLSSVFRDFLNRCEMDVDRRGSAKDLLQ	507
Ga	VEGEPPYLNENPLRALYLIATNGTPELQNERLSSVFRDFLNRCEMDVDRRGSAKELLQ	508
Hs1	IEGEPPYLNENPLRALYLIATNGTPELQNEKLSAIFRDFLNRCEMDVEKRGSAKELLQ	517
Hs2	VEGEPPYLNENPLRALYLIATNGTPELQNEKLSPIFRDFLNRCEMDVEKRGSAKELLQ	497
	*** *****	


```

Hs3      HPFLKLAKPLSSLTPLIIAAKEAIKNSSR 544
Pp       HPFLKLAKPLSSLTPLIIAAKEAIKNSSR 544
Pt       HPFLKLAKPLSSLTPLIIAAKEAIKNSSR 544
Cl       HPFLKLAKPLSSLTPLIIAAKEAIKNSSR 514
Ec       HPFLKLAKPLSSLTPLIIAAKEAIKNSSR 544
Mm       HPFLKLAKPLSSLTPLIIAAKEAIKNSSR 544
Rn       HPFLKLAKPLSSLTPLIIAAKEAIKNSSR 544
Cf       HPFLKLAKPLSSLTPLIIAAKEAIKNSSR 531
Gg       HPFLKLAKPLSSLTPLIIAAKEAIKNSSR 543
Xl       HPFLKIAKPLSSLTPLIIAAKEAIKNSSR 549
Tr       HSFLKLAKPLSSLTPLIVAAKEAIKNSSR 535
Tn       HSFLKLAKPLSSLTPLIVAAKEAIKNSSR 554
Ol       HSFLKLAKPLSSLTPLILAAKEAIKNSSR 536
Ga       HSFLKLAKPLSSLTPLIVAAKEAIKNSSR 537
Hs1     HQFLKIAKPLSSLTPLIAAAKEATKNNH- 545
Hs2     HPFLKLAKPLSSLTPLIMAAKEAMKSNR- 525
*  ***  *****  *****  *  *  *  *  *  *  *  *  *
    
```

Supplementary data 3. Alignment of 14 PAK3 vertebrate sequences with human PAK1 and PAK2.

Multiple sequences were aligned using ClustalW, with manual optimization. Alternatively spliced exons were removed and fish sequences located at the exons junctions of homologous mammalian exon junctions and corresponding most probably to introns, were eliminated. *Homo sapiens* PAK1: Hs1, *Homo sapiens* PAK2: Hs2, *Homo sapiens* PAK3: Hs3, *Pongo pongo*: Pp, *Pan troglodytes*: Pt, *Canis familiaris*: Cf, *Catus felix*: Cl, *Mus musculus*: Mm, *Rattus norvegicus*: Rn, *Equus caballus*: Ec, *Gallus gallus*: Gg, *Xenopus tropicalis*: Xt, *Oryzias latipes*: Ol, *Gasterosteus aculeatus*: Ga, *Tetraodon nigroviridis*: Tn, *Takifugu Rubripes*: Tr. * residues totally conserved in all PAK vertebrates genes, * residues specific to PAK3, * residues conserved among PAK3 and PAK1 or PAK3 and PAK2.

Characteristics of PAK3 residues	number	% (/544)
Totally conserved in PAK1/2/3	364	67
Highly Specific to PAK3	44	8
Conserved in PAK3 and PAK1 or PAK3 and PAK2	48	9
Conserved among PAK3 tetrapods	48	9
Conserved among PAK3 mammals	8	1.5
Conserved among PAK3 primates	3	0.5
Other	29	5
total	544	100

Supplementary data 4. Table 3. Summary of the conserved sequences between PAK1, PAK2 and PAK3.

En conclusion, notre approche souligne l'importance d'associer à une recherche *in silico*, une recherche plus classique de clonage et de séquençage. Ceci nous a permis d'identifier un nouvel exon alternatif présent dans deux nouvelles protéines détectées dans le cerveau et de modifier certaines séquences codantes prédites dans les banques de données. Ainsi, nous avons présenté l'histoire biologique détaillée de la genèse des différents variants de PAK3.

III

Homodimérisation et hétérodimérisation des kinases PAK : nouveau modèle de régulation des kinases PAK du groupe I

De nombreux arguments suggèrent que l'activité kinase des trois nouveaux variants constitutivement actifs soit en fait régulée *in vivo*. En effet, il est vraisemblable que l'existence de formes constitutivement actives des kinases PAK soit incompatible avec la vie cellulaire, en particulier dans les neurones. Plusieurs données montrent qu'une activité trop importante des kinases PAK provoque une toxicité que ce soit dans *E.coli*, la levure ou les cellules de mammifères (Zhao et al., 1998 ; Tu et Wiegler, 1998). Nous avons observé une certaine mort cellulaire lors de la transfection dans les cellules COS-7, des variants d'épissage constitutivement actifs. Le modèle actuellement admis de régulation des PAKs repose sur la formation de dimères permettant des interactions inhibitrices agissant en trans (d'un monomère sur l'autre) et de manière symétrique (Lei et al., 2000 ; Parrini et al., 2002, voir figures 20 et 34A). Or les inserts b et c de PAK3 sont localisés au sein du domaine auto-inhibiteur, dans le feuillet $\beta 2$ du switch inhibiteur (Figure 34A). La structure cristallographique de la figure 34B montre que cette région est déterminante pour amener le segment Ki dans le sillon catalytique. Il a été montré que la présence de l'insert b dans le domaine auto-inhibiteur de PAK3 empêche l'inhibition de l'activité kinase (Rousseau et al., 2003). Par conséquent un homodimère formé de deux molécules de PAK3b ne permettrait pas de réguler l'activité kinase des deux partenaires.

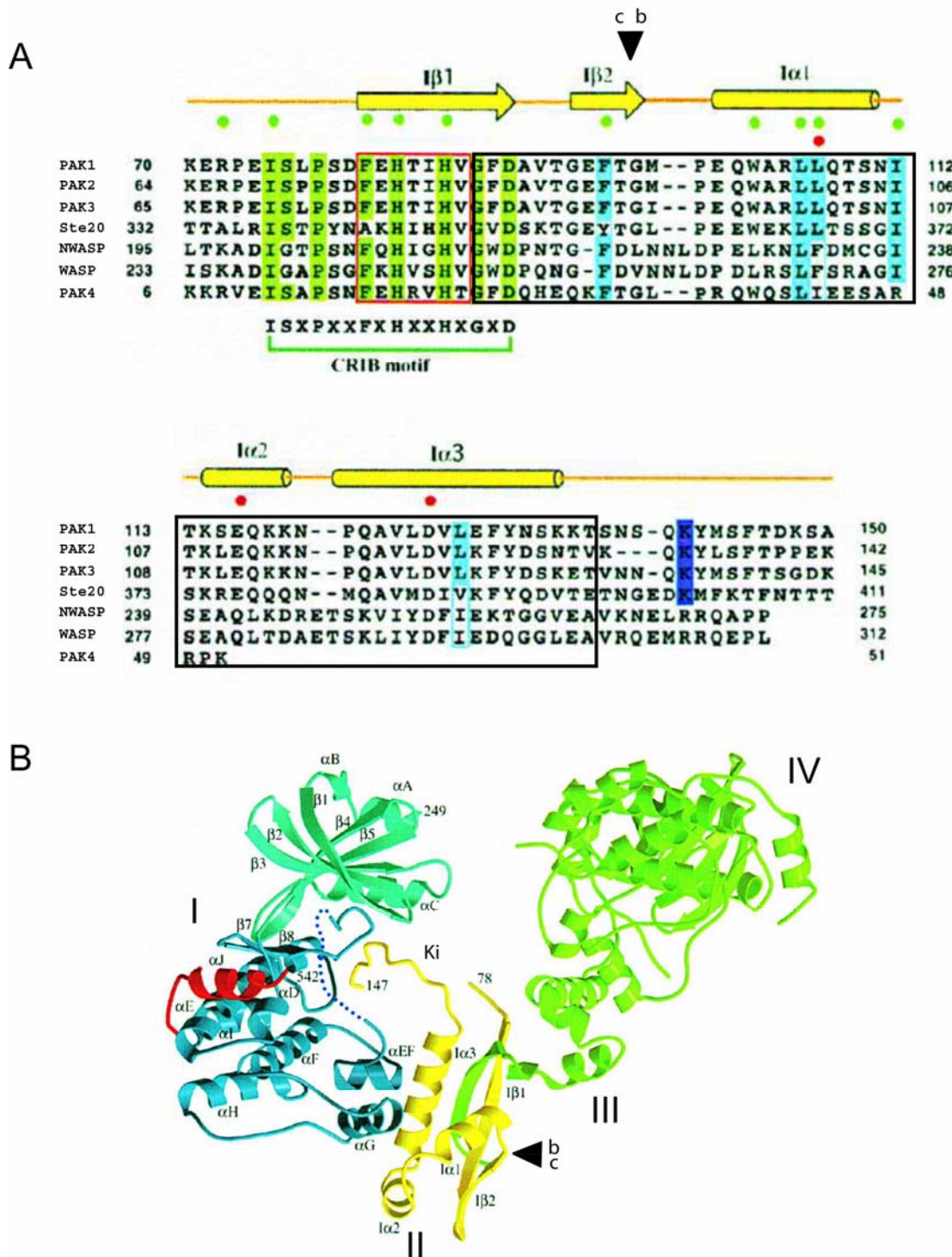


Figure 34. Structure des PAK groupe I. **A.** Alignement de la séquence en acides aminés du domaine auto-inhibiteur des membres de la famille PAK, WASP et N-WASP. Les localisations des inserts c et b sont indiquées par un triangle noir. Les structures secondaires déduites de la structure cristallographique (feuilletés β et hélices α) sont notées au-dessus des séquences. "I" signifie "inhibiteur". Le domaine de dimérisation est encadré en rouge et le domaine "Inhibitory switch" est encadré en noir. Les résidus conservés dans le domaine CRIB sont en vert, ceux qui interagissent avec le domaine kinase sont en bleu clair et les lysines en bleu foncé interagissent avec le domaine catalytique. Les points verts représentent les résidus importants pour la liaison à Cdc42. La mutation des résidus notés d'un point rouge entraîne l'activation de la kinase. **B.** Structure dimérique en ruban de PAK1. Les chaînes polypeptidiques II et III sont les régions régulatrices et les chaînes I et IV sont les domaines kinases. Les pointillés dans la chaîne I représentent la boucle activatrice désorganisée du domaine kinase. Le domaine Ki (Kinase inhibitory) logé dans le sillon catalytique est indiqué en noir. Adapté de Lei et al., 2000.

Nous avançons l'hypothèse que le mécanisme de régulation des isoformes constitutivement actives repose sur la formation d'hétérodimères : les isoformes constitutivement actives, PAK3b, PAK3c et PAK3cb forment des hétérodimères avec PAK3a ou PAK1 permettant un mécanisme de trans-inhibition asymétrique (Figure 35). Afin de valider notre modèle, il était indispensable dans un premier temps, de savoir si les variants d'épissage de PAK3 et la kinase PAK1 étaient co-exprimés dans un même neurone. Dans un deuxième temps, il était nécessaire de vérifier que la présence des exons alternatifs au sein du "switch inhibiteur" responsables en partie de la dimérisation, n'altère pas la capacité de la kinase à dimériser. J'ai donc analysé ces deux points et les résultats sont présentés ci-dessous.

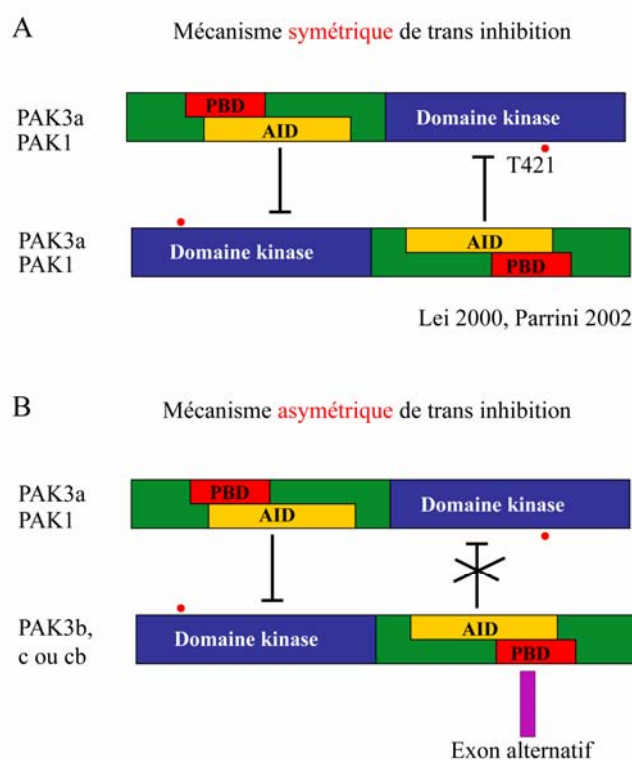


Figure 35. Modèle de regulation des isoformes PAK3b, c et cb sous forme d'hétérodimères.

A. Le mécanisme symétrique de trans-inhibition est basé sur le modèle de Lei et al. et les expériences de Parrini et al. Les kinases sont inactives sous la forme d'un dimère, chacune inhibant son partenaire. **B.** Le mécanisme asymétrique de trans inhibition que nous proposons. Le domaine auto-inhibiteur (AID) fonctionnel de PAK1 ou PAK3a inhibe son partenaire PAK3b, c ou cb qui possèdent un insert (en violet) dans leur AID. Dans ce dimère, PAK3a n'est pas active, car non phosphorylée sur la T421. Cette phosphorylation réalisée en trans ne peut se faire tant que l'autre monomère est inactif

1) Les gènes PAK3 et PAK1 sont co-exprimés dans le même neurone

Parmi les gènes PAK du groupe I, PAK3 et PAK1 sont fortement exprimés dans le cerveau et dans les neurones d'hippocampe (voir article 2, Figure 4D, p 98). Pour que les kinases PAK puissent former des hétérodimères, la première condition est qu'elles soient co-exprimées dans un même neurone. J'ai donc réalisé des RT-PCR sur cellule unique pour étudier l'expression de chaque transcrite. Dans cette analyse, je me suis intéressée uniquement à l'expression de PAK1 et PAK3, les deux isoformes les plus abondantes du cerveau. Des neurones pyramidaux de la couche 5 du cortex visuel ou des neurones d'hippocampe en culture à J16 sont patchés en configuration cellule entière puis le cytoplasme est prélevé par aspiration. Après une première étape de réverse transcription, les ADNc de PAK3, PAK1 et de l'actine sont amplifiés simultanément avec trois couples d'amorces externes spécifiques de chaque gène. Puis par la technique de PCR nichée, une deuxième amplification avec un deuxième couple d'amorces internes permet d'amplifier spécifiquement chaque transcrite. Puisque la quantité de cytoplasme aspirée pour chaque neurone est difficile à estimer, l'expression de l'actine est prise comme contrôle interne et seuls les neurones positifs pour l'actine sont pris en compte (Figure 36).

Sur 37 neurones actine positifs, 26 sont positifs pour PAK1 (70%) et 11 positifs pour PAK3 (30%). Parmi les neurones positifs pour PAK3, j'ai trouvé les combinaisons d'expression suivantes : PAK3a seul, PAK3b seul, PAK3a et PAK3cb exprimés ensemble. Sur les 11 neurones qui expriment PAK3, 5 expriment PAK3a, 4 expriment PAK3b et 2 expriment PAK3a et PAK3cb. Un exemple de 13 neurones patchés où 12 sont positifs pour l'expression de PAK1 et 4 positifs pour l'expression de PAK3 est présenté dans la Figure 36. Il est important de savoir si l'absence de signal dans les neurones négatifs pour PAK3 ou PAK1 reflète une absence d'expression de la kinase ou si l'absence d'amplification est due à une très faible abondance des ARNm. En effet, il a été montré que pour une quantité très faible d'ARNm la détection par PCR suit une amplification tout ou rien (Poëa-Guyon, 2006) : si le nombre de molécules d'ADNc est trop faible, l'amplification n'est pas détectable. Ces données suggèrent donc que dans nos conditions de RT-PCR sur cellule unique, la détection du tout ou rien ne reflète pas forcément une absence d'expression dans certains neurones mais pourrait être due à une expression très faible du transcrite. De ce fait, le nombre de neurones positifs semble être corrélé à l'abondance du transcrite. Ainsi, PAK3c n'est ni détectée par RT-PCR sur cellule unique, ni trouvée dans les banques d'EST (Expressed Sequence Tag) ou d'ADNc ce qui corrèle avec le fait que la protéine PAK3c est présente en quantité très faible dans le cerveau de souris adulte (voir article 2, Figures 3C-D, p97). Au contraire, PAK1 qui

est présente en quantité plus abondante que PAK3 dans du cerveau de souris, est détectée par RT-PCR dans un plus grand nombre de neurones que PAK3. Les données de Bernadett Boda dans le laboratoire de D. Muller observées par PCR quantitative sur des ARNs de tranche d'hippocampe, montrent qu'il y a 10 fois plus de transcrits PAK1 que de transcrits PAK3 (communications personnelles). En conclusion, malgré la difficulté de détection des transcrits de PAK3, il semble qu'ils soient toujours co-exprimés avec PAK1. Ce résultat n'a pas pu être confirmé par immunocytochimie puisque les anticorps spécifiques des inserts b et c, utilisés en Western Blot dans la Figure 3B p97 de l'article 2, ne donnent aucun marquage spécifique en immunofluorescence. Ainsi, des hétérodimères PAK3/PAK1 sont bien envisageables ainsi que des hétérodimères entre transcrits de PAK3 puisqu'on détecte aussi la combinaison PAK3cb/PAK3a.

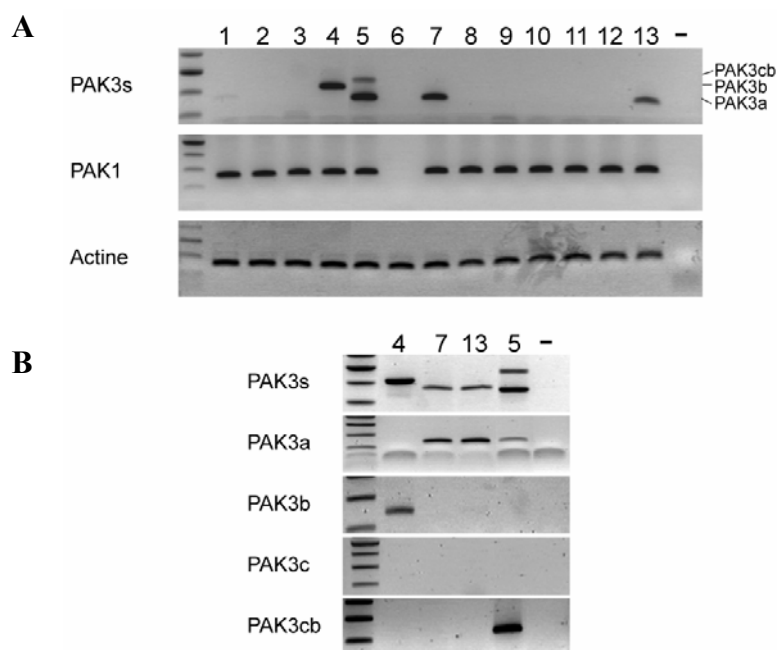


Figure 36. Coexpression dans un même neurone des isoformes PAK3 et PAK1 détectées par RT-PCR sur cellule unique. **A.** Exemple d'une expérience avec 13 neurones positifs pour l'expression de l'actine. PAK1 est détecté dans 12 neurones et PAK3 dans 4 neurones. **B.** Identification dans cette expérience des variants de PAK3 avec des oligonucléotides spécifiques utilisés dans la figure 4B de l'article 2 (page 98). Parmi les 4 neurones positifs pour PAK3, deux expriment PAK3a seul (#7 et #13), 1 exprime PAK3b seul (#4) et 1 exprime la combinaison PAK3a et PAK3cb (#5).

2) PAK1 et PAK3 forment des homodimères ou des hétérodimères dans des fibroblastes

La formation des dimères a ensuite été analysée en transfectant des cellules COS-7 avec les kinases PAK étiquetées en position N-terminale avec les épitopes FLAG et HA. Les protéines étiquetées HA sont immunoprécipitées et les protéines étiquetées FLAG associées sont détectées par Western Blot. Dans la mesure où les kinases PAK actives s'autophosphorylent au niveau de sites pouvant réguler la dimérisation, notamment la Sérine 144 ou la Thréonine 421, des formes dépourvues d'activité kinase sont utilisées (K299R pour PAK1 et K297L pour PAK3) (Parrini et al., 2002). L'acide aminé leucine 107 est impliqué dans l'interaction entre le "switch inhibiteur" et le domaine kinase (noté d'un point rouge sur la figure 34A). Sa mutation en phénylalanine supprime l'interaction entre deux monomères et sera donc utilisée pour vérifier la spécificité de nos interactions (Parrini et al., 2002).

2.1) Mise en évidence des homodimères PAK1/PAK1

Afin de valider les résultats déjà publiés sur la formation des homodimères PAK1/PAK1 (Parrini et al., 2002), j'ai co-transfecté des cellules COS-7 avec les constructions FLAG-PAK1-K299R et HA-PAK1-K299R. Dans les conditions décrites ci-dessus, j'ai montré qu'une molécule de PAK1 forme un dimère avec une autre molécule de PAK1. La mutation L107F présente sur les deux partenaires PAK1 supprime la co-immunoprécipitation montrant ainsi la spécificité de l'interaction (Figure 37). La mutation L107F présente sur un seul partenaire diminue fortement l'interaction, sans la supprimer totalement (résultat non présenté).

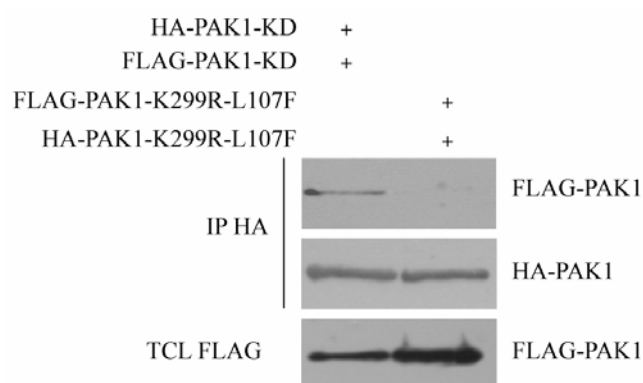


Figure 37. Mise en évidence de dimères PAK1/PAK1. Les cellules COS-7 ont été transfectées avec les constructions HA-PAK1-K299R, FLAG-PAK1-K299R, HA-PAK1-K299R-L107F, FLAG-PAK1-K299R-L107F. Les lysats cellulaires sont immunoprécipités avec un anticorps HA (IP HA). Les protéines immunoprécipitées ou les lysats cellulaires (TCL : Total Cell Lysate) sont déposés sur SDS-PAGE et les protéines PAK1 sont révélées par Western Blot avec des anticorps HA ou FLAG.

2.2) Mise en évidence des homodimères PAK3a/PAK3a et des hétérodimères PAK3a/PAK1

Les identités de séquences entre les différents membres de la famille PAK en particulier les régions du domaine auto-inhibiteur, suggèrent que ces kinases soient régulées par les mêmes mécanismes. Dans un premier temps, j'ai vérifié que PAK3a forme bien des homodimères, puis dans un deuxième temps nous nous sommes demandés si PAK3a pouvait s'associer à PAK1 pour former des hétérodimères. Ainsi, les cellules COS-7 sont transfectées avec les plasmides HA-PAK3-K297L, FLAG-PAK3-K297L, HA-PAK1-K299R, FLAG-PAK1-K299R. Dans les mêmes conditions expérimentales que précédemment, j'ai montré que PAK3a forme des homodimères (Figure 38). Cette interaction est spécifique puisque la mutation L102F, homologue à la mutation L107F de PAK1, supprime l'état dimérique. Ceci était prévisible dans la mesure où PAK3 possède une très forte identité de séquence avec PAK1. Ce même argument permet d'envisager que les PAKs du groupe I forment des hétérodimères entre elles. En effet, j'ai montré qu'en plus de former des homodimères, PAK3a peut former des hétérodimères avec PAK1 (Figure 38). Les mutations L107F de PAK1 et L102F de PAK3 abolissent cette interaction.

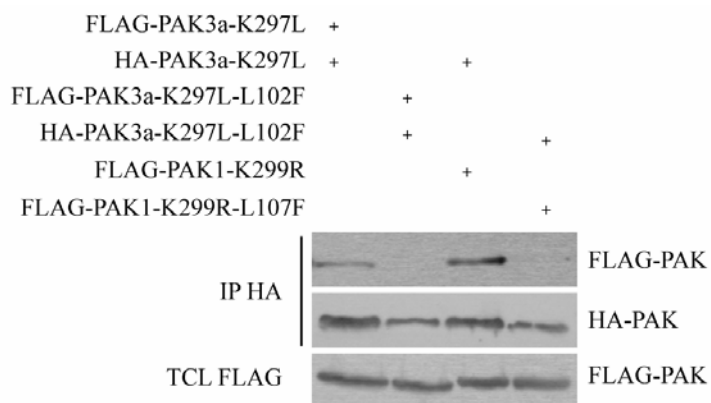


Figure 38. Mise en évidence de dimères PAK3a/PAK3a et PAK3a/PAK1. Les cellules COS-7 ont été transfectées avec différentes constructions de PAK1 et PAKa. Les lysats cellulaires sont immunoprécipités avec un anticorps HA (IP HA). Les protéines immunoprécipitées et les lysats cellulaires (TCL : Total Cell Lysate) sont déposés sur SDS-PAGE et les protéines PAK sont révélées par Western Blot avec un anticorps HA ou FLAG.

2.3) PAK3b forme des homodimères avec PAK3b et des hétérodimères avec PAK3a et PAK1

Afin de valider notre modèle de régulation des variants de PAK3 constitutivement actifs, présenté dans la Figure 35B, j'ai ensuite vérifié si la présence de l'insert b pouvait altérer la dimérisation. Ainsi, j'ai analysé la capacité de PAK3b à former des homodimères ou des hétérodimères. La Figure 39 montre que PAK3b forme des hétérodimères avec PAK1 et PAK3a. De façon surprenante, alors que l'insert b est localisé dans le domaine du "switch inhibiteur" une région fondamentale pour la dimérisation, il n'empêche pas la formation d'homodimères PAK3b/PAK3b (Figures 34 et 39). La quantification de deux expériences indépendantes montre que PAK3b semble former plus facilement des complexes avec PAK1 qu'avec PAK3a ou PAK3b.

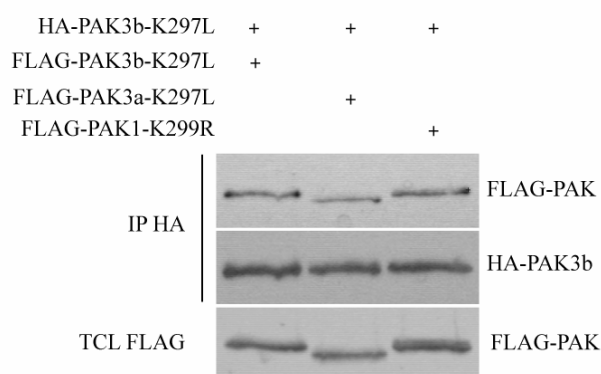


Figure 39. PAK3b forme des homo- et hétérodimères. Les cellules COS-7 ont été transfectées avec différentes constructions de PAK1 et PAKa. Les lysats cellulaires sont immunoprécipités avec un anticorps HA (IP HA). Les protéines immunoprécipitées ou les lysats cellulaires (TCL : Total Cell Lysat) sont déposés sur SDS-PAGE et les protéines PAK sont révélées par Western Blot avec un anticorps HA ou FLAG.

Ainsi, la présence de l'exon alternatif b n'empêche pas la formation d'homodimères, mais au contraire favorise la formation des hétérodimères. Par ailleurs, plusieurs données montrent que PAK1 est beaucoup plus abondante que PAK3 :

- La détection de PAK1 par RT-PCR sur cellule unique dans un plus grand nombre de neurones que PAK3 (Figure 36).
- La quantification par Western Blot de PAK1 et PAK3 dans des extraits de cerveau de souris (résultats non présentés)
- La quantification par PCR des transcrits PAK1 et PAK3 sur des ARNs de tranche d'hippocampe (Bernadett Boda, communications personnelles).

Ceci suggère donc que les différents variants d'épissage de PAK3 peuvent former facilement des hétérodimères avec PAK1.

3) PAK3 forme des hétérodimères avec PAK1 *in vivo*

De façon très intéressante, PAK3a, PAK3b et PAK1 surexprimées dans les fibroblastes, forment des hétérodimères entre elles. Afin de valider cette interaction dans une situation *in vivo*, j'ai analysé l'interaction PAK1/PAK3 dans un cerveau de souris adulte par immunoprécipitation. Pour cela, dans un premier temps, j'ai vérifié la spécificité de chaque anticorps par Western Blot.

3.1) Spécificité des anticorps utilisés pour immunoprécipiter PAK3 et PAK1 *in vivo*

Nous disposons d'un anticorps commercial dirigé contre la partie N-terminale de PAK3 (PAK3-N19 en bleu sur la Figure 40A). Or l'alignement des séquences PAK du groupe I montre que cette région est assez bien conservée au sein des PAK du groupe I rendant possible des réactions croisées (Figure 40A). Nous avons produit au laboratoire un sérum dirigé contre une région plus centrale de PAK3 et dont la séquence peptidique (en vert sur la figure 40A) ne présente aucune identité avec celle de PAK1. Le Western Blot de la figure 40B, montre que l'anticorps PAK3-Gif est tout à fait spécifique de PAK3 contrairement à l'anticorps commercial PAK3-N19. L'anticorps PAK1-N20 est lui aussi spécifique de PAK1. Ces deux anticorps seront utilisés dans la suite de mes travaux.

A

PAK1	1	MSNNGLDVQDKPPAPP	RNTSTMIGAGSKDPG	TLNHGSKPLPPN	PEEKKKDRF	YRSILA
PAK3	1	MSDSLDMEEKPPAPPL	RNNMNDSSA	LNHSSKPLPMA	PEEKKKDR	RSIFPG
PAK2	1	MSDNGELEDKPPAPP	VMSSTIFSTIGGKDPLS	AMHSLKPLPSV	PEEKKPRNKII	SIFSS
PAK1	61	G-DKTNKKKKEKERPE	ISLPSDFEHTIHVGFD	AVTGEFTGMPEQ	WARLLQTSNITK	SEQKK
PAK3	55	GGDKTNKKKKEKERPE	ISLPSDFEHTIHVGFD	AVTGEFTGIPEQ	WARLLQTSNITK	LEQKK
PAK2	60	T-EKGSKKKKEKERPE	ISLPSDFEHTIHVGFD	AVTGEFTGMPEQ	WARLLQTSNITK	LEQKK
PAK1	120	NPQAVLDVLEFYNSKKT	ENSQKYSFT--DKSA	EDYNSNTLN	VKTVSETPA	VPPVSEDE
PAK3	115	NPQAVLDVLFYDSKET	VNNQKYSFTSGD	KSAHGYYIAAH	QSNITKTGSE	PPLAPPVSEEE
PAK2	119	NPQAVLDVLFYDSN--	TVKQKYLSTP--	PEKDGFP	SGTALNTKG	SETSAVVTEEDDD
PAK1	178	DDD-----DDAT	PPPVIAPRPEHTK	SVYTRSVIEPL	PVTPTRDVAT	SPISPTENNTIPPD
PAK3	175	DEEEEEEDDNE	PPPVIAPRPEHTK	SYTRSVVVEST	ASPAAPNKED	IPPSAENAWST---
PAK2	175	DED-----A	APPVIAPRPDHTK	SYTRSVIDPI	PAPVGD	SNVDS-----
PAK1	233	ALTRNTEKQKKKPK	MSD			
PAK3	232	TLYRNTDRQKKKSK	MTD			
PAK2	214	-GAKSSDKQKKKAK	MTD			

XXX anti-PAK1-N20
 XXX anti-PAK3-N19
 XXX anti-PAK3-Gif

B

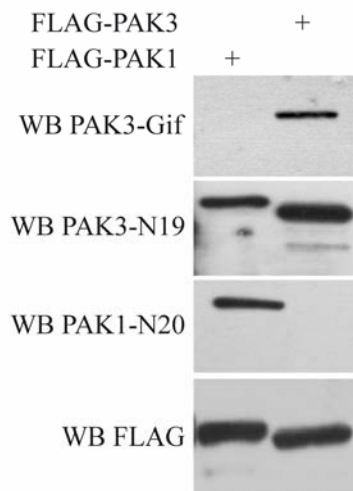


Figure 40. Spécificité des anticorps dirigés contre PAK3 et PAK1. A. Alignement des séquences régulatrices amino-terminales (1-149) de PAK1, PAK2, PAK3. Les séquences peptidiques reconnues par les trois anticorps anti-PAK1-N20, anti-PAK3-N19 et anti-PAK3-Gif, sont notées en couleur. B. Test de la spécificité des anticorps par Western blot. Des lysats de cellules COS-7, transfectées avec les constructions FLAG-PAK3 ou FLAG-PAK1 sont déposés sur SDS-PAGE. Les protéines sont révélées par Western Blot (WB) avec les anticorps PAK3-Gif, PAK3-N19, PAK1-N20 ainsi qu'avec un anti-FLAG

3.2) PAK1 co-immunoprécipite avec PAK3 dans des extraits de cerveau de souris

PAK3 est immunoprécipité dans des extraits de cerveau de souris en utilisant l'anticorps spécifique PAK3-Gif et l'immunoprécipitat est soumis à un Western Blot. L'anticorps anti-PAK3-N19 révèle trois bandes qui correspondent aux quatre variants d'épissage de PAK3 (Figure 41 et voir article 2 Figure 3C-N19, p97). La co-immunoprécipitation révélée par l'anticorps PAK1-N20 révèle une bande qui correspond spécifiquement à PAK1 (Figure 41). Ainsi, j'ai montré pour la première fois que PAK1 co-immunoprécipite avec PAK3 dans des extraits de cerveau de souris. Ces interactions pourront être étudiées plus en détail en utilisant les anticorps spécifiques des inserts b et c.

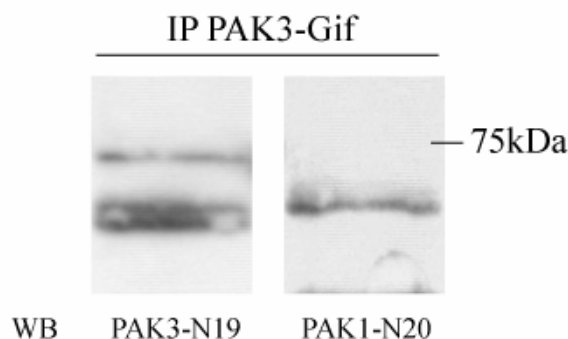


Figure 41. PAK3 forme des hétérodimères avec PAK1 *in vivo*.

Plusieurs variants d'épissage sont immunoprécipités (IP PAK3-Gif) à partir d'un lysat de cerveau de souris adulte et l'immunoprécipitat est soumis à un Western blot (WB) anti-PAK3 (à gauche) et anti-PAK1 (à droite).

En conclusion, j'ai montré que PAK3a forme des homodimères tout comme cela a été décrit pour PAK1. Je montre aussi pour la première fois que PAK3a forme des hétérodimères avec PAK1. De plus, l'exon b présent dans PAK3b n'empêche ni la formation des homodimères PAK3b/PAK3b ni la formation des complexes PAK3a/PAK3b. De plus, PAK3b co-immunoprécipite aussi avec PAK1. Enfin, j'ai montré qu'*in vivo* PAK1 coimmunoprécipite avec PAK3.

L'ensemble de ces résultats montre que dans un premier temps les exons alternatifs ne suppriment pas les mécanismes de dimérisation et dans un deuxième temps que les kinases PAK forment des complexes entre elles.

IV

PAK3 dans la physiopathologie

1) Recherche de mutations dans les exons alternatifs dans une cohorte de patients atteints de retard mental

Une des difficultés de l'identification des gènes associés au retard mental tient au fait que la caractérisation des symptômes est assez floue, que les limites entre les formes syndromiques et non syndromiques s'estompent et que le nombre de familles portant des mutations dans un même gène peut être réduit. Ainsi, seulement quatre familles avec des mutations pour le gène PAK3 ont été identifiées à l'heure actuelle. Une des stratégies pour identifier un gène responsable de retard mental est de définir par une étude de liaison génétique un intervalle chromosomique et de rechercher les mutations dans les gènes cibles (Chelly et Mandel, 2001). Les phénotypes caractéristiques du retard mental syndromique permettent de mettre en évidence plus facilement une région candidate impliquée dans la pathologie. Au contraire, la grande diversité génétique du retard mental non syndromique, ne permet pas toujours de regrouper l'information des études de liaison génétique des familles atteintes, ce qui complique la recherche de gènes. De ce fait, il existe très souvent un nombre important de gènes candidats (Ropers et Hamel, 2005). La mise en place en 1995 d'un Consortium Européen d'étude du retard mental lié au chromosome X a fortement contribué à l'identification des gènes responsables de retard mental lié au chromosome X. La mise en évidence des deux nouveaux exons alternatifs, b et c dans le gène PAK3 nous a amené à rechercher des mutations dans ces exons chez des patients atteints de retard mental non syndromique. L'analyse génétique de 16 familles avait permis de localiser une mutation au niveau du locus Xq22-23, sans qu'elle puisse être toutefois identifiée au niveau des séquences codantes du gène PAK3, ou d'un des gènes avoisinants. Les échantillons d'ADN des 16 patients ont été collectés et analysés par le Consortium Européen d'étude du retard mental lié au chromosome X et nous ont été fournis par J. Chelly.

J'ai choisi deux couples d'amorces, correspondant à des séquences introniques du gène humain, et permettant d'amplifier des fragments d'environ 300 pb contenant l'un ou l'autre des deux exons c et b. J'ai mis au point les conditions de PCR sur des échantillons d'ADNs humains provenant de personnes saines. Les produits de PCR, vérifiés par électrophorèse, ont été directement séquencés. Leurs séquences ont ensuite été comparées avec celles du génome humain (programme MultiAlign, Infobiogen). J'ai montré que chez les 16 patients étudiés, aucune mutation n'est présente au niveau des exons b et c, ni au niveau des séquences introniques avoisinantes. De plus, je n'ai pas observé de variation de séquence liée à un polymorphisme chez les différents patients. J'ai ensuite analysé en collaboration avec le laboratoire de Jamel Chelly, 200 échantillons d'ADN humain pour lesquels le locus portant la

mutation n'avait pas pu être précisé. De la même façon, j'ai amplifié les séquences génomiques avoisinantes des exons b et c et vérifié par électrophorèse l'amplification. Les échantillons ont ensuite été analysés par HPLC. Aucune mutation n'a pas été identifiée dans les inserts b et c. Nous pensons qu'aux vues de l'importance quantitative des variants d'épissage de PAK3, la recherche de mutations dans les exons c et b devrait être faite de manière systématique quand le gène PAK3 est suspecté.

2) Analyse de l'expression de PAK3 chez des patients atteints de la maladie d'Alzheimer

PAK3 joue un rôle important dans la maladie d'Alzheimer : dans la synthèse de l'ADN et dans l'apoptose neuronale (McPhie et al., 2003). Nous nous sommes demandés s'il pouvait y avoir un défaut différentiel d'expression impliquant l'un ou l'autre des variants d'épissage de PAK3. Dans le but de répondre à cette question et afin d'identifier un variant de PAK3 spécifiquement impliqué dans la maladie d'Alzheimer, nous avons analysé en collaboration avec Charles Duyckaerts (Pitié-Salpêtrière, Paris), l'expression des 4 transcrits de PAK3 par RT-PCR semi-quantitative dans des biopsies de cerveau de patients atteints de la maladie d'Alzheimer. En utilisant des oligonucléotides spécifiques des exons alternatifs, j'ai amplifié les 4 variants d'épissage à partir d'ARNm extraits de cerveau de patients et de sujets sains (Figure 42). L'expérience a été réalisée en aveugle. L'expression des quatre variants est semblable pour les 4 individus étudiés. La faible expression de l'individu D est liée à la mauvaise qualité de l'ARN. Au vu de ces résultats, nous avons décidé de ne pas poursuivre cette analyse plus loin. Il aurait peut être été judicieux de poursuivre cette analyse sur un plus grand nombre de patients. En effet Zhao et al. ont montré deux ans plus tard que l'expression et l'activité kinase de PAK3 sont diminuées chez des patients atteints de la maladie (Zhao et al., 2006).

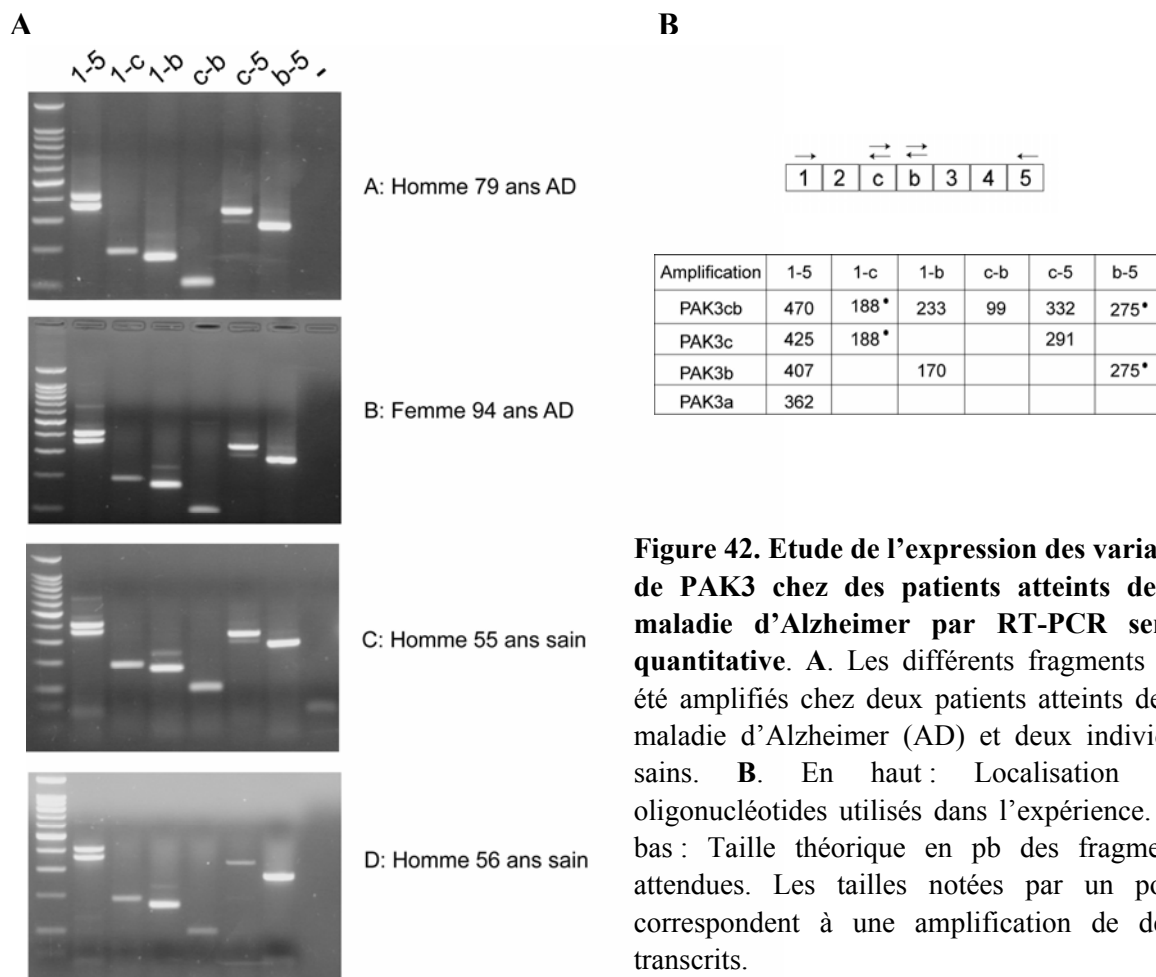


Figure 42. Etude de l'expression des variants de PAK3 chez des patients atteints de la maladie d'Alzheimer par RT-PCR semi-quantitative. **A.** Les différents fragments ont été amplifiés chez deux patients atteints de la maladie d'Alzheimer (AD) et deux individus sains. **B.** En haut : Localisation des oligonucléotides utilisés dans l'expérience. En bas : Taille théorique en pb des fragments attendues. Les tailles notées par un point correspondent à une amplification de deux transcrits.

DISCUSSION

Les points suivants ont été discutés dans les deux papiers insérés dans la partie "Résultat":

- Les mutations de PAK3 responsables de retard mental affectent différentes propriétés de la kinase
- Cdc42 est le meilleur activateur de PAK3
- La voie de signalisation Cdc42/PAK3 est essentielle dans la formation de l'épine dendritique
- Les nouveaux variants d'épissage apportent de nouvelles fonctions biologiques à la kinase PAK3

Dans cette discussion générale, certains de ces points seront discutés plus en détail

1) Rôle de PAK3 dans le cerveau

1.1) Relation entre les mutations, leurs conséquences biochimiques et les phénotypes cliniques

Trois mutations responsables de retard mental non syndromique sont localisées dans le domaine kinase de PAK3. La kinase qui porte la mutation R419X code pour une protéine tronquée dépourvue d'activité catalytique dans les cellules COS (Allen et al., 1998). Nous n'avons aucune information sur la stabilité des ARN ou des protéines, chez les patients porteurs de cette mutation. En effet, chez les eucaryotes il existe des mécanismes de "contrôle qualité" qui dégradent les ARNm portant un codon non sens afin d'éviter un effet dominant négatif ou gain de fonction (Chang et al., 2007). Par conséquent, les défauts cognitifs chez les patients portant la mutation R419X pourraient être liés, non pas à une absence d'activité kinase de PAK, mais à une absence totale de la protéine. Inversement, les défauts cognitifs pourraient être dus à une perte de fonction de PAK3 à laquelle s'ajoute un effet dominant négatif de la protéine mutée sur les autres kinases PAK. L'implication différentielle de ces deux composantes pourrait être responsable de phénotypes différents associés aux quatre mutations de PAK3.

La mutation A365E est localisée dans le sous domaine VIa au sein de l'hélice E du grand lobe des kinases (Hanks, 2003). En recherchant des pathologies associées à des kinases portant des mutations faux-sens situées dans ce domaine, nous avons trouvé dans la banque de données KinMutBase (<http://bioinf.uta.fi/KinMutBase>) (Ortutay et al., 2005), cinq protéines : la sérine thréonine kinase II (STKII) associée au syndrome Peutz-Jegers, la kinase phosphorylase gamma-2 (PHKG2) dont les mutations conduisent à des pathologies hépatiques, la Checkpoint kinase 2 (CHK2) associée à une prédisposition au cancer du sein ou de la

prostate, la rhodopsine kinase (RhoK) associée à la pathologie d'Oguchi caractérisée par une rétinite pigmentaire et enfin la bone morphogenetic protein receptor 1A (BMPR1A) dont les mutations sont à l'origine des polypes colo-rectaux juvéniles. Les données bibliographiques ne donnent pas d'information sur les conséquences des mutations du domaine VIa sur l'activité des kinases. Ainsi, nous montrons pour la première fois qu'une mutation dans ce domaine abolit totalement l'activité kinase.

La mutation de PAK3, W446S, récemment identifiée, est localisée dans le sous domaine IX de l'hélice F après le segment catalytique appelé T-loop (Hanks, 2003). Des mutations faux-sens au niveau de ce domaine ont été identifiées dans sept gènes codant pour des kinases, conduisant à des pathologies: STKII, PHGK2, RhoK, BMPR2 associée à une hypertension pulmonaire primaire, la protéine AMHR2 (anti-müllerian type II receptor) dont les mutations conduisent au syndrome de la persistance du canal müllérien, ALK (activin receptor-like kinase-1) associée à une télangiectasie hémorragique et TGFBR2 (transforming growth factor-beta receptor type II) associée à des carcinomes. L'acide aminé W446 est très conservé au sein de la famille des PAK Ste20. Les défauts fonctionnels associés à la mutation W446S n'ont pas encore été caractérisés mais sa localisation très proche du segment catalytique de la kinase suggère que la mutation de ce résidu conduise aussi à une absence d'activité kinase.

Peippo et al. ont comparé les signes cliniques des patients portant les différentes mutations de PAK3 (Peippo et al., 2007). Les signes cliniques associés à la mutation W446S sont plus diversifiés et plus marqués que ceux associées aux mutations R419X, R67C et R419X, notamment au niveau de la morphologie du visage et des symptômes neurologiques. Il ressort toutefois un phénotype physique et comportemental caractéristique des patients porteurs d'une mutation dans le gène PAK3 : une petite tête, des grandes oreilles, des défauts de langage, des troubles du comportement et parfois des symptômes psychiatriques (Tableau 2).

Ainsi il s'avère que les mutations de PAK3 sont à l'origine de signes cliniques pouvant classer PAK3 dans un retard mental syndromique. Ceci confirme le continuum entre retard mental syndromique et non syndromique. De façon très intéressante la mutation R67C dont le défaut biochimique associé apparaît moins drastique que pour les deux autres mutations (A365E et R419X) conduit à un retard mental plus sévère. Compte tenu de la présence de cette mutation dans une seule famille, une des hypothèses est que le contexte génétique soit responsable de la sévérité du retard mental. Toutefois, nous avons montré que la densité des épines des neurones transfectés avec PAK3-R67C est fortement réduite par rapport aux neurones

transfectés avec PAK3-A365E ou PAK3-R419X, suggérant que cette diminution soit à l'origine du phénotype plus sévère chez ces patients.

Mutation de PAK3	R419X	R67C	A365E	W466S
Signes cliniques				
Nombre de patients analysés	4	6	13	5
Retard mental	léger	modéré à sévère	léger	léger
Petite tête	4/4	-	-	4/5
Grandes oreilles	1/4	-	7/13	4/5
Autres caractéristiques du visage	-	-	-	+
Défauts d'articulation	-	4/6	1/13	4/5
Epilepsie	-	-	1/13	1/5
Hydroencéphalie				1/5
Défauts biochimiques associés				
Absence d'activité kinase	+	-	+	?
Diminution de la liaison à Cdc42	-	+	-	?
Défauts des épines dendritiques				
Diminution de la densité	+	++	+	?
Augmentation de la longueur	+	-	+	?

Tableau 2. Tableau récapitulatif des mutations de PAK3 associées au retard mental.

Présentation des signes cliniques des patients, des défauts biochimiques des protéines portant les mutations, des caractéristiques des épines dendritiques des neurones d'hippocampe transfectés par les mutants PAK3. Les résultats biochimiques, de densité et de morphologie des épines dendritiques proviennent de notre laboratoire, les signes cliniques ont été rapporté dans la littérature. N.B. Le tableau proposé par Peippo et al., contient une erreur d'inversion entre la mutation R67C et R419X. D'après Allen et al., 1998 ; Bienvenu et al., 2000 ; Gedeon et al., 2003 ; Peippo et al., 2007.

1.2) PAK3 et les GTPases de la famille Rho

Nous avons montré que Cdc42 est la GTPase qui lie PAK3 avec la meilleure affinité et celle qui active le mieux PAK3 par rapport à Rac1 (Kreis et al., 2007). De plus, par rapport à PAK1, PAK3 lie beaucoup mieux Cdc42.

Les GTPases de la famille Rho forment huit sous groupes et s'assemblent en 4 sous familles. La première comprend Rnd1-3 (round), RhoA-C et RhoD-RhoF (Rif : Rho in filopodia), la deuxième comprend Rac1-3, RhoG, Cdc42, RhoQ (TC10), RhoJ (TCL : TC10 like), RhoV (Chp : Cdc42 homologous protein) et RhoU (Wrch : Wnt-1 responsive Cdc42 homologue), la troisième comprend RhoH (TTF) et la quatrième RhoBTB1 et RhoBTB2 (Boureux et al., 2006). Les GTPases les plus anciennes d'un point de vue évolutif, Cdc42, Rac1 et Rho, sont

celles qui ont été le plus étudiées (Boureux et al., 2006). Très peu de données existent sur le rôle des autres GTPases, en particulier dans la physiologie neuronale (Govek et al., 2005). Il a été montré que TC10 et Rnd jouent un rôle dans le développement neuronal notamment en induisant respectivement la pousse neuritique et la formation des épines dendritiques (Abe et al., 2003 ; Ishikawa et al., 2003). Parmi les membres de la famille Cdc42/Rac, les protéines Chp, Wrch et TC10 sont fortement exprimées dans le cerveau (Aronheim et al., 1998 ; Tao et al., 2001 ; Abe et al., 2003). Wrch et TC10 induisent des filopodes et la dissolution des fibres de stress, alors que Chp induit la formation de lamellipodes et TCL la formation de repliements membranaires (Neudauer et al., 1998 ; Aronheim et al., 1998 ; Vigal et al., 2000 ; Tao et al., 2001). Tous les membres de la famille Cdc42/Rac, à l'exception de RhoG, interagissent avec PAK1 (Aspenström et al., 2004). Mon équipe a montré que PAK3 interagit aussi avec ces membres, à savoir TC10, TCL, Wrch et Chp (Rousseau et al., 2003 ; Thévenot et al., thèse en cours).

Puisque nous montrons qu'un activateur de Cdc42 endogène, l'Intersectine active PAK3 alors qu'un activateur de Rac1 ne le fait pas, la question est la suivante : Peut-on exclure Rac1 des voies de signalisation de PAK3 ? Il est intéressant de remarquer que les localisations subcellulaires de Cdc42 et Rac1 sont différentes. Ainsi dans les neurones d'hippocampe différenciés, Rac1 est axonal alors que Cdc42 est axonal et dendritique (Santos Da Silva et al., 2004). Toutefois, plusieurs données mettent en évidence le rôle de Rac1 dans la spinogénèse (Nakayama et al., 2000 ; Tashiro, 2000 ; Zhang, 2005) (voir partie Introduction III §6.2.4). L'ensemble de ces données suggère qu'il existe des fonctions synaptiques spécifiques à chaque GTPase, Cdc42 étant impliquée préférentiellement dans l'activation de la kinase PAK3.

1.3) Le recrutement de PAK3 dans les épines

Plusieurs données montrent que PAK3 est localisée dans les épines dendritiques (Hayashi et al., 2002 ; Rex et al., 2007). On connaît à l'heure actuelle deux voies qui permettent de recruter PAK au niveau de la membrane. La première fait intervenir Nck et la seconde passe par le facteur d'échange PIX. Alors que très peu de données existent sur l'implication de Nck dans la spinogénèse, le facteur d'échange PIX a été très étudié dans ce processus. En effet, la voie de signalisation Shank/PIX pourrait être à l'origine du recrutement de PAK3 dans les épines. Par ailleurs, la voie de signalisation EphR/Intersectine/Cdc42 pourrait permettre d'amener PAK au niveau des récepteurs des éphrines. Toutefois, nous avons montré qu'un mutant de PAK3 incapable de lier les GTPases est toujours localisé dans les épines, ce qui

suggère un mécanisme de recrutement de PAK3 indépendamment des GTPases (Kreis et al., 2007).

La densité post-synaptique regroupe un nombre très important de protéines de signalisation. PAK3 a été détectée dans la fraction PSD, suite à un fractionnement biochimique et c'est surtout la forme phosphorylée qui a été trouvée dans ces densités (Hayashi et al., 2004). Nous avons montré dans les cellules COS, que PAK3 se localisait différemment selon son état d'activation (voir partie Résultat partie I.§3). En effet, contrairement à une forme activable de PAK3, une forme dépourvue d'activité kinase est fortement concentrée dans les adhésions focales. Pourtant nous n'avons pas trouvé de différences de localisation de ces mêmes mutants au niveau des épines dendritiques de neurones d'hippocampe, suggérant donc que PAK est recruté dans l'épine indépendamment de son état d'activation. Par ailleurs, on connaît à l'heure actuelle un mécanisme qui relie l'état d'activation de PAK à son recrutement membranaire. En effet, suite à l'activation et à la phosphorylation de PAK au niveau de la membrane, les complexes Nck/PAK et PIX/PAK se dissocient, permettant à PAK de retourner dans le cytoplasme. L'ensemble de ces données suggère que PAK est recrutée dans les épines grâce au complexe Shank/PIX indépendamment de son activité kinase. De plus, il existe probablement un "turn-over" très dynamique d'activation de PAK dans les épines et ainsi la kinase s'y trouve majoritairement sous une forme phosphorylée.

1.4) PAK3 et spinogénèse

1.4.1) Les filopodes sont-ils des précurseurs des épines ?

Une des hypothèses de la spinogénèse réside dans la formation, au préalable, d'un filopode qui se différencie pour former une épine mature (Yuste et Bonhoeffer, 2004). En utilisant des neurones d'hippocampe en culture ou sur tranche, il a été montré que les filopodes sont des structures particulièrement abondantes et dynamiques pendant les premiers jours du développement des neurones puis ils se stabilisent pour former des protrusions de type épine en face d'un bouton présynaptique (Fiala et al., 1998, Ziv et al., 1996, Dailey et al., 1996). Toutefois, l'équipe de Dominique Müller a montré que les filopodes sont très transitoires et sont éliminés en masse pendant les premiers jours du développement du neurone avant même d'avoir établi un contact synaptique. Ces auteurs suggèrent ainsi que les filopodes contribuent très peu à la formation des épines matures et à la stabilité des contacts synaptiques (De Roo et al., 2007). Ainsi, la stabilité serait apportée par l'acquisition de nouvelles fonctionnalités à la synapse, i.e augmentation de la taille de la tête d'épine, expression de PSD95 et adressage des

récepteurs à la membrane (De Roo et al., 2007). Les épines matures pourraient donc se former par deux mécanismes, à partir d'un filopode qui se développe en épine ou directement à partir du corps dendritique. Une autre hypothèse est que le filopode se forme, établit un premier contact avec l'axone, puis se rétracte pour permettre l'émergence d'une épine mature à ce niveau (Dailey et al., 1996).

1.4.2) Rôle du module Cdc42-PAK3 dans la formation des épines

Alors que Rac1 régule la formation des lamellipodes, la GTPase Cdc42 est impliquée dans la formation des filopodes (Hall et al., 1998). Les filopodes, composés de fibres d'actine parallèles, jouent un rôle important dans la migration cellulaire pour explorer le milieu extracellulaire. Ils sont retrouvés dans plusieurs types cellulaires notamment les fibroblastes, et sont nombreux au niveau des cônes de croissance des neurones. Le rôle de Cdc42 dans la spinogénèse a été assez peu étudié mais quelques données montrent que cette GTPase joue pourtant un rôle important dans ce processus (Irie et Yamaguchi, 2002 ; Scott et al., 2003). Il existe plusieurs candidats parmi les effecteurs de Cdc42 qui régulent la dynamique du cytosquelette d'actine et qui pourraient être impliqués dans la formation du filopode (Faix et Rottner, 2006). La protéine mDia2 (mouse Diaphanous), de la famille des formines, stimule la polymérisation de filaments linéaires d'actine. Cependant, il n'y a pas de données sur le rôle de mDia ou d'autres formines dans la formation des épines. IRSp53, de par son interaction avec les membres Ena/VASP, contribue à la formation du filopode (Krugmann et al., 2001). De plus, IRSp53 régule la morphogénèse des épines dendritiques mais sans qu'il soit possible de dire si cette régulation est dépendante de Cdc42 ou Rac1 (Choi et al., 2005). PAK3 ainsi que deux membres du groupe II, PAK4 et PAK5, sont des effecteurs de Cdc42 et jouent aussi un rôle important dans la formation des protrusions filopodiales (Abo et al., 1998, Dan et al., 2002). Plus précisément, il a été montré que PAK5, un effecteur de Cdc42, joue un rôle important dans la formation des neurites, dans une voie activée par le facteur d'échange GEFT (Bryan et al., 2004). Il existe plusieurs hypothèses quant aux rôles de PAK3 dans la spinogénèse. La diminution de la densité des épines, observée notamment pour le mutant PAK3-R67C, peut être due à un défaut dans le mécanisme d'initiation de l'épine ou bien peut être due à un défaut de stabilisation des épines nouvellement formées. Le fait que Cdc42 soit impliquée dans la formation des filopodes, nous conduit à favoriser l'hypothèse d'un rôle du module Cdc42/PAK3 dans l'initiation des épines.

1.4.3) Quel est ou quels sont les mécanismes d'activation du module Cdc42/PAK3 ?

Il existe de nombreux facteurs d'échange capables d'activer Cdc42. La plupart sont fortement exprimés dans le cerveau. Seuls quelques uns sont spécifiques de Cdc42 par rapport à Rac1. De plus, les démarches rigoureuses pour analyser les propriétés spécifiques des GEF sont souvent assez délicates à mener et rarement réalisées. Rappelons l'exemple de la perte du défaut d'activation du mutant PAK3-R67C par la GTPase Cdc42, lorsqu'on surexprime ces protéines (Kreis et al., 2007, Figures 1B (p69) et 4C-D (p72)). Les mécanismes d'activation du module Cdc42/PAK3 ne dépendent pas forcément de la spécificité du facteur d'échange mais de l'existence de complexes protéiques qui permettent un "cross talk" entre les protéines. Existe-il un membre de la famille PIX spécifiquement impliqué dans l'activation du module Cdc42/PAK3 ? Nous pouvons énumérer les arguments suivants :

En faveur de α -PIX : son implication dans le retard mental (Kutsche et al., 2000), sa spécificité sur Cdc42 sous sa forme monomérique (Baird et al., 2005 ; Li et al., 2003), sa liaison à PAK3 (résultats personnels de l'équipe), le sauvetage du Si-RNA de α -PIX par PAK3 constitutivement actif (Nodé-langlois et al., 2006).

En faveur de β -PIX : sa liaison à Shank (Park et al., 2003) et sa liaison à PAK3 (résultats personnels de l'équipe).

On pourrait proposer un scénario dynamique de spinogénèse faisant intervenir ces différents acteurs. Shank recrute β -PIX qui dimérise avec α -PIX (Kim et al., 2001 ; Koh et al., 2001). Ces GEF amènent avec eux les kinases PAK3. Une des PIX active Cdc42 qui active PAK3 favorisant l'initiation de l'épine puis l'autre PIX active Rac permettant la maturation de l'épine.

1.4.4) Quelles sont les cibles du module Cdc42/PAK3

Plusieurs données de la littérature montrent que PAK3 est impliquée dans la spinogénèse et dans la transmission synaptique (Boda et al., 2004 ; Hayashi et al., 2004 ; Meng et al., 2005 ; Kreis et al., 2007) mais il existe peu d'information concernant les voies de signalisation, en aval de PAK3 qui sont impliquées dans ces processus. La LIM Kinase et la MLC sont des substrats de PAK1 et des régulateurs du cytosquelette d'actine et de la myosine respectivement. Les souris KO de la LIM Kinase présentent de fortes anomalies du cytosquelette d'actine et de la morphologie des épines, suggérant que PAK3 régule la morphogénèse des épines via cette voie (Meng et al., 2002). Par ailleurs, la MLC qui est un régulateur de l'activité ATPasique de la myosine, est impliquée dans la formation de la

synapse (Zhang et al., 2005). Il a aussi été montré que la phosphorylation du facteur de transcription CREB est fortement réduite dans les souris KO de PAK3, suggérant que PAK3 régule l'activité de CREB lors de la LTP tardive qui nécessite l'expression de nouveaux gènes (Meng et al., 2005). Cependant, les mécanismes par lesquels PAK3 régule la phosphorylation de la sérine 133 de CREB restent inconnus. PAK3 peut interagir avec plusieurs protéines kinases comme les MAP kinases, PI3-kinase/Akt, PKA ou la LIM Kinase I, toutes sont capables de phosphoryler CREB (Johannessen et al., 2004). Suite à sa phosphorylation, CREB change de conformation et recrute un co-activateur CBP (CREB binding protein) pour initier la transcription. De nombreux gènes cibles de CREB sont impliqués dans la plasticité synaptique notamment celui du BDNF (Lonze et Ginty, 2002).

Il est à noter que les souris KO de PAK3 ne présentent aucune anomalie de morphologie des épines dendritiques contrairement au Si-RNA de PAK3 ou à l'expression d'un dominant négatif de PAK3 (Meng et al., 2005). La question qui se pose est donc la suivante : quel est le modèle cellulaire qui reflèterait le plus la situation *in vivo*, chez les patients atteints de retard mental ? Chez ces personnes, bien que la fonction de PAK3 soit altérée, la protéine est à priori exprimée sous la forme entière ou tronquée. PAK3 mutée pourrait alors jouer un rôle de dominant négatif en titrant des partenaires nécessaires au bon fonctionnement de la synapse. Au contraire, chez les souris KO de PAK3, la protéine est totalement absente au cours du développement et une des hypothèses pour expliquer l'absence d'anomalies des épines est la mise en place de systèmes de compensation, notamment par les kinases PAK1 et PAK2. Le fait que nous ayons mis en évidence une interaction de PAK3 avec PAK1 renforce cette idée d'interrelation entre ces kinases dans le fonctionnement synaptique.

1.5) PAK3 régule-elle la différenciation neuronale ?

Les mutations de PAK3 semblent être à l'origine d'anomalies de développement du cerveau (i.e. petite tête). En effet, il a été montré récemment que cette kinase joue un rôle important lors du développement et de la différenciation des neurones. Alors que l'expression de PAK3 est réprimée dans le télencéphale lors de la migration des interneurones jusqu'au cortex, son expression est augmentée dans le cortex lorsque les interneurones se différencient (Cobos et al., 2007). Par ailleurs, il a été montré qu'au cours du développement du xénope, PAK3 est impliquée dans la voie proneurale en inhibant le cycle cellulaire pour permettre la différenciation neuronale (Souopgui et al., 2002). L'ensemble de ces données suggère qu'un des rôles spécifiques de PAK3 est de réguler certaines étapes de la différenciation neuronale en favorisant les étapes post-mitotiques. Toutefois il a été montré que dans certaines

conditions, PAK3 participe à une voie d'initiation de la synthèse d'ADN (McPhie et al., 2003). Ces données paraissent ainsi contradictoires et seule une analyse plus poussée des mécanismes moléculaires pourra permettre de comprendre les différentes facettes de l'action de PAK3. Ainsi la kinase PAK3 pourrait être impliquée dans plusieurs fonctions distinctes à différentes périodes de la vie neuronale, dans le déterminisme proneural et la différenciation neuritique au cours du développement embryonnaire ainsi que dans la plasticité synaptique au cours de l'enfance et la période adulte. Les relations entre ces différentes fonctions et les physiopathologies de la cognition (i.e. retard mental et maladie d'Alzheimer) sont inconnues.

2) Comment sont régulés les variants de PAK3 constitutivement actifs ?

2.1) Mise en évidence de nouveaux variants d'épissage de PAK3

Nous avons mis en évidence un nouvel exon alternatif c retrouvé dans deux nouveaux variants d'épissage PAK3c et PAK3cb qui présentent de nouvelles caractéristiques. Lorsqu'elles sont exprimées dans les cellules COS, ces kinases sont constitutivement actives et non régulées par les GTPases. La forte conservation de l'exon b au cours de l'évolution et l'apparition de l'exon c chez les mammifères suggèrent que les nouveaux variants d'épissage possèdent des fonctions nécessaires notamment aux fonctions cognitives. Nous avons cherché à déterminer si ces variants avaient une localisation particulière dans le cerveau ou si ils s'exprimaient à un moment précis au cours du développement des neurones. Les expériences de RT-PCR semi quantitative montrent que les quatre variants sont exprimés dans tout le cerveau de souris adulte. Alors qu'ils sont absents des cellules gliales, leur expression est augmentée dans les neurones entre le 4^{ème} et le 14^{ème} jour de culture *in vitro*, ce qui suit la cinétique de différenciation synaptique. Nous avons cherché à étudier la localisation subcellulaire des variants d'épissage endogènes par immunofluorescence avec des sérums spécifiques mais les outils dont nous disposons ne nous permettent pas actuellement de les détecter spécifiquement. Par ailleurs, l'expression exogène des variants constitutivement actifs portant l'étiquette GFP dans des cellules COS ou dans des neurones d'hippocampe entraîne souvent de par leur forte activité, la mort cellulaire. La question est de savoir quelle est la fonction des quatre variants de PAK3. Une des hypothèses est que la présence de deux nouveaux exons alternatifs apporte de nouvelles spécificités de substrats ou de nouveaux partenaires à la kinase qui permettrait d'intégrer PAK3 dans de nouvelles voies de signalisation. Nous sommes actuellement en train de rechercher de nouveaux partenaires de PAK3 dans un screen de double hybride.

2.2) Mécanismes de régulation des nouveaux variants de PAK3 constitutivement actifs

La forte activité kinase des nouveaux variants d'épissage de PAK3 dans les cellules COS suggère qu'ils soient régulés *in vivo* par un mécanisme inconnu. Une des hypothèses de régulation des variants d'épissage est que l'expression de ces protéines soit régulée au niveau de l'épissage alternatif ou au niveau post-transcriptionnel. L'expression de plusieurs gènes qui codent pour des facteurs de transcription ou des molécules synaptiques, est finement régulée par l'activité synaptique (Ule et Darnell, 2006). L'expression de Homer1a, un variant d'épissage qui code pour une forme courte de Homer1, est induite par activation neuronale de l'hippocampe (revue de Shiraishi-Yamaguchi et Furuichi, 2007). Par ailleurs, l'expression de deux sérine/thréonine kinases Fnk (FGF-inductible kinase) et Snk (Serum-inductible Kinase) est augmentée suite à une induction de la LTP, puis que ces deux protéines transloquent dans les dendrites des neurones activés (Kauselmann et al., 1999). Une autre hypothèse de régulation des variants d'épissage repose sur la formation d'hétérodimères PAK3a ou PAK1 en association avec un des variants constitutivement actifs afin de maintenir, en absence des GTPases, un état inactif. Nous avons déjà démontré l'existence d'hétérodimères PAK3a/PAK1 et PAK3b/PAK1 ou PAK3b/PAK3a. Afin de confirmer notre modèle de régulation des kinases PAK3, nous cherchons à montrer par des expériences de test kinase qu'un complexe hétérodimérique composé de PAK3a ou PAK1 associé à un nouveau variant d'épissage PAK3b, c ou cb est inactif à l'état basal, comme cela a déjà été montré pour PAK1/PAK1 (Parrini et al., 2002) ; puis que les deux partenaires s'activent suite à la liaison de l'activateur Cdc42. Nos premiers résultats montrent que le complexe PAK3a/PAK3a est bien inactif au repos et que les deux partenaires s'activent par liaison à Cdc42.

Il a été montré qu'une molécule de Cdc42 était suffisante pour permettre la dissociation et donc l'activation de deux molécules de PAK1 (Parrini et al., 2002). Ainsi, si une GTPase est spécifique d'une PAK, elle est toutefois capable d'activer deux kinases PAK différentes dans un complexe hétérodimérique. Nous proposons un modèle basé sur la formation de complexes multimérique PAK1/PAK3 qui assurent une fonction d'intégration en aval des GTPases, avec des régulations spécifiques à chacune des kinases, pour contrôler différents processus cellulaires. La formation des hétérodimères permet d'amener des partenaires différents à proximité l'un de l'autre, ce qui pourrait avoir une importance fonctionnelle majeure et conférerait ainsi aux kinases PAK un rôle de protéines d'échafaudage. Les protéines PIX sont aussi capables de dimériser grâce à leur domaine leucine zipper et ainsi PAK et PIX peuvent

s'associer pour former des tétramères (Kim et al., 2001 ; Koh et al., 2001). Par ailleurs, il a été proposé l'existence de complexes regroupant des dimères de PIX et des dimères de GIT (Paris et al., 2003). Ainsi, le regroupement des dimères protéiques permet de former des complexes multimériques avec des combinaisons particulières pour réguler spécifiquement les différents effets biologiques.

CONCLUSIONS/PERSPECTIVES

Les kinases PAK ont une structure très proche et sont impliquées dans de nombreux processus physiologiques. Cependant les caractéristiques fonctionnelles propres à chaque kinase restent encore peu comprises. Au cours de ma thèse, je me suis intéressée à la kinase PAK3 qui a la particularité d'être impliquée dans le retard mental. Mon travail a permis d'apporter de nouveaux éléments quant aux spécificités de PAK3. D'abord, PAK3 lie fortement la GTPase Cdc42 ce qui permet au complexe Cdc42-PAK3 de jouer un rôle important dans l'initiation des épines dendritiques. Ensuite le gène PAK3 code pour quatre variants d'épissage dont trois sont constitutivement actifs. Enfin les domaines fonctionnels communs à PAK1 et PAK3 permettent à ces deux kinases de former des dimères pour réguler finement l'activité kinase. Ces données suggèrent que l'interconnexion entre PAK1 et PAK3 permet une certaine synergie entre les kinases qui conservent cependant leur spécificité individuelle. Des approches *in vivo* en utilisant des souris *PAK3* conditionnelles pour supprimer spécifiquement l'expression de *PAK3* à l'âge adulte, ou des souris transgéniques exprimant le gène PAK3 muté, devraient permettre d'améliorer nos connaissances sur le rôle de PAK3 dans la physiopathologie des retards mentaux. Par ailleurs, des souris KO des exons alternatif ou des approches de Si-RNA pour supprimer l'expression des variants d'épissage, pourraient apporter de nouvelles données pour mieux comprendre le rôle de ces variants dans les différents processus cellulaires.

BIBLIOGRAPHIE

- Abe T, Kato M, Miki H, Takenawa T, Endo T (2003) Small GTPase Tc10 and its homologue RhoT induce N-WASP-mediated long process formation and neurite outgrowth. *J Cell Sci* 116:155-168.
- Adams JP, Sweatt JD (2002) Molecular psychology: roles for the ERK MAP kinase cascade in memory. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 42:135-163.
- Aizawa H, Wakatsuki S, Ishii A, Moriyama K, Sasaki Y, Ohashi K, Sekine-Aizawa Y, Sehara-Fujisawa A, Mizuno K, Goshima Y, Yahara I (2001) Phosphorylation of cofilin by LIM-kinase is necessary for semaphorin 3A- induced growth cone collapse. *Nat Neurosci* 4:367-373.
- Allen KM, Gleeson JG, Bagrodia S, Partington MW, MacMillan JC, Cerione RA, Mulley JC, Walsh CA (1998) PAK3 mutation in nonsyndromic X-linked mental retardation. *Nat Genet* 20:25-30.
- Aoto J, Chen L (2006) Bidirectional ephrin/Eph signaling in synaptic functions. *Brain Res.*
- Arber S, Barbayannis FA, Hanser H, Schneider C, Stanyon CA, Bernard O, Caroni P (1998) Regulation of actin dynamics through phosphorylation of cofilin by LIM-kinase. *Nature* 393:805-809.
- Aronheim A, Broder YC, Cohen A, Fritsch A, Belisle B, Abo A (1998) Chp, a homologue of the GTPase Cdc42Hs, activates the JNK pathway and is implicated in reorganizing the actin cytoskeleton. *Curr Biol* 8:1125-1128.
- Aspenstrom P, Fransson A, Saras J (2004) Rho GTPases have diverse effects on the organization of the actin filament system. *Biochem J* 377:327-337.
- Ast G (2004) How did alternative splicing evolve? *Nat Rev Genet* 5:773-782.
- Bagrodia S, Taylor SJ, Creasy CL, Chernoff J, Cerione RA (1995) Identification of a mouse p21Cdc42/Rac activated kinase [published erratum appears in *J Biol Chem* 1996 Jan 12;271(2):1250]. *J Biol Chem* 270:22731-22737.
- Bagrodia S, Taylor SJ, Jordon KA, Van Aelst L, Cerione RA (1998) A novel regulator of p21-activated kinases. *J Biol Chem* 273:23633-23636.
- Baird D, Feng Q, Cerione RA (2005) The Cool-2/ α -Pix protein mediates a Cdc42-Rac signaling cascade. *Curr Biol* 15:1-10.
- Balasenthil S, Sahin AA, Barnes CJ, Wang RA, Pestell RG, Vadlamudi RK, Kumar R (2004) p21-activated kinase-1 signaling mediates cyclin D1 expression in mammary epithelial and cancer cells. *J Biol Chem* 279:1422-1428.
- Bear MF, Connors, B.W, Paradiso M.A (2002) *Neurosciences à la découverte du cerveau.*
- Bear MF, Huber KM, Warren ST (2004) The mGluR theory of fragile X mental retardation. *Trends Neurosci* 27:370-377.
- Bergmann C, Zerres K, Senderek J, Rudnik-Schoneborn S, Eggermann T, Hausler M, Mull M, Ramaekers VT (2003) Oligophrenin 1 (OPHN1) gene mutation causes syndromic X-linked mental retardation with epilepsy, rostral ventricular enlargement and cerebellar hypoplasia. *Brain* 126:1537-1544.
- Bienvenu T, Der-Sarkissian H, Billuart P, Tissot M, Des Portes V, Bruls T, Chabrolle JP, Chauveau P, Cherry M, Kahn A, Cohen D, Beldjord C, Chelly J, Cherif D (1997) Mapping of the X-breakpoint involved in a balanced X;12 translocation in a female with mild mental retardation. *Eur J Hum Genet* 5:105-109.

- Bienvenu T, des Portes V, McDonnell N, Carrie A, Zemni R, Couvert P, Ropers HH, Moraine C, van Bokhoven H, Fryns JP, Allen K, Walsh CA, Boue J, Kahn A, Chelly J, Beldjord C (2000) Missense mutation in PAK3, R67C, causes X-linked nonspecific mental retardation. *Am J Med Genet* 93:294-298.
- Bienvenu T, Chelly J (2006) Molecular genetics of Rett syndrome: when DNA methylation goes unrecognized. *Nat Rev Genet* 7:415-426.
- Billuart P, Bienvenu T, Ronce N, des Portes V, Vinet MC, Zemni R, Roest Crolius H, Carrie A, Fauchereau F, Cherry M, Briault S, Hamel B, Fryns JP, Beldjord C, Kahn A, Moraine C, Chelly J (1998) Oligophrenin-1 encodes a rhoGAP protein involved in X-linked mental retardation. *Nature* 392:923-926.
- Blanpied TA, Ehlers MD (2004) Microanatomy of dendritic spines: emerging principles of synaptic pathology in psychiatric and neurological disease. *Biol Psychiatry* 55:1121-1127.
- Blencowe BJ (2006) Alternative splicing: new insights from global analyses. *Cell* 126:37-47.
- Bliss TV, Lomo T (1973) Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol* 232:331-356.
- Boda B, Alberi S, Nikonenko I, Node-Langlois R, Jourdain P, Moosmayer M, Parisi-Jourdain L, Muller D (2004) The mental retardation protein PAK3 contributes to synapse formation and plasticity in hippocampus. *J Neurosci* 24:10816-10825.
- Bokoch GM, Reilly AM, Daniels RH, King CC, Olivera A, Spiegel S, Knaus UG (1998) A GTPase-independent mechanism of p21-activated kinase activation. Regulation by sphingosine and other biologically active lipids. *J Biol Chem* 273:8137-8144.
- Bokoch GM (2003) Biology of the p21-Activated Kinases. *Annu Rev Biochem* 72:727-747.
- Bonaglia MC, Giorda R, Borgatti R, Felisari G, Gagliardi C, Selicorni A, Zuffardi O (2001) Disruption of the ProSAP2 gene in a t(12;22)(q24.1;q13.3) is associated with the 22q13.3 deletion syndrome. *Am J Hum Genet* 69:261-268.
- Boureaux A, Vignal E, Faure S, Fort P (2007) Evolution of the Rho family of ras-like GTPases in eukaryotes. *Mol Biol Evol* 24:203-216.
- Bryan B, Kumar V, Stafford LJ, Cai Y, Wu G, Liu M (2004) GEFT, a Rho family guanine nucleotide exchange factor, regulates neurite outgrowth and dendritic spine formation. *J Biol Chem* 279:45824-45832.
- Burbelo PD, Drechsel D, Hall A (1995) A conserved binding motif defines numerous candidate target proteins for both Cdc42 and Rac GTPases. *J Biol Chem* 270:29071-29074.
- Cajal SR. (1894) La fine structure des centres nerveux. *Proc R Soc London* 55:444-468.
- Calabrese B, Wilson MS, Halpain S (2006) Development and regulation of dendritic spine synapses. *Physiology (Bethesda)* 21:38-47.
- Carter JH, Douglass LE, Deddens JA, Colligan BM, Bhatt TR, Pemberton JO, Konicek S, Hom J, Marshall M, Graff JR (2004) Pak-1 expression increases with progression of colorectal carcinomas to metastasis. *Clin Cancer Res* 10:3448-3456.
- Chang YF, Imam JS, Wilkinson MF (2007) The nonsense-mediated decay RNA surveillance pathway. *Annu Rev Biochem* 76:51-74.

- Chechlac M, Gleeson JG (2003) Is mental retardation a defect of synapse structure and function? *Pediatr Neurol* 29:11-17.
- Check E (2005) Genetics: the X factor. *Nature* 434:266-267.
- Chelly J, Mandel JL (2001) Monogenic causes of X-linked mental retardation. *Nat Rev Genet* 2:669-680.
- Chen H, Bernstein BW, Bamberg JR (2000) Regulating actin-filament dynamics in vivo. *Trends Biochem Sci* 25:19-23.
- Chen H, Bernstein BW, Sneider JM, Boyle JA, Minamide LS, Bamberg JR (2004) In vitro activity differences between proteins of the ADF/cofilin family define two distinct subgroups. *Biochemistry* 43:7127-7142.
- Chen LY, Rex CS, Casale MS, Gall CM, Lynch G (2007) Changes in synaptic morphology accompany actin signaling during LTP. *J Neurosci* 27:5363-5372.
- Chetkovich DM, Bunn RC, Kuo SH, Kawasaki Y, Kohwi M, Brecht DS (2002) Postsynaptic targeting of alternative postsynaptic density-95 isoforms by distinct mechanisms. *J Neurosci* 22:6415-6425.
- Choi J, Ko J, Racz B, Burette A, Lee JR, Kim S, Na M, Lee HW, Kim K, Weinberg RJ, Kim E (2005) Regulation of dendritic spine morphogenesis by insulin receptor substrate 53, a downstream effector of Rac1 and Cdc42 small GTPases. *J Neurosci* 25:869-879.
- Chong C, Tan L, Lim L, Manser E (2001) The mechanism of PAK activation. Autophosphorylation events in both regulatory and kinase domains control activity. *J Biol Chem* 276:17347-17353.
- Cobos I, Borello U, Rubenstein JL (2007) Dlx transcription factors promote migration through repression of axon and dendrite growth. *Neuron* 54:873-888.
- Cooke SF, Bliss TV (2006) Plasticity in the human central nervous system. *Brain* 129:1659-1673.
- Curry CJ, Stevenson RE, Aughton D, Byrne J, Carey JC, Cassidy S, Cunniff C, Graham JM, Jr., Jones MC, Kaback MM, Moeschler J, Schaefer GB, Schwartz S, Tarleton J, Opitz J (1997) Evaluation of mental retardation: recommendations of a Consensus Conference: American College of Medical Genetics. *Am J Med Genet* 72:468-477.
- Dailey ME, Smith SJ (1996) The dynamics of dendritic structure in developing hippocampal slices. *J Neurosci* 16:2983-2994.
- Dalva MB, McClelland AC, Kayser MS (2007) Cell adhesion molecules: signalling functions at the synapse. *Nat Rev Neurosci* 8:206-220.
- Dan I, Watanabe NM, Kusumi A (2001) The Ste20 group kinases as regulators of MAP kinase cascades. *Trends Cell Biol* 11:220-230.
- Daniels RH, Bokoch GM (1999) p21-activated protein kinase: a crucial component of morphological signaling? *Trends Biochem Sci* 24:350-355.
- Daniels RH, Zenke FT, Bokoch GM (1999) alphaPix stimulates p21-activated kinase activity through exchange factor-dependent and -independent mechanisms. *J Biol Chem* 274:6047-6050.
- Daub H, Gevaert K, Vandekerckhove J, Sobel A, Hall A (2001) Rac/Cdc42 and p65PAK regulate the microtubule-destabilizing protein stathmin through phosphorylation at serine 16. *J Biol Chem* 276:1677-1680.

- De Roo M, Klauser P, Mendez P, Pogliani L, Muller D (2007) Activity-Dependent PSD Formation and Stabilization of Newly Formed Spines in Hippocampal Slice Cultures. *Cereb Cortex*.
- Dent EW, Gertler FB (2003) Cytoskeletal dynamics and transport in growth cone motility and axon guidance. *Neuron* 40:209-227.
- Dharmawardhane S, Sanders LC, Martin SS, Daniels RH, Bokoch GM (1997) Localization of p21-activated kinase 1 (PAK1) to pinocytotic vesicles and cortical actin structures in stimulated cells. *J Cell Biol* 138:1265-1278.
- Dillon C, Goda Y (2005) The actin cytoskeleton: integrating form and function at the synapse. *Annu Rev Neurosci* 28:25-55.
- Donnai D, Karmiloff-Smith A (2000) Williams syndrome: from genotype through to the cognitive phenotype. *Am J Med Genet* 97:164-171.
- Dosemeci A, Makusky AJ, Jankowska-Stephens E, Yang X, Slotta DJ, Markey SP (2007) Composition of the Synaptic PSD-95 Complex. *Mol Cell Proteomics* 6:1749-1760.
- Durand CM, Betancur C, Boeckers TM, Bockmann J, Chaste P, Fauchereau F, Nygren G, Rastam M, Gillberg IC, Anckarsater H, Sponheim E, Goubran-Botros H, Delorme R, Chabane N, Mouren-Simeoni MC, de Mas P, Bieth E, Roge B, Heron D, Burglen L, Gillberg C, Leboyer M, Bourgeron T (2007) Mutations in the gene encoding the synaptic scaffolding protein SHANK3 are associated with autism spectrum disorders. *Nat Genet* 39:25-27.
- Edwards DC, Sanders LC, Bokoch GM, Gill GN (1999) Activation of LIM-kinase by Pak1 couples Rac/Cdc42 GTPase signalling to actin cytoskeletal dynamics. *Nat Cell Biol* 1:253-259.
- El-Husseini AE, Schnell E, Chetkovich DM, Nicoll RA, Brecht DS (2000) PSD-95 involvement in maturation of excitatory synapses. *Science* 290:1364-1368.
- Etienne-Manneville S (2004) Actin and microtubules in cell motility: which one is in control? *Traffic* 5:470-477.
- Fan X, Labrador JP, Hing H, Bashaw GJ (2003) Slit stimulation recruits Dock and Pak to the roundabout receptor and increases Rac activity to regulate axon repulsion at the CNS midline. *Neuron* 40:113-127.
- Feng Q, Albeck JG, Cerione RA, Yang W (2002) Regulation of the Cool/Pix proteins: key binding partners of the Cdc42/Rac targets, the p21-activated kinases. *J Biol Chem* 277:5644-5650.
- Feng Y, Walsh CA (2004) The many faces of filamin: a versatile molecular scaffold for cell motility and signalling. *Nat Cell Biol* 6:1034-1038.
- Fiala JC, Feinberg M, Popov V, Harris KM (1998) Synaptogenesis via dendritic filopodia in developing hippocampal area CA1. *J Neurosci* 18:8900-8911.
- Fiala JC, Spacek J, Harris KM (2002) Dendritic spine pathology: cause or consequence of neurological disorders? *Brain Res Brain Res Rev* 39:29-54.
- Fischer M, Kaech S, Knutti D, Matus A (1998) Rapid actin-based plasticity in dendritic spines. *Neuron* 20:847-854.
- Frints SG, Froyen G, Marynen P, Fryns JP (2002) X-linked mental retardation: vanishing boundaries between non-specific (MRX) and syndromic (MRXS) forms. *Clin Genet* 62:423-432.

- Frost JA, Khokhlatchev A, Stippec S, White MA, Cobb MH (1998) Differential effects of PAK1-activating mutations reveal activity-dependent and -independent effects on cytoskeletal regulation. *J Biol Chem* 273:28191-28198.
- Frost JA, Swantek JL, Stippec S, Yin MJ, Gaynor R, Cobb MH (2000) Stimulation of NFkappa B activity by multiple signaling pathways requires PAK1. *J Biol Chem* 275:19693-19699.
- Fu WY, Chen Y, Sahin M, Zhao XS, Shi L, Bikoff JB, Lai KO, Yung WH, Fu AK, Greenberg ME, Ip NY (2007) Cdk5 regulates EphA4-mediated dendritic spine retraction through an ephexin1-dependent mechanism. *Nat Neurosci* 10:67-76.
- Fukazawa Y, Saitoh Y, Ozawa F, Ohta Y, Mizuno K, Inokuchi K (2003) Hippocampal LTP is accompanied by enhanced F-actin content within the dendritic spine that is essential for late LTP maintenance in vivo. *Neuron* 38:447-460.
- Gecz J, Gedeon AK, Sutherland GR, Mulley JC (1996) Identification of the gene FMR2, associated with FRAXE mental retardation. *Nat Genet* 13:105-108.
- Gedeon AK, Nelson J, Gecz J, Mulley JC (2003) X-linked mild non-syndromic mental retardation with neuropsychiatric problems and the missense mutation A365E in PAK3. *Am J Med Genet A* 120:509-517.
- Giniger E (2002) How do Rho family GTPases direct axon growth and guidance? A proposal relating signaling pathways to growth cone mechanics. *Differentiation* 70:385-396.
- Govek EE, Newey SE, Akerman CJ, Cross JR, Van der Veken L, Van Aelst L (2004) The X-linked mental retardation protein oligophrenin-1 is required for dendritic spine morphogenesis. *Nat Neurosci* 7:364-372.
- Govek EE, Newey SE, Van Aelst L (2005) The role of the Rho GTPases in neuronal development. *Genes Dev* 19:1-49.
- Greenman C, Stephens P, Smith R, Dalgliesh GL, Hunter C, Bignell G, Davies H, Teague J, Butler A, Stevens C, Edkins S, O'Meara S, Vastrik I, Schmidt EE, Avis T, Barthorpe S, Bhamra G, Buck G, Choudhury B, Clements J, Cole J, Dicks E, Forbes S, Gray K, Halliday K, Harrison R, Hills K, Hinton J, Jenkinson A, Jones D, Menzies A, Mironenko T, Perry J, Raine K, Richardson D, Shepherd R, Small A, Tofts C, Varian J, Webb T, West S, Widaa S, Yates A, Cahill DP, Louis DN, Goldstraw P, Nicholson AG, Brasseur F, Looijenga L, Weber BL, Chiew YE, DeFazio A, Greaves MF, Green AR, Campbell P, Birney E, Easton DF, Chenevix-Trench G, Tan MH, Khoo SK, Teh BT, Yuen ST, Leung SY, Wooster R, Futreal PA, Stratton MR (2007) Patterns of somatic mutation in human cancer genomes. *Nature* 446:153-158.
- Guillemot F (2007) Cortical Interneurons Refuse to Follow the PAK. *Neuron* 54:845-847.
- Gururaj AE, Rayala SK, Kumar R (2005) p21-activated kinase signaling in breast cancer. *Breast Cancer Res* 7:5-12.
- Hall A (1998) Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* 279:509-514.
- Hall A (2005) Rho GTPases and the control of cell behaviour. *Biochem Soc Trans* 33:891-895.
- Hanks SK (2003) Genomic analysis of the eukaryotic protein kinase superfamily: a perspective. *Genome Biol* 4:111.
- Hashimoto S, Tsubouchi A, Mazaki Y, Sabe H (2001) Interaction of paxillin with p21-activated Kinase (PAK). Association of paxillin alpha with the kinase-inactive and the Cdc42-activated forms of PAK3. *J Biol Chem* 276:6037-6045.

- Hay N, Sonenberg N (2004) Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev* 18:1926-1945.
- Hayashi ML, Choi SY, Rao BS, Jung HY, Lee HK, Zhang D, Chattarji S, Kirkwood A, Tonegawa S (2004) Altered cortical synaptic morphology and impaired memory consolidation in forebrain-specific dominant-negative PAK transgenic mice. *Neuron* 42:773-787.
- Hayashi ML, Rao BS, Seo JS, Choi HS, Dolan BM, Choi SY, Chattarji S, Tonegawa S (2007) Inhibition of p21-activated kinase rescues symptoms of fragile X syndrome in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:11489-11494.
- Henkemeyer M, Itkis OS, Ngo M, Hickmott PW, Ethell IM (2003) Multiple EphB receptor tyrosine kinases shape dendritic spines in the hippocampus. *J Cell Biol* 163:1313-1326.
- Hillman MA, Gecz J (2001) Fragile XE-associated familial mental retardation protein 2 (FMR2) acts as a potent transcription activator. *J Hum Genet* 46:251-259.
- Hing H, Xiao J, Harden N, Lim L, Zipursky SL (1999) Pak functions downstream of Dock to regulate photoreceptor axon guidance in *Drosophila*. *Cell* 97:853-863.
- Hoefen RJ, Berk BC (2006) The multifunctional GIT family of proteins. *J Cell Sci* 119:1469-1475.
- Hofmann C, Shepelev M, Chernoff J (2004) The genetics of Pak. *J Cell Sci* 117:4343-4354.
- Irie F, Yamaguchi Y (2002) EphB receptors regulate dendritic spine development via intersectin, Cdc42 and N-WASP. *Nat Neurosci* 5:1117-1118.
- Ishikawa Y, Katoh H, Negishi M (2003) A role of Rnd1 GTPase in dendritic spine formation in hippocampal neurons. *J Neurosci* 23:11065-11072.
- Jacobsen JS, Wu CC, Redwine JM, Comery TA, Arias R, Bowlby M, Martone R, Morrison JH, Pangalos MN, Reinhart PH, Bloom FE (2006) Early-onset behavioral and synaptic deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:5161-5166.
- Jaffer ZM, Chernoff J (2002) p21-Activated kinases: three more join the Pak. *Int J Biochem Cell Biol* 34:713-717.
- Jaskolski F, Martin S, Henley JM (2007) Retaining Synaptic AMPARs. *Neuron* 55:825-827.
- Johannessen M, Delghandi MP, Moens U (2004) What turns CREB on? *Cell Signal* 16:1211-1227.
- Johnson OL, Ouimet CC (2006) A regulatory role for actin in dendritic spine proliferation. *Brain Res* 1113:1-9.
- Jung ID, Lee J, Lee KB, Park CG, Kim YK, Seo DW, Park D, Lee HW, Han JW, Lee HY (2004) Activation of p21-activated kinase 1 is required for lysophosphatidic acid-induced focal adhesion kinase phosphorylation and cell motility in human melanoma A2058 cells. *Eur J Biochem* 271:1557-1565.
- Jung JH, Traugh JA (2005) Regulation of the interaction of Pak2 with Cdc42 via autophosphorylation of serine 141. *J Biol Chem* 280:40025-40031.
- Kandel ER (2001) The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. *Science* 294:1030-1038.
- Kasai H, Matsuzaki M, Noguchi J, Yasumatsu N, Nakahara H (2003) Structure-stability-function relationships of dendritic spines. *Trends Neurosci* 26:360-368.

- Kauselmann G, Weiler M, Wulff P, Jessberger S, Konietzko U, Scafidi J, Staubli U, Bereiter-Hahn J, Strebhardt K, Kuhl D (1999) The polo-like protein kinases Fnk and Snk associate with a Ca(2+)- and integrin-binding protein and are regulated dynamically with synaptic plasticity. *Embo J* 18:5528-5539.
- Khelifaoui M, Denis C, van Galen E, de Bock F, Schmitt A, Houbron C, Morice E, Giros B, Ramakers G, Fagni L, Chelly J, Nosten-Bertrand M, Billuart P (2007) Loss of X-linked mental retardation gene oligophrenin1 in mice impairs spatial memory and leads to ventricular enlargement and dendritic spine immaturity. *J Neurosci* 27:9439-9450.
- Kim T, Park D (2001) Molecular cloning and characterization of a novel mouse betaPix isoform. *Mol Cells* 11:89-94.
- Kim S, Lee SH, Park D (2001) Leucine zipper-mediated homodimerization of the p21-activated kinase-interacting factor, beta Pix. Implication for a role in cytoskeletal reorganization. *J Biol Chem* 276:10581-10584.
- Kim K, Hou P, Gorski JL, Cooper JA (2004) Effect of Fgd1 on cortactin in Arp2/3 complex-mediated actin assembly. *Biochemistry* 43:2422-2427.
- Kim E, Sheng M (2004) PDZ domain proteins of synapses. *Nat Rev Neurosci* 5:771-781.
- Kim Y, Sung JY, Ceglia I, Lee KW, Ahn JH, Halford JM, Kim AM, Kwak SP, Park JB, Ho Ryu S, Schenck A, Bardoni B, Scott JD, Nairn AC, Greengard P (2006) Phosphorylation of WAVE1 regulates actin polymerization and dendritic spine morphology. *Nature* 442:814-817.
- King CC, Gardiner EM, Zenke FT, Bohl BP, Newton AC, Hemmings BA, Bokoch GM (2000) p21-activated kinase (PAK1) is phosphorylated and activated by 3-phosphoinositide-dependent kinase-1 (PDK1). *J Biol Chem* 275:41201-41209.
- Kiosses WB, Daniels RH, Otey C, Bokoch GM, Schwartz MA (1999) A role for p21-activated kinase in endothelial cell migration. *J Cell Biol* 147:831-844.
- Knaus UG, Wang Y, Reilly AM, Warnock D, Jackson JH (1998) Structural requirements for PAK activation by Rac GTPases. *J Biol Chem* 273:21512-21518.
- Koh CG, Manser E, Zhao ZS, Ng CP, Lim L (2001) BetaPIX, the PAK-interacting exchange factor, requires localization via a coiled-coil region to promote microvillus-like structures and membrane ruffles. *J Cell Sci* 114:4239-4251.
- Kohn M, Kehrer-Sawatzki H, Steinbach P, Marshall Graves JA, Hameister H (2007) Recruitment of old genes to new functions: evidences obtained by comparing the orthologues of human XLMR genes in mouse and chicken. *Cytogenet Genome Res* 116:173-180.
- Kreis P, Thevenot E, Rousseau V, Boda B, Muller D, Barnier JV (2007) The p21-activated kinase 3 implicated in mental retardation regulates spine morphogenesis through a Cdc42-dependent pathway. *J Biol Chem* 282:21497-21506.
- Krugmann S, Jordens I, Gevaert K, Driessens M, Vandekerckhove J, Hall A (2001) Cdc42 induces filopodia by promoting the formation of an IRSp53:Mena complex. *Curr Biol* 11:1645-1655.
- Kumar R, Gururaj AE, Barnes CJ (2006) p21-activated kinases in cancer. *Nat Rev Cancer* 6:459-471.
- Kutsche K, Yntema H, Brandt A, Jantke I, Nothwang HG, Orth U, Boavida MG, David D, Chelly J, Fryns JP, Moraine C, Ropers HH, Hamel BC, van Bokhoven H, Gal A (2000) Mutations in ARHGEF6, encoding a guanine nucleotide exchange factor for Rho GTPases, in patients with X-linked mental retardation. *Nat Genet* 26:247-250.
- Lamprecht R, LeDoux J (2004) Structural plasticity and memory. *Nat Rev Neurosci* 5:45-54.

- Laumonier F, Bonnet-Brilhault F, Gomot M, Blanc R, David A, Moizard MP, Raynaud M, Ronce N, Lemonnier E, Calvas P, Laudier B, Chelly J, Fryns JP, Ropers HH, Hamel BC, Andres C, Barthelemy C, Moraine C, Briault S (2004) X-linked mental retardation and autism are associated with a mutation in the NLGN4 gene, a member of the neuroligin family. *Am J Hum Genet* 74:552-557.
- Lebel RR, May M, Pouls S, Lubs HA, Stevenson RE, Schwartz CE (2002) Non-syndromic X-linked mental retardation associated with a missense mutation (P312L) in the FGD1 gene. *Clin Genet* 61:139-145.
- Lei M, Lu W, Meng W, Parrini MC, Eck MJ, Mayer BJ, Harrison SC (2000) Structure of PAK1 in an autoinhibited conformation reveals a multistage activation switch. *Cell* 102:387-397.
- Levinson JN, El-Husseini A (2005) New players tip the scales in the balance between excitatory and inhibitory synapses. *Mol Pain* 1:12.
- Li F, Adam L, Vadlamudi RK, Zhou H, Sen S, Chernoff J, Mandal M, Kumar R (2002) p21-activated kinase 1 interacts with and phosphorylates histone H3 in breast cancer cells. *EMBO Rep* 3:767-773.
- Li Z, Hannigan M, Mo Z, Liu B, Lu W, Wu Y, Smrcka AV, Wu G, Li L, Liu M, Huang CK, Wu D (2003) Directional sensing requires G beta gamma-mediated PAK1 and PIX alpha-dependent activation of Cdc42. *Cell* 114:215-227.
- Li X, Minden A (2003) Targeted Disruption of the Gene for the PAK5 Kinase in Mice. *Mol Cell Biol* 23:7134-7142.
- Li W, Guan KL (2004) The Down syndrome cell adhesion molecule (DSCAM) interacts with and activates Pak. *J Biol Chem* 279:32824-32831.
- Li B, Woo RS, Mei L, Malinow R (2007) The neuregulin-1 receptor erbB4 controls glutamatergic synapse maturation and plasticity. *Neuron* 54:583-597.
- Licatalosi DD, Darnell RB (2006) Splicing regulation in neurologic disease. *Neuron* 52:93-101.
- Lipscombe D (2005) Neuronal proteins custom designed by alternative splicing. *Curr Opin Neurobiol* 15:358-363.
- Lonze BE, Ginty DD (2002) Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system. *Neuron* 35:605-623.
- Lu W, Man H, Ju W, Trimble WS, MacDonald JF, Wang YT (2001) Activation of synaptic NMDA receptors induces membrane insertion of new AMPA receptors and LTP in cultured hippocampal neurons. *Neuron* 29:243-254.
- Lu R, Wang H, Liang Z, Ku L, O'Donnell W T, Li W, Warren ST, Feng Y (2004) The fragile X protein controls microtubule-associated protein 1B translation and microtubule stability in brain neuron development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:15201-15206.
- Lu J, Helton TD, Blanpied TA, Racz B, Newpher TM, Weinberg RJ, Ehlers MD (2007) Postsynaptic positioning of endocytic zones and AMPA receptor cycling by physical coupling of dynamin-3 to homer. *Neuron* 55:874-889.
- Luo L, Hensch TK, Ackerman L, Barbel S, Jan LY, Jan YN (1996) Differential effects of the Rac GTPase on Purkinje cell axons and dendritic trunks and spines. *Nature* 379:837-840.
- Luo L (2000) Rho GTPases in neuronal morphogenesis. *Nat Rev Neurosci* 1:173-180.

- Luo L (2002) Actin cytoskeleton regulation in neuronal morphogenesis and structural plasticity. *Annu Rev Cell Dev Biol* 18:601-635.
- Malenka RC, Bear MF (2004) LTP and LTD: an embarrassment of riches. *Neuron* 44:5-21.
- Mandel JL, Chelly J (2004) Monogenic X-linked mental retardation: is it as frequent as currently estimated? The paradox of the ARX (Aristaless X) mutations. *Eur J Hum Genet* 12:689-693.
- Manser E, Huang HY, Loo TH, Chen XQ, Dong JM, Leung T, Lim L (1997) Expression of constitutively active alpha-PAK reveals effects of the kinase on actin and focal complexes. *Mol Cell Biol* 17:1129-1143.
- Manser E, Loo TH, Koh CG, Zhao ZS, Chen XQ, Tan L, Tan I, Leung T, Lim L (1998) PAK kinases are directly coupled to the PIX family of nucleotide exchange factors. *Mol Cell* 1:183-192.
- Marie-Claire C, Salzmann J, David A, Courtin C, Canestrelli C, Noble F (2007) Rnd family genes are differentially regulated by 3,4-methylenedioxymethamphetamine and cocaine acute treatment in mice brain. *Brain Res* 1134:12-17.
- Martin KC, Zukin RS (2006) RNA trafficking and local protein synthesis in dendrites: an overview. *J Neurosci* 26:7131-7134.
- Massey PV, Bashir ZI (2007) Long-term depression: multiple forms and implications for brain function. *Trends Neurosci* 30:176-184.
- Matus A, Ackermann M, Pehling G, Byers HR, Fujiwara K (1982) High actin concentrations in brain dendritic spines and postsynaptic densities. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79:7590-7594.
- McPhie DL, Coopersmith R, Hines-Peralta A, Chen Y, Ivins KJ, Manly SP, Kozlowski MR, Neve KA, Neve RL (2003) DNA synthesis and neuronal apoptosis caused by familial Alzheimer disease mutants of the amyloid precursor protein are mediated by the p21 activated kinase PAK3. *J Neurosci* 23:6914-6927.
- Meng Y, Zhang Y, Tregoubov V, Janus C, Cruz L, Jackson M, Lu WY, MacDonald JF, Wang JY, Falls DL, Jia Z (2002) Abnormal spine morphology and enhanced LTP in LIMK-1 knockout mice. *Neuron* 35:121-133.
- Meng J, Meng Y, Hanna A, Janus C, Jia Z (2005) Abnormal long-lasting synaptic plasticity and cognition in mice lacking the mental retardation gene Pak3. *J Neurosci* 25:6641-6650.
- Miki H, Miura K, Takenawa T (1996) N-WASP, a novel actin-depolymerizing protein, regulates the cortical cytoskeletal rearrangement in a PIP2-dependent manner downstream of tyrosine kinases. *Embo J* 15:5326-5335.
- Moeller ML, Shi Y, Reichardt LF, Ethell IM (2006) EphB receptors regulate dendritic spine morphogenesis through the recruitment/phosphorylation of focal adhesion kinase and RhoA activation. *J Biol Chem* 281:1587-1598.
- Molinari F, Rio M, Meskenaite V, Encha-Razavi F, Auge J, Bacq D, Briault S, Vekemans M, Munnich A, Attie-Bitach T, Sonderegger P, Colleaux L (2002) Truncating neurotropsin mutation in autosomal recessive nonsyndromic mental retardation. *Science* 298:1779-1781.
- Murai KK, Nguyen LN, Irie F, Yamaguchi Y, Pasquale EB (2003) Control of hippocampal dendritic spine morphology through ephrin-A3/EphA4 signaling. *Nat Neurosci* 6:153-160.
- Nakayama AY, Harms MB, Luo L (2000) Small GTPases Rac and Rho in the maintenance of dendritic spines and branches in hippocampal pyramidal neurons. *J Neurosci* 20:5329-5338.

- Nayal A, Webb DJ, Brown CM, Schaefer EM, Vicente-Manzanares M, Horwitz AR (2006) Paxillin phosphorylation at Ser273 localizes a GIT1-PIX-PAK complex and regulates adhesion and protrusion dynamics. *J Cell Biol* 173:587-589.
- Neudauer CL, Joberty G, Tatsis N, Macara IG (1998) Distinct cellular effects and interactions of the Rho-family GTPase TC10. *Curr Biol* 8:1151-1160.
- Niihori T, Aoki Y, Narumi Y, Neri G, Cave H, Verloes A, Okamoto N, Hennekam RC, Gillessen-Kaesbach G, Wieczorek D, Kavamura MI, Kurosawa K, Ohashi H, Wilson L, Heron D, Bonneau D, Corona G, Kaname T, Naritomi K, Baumann C, Matsumoto N, Kato K, Kure S, Matsubara Y (2006) Germline KRAS and BRAF mutations in cardio-facio-cutaneous syndrome. *Nat Genet* 38:294-296.
- Nikolic M, Chou MM, Lu W, Mayer BJ, Tsai LH (1998) The p35/Cdk5 kinase is a neuron-specific Rac effector that inhibits Pak1 activity. *Nature* 395:194-198.
- Nobes CD, Lauritzen I, Mattei MG, Paris S, Hall A, Chardin P (1998) A new member of the Rho family, Rnd1, promotes disassembly of actin filament structures and loss of cell adhesion. *J Cell Biol* 141:187-197.
- Node-Langlois R, Muller D, Boda B (2006) Sequential implication of the mental retardation proteins ARHGEF6 and PAK3 in spine morphogenesis. *J Cell Sci* 119:4986-4993.
- Ong WY, Wang XS, Manser E (2002) Differential distribution of alpha and beta isoforms of p21-activated kinase in the monkey cerebral neocortex and hippocampus. *Exp Brain Res* 144:189-199.
- Oostra BA, Chiurazzi P (2001) The fragile X gene and its function. *Clin Genet* 60:399-408.
- Ortutay C, Valiaho J, Stenberg K, Vihinen M (2005) KinMutBase: a registry of disease-causing mutations in protein kinase domains. *Hum Mutat* 25:435-442.
- Ouyang Y, Rosenstein A, Kreiman G, Schuman EM, Kennedy MB (1999) Tetanic stimulation leads to increased accumulation of Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase II via dendritic protein synthesis in hippocampal neurons. *J Neurosci* 19:7823-7833.
- Paavilainen VO, Bertling E, Falck S, Lappalainen P (2004) Regulation of cytoskeletal dynamics by actin-monomer-binding proteins. *Trends Cell Biol* 14:386-394.
- Pak DT, Yang S, Rudolph-Correia S, Kim E, Sheng M (2001) Regulation of dendritic spine morphology by SPAR, a PSD-95-associated RapGAP. *Neuron* 31:289-303.
- Pak DT, Sheng M (2003) Targeted protein degradation and synapse remodeling by an inducible protein kinase. *Science* 302:1368-1373.
- Paris S, Longhi R, Santambrogio P, de Curtis I (2003) Leucine-zipper-mediated homo- and hetero-dimerization of GIT family p95-ARF GTPase-activating protein, PIX-, paxillin-interacting proteins 1 and 2. *Biochem J* 372:391-398.
- Park E, Na M, Choi J, Kim S, Lee JR, Yoon J, Park D, Sheng M, Kim E (2003) The Shank family of postsynaptic density proteins interacts with and promotes synaptic accumulation of the beta PIX guanine nucleotide exchange factor for Rac1 and Cdc42. *J Biol Chem* 278:19220-19229.
- Parrini MC, Lei M, Harrison SC, Mayer BJ (2002) Pak1 kinase homodimers are autoinhibited in trans and dissociated upon activation by Cdc42 and Rac1. *Mol Cell* 9:73-83.
- Pasteris NG, Cadle A, Logie LJ, Porteous ME, Schwartz CE, Stevenson RE, Glover TW, Wilroy RS, Gorski JL (1994) Isolation and characterization of the faciogenital dysplasia (Aarskog-Scott syndrome) gene: a putative Rho/Rac guanine nucleotide exchange factor. *Cell* 79:669-678.

- Peippo M, Koivisto AM, Sarkamo T, Sipponen M, von Koskull H, Ylisaukko-Oja T, Rehnstrom K, Froyen G, Ignatius J, Jarvela I (2007) PAK3 related mental disability: Further characterization of the phenotype. *Am J Med Genet A* 143:2406-2416.
- Penzes P, Beeser A, Chernoff J, Schiller MR, Eipper BA, Mains RE, Haganir RL (2003) Rapid induction of dendritic spine morphogenesis by trans-synaptic ephrinB-EphB receptor activation of the Rho-GEF kalirin. *Neuron* 37:263-274.
- Pfeiffer BE, Huber KM (2006) Current advances in local protein synthesis and synaptic plasticity. *J Neurosci* 26:7147-7150.
- Pilpel Y, Segal M (2005) Rapid WAVE dynamics in dendritic spines of cultured hippocampal neurons is mediated by actin polymerization. *J Neurochem* 95:1401-1410.
- Poea-Guyon S, Amar M, Fossier P, Morel N (2006) Alternative splicing controls neuronal expression of v-ATPase subunit a1 and sorting to nerve terminals. *J Biol Chem* 281:17164-17172.
- Purpura DP (1974) Dendritic spine "dysgenesis" and mental retardation. *Science* 186:1126-1128.
- Qu J, Li X, Novitch BG, Zheng Y, Kohn M, Xie JM, Kozinn S, Bronson R, Beg AA, Minden A (2003) PAK4 kinase is essential for embryonic viability and for proper neuronal development. *Mol Cell Biol* 23:7122-7133.
- Racz B, Blanpied TA, Ehlers MD, Weinberg RJ (2004) Lateral organization of endocytic machinery in dendritic spines. *Nat Neurosci* 7:917-918.
- Ramakers GJ (2002) Rho proteins, mental retardation and the cellular basis of cognition. *Trends Neurosci* 25:191-199.
- Raymond FL, Tarpey P (2006) The genetics of mental retardation. *Hum Mol Genet* 15 Spec No 2:R110-116.
- Regala RP, Weems C, Jamieson L, Khor A, Edell ES, Lohse CM, Fields AP (2005) Atypical protein kinase C iota is an oncogene in human non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 65:8905-8911.
- Renieri A, Pescucci C, Longo I, Ariani F, Mari F, Meloni I (2005) Non-syndromic X-linked mental retardation: from a molecular to a clinical point of view. *J Cell Physiol* 204:8-20.
- Rex CS, Lin CY, Kramar EA, Chen LY, Gall CM, Lynch G (2007) Brain-derived neurotrophic factor promotes long-term potentiation-related cytoskeletal changes in adult hippocampus. *J Neurosci* 27:3017-3029.
- Rodriguez-Viciano P, Tetsu O, Tidyman WE, Estep AL, Conger BA, Cruz MS, McCormick F, Rauen KA (2006) Germline mutations in genes within the MAPK pathway cause cardio-facio-cutaneous syndrome. *Science* 311:1287-1290.
- Ropers HH, Hamel BC (2005) X-linked mental retardation. *Nat Rev Genet* 6:46-57.
- Rousseau V, Goupille O, Morin N, Barnier JV (2003) A new constitutively active brain PAK3 isoform displays modified specificities toward Rac and Cdc42 GTPases. *J Biol Chem* 278:3912-3920.
- Roussignol G, Ango F, Romorini S, Tu JC, Sala C, Worley PF, Bockaert J, Fagni L (2005) Shank expression is sufficient to induce functional dendritic spine synapses in aspiny neurons. *J Neurosci* 25:3560-3570.
- Rudel T, Bokoch GM (1997) Membrane and morphological changes in apoptotic cells regulated by caspase-mediated activation of PAK2. *Science* 276:1571-1574.

Santos Da Silva J, Schubert V, Dotti CG (2004) RhoA, Rac1, and cdc42 intracellular distribution shift during hippocampal neuron development. *Mol Cell Neurosci* 27:1-7.

Schaller MD (2001) Paxillin: a focal adhesion-associated adaptor protein. *Oncogene* 20:6459-6472.

Schurmann A, Mooney AF, Sanders LC, Sells MA, Wang HG, Reed JC, Bokoch GM (2000) p21-activated kinase 1 phosphorylates the death agonist bad and protects cells from apoptosis. *Mol Cell Biol* 20:453-461.

Scott EK, Reuter JE, Luo L (2003) Small GTPase Cdc42 is required for multiple aspects of dendritic morphogenesis. *J Neurosci* 23:3118-3123.

Sells MA, Knaus UG, Bagrodia S, Ambrose DM, Bokoch GM, Chernoff J (1997) Human p21-activated kinase (Pak1) regulates actin organization in mammalian cells. *Curr Biol* 7:202-210.

Sells MA, Pfaff A, Chernoff J (2000) Temporal and spatial distribution of activated Pak1 in fibroblasts. *J Cell Biol* 151:1449-1458.

Shamah SM, Lin MZ, Goldberg JL, Estrach S, Sahin M, Hu L, Bazalakova M, Neve RL, Corfas G, Debant A, Greenberg ME (2001) EphA receptors regulate growth cone dynamics through the novel guanine nucleotide exchange factor ephexin. *Cell* 105:233-244.

Shiraishi-Yamaguchi Y, Furuichi T (2007) The Homer family proteins. *Genome Biol* 8:206.

Singh RR, Song C, Yang Z, Kumar R (2005) Nuclear localization and chromatin targets of p21-activated kinase 1. *J Biol Chem* 280:18130-18137.

Souopgui J, Solter M, Pieler T (2002) XPak3 promotes cell cycle withdrawal during primary neurogenesis in *Xenopus laevis*. *Embo J* 21:6429-6439.

Srebrow A, Kornblihtt AR (2006) The connection between splicing and cancer. *J Cell Sci* 119:2635-2641.

Steward O, Levy WB (1982) Preferential localization of polyribosomes under the base of dendritic spines in granule cells of the dentate gyrus. *J Neurosci* 2:284-291.

Stradal TE, Rottner K, Disanza A, Confalonieri S, Innocenti M, Scita G (2004) Regulation of actin dynamics by WASP and WAVE family proteins. *Trends Cell Biol* 14:303-311.

Suetsugu S, Miki H, Takenawa T (1999) Identification of two human WAVE/SCAR homologues as general actin regulatory molecules which associate with the Arp2/3 complex. *Biochem Biophys Res Commun* 260:296-302.

Sugayama SM, Moises RL, Wagenfur J, Ikari NM, Abe KT, Leone C, da Silva CA, Lopes Ferrari Chauffaille Mde L, Kim CA (2003) Williams-Beuren syndrome: cardiovascular abnormalities in 20 patients diagnosed with fluorescence in situ hybridization. *Arq Bras Cardiol* 81:462-473.

Tada T, Sheng M (2006) Molecular mechanisms of dendritic spine morphogenesis. *Curr Opin Neurobiol* 16:95-101.

Takenawa T, Suetsugu S (2007) The WASP-WAVE protein network: connecting the membrane to the cytoskeleton. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:37-48.

Tang Y, Chen Z, Ambrose D, Liu J, Gibbs JB, Chernoff J, Field J (1997) Kinase-deficient Pak1 mutants inhibit Ras transformation of Rat-1 fibroblasts. *Mol Cell Biol* 17:4454-4464.

- Tao W, Pennica D, Xu L, Kalejta RF, Levine AJ (2001) Wrch-1, a novel member of the Rho gene family that is regulated by Wnt-1. *Genes Dev* 15:1796-1807.
- Tarpey P, Parnau J, Blow M, Woffendin H, Bignell G, Cox C, Cox J, Davies H, Edkins S, Holden S, Kornly A, Mallya U, Moon J, O'Meara S, Parker A, Stephens P, Stevens C, Teague J, Donnelly A, Mangelsdorf M, Mulley J, Partington M, Turner G, Stevenson R, Schwartz C, Young I, Easton D, Bobrow M, Futreal PA, Stratton MR, Gecz J, Wooster R, Raymond FL (2004) Mutations in the DLG3 gene cause nonsyndromic X-linked mental retardation. *Am J Hum Genet* 75:318-324.
- Tashiro A, Minden A, Yuste R (2000) Regulation of dendritic spine morphology by the rho family of small GTPases: antagonistic roles of Rac and Rho. *Cereb Cortex* 10:927-938.
- Tashiro A, Yuste R (2004) Regulation of dendritic spine motility and stability by Rac1 and Rho kinase: evidence for two forms of spine motility. *Mol Cell Neurosci* 26:429-440.
- Thomas GM, Huganir RL (2004) MAPK cascade signalling and synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci* 5:173-183.
- Thomas GM, Rumbaugh GR, Harrar DB, Huganir RL (2005) Ribosomal S6 kinase 2 interacts with and phosphorylates PDZ domain-containing proteins and regulates AMPA receptor transmission. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:15006-15011.
- Thullberg M, Gad A, Beeser A, Chernoff J, Stromblad S (2007) The kinase-inhibitory domain of p21-activated kinase 1 (PAK1) inhibits cell cycle progression independent of PAK1 kinase activity. *Oncogene* 26:1820-1828.
- Tolias KF, Bikoff JB, Burette A, Paradis S, Harrar D, Tavazoie S, Weinberg RJ, Greenberg ME (2005) The Rac1-GEF Tiam1 couples the NMDA receptor to the activity-dependent development of dendritic arbors and spines. *Neuron* 45:525-538.
- Tsokas P, Grace EA, Chan P, Ma T, Sealfon SC, Iyengar R, Landau EM, Blitzer RD (2005) Local protein synthesis mediates a rapid increase in dendritic elongation factor 1A after induction of late long-term potentiation. *J Neurosci* 25:5833-5843.
- Tu H, Wigler M (1999) Genetic evidence for Pak1 autoinhibition and its release by Cdc42. *Mol Cell Biol* 19:602-611.
- Ule J, Darnell RB (2006) RNA binding proteins and the regulation of neuronal synaptic plasticity. *Curr Opin Neurobiol* 16:102-110.
- Vadlamudi RK, Li F, Adam L, Nguyen D, Ohta Y, Stossel TP, Kumar R (2002) Filamin is essential in actin cytoskeletal assembly mediated by p21-activated kinase 1. *Nat Cell Biol* 4:681-690.
- Vadlamudi RK, Manavathi B, Singh RR, Nguyen D, Li F, Kumar R (2005) An essential role of Pak1 phosphorylation of SHARP in Notch signaling. *Oncogene* 24:4591-4596.
- Vazquez LE, Chen HJ, Sokolova I, Knuesel I, Kennedy MB (2004) SynGAP regulates spine formation. *J Neurosci* 24:8862-8872.
- Vignal E, De Toledo M, Comunale F, Ladopoulou A, Gauthier-Rouviere C, Blangy A, Fort P (2000) Characterization of TCL, a new GTPase of the rho family related to TC10 and Cdc42. *J Biol Chem* 275:36457-36464.
- Vikis HG, Li W, Guan KL (2002) The plexin-B1/Rac interaction inhibits PAK activation and enhances Sema4D ligand binding. *Genes Dev* 16:836-845.

- Wolf D, Witte V, Laffert B, Blume K, Stromer E, Trapp S, d'Aloja P, Schurmann A, Baur AS (2001) HIV-1 Nef associated PAK and PI3-kinases stimulate Akt-independent Bad- phosphorylation to induce anti-apoptotic signals. *Nat Med* 7:1217-1224.
- Wu H, Zhou Y, Xiong ZQ (2007) Transducer of regulated CREB and late phase long-term synaptic potentiation. *Febs J* 274:3218-3223.
- Xiao GH, Beeser A, Chernoff J, Testa JR (2002) p21-activated kinase links Rac/Cdc42 signaling to merlin. *J Biol Chem* 277:883-886.
- Yeo G, Holste D, Kreiman G, Burge CB (2004) Variation in alternative splicing across human tissues. *Genome Biol* 5:R74.
- Yuste R, Bonhoeffer T (2004) Genesis of dendritic spines: insights from ultrastructural and imaging studies. *Nat Rev Neurosci* 5:24-34.
- Zanni G, Saillour Y, Nagara M, Billuart P, Castelneau L, Moraine C, Faivre L, Bertini E, Durr A, Guichet A, Rodriguez D, des Portes V, Beldjord C, Chelly J (2005) Oligophrenin 1 mutations frequently cause X-linked mental retardation with cerebellar hypoplasia. *Neurology* 65:1364-1369.
- Zechner U, Wilda M, Kehrer-Sawatzki H, Vogel W, Fundele R, Hameister H (2001) A high density of X-linked genes for general cognitive ability: a run-away process shaping human evolution? *Trends Genet* 17:697-701.
- Zenke FT, King CC, Bohl BP, Bokoch GM (1999) Identification of a central phosphorylation site in p21-activated kinase regulating autoinhibition and kinase activity. *J Biol Chem* 274:32565-32573.
- Zhang H, Webb DJ, Asmussen H, Horwitz AF (2003) Synapse formation is regulated by the signaling adaptor GIT1. *J Cell Biol* 161:131-142.
- Zhang H, Webb DJ, Asmussen H, Niu S, Horwitz AF (2005) A GIT1/PIX/Rac/PAK signaling module regulates spine morphogenesis and synapse formation through MLC. *J Neurosci* 25:3379-3388.
- Zhao ZS, Manser E, Chen XQ, Chong C, Leung T, Lim L (1998) A conserved negative regulatory region in alphaPAK: inhibition of PAK kinases reveals their morphological roles downstream of Cdc42 and Rac1. *Mol Cell Biol* 18:2153-2163.
- Zhao ZS, Manser E, Lim L (2000a) Interaction between PAK and nck: a template for Nck targets and role of PAK autophosphorylation. *Mol Cell Biol* 20:3906-3917.
- Zhao ZS, Manser E, Loo TH, Lim L (2000b) Coupling of PAK-interacting exchange factor PIX to GIT1 promotes focal complex disassembly. *Mol Cell Biol* 20:6354-6363.
- Zhao L, Ma QL, Calon F, Harris-White ME, Yang F, Lim GP, Morihara T, Ubeda OJ, Ambegaokar S, Hansen JE, Weisbart RH, Teter B, Frautschy SA, Cole GM (2006) Role of p21-activated kinase pathway defects in the cognitive deficits of Alzheimer disease. *Nat Neurosci* 9:234-242.
- Zhou GL, Zhuo Y, King CC, Fryer BH, Bokoch GM, Field J (2003) Akt phosphorylation of serine 21 on Pak1 modulates Nck binding and cell migration. *Mol Cell Biol* 23:8058-8069.
- Ziv NE, Smith SJ (1996) Evidence for a role of dendritic filopodia in synaptogenesis and spine formation. *Neuron* 17:91-102.

RÉSUMÉ : La p21-activated kinase 3 (*PAK3*) code pour une sérine/thréonine kinase dont la mutation est responsable de retard mental non syndromique. Les kinases PAK sont activées par les GTPases Rac1 et Cdc42 et régulent la plasticité neuronale en agissant sur le cytosquelette d'actine. Afin de comprendre le rôle spécifique de PAK3 dans les processus cognitifs, nous avons étudié les mutations responsables de retard mental et caractérisé des nouveaux variants d'épissage. Ainsi, nous avons montré: 1) que PAK3 est activé préférentiellement par Cdc42 ; 2) que deux mutations suppriment totalement l'activité kinase et entraînent de fortes anomalies de morphologie des épines dendritiques de neurones d'hippocampe ; 3) qu'une autre mutation diminue fortement la liaison de la kinase à la GTPase Cdc42 et induit une forte réduction de la densité des épines. Ces résultats montrent que le module Cdc42/PAK3 joue un rôle clé dans la formation des épines dendritiques et la plasticité synaptique. Par ailleurs, nous avons identifié deux nouveaux variants d'épissage de PAK3 qui sont constitutivement actifs. Nous proposons un nouveau modèle de régulation de leur activité kinase, basé sur la formation d'hétérodimères.

DISCIPLINE : Neurobiologie Cellulaire et Moléculaire

MOTS-CLÉS : Kinase, PAK3, GTPases, retard mental, variants d'épissage, cytosquelette

SUMMARY : The p21-activated kinase 3 (*PAK3*) codes for a serine threonine protein kinase implicated in non syndromique mental retardation. PAK kinases are activated by the GTPases Cdc42 and Rac1 and regulate neuronal plasticity through actin cytoskeleton. In order to understand the specific role of PAK3 in cognitive functions, we studied the mutations responsible for mental retardation and characterized new splice variants. We show that: 1) PAK3 is selectively activated by Cdc42; 2) two mutations totally abolish the kinase activity and profoundly alter dendritic spine morphology; 3) a third mutation decreases the binding of PAK3 to the GTPase Cdc42 and drastically reduces spine density. These results suggest that Cdc42/PAK3 is a key module in dendritic spine formation and synaptic plasticity. We also identified two new constitutively active PAK3 splice variants and propose a new regulation model of their kinase activity, based on the formation of heterodimers.

KEYWORDS : Kinase, PAK3, GTPases, mental retardation, splice variants, cytoskeleton

ADRESSE DU LABORATOIRE :

Institut de Neurobiologie Alfred Fessard – FRC2118

Laboratoire de Neurobiologie Cellulaire et Moléculaire – UPR9040, CNRS

91198 Gif sur Yvette cedex