



HAL
open science

Neurogenèse adulte et déficience intellectuelle : analyse du rôle de la kinase PAK3 dans deux modèles murins représentatifs de la pathologie

Florence Domenichini

► **To cite this version:**

Florence Domenichini. Neurogenèse adulte et déficience intellectuelle : analyse du rôle de la kinase PAK3 dans deux modèles murins représentatifs de la pathologie. Neurosciences. Université Paris Sud - Paris XI, 2014. Français. NNT : 2014PA11T038 . tel-02918098

HAL Id: tel-02918098

<https://theses.hal.science/tel-02918098>

Submitted on 20 Aug 2020

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

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

UNIVERSITE PARIS-SUD

ÉCOLE DOCTORALE 419 : *Signalisations et Réseaux Intégratifs en Biologie*,
Laboratoire : Centre de Neurosciences Paris-Sud (CNRS UMR 8195)

DISCIPLINE : Neurosciences

THÈSE DE DOCTORAT

soutenue le 29/08/2014

par

Florence DOMENICHINI

***Neurogenèse adulte et déficience intellectuelle:
Analyse du rôle de la kinase PAK3 dans deux modèles murins
représentatifs de la pathologie***

Directeur de thèse : Jean-Vianney BARNIER Directeur de Recherche (CNPS - UMR 8195)

Composition du jury :

<i>Président du jury :</i>	Hervé DANIEL	Professeur (Université Paris-Sud)
<i>Rapporteurs :</i>	Isabelle CAILLE	Maître de Conférences (U. Pierre et Marie Curie)
	Olivier RAINETEAU	Directeur de Recherche (SBRI - U846)
<i>Examineurs :</i>	Marika NOSTEN-BERTRAND	Chargée de Recherche (IFM - UMR 5 839)
	Denis DAVID	Maître de Conférences (Université Paris-Sud)
<i>Directeur de thèse :</i>	Jean-Vianney BARNIER	Directeur de Recherche (CNPS - UMR 8195)

UNIVERSITE PARIS-SUD

ÉCOLE DOCTORALE 419 : *Signalisations et Réseaux Intégratifs en Biologie*,
Laboratoire : Centre de Neurosciences Paris-Sud (CNRS UMR 8195)

DISCIPLINE : Neurosciences

THÈSE DE DOCTORAT

soutenue le 29/08/2014

par

Florence DOMENICHINI

***Neurogenèse adulte et déficience intellectuelle:
Analyse du rôle de la kinase PAK3 dans deux modèles murins
représentatifs de la pathologie***

Directeur de thèse : Jean-Vianney BARNIER Directeur de Recherche (CNPS - UMR 8195)

Composition du jury :

Président du jury :	Hervé DANIEL	Professeur (Université Paris-Sud)
Rapporteurs :	Isabelle CAILLE	Maître de Conférences (U. Pierre et Marie Curie)
	Olivier RAINETEAU	Directeur de Recherche (SBRI - U846)
Examineurs :	Marika NOSTEN-BERTRAND	Chargée de Recherche (IFM - UMR 5 839)
	Denis DAVID	Maître de Conférences (Université Paris-Sud)
Directeur de thèse :	Jean-Vianney BARNIER	Directeur de Recherche (CNPS - UMR 8195)

Remerciements,

Tout d'abord, je tiens à remercier Isabelle Caillé, Olivier Raineteau, Marika Nosten-Bertrand, Denis David et Hervé Daniel d'avoir accepté de lire et de juger mon travail et ce, en dépit de leurs nombreuses obligations, et de s'être rendus disponibles pour une soutenance de thèse estivale.

Je voudrais aussi remercier Gérard Baux et Serge Laroche pour m'avoir acceptée au sein de leurs laboratoires respectifs, le laboratoire de Neurobiologie Moléculaire et Cellulaire (NBCM) et le Centre de Neurosciences Paris-Sud (CNPS), dans lesquels j'ai effectué les travaux présentés. Je remercie l'ensemble des personnes de ces laboratoires pour leur accueil chaleureux, et en particulier les anciens du NBCM : Yvette Morot-Gaudry, Seana O'Reagan, François Meunier, Philippe Fossier, Muriel Amar, José Cancela, Sabine de la Porte. Je souhaite aussi saluer l'ensemble des personnels des animaleries de Gif et du CNPS pour les soins apportés à mes colonies de souris.

Je souhaite remercier très chaleureusement Jean-Vianney Barnier, de m'avoir accordé sa confiance et permis de réaliser ma thèse sous sa direction. Merci de m'avoir accompagnée dans mon travail et de m'avoir soutenue au long de ces quatre années et demie (M1, M2 puis le doctorat, tout de même !). Merci pour tout ce que j'ai appris à tes côtés, pour m'avoir transmis ton enthousiasme pour la recherche, pour le foisonnement (parfois débordant) de tes idées ainsi que pour nos discussions scientifiques. Merci pour cette belle et endurente expérience.

Je tiens à remercier l'ensemble des membres statutaires ou passagers qui font ou ont fait partie de l'équipe :

Un grand merci à toi, Sandrine Poëa-Guyon, pour ton soutien technique, scientifique et personnel au cours de ces derniers mois de thèse. Je suis heureuse que nos chemins scientifiques se soient enfin croisés. Je ne te l'ai pas avoué officiellement mais depuis janvier 2014, tu fais partie de la liste très restreinte de mes numéros de téléphone favoris ! Oui, se passer le relai des manips pendant de nombreux week-ends complets au labo, ça crée des liens ! Nos discussions scientifiques, et moins scientifiques, derrière les loupes binoculaires pendant les dissections vont me manquer !

Véronique Rousseau, merci de m'avoir accompagnée techniquement, scientifiquement et amicalement dans mon travail depuis mon tout début dans l'équipe. Techniquement et scientifiquement, car tu m'as formée sur de nombreuses techniques dès mon arrivée. Tu as aussi toujours répondu à mes questions avec gentillesse, mêmes les plus anodines ou « bêtes ». Je te remercie pour ton soutien amical et scientifique dans les manips et les gros rush, tout au long de ma thèse.

Michela Carraro, tu as été la première stagiaire que j'ai eu l'occasion d'encadrer partiellement et cette expérience d'encadrement et de recherche a été un réel plaisir. Parallèlement à ce côté un peu trop hiérarchique, tu as été une excellente co-locataire de bureau et une bonne amie. Merci pour ce beau et productif passage dans notre équipe.

Je voudrais remercier Nicolas Morel pour son regard critique, ses questions scientifiques pointues, ses nombreux conseils en extraction de protéines/western blot et en biochimie générale mais aussi pour sa présence bienveillante.

Je remercie Claire Jacquet pour toute l'aide que tu m'as apportée dans les manips au cours de mon master et du début de thèse. Que d'heures passées à disséquer, à compter, à mesurer, à marquer... des neurones, des neurosphères etc... ! Je remercie aussi Bernadette Wiszniowski pour tout

le long et fastidieux travail de génotypage, mais toujours réalisé avec beaucoup de sérieux, des nombreuses lignées de souris que nous possédons.

J'ai aussi une pensée pour les anciens thésards de l'équipe, que j'ai côtoyés : Emmanuel Thévenot, Vincent Gleize et Gaëlle Combeau. Merci pour vos conseils de « thésard à thésard » (parce qu'il est tout de même aussi vrai que ce n'est pas évident de poser une question à son chef...) et la bonne ambiance que vous avez su instaurer entre nous et au sein de l'équipe !

Je souhaite une bonne continuation et une bonne réussite à Nathalie Magne qui poursuit sa thèse dans l'équipe.

Je tiens à remercier particulièrement Karine Tuphile, pour toute l'aide technique en biologie moléculaire que tu m'as apportée et pour ta bonne humeur et ton rire communicatifs ; et Nathalie Samson, pour les longues heures de patience dont tu as fait preuve au cryostat pour les coupes des cerveaux.

Au cours de mon doctorat, j'ai eu la chance d'entrer dans le monde merveilleux de la neurogenèse adulte et d'acquérir de nombreuses techniques relatives à l'analyse de ce processus. Je tiens à remercier chaleureusement les personnes qui m'ont transmis toutes ces techniques et qui m'ont conseillée :

-Valérie Coronas, tu m'as appris la technique du neurosphere assay et toutes les analyses qui en découlent. Je te remercie pour les nombreux allers-retours Poitiers-Paris que tu as effectués pour moi, mais aussi pour l'enthousiasme que tu as eu pour mon sujet.

-Fabienne Agasse, assurément, nous aurions constitué un sacré tandem si nous avions pu travailler à temps plein ensemble ! Merci pour tous tes conseils, tes idées, tes petites aides de dernières minutes et le temps que tu m'as accordé.

-Alexandra Veyrac et Roseline Poirier, pour avoir pris le temps de me former à toutes les techniques d'analyse in vivo, et aussi pour m'avoir donné confiance en moi dans ces manips.

Je remercie Cyrille Vaillend et Séverine Farley pour notre collaboration.

Je remercie également l'équipe de Muriel Perron pour le soutien technique et le partage de leur matériel.

Je tiens à remercier mes supers compagnons matériel de thèse qui ont fait (presque toujours) preuve d'un soutien sans faille : le confocal, le mercator, le cryostat, la vidéo-microscopie, les loupes bino, la salle de culture avec le bain-marie, la vaillante petite compteuse, l'incubateur et la hotte, la qPCR, le Larousse des synonymes, wordreference, pubmed...

Je tiens à saluer l'ensemble de l'équipe d'enseignement de biochimie que j'ai intégrée au cours de ma thèse en tant que monitrice puis demi-ATER. J'ai vraiment beaucoup apprécié cette expérience d'enseignement et je vous remercie pour m'avoir accueillie si gentiment parmi vous. Je remercie aussi particulièrement Estelle et Virginie, nos techniciennes-préparatrices des TP ; je me souviendrai longtemps de mon tout premier TP en autonomie d'encadrement ! Une pensée aussi pour Heather McLean, Micaela Galante et Laurence Méry, de la team enseignement de physiologie.

Je remercie chaleureusement Oliver Nüsse, Philippe Robin et Thierry Touzé de m'avoir permis de finir mon doctorat dans de bonnes conditions, grâce au poste de demi-ATER qui m'a été accordé.

Aurélie (Binomette de choc), Marion « Nin » et Daphné « Mimou » : mes partenaires de licence, nous avons pris des chemins fort différents mais c'est toujours avec autant de plaisir qu'on se revoit pour nous remémorer ce moment fan-tas-tique que constitue la licence... !

Merci à Thomas Besson, Claire Meunier, Quentin Gaucher (nous allons pouvoir reprendre les pauses-café de 16h15) et Steeve Lunion pour avoir été des bons co-thésards !

J'adresse une pensée chaleureuse à mes copains de l'harmonie de Chevilly-Larue : Suzy, Gaëlle, Sylvain Maillefert, Eric, Ludo, Suzy, Dom, Vincent, Edith, Fanny, Christine, Angéline, Jennifer, Laurent, Agnès, Guy, Zabé, Sandrine, Jean-Luc Gros Tuba, Pascal, Sylvain Mear (enfin quelqu'un pour reconnaître le bon travail des flûtes !). Nos répétitions du vendredi soir ont constitué un bon moment de musique mais surtout de détente. Je vous remercie de m'avoir si bien intégrée et je suis vraiment heureuse de vous connaître. Vous serez irremplaçables lorsque je vais partir vers d'autres aventures scientifiques (mais je reviendrai !!). Pensées spéciales : aux concerts de Sainte-Cécile qui nous mettent dans un état d'excitation extrême mais aussi à tous nos autres concerts (à parfois en devenir sourds), à nos voyages (l'Italie, Bayonne/Biarritz, Hochdorf !), nos Do mac post-répet (je suis quasi-sûre que le mac Do de Chevilly fonctionne uniquement grâce à nous), aux cérémonies commémoratives (courses entre partis politiques de dépôts de gerbe, défilé). Je remercie aussi les chefs et membres du bureau : Patrick M (Chef !) et Patrick B (Mon président !), Jojo, René... pour votre investissement afin de faire vivre notre orchestre, l'organiser et votre patience à notre égard.

Laetitia, merci d'avoir parfaitement joué ton inestimable rôle de « carotte » pendant ce moment de rédaction ! (Allez, après on se fait un resto ou un ciné !)

Cynthia, pour avoir été mon excellente binôme au cours des TP de master, une bonne collègue de cours et particulièrement une bonne amie de tous les moments, les bons comme les moins bons : et ces trois qualités surtout réunies au moment où j'en ai eu le plus besoin pendant ce mois de décembre de M2, sans le soutien dont tu as fait preuve à mon égard à ce moment difficile, je crois que je n'aurais pas aussi bien fini ce semestre et cette année de master avec concours à la clé !

La musique classique est ma passion, hors recherche. Je tiens à remercier sincèrement Dominique Guiguet et Yan Garac, respectivement mes professeurs de piano et violoncelle. Vous encadrez mon apprentissage de la musique depuis mes 5 ans, dans un plaisir partagé. A vos côtés, j'ai appris la persévérance mais aussi la patience, et le goût du travail bien fait. Merci d'avoir été à mes côtés depuis tout ce temps.

Marion, nous nous connaissons depuis maintenant 22 ans mais nous nous ne sommes trouvées réellement il n'y a seulement que 2 ans et demi. Bien que tu sois à Tokyo au moment de

cette fin de thèse, merci pour tout ton soutien (d'abord à proximité puis depuis Tokyo) et ton affection. Merci aussi pour nos beaux moments de détente, de rire et de délire !

Shervine, nous le savons déjà toutes les deux, notre amitié se passe de mot. Cependant, je voudrais tout de même t'adresser mes remerciements pour ces années d'affection mutuelle, nos petits délires perso, pour ton soutien indéfectible et nos merveilleux moments d'amitié.

Axel, mon amoureux (comme je le dis toujours avec un petit sourire), tu partages cette fin de thèse avec moi depuis plus d'un an maintenant. Merci pour ton amour et ton soutien mais aussi le calme que tu m'apportes depuis notre rencontre.

Mes grands-parents, et plus largement ma famille : bien que dispatchée dans toute la France, et même outre-Atlantique pour certains, je suis heureuse d'avoir pu constater cette année les liens d'affection qui nous unissent.

Ma sœur Séverine Domenichini, une pensée particulière pour toi car nous avons toutes deux partagé une expérience de doctorat pendant ces 4 ans. Merci pour nos discussions scientifiques et carrément pas du tout scientifiques surtout ! Un petit clin d'œil à mes deux adorables et formidables nièces, Pauline et Mathilde, source de joie, de rire et d'énergie... Enfin pour l'énergie... parfois c'est un peu l'inverse mais avec toujours beaucoup de plaisir !

Mes chers parents, lorsque nous étions encore à Gif, au début de ma thèse, une personne m'a dit une fois, avec gentillesse : « Florence, tu es une enfant gâtée ». Devant ma surprise, cette personne a rectifié : « Non, ce n'est pas à prendre dans le sens péjoratif. On sent que tu as été une enfant choyée, qui a reçu tout l'amour et l'attention possibles de la part de ses parents ». Et c'est effectivement exactement cela ! Merci pour de m'avoir poussée, encouragée dans mes études, d'avoir fait de moi une enfant épanouie et heureuse. Surtout, merci pour votre amour et votre soutien, à tous les moments !

*A la mémoire de mes grands-parents, Jacqueline et Lionel LEBEAU,
Qui ont vu naître ce beau projet.*

*« Je cherche à comprendre »
Jacques Monod*

Table des matières	I
Figures	VI
Tableaux	IX
Liste des abréviations	X

INTRODUCTION

I. Déficience intellectuelle	1
1. Définition et prévalence de la déficience intellectuelle.....	1
2. Classifications de la déficience intellectuelle	2
2.1. Evaluation du quotient intellectuel	2
2.2. Classification syndromique et non syndromique : une classification remise en question mais bien utile	2
3. Causes de la déficience intellectuelle.....	3
3.1. Causes environnementales.....	3
3.2. Causes génétiques	3
3.2.1. La découverte de l'importance quantitative des mutations <i>de novo</i> provoque une révolution conceptuelle	5
3.2.2. Mutations monogéniques et phénotypes complexes.....	6
3.2.3. Mutations autosomales.....	6
3.2.4. Mutations liées au chromosome X.....	7
4. Mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans les déficits cognitifs.....	8
4.1. Mécanismes moléculaires.....	9
4.1.1. La synapse et les densités post-synaptiques.....	10
4.1.2. La voie des MAP kinases ERK.....	10
4.1.3. Rho-GTPases, dynamiques des épines dendritiques et DI	12
4.1.4. Transcription et épigénétique	15
4.2. DI, ASD et Schizophrénie, vers un continuum étiologique et signalitique	17
5. Perspectives de thérapies	19
5.1. Thérapies actuelles et résultats.....	19
5.2. Vers d'autres approches	20

II. Neurogenèse adulte	22
1. Définition et historique	22
2. Niches neurogéniques, neurogenèse régénératrice et cellules souches de cancer	22
3. Importance du phénomène chez l’Homme.....	24
4. Neurogenèse adulte comparée chez les rongeurs et chez l’Homme	25
5. Mécanismes cellulaires et moléculaires de la neurogenèse adulte.....	27
5.1. La cellule souche neurale.....	27
5.2. La neurogenèse hippocampique.....	29
6. L’activité neuronale régule la neurogenèse adulte.....	33
6.1. Dans l’hippocampe	33
6.2. Modulation de la neurogenèse adulte hippocampique par la sérotonine et la dopamine	35
6.3. Dans la zone sous-ventriculaire et dans le bulbe olfactif	35
7. Neurogenèse adulte et mémoire	36
7.1. Manipulations expérimentales de la neurogenèse et effets sur les performances mnésiques.	37
7.2. Rôle de la neurogenèse adulte hippocampique dans la consolidation de la mémoire....	38
7.3. Régulation de la neurogenèse adulte par l’apprentissage	39
8. Neurogenèse adulte et physiopathologie de la mémoire.....	40
8.1. Vieillesse.....	40
8.2. Maladie d’Alzheimer.....	41
8.3. Déficience intellectuelle	41
 III. Les p-21 activated kinases dans la signalisation neuronale	 43
1. Structure	43
1.1. Domaine de régulation	43
1.2. PAK3 et ses variants d’épissage	45
2. Régulations	47
2.1. Modèle de trans-inhibition	47
2.2. Activation par les Rho-GTPases Rac1 et Cdc42.....	48
2.3. Recrutement membranaire	49
3. Expression tissulaire et localisation subcellulaire des kinases PAK	51
4. Fonctions cellulaires des kinases PAK	52

4.1.	Régulation du cytosquelette d'actine.....	52
4.2.	Régulation de l'expression génique.....	52
4.3.	PAK et cancer.....	53
5.	Fonctions neuronales des kinases PAK, rôles dans la plasticité.....	53
5.1.	Plasticité, synapses et épines dendritiques.....	53
5.2.	Rôle des kinases PAK dans la plasticité synaptique.....	57
5.3.	Rôle de la kinase PAK1 dans la morphologie des épines dendritiques.....	57
5.4.	Rôle des kinases PAK dans la plasticité.....	58
5.5.	Rôle des kinases PAK dans l'apprentissage et la mémorisation.....	60
6.	Fonctions neuronales spécifiques de PAK3.....	60
6.1.	Implication dans la déficience intellectuelle : les mutations de PAK3.....	60
6.2.	PAK3 et plasticité synaptique.....	64
6.3.	Rôle développemental dans la migration.....	66
6.4.	Rôle dans la sortie du cycle cellulaire et la différenciation neuronale.....	67

RESULTATS

Objectifs de mon travail de thèse.....	70
I. Rôle de PAK3 dans la physiologie neuronale.....	71
1. Rôle de PAK3 dans la neuritogenèse, la spinogenèse et la synaptogenèse des neurones d'hippocampe.....	71
1.1. Neuritogenèse.....	71
1.2. Spinogenèse et densités post-synaptiques.....	72
1.3. Synaptogenèse.....	73
2. Rôle de PAK3 dans la transmission synaptique via Nck2.....	76
3. Mécanisme de régulation : régulation de PAK3 par hétérodimérisation.....	78
4. Description phénotypique de la souris invalidée pour le gène <i>pak3</i>	81
II. PAK3 et neurogenèse adulte.....	83
1. Expression de PAK3 dans les cellules souches/progéniteurs.....	83
2. Rôle de PAK3 dans la biologie des cellules souches.....	87
2.1. Analyse de la formation des neurosphères dans le modèle des souris KO.....	87
2.2. Réservoir.....	90
2.3. L'inactivation du gène <i>pak3</i> n'affecte pas les propriétés cardinales des cellules souches	91

2.4.	PAK3 régule la prolifération des cellules souches/progénéiteurs.....	92
3.	La mutation R67C	95
3.2.	Expression de PAK3 dans le cerveau.....	96
3.3.	Caractérisation phénotypique de la souris KI-R67C.	97
3.4.	La mutation de déficience intellectuelle R67C affecte la neurogenèse adulte	97
3.4.1	La mutation R67C n'affecte pas l'expression de PAK3 dans les cellules souches/progénéiteurs.	97
3.4.2	La mutation R67C diminue la prolifération des NSPCs/précurseurs neuraux dans les deux zones neurogéniques.	98
3.4.3	PAK3 et sortie du cycle cellulaire.....	101
3.4.4	Dans le DG, les cellules nouveau-nées de la souris KI ne meurent pas de façon prématurée par rapport au WT.....	103
3.4.5	Devenir des cellules nouveau-nées au cours de la neurogenèse adulte chez les souris KI-R67C.....	104

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

1.	Les souris KO et KI, modèles des différentes mutations de DI du gène <i>pak3</i>	110
2.	Les mutations de PAK3 : changement de fonction et perte de fonction.....	111
3.	PAK3 et réservoir de cellules souches.....	112
4.	Rôle de PAK3 dans la sortie du cycle cellulaire des progéniteurs neuraux.....	116
5.	Rôle de PAK3 dans la spécification phénotypique et la survie	116
6.	Rôle de PAK3 dans la différenciation neuronale.....	117
7.	Rôle de PAK3 dans la migration des cellules au cours de la neurogenèse adulte	119
8.	Spécificités fonctionnelles de PAK3 dans la neurogenèse adulte.....	119

MATERIELS ET METHODES

1.	Description de la lignée <i>pak3</i> -	125
1.1.	Développement d'une méthode optimisée de géotypage.....	125
1.2.	Elevage de la colonie.....	126
1.3.	Géotypage des souris <i>pak3</i> -.....	126
1.4.	Vérification de l'absence de protéine PAK3 chez les souris <i>pak3</i> -	127
1.5.	Recherche d'une éventuelle compensation par la kinase PAK1 de l'inactivation du gène <i>pak3</i>	128

2. Description de la lignée <i>pak3</i> Knock in R67C	129
3. Culture des neurones d'hippocampes.....	130
4. Cell culture and neurosphere assay.	131
5. PCR quantitative	132
5.1. Analyse de l'expression des gènes Pak3, Bdnf, VGlut et Viaat	132
5.2. Analyse de l'expression des gènes Pak3, Dcx, Nestin.....	132
6. Western blotting et immunoprécipitation	133
7. Méthodes d'étude de la neurogenèse adulte	133
7.1. Administration du BrdU	134
7.2. Immunohistochimie	134

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....136

ANNEXES

Annexe I: <i>p21-Activated Kinase 3 (PAK3) Protein Regulates Synaptic Transmission through Its Interaction with the Nck2/Grb4 Protein Adaptor (Thévenot et al., 2011)</i>	160
Annexe II: <i>The p21-activated Kinase PAK3 Forms Heterodimers with PAK1 in Brain Implementing Trans-regulation of PAK3 Activity (Combeau et al., 2012)</i>	177

Figures

INTRODUCTION

Figure 1. Classification des déficiences intellectuelles en fonction du quotient intellectuel. ...	2
Figure 2. Les techniques d'analyse génomique.....	4
Figure 3. Les mutations de novo représentent 60% des cas de DI sévères.	5
Figure 4. Localisation des gènes de DI sur le chromosome X.....	8
Figure 5. Rôle des Rho-GTPases dans la régulation du cytosquelette d'actine et la dynamique des épines dendritiques.	13
Figure 6. La protéine FRMP1 régule la traduction des protéines de l'épine dendritique.	16
Figure 7. De nombreux gènes sont impliqués dans différentes maladies psychiatriques.	18
Figure 8. Evolution du nombre de synapses au cours de la vie.....	19
Figure 9. Section sagittale d'un cerveau de rongeur adulte.....	23
Figure 10. Environnement de niche dans la SVZ et la SGZ.	23
Figure 11. Comparaison des taux de neurogenèse adulte chez l'Homme et chez la souris. ...	26
Figure 12. Neurogenèse adulte dans la zone sous-ventriculaire du ventricule latéral.	29
Figure 13. Neurogenèse adulte dans le gyrus denté de l'hippocampe.	30
Figure 14. Illustration schématique de la séquence hypothétique d'événements impliqués dans l'intégration synaptique des neurones nouveau-nés à l'âge adulte dans le réseau glutamatergique.....	32
Figure 15. Intégration synaptique des nouveaux neurones granulaires du gyrus denté de l'hippocampe de souris adulte.	34
Figure 16. La régulation de la neurogenèse adulte peut moduler les processus d'apprentissage et de mémorisation.	39
Figure 17. Mécanismes possibles expliquant la neurogenèse réduite liée à l'âge.....	40
Figure 18. Anomalies de neurogenèse adulte hippocampique dans le syndrome de Rett et l'X fragile.....	42
Figure 19. Schéma des différentes régions fonctionnelles des kinases PAK du groupe I.	44
Figure 20. Comparaison structurale des kinases PAKs des groupes I et II.	45
Figure 21. <i>pak3</i> code pour quatre variants d'épissage PAK3a, PAK3b, PAK3c et PAK3cb.	46
Figure 22. Modèle de trans-inhibition des kinases PAK.	48
Figure 23. Mécanismes d'activation des PAK du groupe I.	49
Figure 24. Les deux voies de recrutement membranaire de PAK.	50
Figure 25. Morphologie des épines dendritiques et déficience intellectuelle.	56
Figure 26. Les kinases PAK sont au centre d'une voie qui régule la plasticité.	59
Figure 27. Les six mutations de PAK3.	62

RESULTATS

Figure 28. Mise en place des dendrites durant les stades précoces de développement.	71
Figure 29. Segments de 50 µm de dendrites issus de neurones d'hippocampe mutés (KO <i>pak3</i> - à gauche) ou sauvages (WT, à droite) à différents stades du développement.....	72

Figure 30. Densité des puncta de PSD-95 sur des dendrites, au cours de la différenciation...	72
Figure 31. Les souris invalidées pour le gène <i>pak3</i> ne présentent pas de différence dans l'expression de PSD-95 par rapport aux souris sauvages.....	73
Figure 32. Les souris invalidées pour le gène <i>pak3</i> ne présentent pas de différence dans l'expression de GluR2 par rapport aux souris sauvages.....	74
Figure 33. Analyse des synapses par double marquage présynaptique/post-synaptique.....	75
Figure 34. PAK3 agit sur la spinogénèse via son interaction avec Nck2.....	76
Figure 35. Modèle de régulation de la transmission synaptique par PAK3.	77
Figure 36. PAK3a forme des homodimères.....	78
Figure 37. Les formes WT des kinases PAK interagissent entre elles.....	79
Figure 38. Expression du BDNF chez les souris KO et WT en conditions basales, ou bien 4 h et 24 h après la séance d'acquisition d'une peur conditionnée au contexte.....	82
Figure 39. Le retrait des facteurs de croissance induit une très forte expression de PAK3 dans les cultures de cellules souches neurales issues des 2 niches SVZ et SGZ, dans les souriceaux et chez l'adulte.....	84
Figure 40. Analyse par PCR quantitative de l'expression de PAK3, de Nestine et de Dcx dans les cultures de cellules souches/progéniteurs issues des 2 zones neurogéniques de nouveau-nés ou d'adultes suite au retrait des facteurs de croissance.....	85
Figure 41. Les cellules souches/progéniteurs cessent de se diviser plus de 24 h après le retrait des facteurs de croissance.	86
Figure 42. La fréquence de neurosphères primaires formées à partir des cellules souches/progéniteurs issues de la SVZ et du DG d'individus invalidés pour le gène <i>pak3</i> augmente, en comparaison avec le WT.	88
Figure 43. Tailles des neurosphères primaires issues des SVZ de nouveau-nés WT et KO.....	88
Figure 44. Analyse de l'expression des gènes caractéristiques de l'état cellules souches.	90
Figure 45. Analyse du potentiel d'auto-renouvellement des cellules souches issues des SVZ et DG de souriceaux des deux génotypes.	91
Figure 46. Les cellules souches <i>pak3</i> - sont multipotentes	92
Figure 47. Prolifération des cellules souches/progéniteurs.....	93
Figure 48. Représentation schématique des loci sauvage et recombiné, et de la stratégie de recombinaison.....	95
Figure 49. L'ADN issu de la souris KI porte effectivement la mutation R67C.....	96
Figure 50. Caractérisation des protéines PAK3 dans les cerveaux des deux modèles transgéniques KO et KI.	96
Figure 51. La mutation R67C ne modifie pas l'expression de la protéine mutée dans les cellules souches/progéniteurs suite au retrait des facteurs de croissance	98
Figure 52. La mutation R67C diminue la prolifération des précurseurs dans les zones sous-ventriculaire (SVZ, A.) et sub-granulaire (SGZ, B.) du cerveau adulte.....	99
Figure 53. La mutation R67C diminue le nombre de cellules BrdU+ 7 jours après injections dans les zones sous-ventriculaire (SVZ, A.) et sub-granulaire (SGZ, B.) du cerveau adulte.	100
Figure 54. Analyse du nombre de cellules nouveau-nées dans le bulbe 7 j post-injections..	101
Figure 55. Sortie du cycle cellulaire des cellules nouveau-nées âgées de 7 jours.	102
Figure 56. La diminution de la prolifération observée chez la souris KI n'est pas due à une mort prématurée des cellules.	104

Figure 57. Analyse de la différenciation des cellules nouveau-nées dans le gyrus denté de mâles KI de 3 mois.....	105
Figure 58. Analyse de la maturation des neurones âgés de 28 j dans le DG des animaux KI.	106

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Figure 59. Identification des cellules souches par triple marquage immunologique Nestine, GFAP et Sox2.	114
Figure 60. La neurogenèse adulte et la plasticité synaptique sont intimement liées par des régulations réciproques.....	120
Figure 61. Rôles hypothétiques et démontrés de la protéine multifonctionnelle PAK3 dans la neurogenèse adulte.	122

MATERIELS ET METHODES

Figure 62. Schéma du principe géotypage.	125
Figure 63. Les souris invalidées pour le gène pak3 ne présentent pas la protéine PAK3 tronquée.....	128
Figure 64. Les souris invalidées pour le gène pak3 présentent une diminution de l'expression de PAK1 à 90 jours.....	129

Tableaux

INTRODUCTION

Tableau 1. Caractéristiques cliniques des patients hommes atteints de déficience intellectuelle liée aux différentes mutations du gène *pak3*..... 63

RESULTATS

Tableau 2. Evolution de la diminution relative des cellules BrdU+ dans les zones neurogéniques des KI comparées aux WT, au cours du temps..... 100

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Tableau 3. Les mutations affectant les différentes régions (régulatrice et kinase) de PAK3 sont à l'origine de changements de fonction de cette kinase. 121

Liste des abréviations

AD	maladie d'Alzheimer
ADID	autosomal dominant ID
AMPA	α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor
ARID	autosomal recessive ID
BDNF	brain-derived neurotrophic factor
BO	bulbe olfactif
BrdU	bromodéoxyuridine
Cdc42	Cell division control protein 42 homolog
CGH	comparative genomic hybridization
CNV	copy number variants or variations
CREB	<i>cAMP response element-binding</i> protein
DCX	doublecortin
DG	gyrus denté
DI	déficiência intellectuelle
DILX	déficiência intellectuelle liée à l'X
EGF	epidermal growth factor
Eph	éphrine
FMRP	fragile-X mental retardation protein
GCL	granule cell layer
GEF	guanine Exchange Factor
GFAP	glial fibrillary acidic protein
iPSC	cellules souches pluripotentes induites
LTP	Long term potentiation
MAP2	Microtubule-associated protein 2
MAPK	Mitogen activated protein kinase
NeuN	Neuronal nuclei
NF1	Neurofibromatose de type 1
NMDA	N-methyl-D-aspartate receptor
NSC	cellule souche neurale
NSPC	neural stem/progenitors cells
OPHN1	Oligophrenin1
pak	p21-activated kinases
PSD95	postsynaptic density protein 95
QI	quotient intellectuel
RM	Retard mental
RMS	flux rostral migratoire
SGZ	zone subgranulaire
SNP	<i>single-nucleotide polymorphism</i>
SVZ	zone sous ventriculaire
XLID	X-linked Intellectual Disability

INTRODUCTION

I. Déficience intellectuelle

1. Définition et prévalence de la déficience intellectuelle

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, la déficience intellectuelle se définit par « la capacité sensiblement réduite de comprendre une information nouvelle ou complexe, et d'apprendre et d'appliquer de nouvelles compétences (trouble de l'intelligence). Il s'ensuit une aptitude diminuée à faire face à toute situation de manière indépendante (trouble du fonctionnement social), un phénomène qui commence avant l'âge adulte et exerce un effet durable sur le développement. »

La déficience intellectuelle est caractérisée par un quotient intellectuel (QI) inférieur à 70, des aptitudes limitées dans au moins deux comportements adaptatifs (tels que la communication, l'interaction sociale, les usages communs, la prise en charge/responsabilité de soi...) et doit être décelée au cours de l'enfance, avant 18 ans. La déficience intellectuelle est diagnostiquée suite à l'évaluation du quotient intellectuel du patient, basée sur un test qui mesure ses performances intellectuelles, appelé l'échelle d'intelligence de Wechsler. Il existe trois échelles adaptées chacune à un âge du développement intellectuel, dont deux pour les enfants : le WISC (Wechsler Intelligence Scale for Children, ou l'échelle de Wechsler pour les enfants de 6 à 16 ans) et le WPPSI (Wechsler Preschool and Primary Scale of Intelligence-R, l'échelle de Wechsler pour les enfants de 4 à 6,5 ans).

Jusque dans les années 2000, les patients étaient diagnostiqués « atteints de retard mental ». Ce terme a été progressivement puis définitivement remplacé par « déficience intellectuelle » (DI) (Salvador-Carulla et al., 2008). Une des justifications à ce changement vient de ce que la DI ne peut être considérée comme une maladie puisque cela correspond à un groupe de signes cliniques extrêmement hétérogènes, aux étiologies multiples et multifactorielles, allant de causes génétiques à des origines nutritionnelles, métaboliques, neurotoxiques ou infectieuses. L'expression la plus appropriée serait déficience cognitive développementale, souvent remplacée par déficience intellectuelle. En raison de l'importance de la prévalence de cette pathologie, des nécessités d'assistance et de médication des patients tout au long de leur vie mais aussi de l'impact social et émotionnel sur les patients et leurs familles, cette évolution a pris une tournure officielle, avec la signature de la loi « Rosa » en 2010 par le président américain Barack Obama aux Etats-Unis d'Amérique.

Cette pathologie affecte 1 à 3% de la population, avec une prévalence estimée de 0.3 à 0.5% de déficience intellectuelle sévère et de 1 à 1.5% de retard mental léger (Bassani et al., 2013). Les impacts sociétaux et les coûts économiques de cette pathologie sont extrêmement élevés (Gustavsson et al., 2011).

2. Classifications de la déficience intellectuelle

2.1. Evaluation du quotient intellectuel

La déficience intellectuelle est profonde lorsque le QI est inférieur à 20, sévère lorsque le QI est compris entre 20 et 34, modérée lorsque cette valeur est comprise entre 35 et 49, et légère lorsque le QI est compris entre 50 et 69. Communément, la déficience intellectuelle est dite sévère lorsque le QI est inférieur à 50 et légère lorsque le QI est compris entre 50 et 70 (American Psychiatric Association, 1994) (Figure 1).

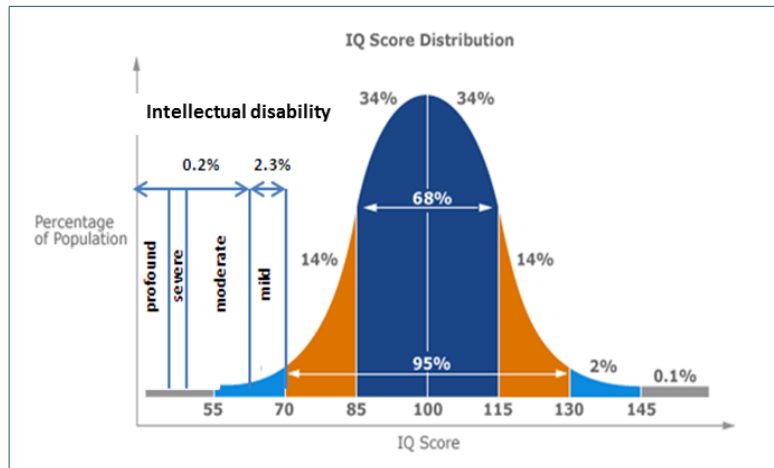


Figure 1. Classification des déficiences intellectuelles en fonction du quotient intellectuel.

Courbe de répartition des QI de la population.

2.2. Classification syndromique et non syndromique : une classification remise en question mais bien utile

Devant l'hétérogénéité des cas cliniques et dans le but d'identifier les causes de cette maladie, plusieurs classifications ont été proposées dans le début des années 90. Ainsi, la déficience intellectuelle est dite syndromique lorsque le patient présente d'autres signes cliniques associés aux défauts cognitifs, tels que des anomalies métaboliques ou bien des caractéristiques physiques. C'est par exemple le cas du syndrome de Coffin-Lowry, dû aux mutations du gène *rsk2* codant pour la kinase RSK2 présentant un dimorphisme caractéristique de la face et des mains (Hanauer & Young, 2002). Lorsque le seul signe clinique est le déficit cognitif, la déficience intellectuelle est dite « non-syndromique » (Chelly & Mandel, 2001).

Cependant, cette distinction faite entre DI syndromique et non-syndromique est remise en question et est peut-être devenue obsolète. En effet, dès le début des années 2000, la communauté scientifique explorant la génétique de la DI observa un continuum entre retard mental syndromique et non syndromique lié aux mutations d'un même gène. Nous pouvons citer comme exemple *rsk2*, dont la plupart des mutations sont responsables du syndrome de Coffin-Lowry. Toutefois, il a été

identifié une mutation faux sens responsable d'une forme non syndromique (Merienne et al., 1999). Par ailleurs, les descriptions cliniques des patients s'améliorent grâce au recours à des techniques d'analyses non invasives, permettant de dégager des caractéristiques communes à des cohortes de patients. Ainsi, les mutations du gène codant pour l'oligophérine, initialement décrites pour être responsables d'une forme non syndromique, sont souvent responsables d'une hypoplasie cérébelleuse.

Bien que remise en question, cette classification reste à ce jour utilisée pour caractériser une DI impliquant un gène nouvellement identifié. L'intérêt de disposer de cette classification est, en plus d'aider les cliniciens à identifier les causes de la pathologie chez chaque patient, de contribuer également à la compréhension des dysfonctionnements à l'origine de la pathologie, en ayant en ligne de mire la mise en place de stratégies thérapeutiques. Ainsi, une question importante est de savoir si, dans le cas des DI non syndromiques, les défauts cognitifs sont dus à un dysfonctionnement neuronal ou bien sont la conséquence d'une anomalie liée à des perturbations au cours de l'ontogenèse du cerveau. Il est évident que la réponse à cette question aura des conséquences sur les options thérapeutiques (Cf partie « 5. Perspectives de thérapies »).

3. Causes de la déficience intellectuelle

Les causes de la déficience intellectuelles sont multiples et hétérogènes.

3.1. Causes environnementales

Des causes non génétiques affectent le développement du système nerveux central au cours du développement prénatal ou pendant la petite enfance. Les facteurs environnementaux responsables de déficience intellectuelle les plus fréquemment rapportés sont la malnutrition de la mère au cours de la grossesse, le syndrome d'alcoolisme fœtal ou bien l'exposition à d'autres substances toxiques au cours de la grossesse, la naissance prématurée, un poids faible à la naissance, une hypoxie/anoxie périnatale ou encore une infection virale (par le cytomégalovirus au cours de la grossesse ou par le virus de la méningite après la naissance) (Chelly & Mandel, 2001 ; Ropers, 2010 ; van Bokhoven, 2011).

3.2. Causes génétiques

L'amélioration des techniques d'investigation génétique (Krumm et al, 2014) grâce à l'analyse des copies de nombre de gènes par des techniques de puces à ADN, et au séquençage à haut débit des séquences codantes des gènes (WES) ou des gènes entiers (WGS), associée aux programmes performants des traitements de données sont en train de provoquer une mini-révolution dans l'identification des causes des maladies psychiatriques (Figure 2) et de diminuer le nombre de causes non identifiées (Voir par exemple Gilisen et al., 2014). La technique de WGS reste encore l'une des plus lourdes mais possède le plus haut taux d'identification de l'étiologie des DI. De plus, cela permet de mettre en évidence un certain nombre d'anomalies dans les séquences non codantes, à savoir les promoteurs, les introns et les régions non codantes en général, sans toutefois pouvoir affirmer leur implication dans la pathologie.

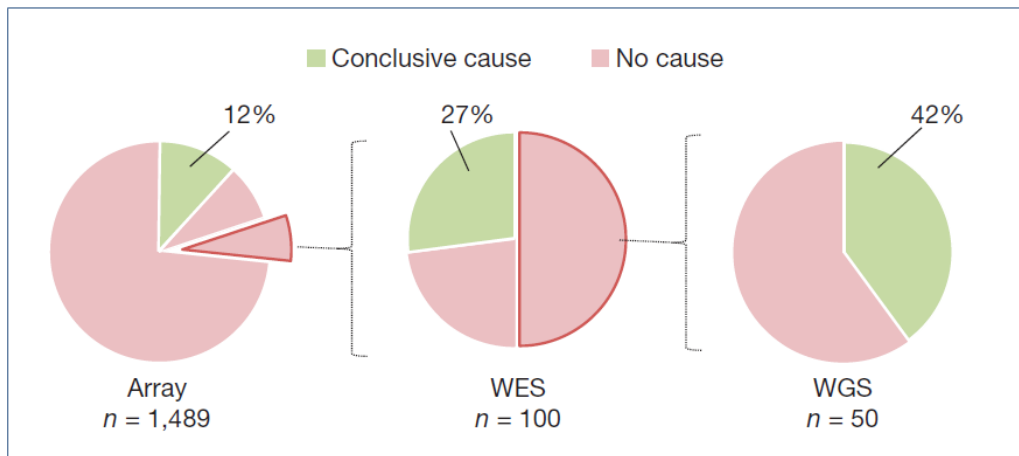


Figure 2. Les techniques d'analyse génomique.

Puces à ADN : Array, séquençage de l'exome : WES ; séquençage du génome : WGS sont en train de faire diminuer le nombre de cas non identifiés de DI sévère. D'après Gilisen et al., 2014.

Les principales causes génétiques de DI sont :

Des anomalies ou aberrations chromosomiques à l'origine de 1 cas sur 7 (environ 15%) de DI sévère. (Leonard H & Wen X, 2002).

L'aneuploïdie : Le syndrome de Down ou trisomie 21 est la pathologie la plus fréquente (1 cas sur 1000 naissances) et connue d'aneuploïdie chromosomique associée à une DI. Ces aberrations du nombre de chromosomes sont directement identifiables par établissement du caryotype ou par la technique d'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH = Fluorescent *In Situ* Hybridization).

Les réarrangements de régions télomériques des autosomes touchent 2.5% des patients atteints de DI et sont aussi détectables par la technique de FISH.

Les variations du nombre de copies (copy number variants or variations, CNV) d'un gène consistent en des microdélétions ou des microduplications de gènes. Ces variations du nombre de copies ont une prévalence équivalente à celle des aberrations chromosomiques cytogénétiques visibles, et concernent environ 15% des patients atteints de déficience intellectuelle (Ropers 2007, 2008, 2010). Les CNV sont identifiables par la méthode de l'hybridation génomique comparative (array-based comparative genomic hybridization ou array CGH) et peuvent être à l'origine des microdélétions, comme c'est le cas pour les syndromes de Prader-Willi, d'Angelman, du syndrome de Williams-Beuren (microdélétion dans le chromosome 7 impliquant la région comprenant le gène codant pour la LimK1 kinase régulée par les kinases PAK), du syndrome de Smith-Magenis (délétion du gène *RA1*). Les changements d'une base ou de quelques bases dans la séquence codante des gènes et quelque fois dans des séquences introniques ou régulatrices sont aussi responsables d'une proportion importante de DI. Ainsi, dans le cas de l'analyse de 50 DI sévères, environ 35 % sont dus à des SNV (Small Nucleotide Variant) alors que 25% sont dus à des CNV (Cf. Figure 3).

3.2.1. La découverte de l'importance quantitative des mutations *de novo* provoque une révolution conceptuelle

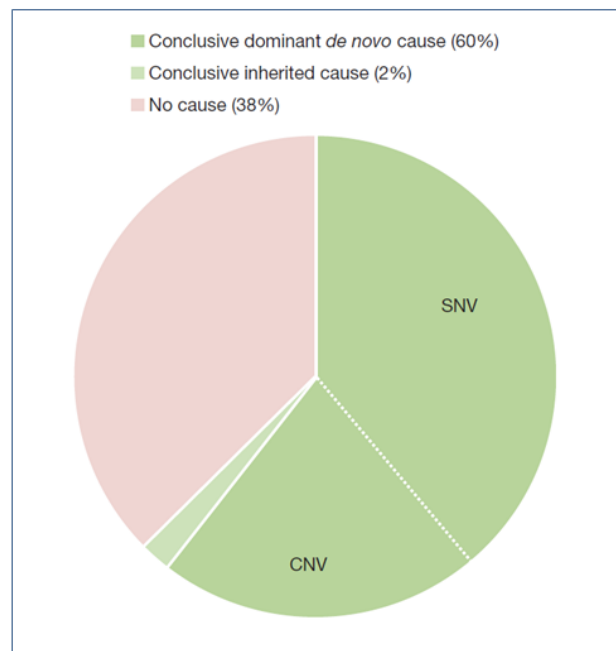
En 2011, environ 450 gènes responsables de déficience intellectuelle avaient été identifiés dont 400 à l'origine de DI syndromique et 50 associés à des DI non syndromiques (van Bokhoven, 2011). La plupart de ces mutations ont une très faible prévalence et leurs phénotypes sont souvent impossibles à distinguer les uns des autres. Une estimation actuelle propose que ces 400 gènes puissent représenter moins de la moitié de tous les gènes impliqués dans la DI.

Comme nous venons de l'écrire, les nouvelles méthodes de séquençage à haut débit permettent d'identifier de nouveaux gènes associés à la DI. Ainsi en 2009, le séquençage des exons codants du chromosome X de 208 patients atteints de DI permit d'identifier neuf nouveaux gènes impliqués dans cette pathologie, dont Cask et la synaptophysine (Tarpey et al., 2009). Un nouveau concept est la relativement haute fréquence **des mutations *de novo*** responsables de DI (Vissers et al., 2010 ; Hamdan et al., 2011 ; Gilisen et al., 2014) (Figure 3). Le taux de mutation par génération est relativement élevé chez l'homme. Ainsi, en séquençant l'exome de dix patients, ces auteurs ont mis en évidence 9 mutations *de novo*, dont six sont très probablement responsables de la pathologie. Les mutations *de novo* semblent être responsables d'un nombre très élevé de DI, un phénomène sous-estimé jusqu'alors.

Une analyse récente par whole genomic sequencing de 50 patients présentant un retard mental sévère et pour lesquels les analyses génétiques classiques et extensives n'avaient pas permis d'identifier les causes apportent plusieurs informations intéressantes (Gilissen et al., 2014). Celles-ci concernent l'importance quantitative des mutations *de novo* affectant les régions codantes qui atteignent 60% des patients analysés contre 2% pour les formes héréditaires (Figure 3). Une autre information est l'identification réitérée à relativement haute fréquence des gènes déjà connus ainsi que la mise en évidence de l'expression en mosaïque des allèles mutés rendant l'analyse encore plus complexe.

Figure 3. Les mutations de novo représentent 60% des cas de DI sévères.

D'après Gilisen et al., 2014.



Une autre approche, par technique de puces à ADN, a consisté à identifier, chez des déficients intellectuels de familles hautement consanguines en Iran, des zones génomiques de chromosomes autosomiaux, puis séquencer les exomes incriminés (Najmabadi et al., 2011). Ceci leur permit d'analyser 136 familles, d'identifier des mutations dans 23 gènes déjà connus pour être impliqués dans la DI et surtout d'identifier 50 nouveaux gènes dont les mutations sont très probablement responsables de la DI. Des approches similaires en choisissant des patients atteints de formes sévères (de Ligt et al., 2012) ont permis d'identifier de nouveaux gènes. Ces approches sont toujours en cours, avec une attention particulière sur des sélections de cohortes de patients avec des diagnostics cliniques de plus en plus précis.

3.2.2. Mutations monogéniques et phénotypes complexes

Une autre observation émerge progressivement grâce à l'identification de nombreuses mutations monogéniques impliquées dans les maladies neurologiques ; elle concerne l'extrême diversité phénotypique associée aux mutations d'un même gène, voire parfois au sein d'une même fratrie. Il n'est donc pas rare de décrire des maladies pouvant ou non comprendre de l'épilepsie, de la déficience intellectuelle, de l'autisme (Voir par exemple la revue de Merwick et al., 2012). Il y a plusieurs explications possibles.

Les mutations peuvent induire des pertes de fonction par absence de la protéine codée par le gène. Les mutations non-sens et un certain nombre de mutations affectant les sites régulateurs d'épissage génèrent des protéines tronquées ayant perdu leur fonction. Dans le cas des mutations faux sens, la protéine tronquée peut-être détruite au cours de la synthèse grâce à un système sophistiqué de contrôle de la traduction, le Non sens RNA decay NMD (Eberle & Visa, 2014). Ces mutations conduisent donc à l'absence de la protéine. Inversement, des mutations faux-sens peuvent être responsables d'une perte de fonction et permettre la traduction d'une protéine stable non fonctionnelle. Cette protéine, en plus de ne pouvoir accomplir ses fonctions, peut titrer ses régulateurs et effecteurs par la formation de complexes protéine/protéine, et donc avoir des interférences avec les voies de signalisation de ces protéines associées : cette mutation peut de ce fait avoir des effets de dominant négatif. Enfin, les mutations ponctuelles faux-sens peuvent modifier la nature des partenaires et induire ainsi un changement de voie de signalisation. Cette description s'applique parfaitement au cas de la kinase PAK3 (cf. Tableau 1). La première description montrait que la mutation du gène n'induisait que des altérations des fonctions cognitives, indiquant que le gène *pak3* appartient aux groupes des DI non syndromiques (Allen et al., 1998 ; Bienvenu et al., 2000). Plus tard, Peippo et collègues (2006) mettent en évidence d'autres signes cliniques et proposent qu'il soit défini comme syndromique. Plus récemment, la description de la sixième mutation létale à l'adolescence nous oblige à repenser ces caractérisations (Magini et al., 2014). Enfin, il est évident que l'expression phénotypique des mutations monogéniques est dépendante du contexte génétique dans lequel elle se trouve, ainsi que de l'existence de polymorphisme génétique au niveau d'autres gènes (GWAS, SNP, etc).

3.2.3. Mutations autosomales

Les déficiences intellectuelles autosomiques sont classées en fonction du caractère dominant ou récessif de la mutation et sont liées à des mutations de gènes portés par des autosomes (Ropers, 2008 et 2010 ; Afroze & Chaudry, 2013). La DI autosomique **dominante** (autosomal dominant ID =

ADID) est le plus souvent due à des mutations qui apparaissent spontanément et qui ne seront que rarement transmises, les patients n'ayant pas d'enfant. C'est notamment le cas des gènes *SYNGAP1* et *STXBP1*. Le gène *SYNGAP1* code pour une GTPase activant de Ras (GAP) qui régule l'activation des MAP kinases ERK et p38, contrôlant ainsi l'insertion des récepteurs AMPA à la membrane de la synapse et la régulation du cytosquelette d'actine par modulation de la phosphorylation de la cofiline. Trois mutations *de novo* ont été identifiées comme étant la cause de retard mental non syndromique autosomal (Hamdan et al., 2009). Le gène *STXBP1* code pour un régulateur de la fusion des vésicules synaptiques à la membrane présynaptique impliquant les complexes SNARES et permettant le relargage des neurotransmetteurs. En 2009, deux mutations spontanées ont été identifiées chez des patients atteints de retard mental sévère et d'épilepsie (Hamdan et al., 2009). En revanche, peu de données sont connues concernant les déficiences intellectuelles autosomiques récessives (ARID= autosomal recessive ID), et l'émergence de ces cas de retard mental est le plus largement observée dans les pays en développement (du Maroc à l'Inde) au sein de familles consanguines. A ce jour, une dizaine de gènes portés par des autosomes a été identifiée comme étant impliquée dans le développement de déficience intellectuelle non syndromique autosomale, dont le premier, *PRSS12*, fut mis en évidence en 2002 par Molinari et collègues (Molinari et al. 2002 ; Afroze & Chaudry, 2013).

3.2.4. Mutations liées au chromosome X

La déficience intellectuelle liée à une ou des mutations de gènes portés par le chromosome X (nommée déficience intellectuelle liée à l'X= DILX ou X-Linked Intellectual Disability= XLID) concerne 5 à 10% des cas de DI chez l'Homme (Lubs et al., 2012) (ou 10% à 12% selon Ropers, 2010). Les mutations responsables de retard mental lié à l'X sont localisées dans 102 gènes de ce chromosome. Les mutations de ces 102 gènes sont à l'origine de 81 des 160 déficiences syndromiques connues et de 50 retards mentaux non syndromiques. La déficience intellectuelle liée à l'X fut la première identifiée et est la plus étudiée car les généticiens ont d'abord constaté que cette pathologie affectait un plus grand nombre d'hommes que de femmes et que les mêmes signes cliniques étaient observés au sein d'une même famille, laissant supposer que la pathologie ségrégeait en suivant la distribution du chromosome X (Figure 4) (Lubs et al., 2012). On peut se poser la question de savoir si la totalité des gènes du chromosome X impliqués dans la DI ont été identifiés. Par exemple, une étude finnoise analysant des patients mâles met en évidence des gènes déjà identifiés mais avec de nouvelles mutations (Philips et al., 2014).

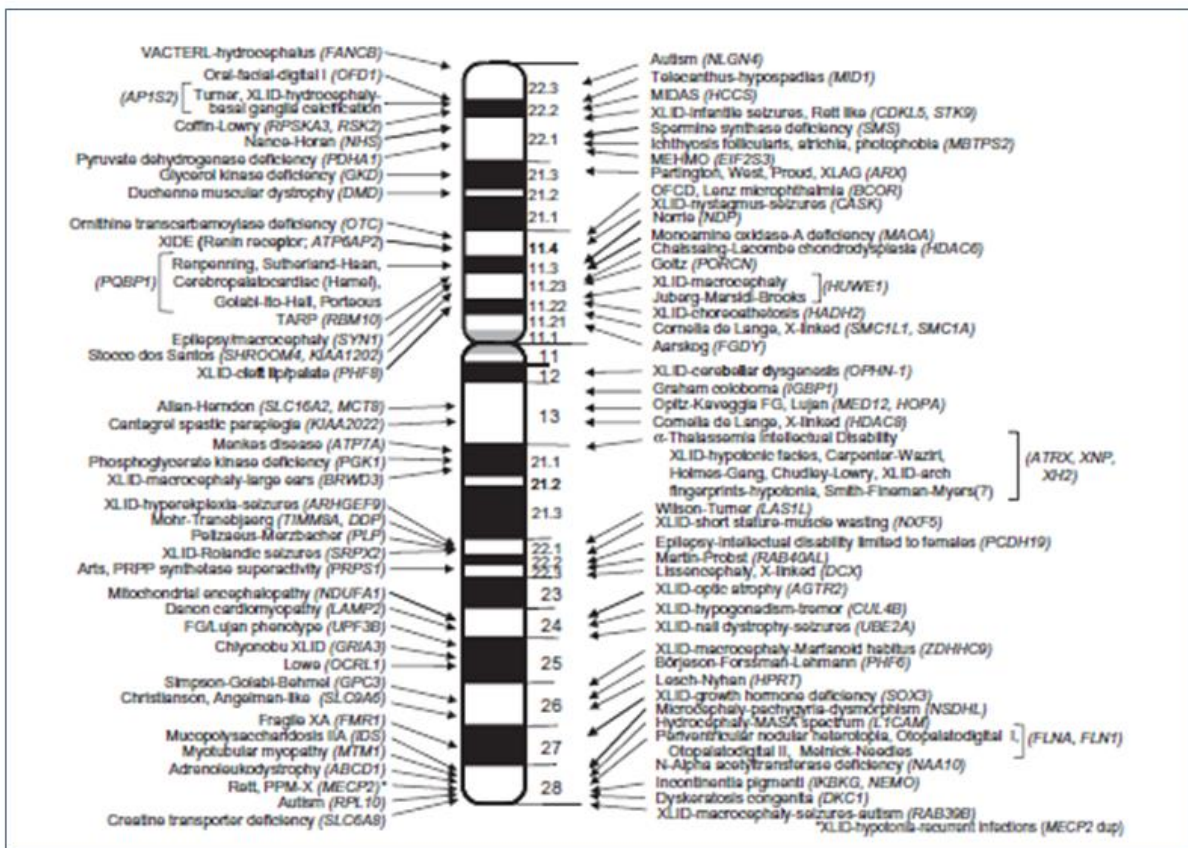


Figure 4. Localisation des gènes de DI sur le chromosome X.

D'après Lubs et al., 2012.

Il faut aussi noter que 25 à 40% des cas de déficience intellectuelle sévère et certains cas de retard mental léger restent encore inexpliqués et sont probablement dus à une combinaison de facteurs environnementaux et génétiques (Chelly & Mandel, 2001 ; Ropers, 2010).

4. Mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans les déficits cognitifs

Le très grand nombre de gènes associés à des DI rend extrêmement difficile de réaliser une revue extensive des mécanismes moléculaires et cellulaires mis en jeu dans la physiopathologie neuronale. Dans les années 90 semblaient se dégager quelques voies centrales de signalisation comme celles des Rho-GTPases. Aujourd'hui, on peut proposer que toutes les grandes fonctions cellulaires sont impliquées : la régulation génique et épigénétique de l'expression des gènes, les différentes étapes de la maturation des ARN et celles de leur stabilisation et dégradation, les modifications post-traductionnelles des protéines, les localisations subcellulaires de ces dernières dans des complexes aux stoechiométries régulées mais aussi dans des assemblages moléculaires structurant les épines dendritiques ou les zones synaptiques, etc. Toutefois, les constituants

synaptiques via la régulation de leur expression et de leur activité semblent être au centre des mécanismes dysfonctionnant dans la DI. On peut inclure dans cette catégorie les récepteurs, les complexes d'assemblage et de structuration de la synapse impliquant un très grand nombre de protéines (par exemple au sein des complexes associés aux récepteurs NMDA), les mégacomplexes constituant les densités post-synaptiques, les protéines du cytosquelette d'actine, sans oublier celles impliquées dans l'endocytose et l'exocytose. Ces données placent logiquement récepteurs aux neurotransmetteurs et dynamique des épines dendritiques au centre de la problématique de la physiopathologie synaptique. Néanmoins, certaines protéines régulant le cycle cellulaire sont aussi impliquées dans la DI soulignant le rapport complexe entre cycle cellulaire et plasticité neuronale.

4.1. Mécanismes moléculaires

Les protéines codées par les nombreux gènes responsables de déficience intellectuelle liée à l'X sont impliquées dans quasiment toutes les fonctions de la physiologie cellulaire. 22% de ces gènes sont impliqués dans la régulation de la transcription, 19% dans des voies de transduction du signal, 15% participent au métabolisme et 15% sont impliqués dans des fonctions associées à la membrane. Les mutations des protéines du cytosquelette, la traduction des ARN, les mécanismes de réparation et répllication de l'ADN, la synthèse des protéines et leur ubiquitination ainsi que la régulation du cycle cellulaire mais aussi l'adhésion, concernent une minorité de gènes du chromosome X (environ 3 à 5% pour chacun d'entre eux). De plus, les protéines codées par les gènes de déficience intellectuelle liée à l'X se localisent en grande partie dans le noyau (30%) et le cytoplasme (28%) ; les membranes et les organites intracellulaires constituent les deux autres localisations subcellulaires majeures de ces protéines (respectivement 18 et 16%) (Lubs et al., 2012).

Un autre aspect de la signalisation est que ce sont des complexes multiprotéiques qui constituent le support de la plasticité synaptique, au sein des densités synaptiques par exemple. Des mutations affectant la stœchiométrie de ces édifices ou la dynamique de ces assemblages auront donc vraisemblablement un impact sur la plasticité synaptique (Ropers, 2010).

Les gènes de déficience intellectuelle convergent vers des voies de signalisation centrales impliquées dans la plasticité synaptique. Historiquement, les premiers gènes identifiés étaient localisés sur le chromosome X, bien évidemment pour des raisons de ségrégation avec un indicateur de sex-ratio et de facilité à identifier des gènes mutés sur un chromosome donné. Ceci avait conduit certains chercheurs à s'interroger sur l'enrichissement de gènes de RM sur ce chromosome, alors qu'il est possible que cela ne soit qu'un biais lié à la nature du chromosome sexuel. Le même biais concerne les voies de signalisation. Historiquement, l'identification de premiers gènes des formes non syndromiques soulignait l'implication de la voie des Rho-GTPases contrôlant le cytosquelette d'actine (Chelly & Mandel, 2001 ; Ramakers, 2002). Actuellement nous pouvons affirmer que toutes les grandes voies de signalisation semblent pouvoir être impliquées par les gènes de DI. Néanmoins, la grande majorité des gènes impliqués dans la DI contrôle la fonction synaptique ou la dynamique des épines dendritiques (Humeau et al., 2009 ; Verpelli & Sala, 2012).

Vu l'étendue du sujet, nous décrivons brièvement quelques voies de signalisation ayant un rapport avec la voie des p21-activated kinases.

4.1.1. La synapse et les densités post-synaptiques

De manière étonnante, le gène codant pour la PSD95 n'a pas été trouvé associé à de la DI. Par contre, le gène *DLG3* codant pour l'isoforme SAP102 a été identifié dans plusieurs cas de DI. Il en est de même pour les gènes de la famille Shank, dont plusieurs membres de cette famille ont été trouvés associés à de la DI et des formes d'autisme (revue de Verpelli & Sala, 2012). Enfin, et de manière non exclusive, on peut dire que généralement, les gènes DI participent à la régulation de la transmission synaptique dépendante de l'activité neuronale c'est-à-dire de la plasticité synaptique (Vaillend et al., 2008). Les PAK sont reliées aux densités synaptiques principalement via leur complexe impliquant les protéines PIX et GIT, PIX étant un partenaire de Shank. Des auteurs ont systématiquement séquencé 197 gènes impliqués dans les complexes protéiques associés aux récepteurs métabotropiques mGluR5 (52 protéines) et ionotropiques NMDA (185 protéines) chez des patients atteints de DI et ont identifié des mutations *de novo* dans 11% de ces gènes (Hamdan et al., 2011). Ces mutations affectent les gènes codant pour les récepteurs mais aussi pour les régulateurs du trafic des récepteurs AMPA. De manière intéressante, certains de ces gènes sont aussi impliqués dans d'autres maladies psychiatriques et contrôlent les mêmes voies de signalisation synaptique (Penzes et al., 2013).

4.1.2. La voie des MAP kinases ERK

De très nombreux travaux démontrent le rôle des MAP kinases ERK dans la régulation de la plasticité synaptique. La première évidence de l'implication de ERK dans des mécanismes de mémorisation date de 1998, avec des expériences de conditionnement par crainte réalisées chez le rat. La période d'apprentissage s'accompagne d'une augmentation de la phosphorylation de ERK2, principalement dans l'hippocampe. L'utilisation d'inhibiteurs de l'activation des ERK conduit à l'absence de l'apparition de cette mémoire. Depuis, l'implication de ERK a pu être mise en évidence dans d'autres types de mémoire, comme la mémoire spatiale (test de Morris). De manière concomitante, on montrait dans des cultures de neurones que les stimulations glutamatergiques activaient les MAPK ERK. On considère à l'heure actuelle que le module Ras/ERK est l'une des principales voies de signalisation impliquées dans la plasticité synaptique.

L'activité synaptique liée à l'activité des réseaux neuronaux induit une dépolarisation de la membrane responsable de l'augmentation intracellulaire des influx calciques transitoires. Ceux-ci sont décodés en fonction de leur source et de leur intensité par plusieurs senseurs protéiques sensibles à la concentration du calcium intracellulaire. Les signaux calciques sont propagés depuis le site de leur production dans le cytoplasme vers le noyau afin d'activer la machinerie transcriptionnelle. En plus de la propagation du signal calcique par augmentations transitoires calciques nucléaires, plusieurs voies prennent le relais. Les ERK sont au centre de cette voie principalement via les nombreux facteurs d'échange régulés par le calcium. L'activation en cascade des ERK permet leur translocation nucléaire. Les ERK nucléaires activées catalysent l'activation de nombreux facteurs de transcription, mais régulent également la structure active de la chromatine et la perméabilité des membranes nucléaires (Wiegert & Bading, 2011).

Plusieurs DI impliquent des gènes associés à cette cascade. Nous citerons une GAP de Ras et une kinase effectrice des ERK pour lesquelles les mutations sont responsables de syndromes cognitifs sévères.

La neurofibromatose de type 1 (NF1), ou maladie de Recklinghausen, est l'une des maladies génétiques les plus fréquentes : elle touche de 1/3000 à 1/4000 individus. C'est une affection autosomique (ou autosomale) dominante et sa pénétrance est quasi-complète à l'âge de 5 ans. Le gène NF1, responsable de la maladie, est localisé sur le bras long du chromosome 17 en 17q11.2. Il s'agit d'un gène suppresseur de tumeur de grande taille (350 Kb - 60 exons) codant pour une protéine cytoplasmique, la neurofibromine, qui possède une activité GAP de Ras. Les mutations germinales délétères sont réparties sur l'ensemble du gène et généralement spécifiques de chaque famille. La fréquence des néo-mutations est particulièrement élevée et près de la moitié des patients NF1 sont des cas sporadiques. La NF1 est caractérisée par une très grande variabilité de son expression clinique que l'on retrouve également au sein d'une même famille : taches café au lait, neurofibromes cutanés, neurofibrome plexiforme, hamartomes iriens, lésion squelettique spécifique (dysplasie du sphénoïde, amincissement de la corticale des os longs, pseudarthrose), gliome des voies optiques. La grande variabilité de l'expression clinique, les risques tumoraux et l'évolution totalement imprévisible de la maladie imposent un suivi régulier des sujets atteints.

Rsk2 et le syndrome de Coffin-Lowry. Les mutations du gène *RPS6KA3* (Ribosomal Protein S6 Kinase polypeptide 3) qui code pour la protéine RSK2 sont responsables du syndrome de Coffin-Lowry (Trivier et al., 1996). Actuellement, plus de 140 mutations ont été identifiées et 80% d'entre elles sont des mutations *de novo* (Jurkiewicz et al., 2010). Ces mutations sont distribuées tout le long de la séquence et la plupart génèrent des protéines tronquées et inactives (Zeniou et al., 2004 ; Falco et al., 2005). Chez les garçons, le déficit intellectuel est de modéré à sévère et s'accompagne d'une petite taille, de modifications du squelette au cours de la croissance (scolioses...), de mains larges et molles, de doigts longs et pointus, de dimorphismes faciaux, de dents irrégulières ou manquantes. Il existe une grande variété phénotypique, sans qu'il soit facile de corrélérer la sévérité de la pathologie à la nature de la mutation (Merienne et al., 1999 ; Hanauer & Young, 2002 ; Field et al., 2006). Ainsi il y a des cas de microcéphalies et d'anomalies cardiaques. Chez les filles, le déficit intellectuel est léger, voire absent et accompagné d'un visage large et de doigts pointus. Des cas plus rares ont révélé des déficits intellectuels plus graves et des malformations squelettiques, faciales et des mains (Hanauer and Young, 2002). L'hétérogénéité des symptômes rend l'évaluation de la prévalence de cette maladie difficile mais elle est estimée entre 1/50 000 et 1/100 000 individus. Rsk2 appartient à une famille de quatre gènes codant pour les protéines RSK1 à 4 qui présentent une forte identité de séquence de 75 à 80% (Romeo et al., 2012). Les protéines, d'environ 750 acides aminés, contiennent deux domaines kinases non identiques partageant des caractéristiques structurales avec les kinases du groupe AGC pour le domaine kinase N-terminal, et avec la CaM Kinase II et l'AMPK pour le domaine C-terminal. Le domaine kinase C-ter est activé par la voie des MAP kinases ERK, et une fois activé, permet l'activation du domaine C-ter qui phosphoryle une série de substrats. Le domaine C-ter n'aurait pas d'autre substrat que cette phosphorylation en *cis*. La phosphorylation de RSK2 lui permet alors d'être transloquée dans le noyau où elle activera le complexe de transcription SRF et peut-être CREB. La voie de signalisation induisant cette dernière phosphorylation est d'ailleurs altérée chez les souris KO *RPS6KA3* (Schneider et al., 2011). Les principaux substrats de RSK2 sont des facteurs de transcription comme Elk, ATF4, CREB, soulignant la fonction de RSK dans la régulation de la transcription et dans l'activation de nombreux programmes géniques (Romeo et al., 2012). RSK2 possède aussi des substrats cytoplasmiques. Ainsi la régulation de la Phospholipase D1 par RSK2 est impliquée dans la pousse neuritique (Ammar et al., 2013). Les protéines RSK jouent un rôle dans des fonctions diverses telles que la prolifération ou la différenciation cellulaire, la réponse au stress

cellulaire ou l'apoptose (Blenis, 1993). RSK2 est aussi impliquée dans la régulation de la voie ERK (Schneider et al., 2011). Enfin les souris KO *RPS6KA3* présentent des défauts de neurogenèse embryonnaire. Ainsi, il est possible qu'une partie des symptômes observés chez les patients Coffin-Lowry soit due à un problème de différenciation des précurseurs neuronaux au cours du développement (Dugani et al., 2010). Enfin, les souris invalidées pour ce gène présentent des anomalies structurales de la morphologie des épines dendritiques, des défauts de transmission synaptique et des déficits dans certains tests cognitifs et de mémoire, tel qu'un défaut de consolidation de la mémoire spatiale à long terme et dans certains tests comportementaux de peur (Poirier et al., 2007 ; Morice et al., 2013).

Les kinases PAK sont des régulateurs de la cascade des MAP kinases ERK, soit en phosphorylant la MEK, soit en phosphorylant la protéine Raf1 au niveau de la sérine 338, un de ses sites majeurs de régulation. L'implication de la voie PAK/ERK dans la plasticité n'a toutefois pas été décrite.

4.1.3. Rho-GTPases, dynamiques des épines dendritiques et DI

Les GTPases de la famille Rho/Rac/Cdc42 sont au centre de nombreux processus biologiques comprenant l'organisation du cytosquelette, l'adhésion cellulaire, la migration cellulaire, le trafic membranaire, la polarité cellulaire et aussi des fonctions associées à des états de différenciation comme la neuritogénèse (Cf. partie Introduction III). Elles participent également à la progression à travers le cycle cellulaire et à la régulation de l'expression génique.

Les protéines Rho (pour Ras homology) ont été découvertes par hasard lors d'un clonage chez l'Aplysie en 1987. Depuis de nombreux gènes ont été caractérisés chez les mammifères. A la différence de Ras, ces protéines ne sont pas systématiquement et constitutivement membranaires. Certaines le sont, d'autres sont principalement cytoplasmiques ; l'une, RhoB est localisée sur les endosomes et Cdc42 sur le réticulum endoplasmique. Mais leur localisation peut dépendre de leur interaction avec d'autres protéines comme les GDI, et cette localisation peut être régulée au cours du cycle des GTPases. La particularité de ces GDI est d'une part, de maintenir sous forme GDP le complexe, d'autre part, de solubiliser la GTPase. Les régulateurs de ces GTPases sont des facteurs d'échange de la famille Dbl et des GTPase Activating Proteins de la famille RhoGAP. La situation devient extrêmement complexe dans la mesure où il est décrit 3 GDI (GDP Dissociation Inhibitor), 8 effecteurs, 10 GAP (GTPase Activating Protein) et plus de 20 GEF (Guanine Exchange Factor). Ces GEF possèdent des caractéristiques communes, en particulier un domaine homologue à celui de DBL (DH), responsable de l'activité facteur d'échange, associé à un domaine PH impliqué dans les interactions avec certains lipides.

Il existe une confusion sur leur fonctionnement biologique. En effet, il est encore trop souvent considéré que les Rho-GTPases seraient des interrupteurs dans les voies de signalisation comme cela a été décrit pour Ras. Or, il y a de plus en plus d'arguments démontrant que pour la plupart des Rho-GTPases, leur fonction dépend principalement de leur capacité à cycliser d'une forme liée au GDP à une forme liée au GTP, souvent associées à des protéines différentes et localisées dans des compartiments subcellulaires différents. Les caractéristiques de signalisation vont donc dépendre, pour chacune des GTPases de cette famille, bien évidemment de leur régulateur spécifique GAP, GEF et GDI, mais aussi de leur propriété GTPasique intrinsèque très variable. En corollaire, les effecteurs de protéines dont la demi-vie sous forme active est plus longue resteront

plus longtemps activés. Ce thème sera repris dans la discussion pour comprendre l'effet de la mutation R67C de PAK3.

Ces protéines sont donc impliquées dans le contrôle de la dynamique du cytosquelette. Schématiquement, on peut dire que Rho contrôle l'assemblage des câbles d'actine ainsi que la formation des plaques d'adhésion, que Rac régule la formation des lamellipodes alors que Cdc42 contrôle celle des filopodes. Les différentes GTPases de cette famille RRC sont reliées entre elles et hiérarchisées : Cdc42 conduit à l'activation de Rac qui elle-même entraîne celle de Rho (Nobes & Hall, 1995). Le cytosquelette d'actine régule la forme des épines. Son implication dans les mécanismes de la plasticité a été mis en évidence suite à l'identification de plusieurs gènes impliqués dans le retard mental et contrôlant l'état de polymérisation de l'actine (revue de Van Galen et Ramakers, 2005) (Figure 5). Ce sont les gènes de la kinase p21-activated kinase 3 (PAK3), de l'oligophrénine OPHN1 et de α PIX aussi appelé ARHGEF6. α PIX code pour un facteur d'échange activateur des GTPases Rac et Cdc42 ; OPHN1 code pour une GAP désactivatrice des GTPases de la famille Rho/Rac/Cdc42 et PAK3 est une sérine/thréonine kinase effectrice des GTPases Rac et Cdc42. Ainsi les GAP et les GEF régulent les GTPases de la famille Rac et Cdc42, celles-ci activent les kinases PAK, qui régulent les LIM kinases, elles-mêmes contrôlant l'état de phosphorylation de la cofiline, une petite protéine qui joue un rôle clé dans la polymérisation de l'actine.

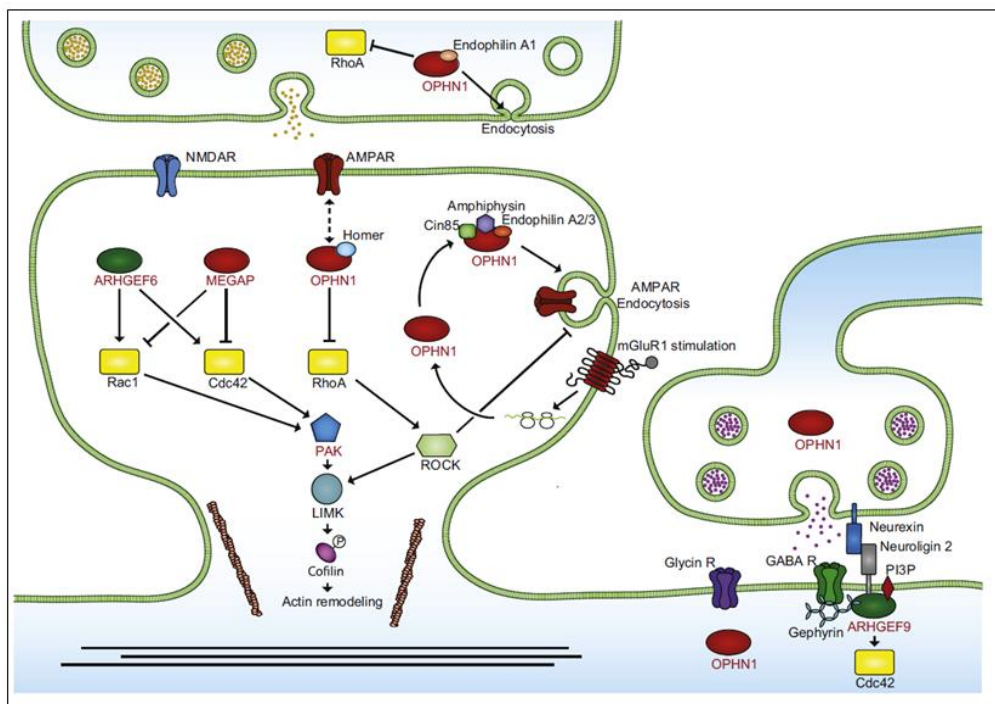


Figure 5. Rôle des Rho-GTPases dans la régulation du cytosquelette d'actine et la dynamique des épines dendritiques.

Les Rho-GTPases contrôlent le cytosquelette d'actine dans les épines dendritiques mais aussi dans la zone active. Les mutations DI affectent leurs régulateurs et effecteurs (adaptée Ba et. 2013).

Si initialement, on pensait que ces GTPases ne contrôlaient que l'état du cytosquelette, il est maintenant évident que ces GTPases participent aussi au contrôle de la prolifération cellulaire, l'altération de cette fonction pouvant alors conduire au phénotype transformé des cellules. En effet,

plusieurs oncogènes se sont révélés être des facteurs d'échange de ces protéines Rho comme Vav, Dbl et Tiam. Dans certains systèmes expérimentaux, l'expression de formes constitutivement actives de Rac (V12) suffit pour induire la transformation cellulaire. De plus, Rho et Rac sont indispensables pour l'obtention d'un phénotype complètement transformé par Ras. En effet, l'expression de formes constitutivement inactives (N17) inhibe cette transformation induite par Ras. Ceci place donc Rho et Rac en aval de Ras et sur des voies différentes de la cascade des MAP kinases ERK. Ces protéines sont ainsi à la croisée de la morphologie cellulaire et du contrôle de la prolifération cellulaire.

Nous décrirons quelques gènes dont les mutations sont impliquées dans la DI :

Une GAP des Rho-GTPases : L'oligophrénine OPHN1 est une GAP des RhoA-GTPases. Le gène OPHN1 qui code pour cette protéine fut le premier gène qui, associé à des défauts de signalisation des voies des Rho-GTPases, a été reconnu impliqué dans la déficience intellectuelle. Les patients atteints de mutations du gène OPHN1 développent un retard mental syndromique associé à des anomalies du cervelet (le phénotype le plus récurrent étant l'hypoplasie) résultant dans chaque cas pathologique d'une perte de fonction de la protéine (Ba et al., 2013). En 2004, Govék et collègues ont montré que chez la souris, le knock-down de OPHN1 aboutissait à une diminution de la longueur des épines dendritiques des neurones pyramidaux du CA1 de l'hippocampe. De plus, ils ont montré que OPHN1 régule négativement la voie de signalisation des Rho-GTPases au cours de l'établissement de l'épine dendritique. Enfin, cette étude a aussi mis en évidence l'interaction de OPHN1 avec HOMER, une protéine impliquée dans la formation des épines dendritiques mais aussi dans la transmission synaptique. (Govék et al., 2004, Nature). Une autre étude a montré que la régulation par OPHN1 de la voie de signalisation des Rho-GTPases est dépendante de l'activité des récepteurs NMDA qui favorise la localisation de OPHN1 dans l'épine dendritique et ainsi son interaction avec les récepteurs AMPA. De cette manière, OPHN1 stabilise les récepteurs AMPA à la membrane de la synapse permettant ainsi la maturation de la synapse glutamatergique et la plasticité synaptique (Nadif Kasri et al., 2009).

Le facteur d'échange α PIX : Les facteurs d'échange α -PIX et β -PIX (PAK-interacting exchange factor aussi initialement appelé COOL), codés par les gènes *ARHGEF6* et *ARHGEF7* respectivement, possèdent une activité guanine exchange facteur (GEF) spécifique des GTPases de la famille Rac et Cdc42. La situation est en fait très complexe puisqu'il existe plusieurs variants d'épissage pour β -PIX, que PIX forme des dimères qui n'ont pas tous la même spécificité vis-à-vis des GTPases et que certaines phosphorylations modifient aussi la spécificité des GEF vis-à-vis des GTPases. Les PIX forment des complexes très stables avec la protéine GIT (G-protein coupled receptor kinase 2 interacting protein appelée aussi PNK). GIT possède une activité GAP vis-à-vis de ARF impliquée dans le trafic membranaire et dans la spinogénèse (Menon et al., 2010). Les complexes PIX/GIT jouent un rôle fondamental dans la régulation dynamique de la forme et des mouvements cellulaires (Frank & Hansen, 2008). Le recrutement de GIT1 par PIX se fait grâce à une région CBD (Cat/Git Binding Domain) présente dans toutes les isoformes de PIX. β -PIX comprend quatre variants d'épissage, possédant tous une région T1 de 18 acides aminés responsable de l'inhibition des kinases de la famille PAK (Feng et al, 2002). α -PIX, quant à elle, peut se trouver sous forme monomérique où elle joue le rôle de GEF à la fois pour Rac et Cdc42. En revanche, sous sa forme dimérique, α -PIX reconnaît spécifiquement GDP-Rac (Feng et al., 2004). Par ailleurs, α -PIX contient une séquence

favorisant l'activation des kinases PAK. Une mutation de α -PIX/*ARHGEF6* a été mise en évidence dans le premier exon de la séquence, chez des patients issus d'une famille atteinte de déficit intellectuel accompagné de dysmorphisme et d'une perte d'audition. Cette mutation induit un épissage alternatif aberrant de l'exon 2 et affecte le domaine d'homologie à la calponine. Cette anomalie a pour conséquence de réduire l'interaction de α -PIX avec les filaments d'actine (Kutsche et al., 2000). Les PIX interagissent fortement avec les kinases PAK via leur domaine SH3. Ces interactions sont fortes et sont impliquées dans les nombreuses fonctions de PAK. Toutefois le rôle d' α -PIX vis-à-vis des PAK est peu documenté.

Une protéine d'échafaudage : CNK2 est une protéine d'échafaudage de la densité post-synaptique des épines dendritiques (Yao et al., 2000 ; Ohtakara et al., 2002) impliquée dans la stimulation de la voie de signalisation des MAPK (mitogen-activated protein kinase) (Roy et al., 2002). Le gène codant pour cette protéine est localisé sur le chromosome X et il est très fortement exprimé dans le cerveau et plus particulièrement dans l'hippocampe. CNK2 a été impliquée dans un cas de déficience intellectuelle non syndromique (délétion des exons 1 à 15) (Houge et al., 2012). De plus, il a été récemment montré que CNK2 permet la formation d'un complexe multi-protéique de régulation de l'activité des Rho-GTPases Rac1/Cdc42 incluant Rac1, α -PIX, β -PIX, GIT1, PAK3 et Vilse (une GTPase-Activating Protein, GAP). De par son interaction avec Vilse, CNK2 est un modulateur spatial du cycle Rac GTP/GDP au cours de la formation des épines dendritiques. En effet, lorsque CNK2 ne peut plus établir d'interactions avec Vilse, le ratio Rac-GTP/GDP est déséquilibré ce qui entraîne un maintien de l'activité de Rac avec, pour conséquence, des défauts de maturation des épines dendritiques (Lim et al., 2014). Ces données récentes viennent appuyer l'ensemble des éléments permettant d'établir une convergence vers des défauts de la voie de signalisation des Rho-GTPases impliqués dans le développement de retard mental non syndromique.

Une kinase effectrice : PAK3. Les kinases PAK du sous-groupe I constituent les principaux effecteurs des GTPases des sous-familles Rac et Cdc42 dans la signalisation. Le rôle de PAK3 dans la plasticité synaptique et ses dysfonctionnements dans la DI seront traités dans le chapitre sur les kinases PAK.

4.1.4. Transcription et épigénétique

Décrit en 1969, le syndrome de l'X fragile se manifeste par une altération des fonctions cognitives supérieures, allant de simples difficultés d'apprentissage à un retard mental sévère. Le syndrome est souvent associé à une dysmorphie faciale et à une macroorchidie chez les garçons. La maladie touche en moyenne un homme sur 4000 et une femme sur 7000 et est la première cause de DI liée à l'X. Le gène *FMR1* en cause dans la maladie est localisé à l'extrémité télomérique du bras long du chromosome X, dans un site fragile de cassure souvent observé par cytogénétique. Il s'agit d'une anomalie due à une augmentation du nombre de répétitions du triplet CGG situé dans la région 5' non codante du gène *FMR1*. Le nombre de répétitions peut varier d'une génération à l'autre, d'une personne à une autre, et au sein d'un même individu atteint dans les différents tissus. Une personne saine présente moins de 60 répétitions, souvent 29 ou 30; un individu en possédant de 60 à 200 est considéré comme prémuté ou porteur. Le syndrome se développe lorsque le nombre de

répétitions dépasse 200. L'augmentation des triplets favorise une hyperméthylation des îlots CpG situés dans le promoteur du gène FMR1, entraînant son inactivation transcriptionnelle et l'absence de la protéine chez ces patients.

FRMP est une RNA Binding protein se liant à des ARN messagers particuliers exerçant une fonction inhibitrice de la traduction de certaines protéines, en particulier celles jouant un rôle crucial dans la formation des épines dendritiques, des densités post-synaptiques et l'élaboration des synapses en réponse à l'activité neuronale (Wang et al., 2012). Le rôle de la protéine FMRP serait de favoriser le décrochage des ribosomes des ARN cibles empêchant ainsi une bonne élongation des polypeptides en cours de la synthèse protéine. FRMP joue un rôle dans le transport des ARN messagers régulés par l'activité neuronale qui contrôle entre autres, la formation des filopodes, étape nécessaire à la formation des nouvelles épines dendritiques, ce qui explique sans doute l'excès d'épines observées chez ces patients (Dictenberg et al., 2008). De manière extrêmement intéressante, il a été démontré que FRMP cible et régule la synthèse de la protéine APP, tout en contrôlant son expression dans les dendrites (Westmark & Malter, 2007). La stimulation des récepteurs métabotropiques du glutamate (mGluR) induit l'augmentation de l'expression d'APP dépendante de la présence de FMRP, suggérant que cette dernière inhibe la traduction d'APP et la production des peptides dérivés bioactifs dans la voie dépendante de la stimulation des récepteurs mGluR. Ceci a conduit plusieurs auteurs à proposer un cadre conceptuel au centre duquel FRMP et APP contrôlent la biosynthèse de protéines clés de la plasticité synaptique (Sokol et al., 2014). FMRP lie aussi des ARN non codants, en particulier des microARN, interférant avec les régulations de Dicer/Argonaute et régule ainsi la traduction d'autres protéines. Une autre cible de FRMP est la Superoxyde dismutase 1 et l'interaction avec ce messenger fait intervenir un nouveau motif structural de l'ARN. Ceci permettrait d'expliquer certaines caractéristiques phénotypiques des patients quant à la sensibilité au stress oxydatif (Bechara et al., 2009).

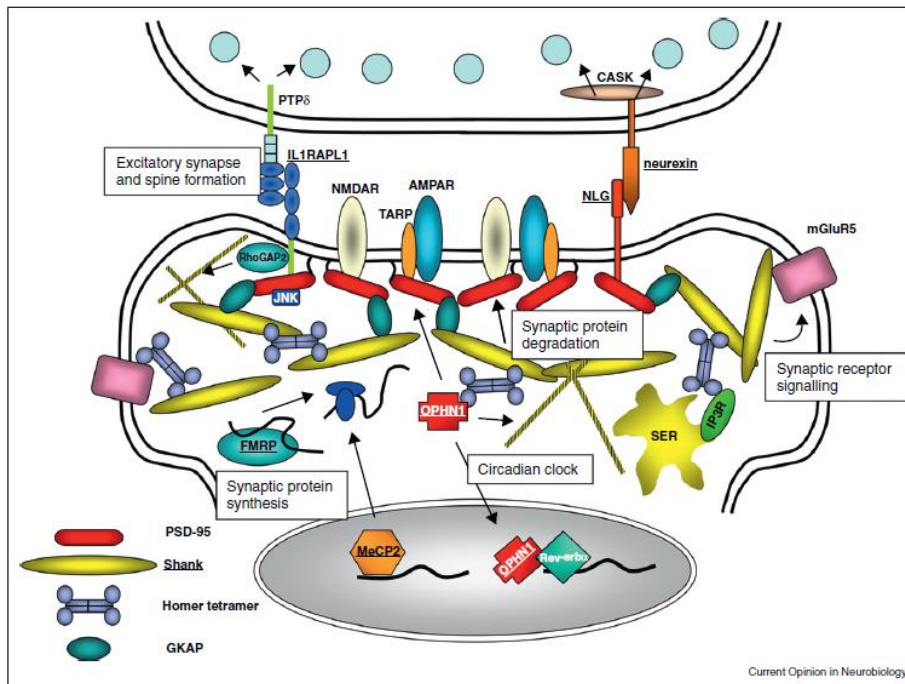


Figure 6. La protéine FRMP1 régule la traduction des protéines de l'épine dendritique.

D'après Doll & Brodie, 2014.

Plusieurs théories ont été proposées et permirent de définir des cibles thérapeutiques, aboutissant à la mise en place de plusieurs essais cliniques visant les récepteurs mGluR5 ou les récepteurs GABA. La première remarque découle des observations que la plasticité synaptique est dépendante de la synthèse protéique. Cette dernière concerne des protéines précises, en particulier impliquées dans le fonctionnement synaptique, et peut avoir lieu au voisinage des épines dendritiques. L'activation de mGluR5 stimule la traduction locale de protéines synaptiques, protéines dont la traduction par les ribosomes est contrôlée par FRMP ou dont les messagers sont stabilisés par celle-ci (Bear et al., 2004). Une version plus récente suggère que FRMP joue un rôle particulier dans cette régulation dépendante de l'activité neuronale (Doll & Broadie, 2014). Nous verrons que les kinases PAK du groupe I antagonisent les effets de FRMP et qu'un inhibiteur de PAK corrige certains défauts structuraux et cognitifs chez la souris invalidée pour ce gène (Hayashi et al., 2007 ; Dolan et al., 2013). En résumé, la traduction locale des protéines, constitutive ou régulée par l'activité neuronale, implique de nombreuses protéines ; FRMP joue un rôle central, peut-être via sa liaison à des messagers codant pour des protéines cruciales du fonctionnement synaptique comme CamKII, PSD95, APP, SOD1 et aussi PAK. De plus, les données récentes de génétique soulignent l'importance des cibles de FMRP et de la voie régulée par l'activité neuronale dans plusieurs pathologies psychiatriques, jetant les bases d'une théorie unificatrice pour ces pathologies (Figure 6).

4.2. DI, ASD et Schizophrénie, vers un continuum étiologique et signalitique

Une idée générale tend à réunifier plusieurs maladies psychiatriques qui partagent signes cliniques, bases génétiques et voies de signalisation. Ceci est nettement visible dans les analyses bibliographiques et cette évolution conceptuelle est sans doute à mettre en rapport avec l'augmentation impressionnante d'analyses génétiques menées à petite ou à très grande échelle et reliant ces différentes pathologies. Par exemple, le séquençage des exomes de 343 patients présentant des symptômes autistiques (ASD) ainsi qu'un membre de leur fratrie, montre que la plupart des gènes identifiés dans cette étude sont des cibles de la régulation par FMRP, la protéine de l'X fragile (Iossifov et al., 2012). Ainsi s'il était admis que DI et ASD présentent un spectre clinique partiellement recouvrant, il est proposé, du moins par certains cliniciens et généticiens, que la schizophrénie rejoigne ce groupe de maladies psychiatriques.

Le séquençage récent des exomes de plusieurs milliers de patients atteints de schizophrénie a mis en évidence les mutations *de novo* affectant les gènes des protéines synaptiques, en particulier les protéines liées à la régulation du cytosquelette d'actine, autour des complexes ARC et celles dont les messagers sont régulés par FMRP (Fromer et al., 2014 ; Purcell et al., 2014). Ces auteurs soulignent qu'un certain nombre de ces gènes sont aussi impliqués dans l'autisme et la DI (Figure 7).

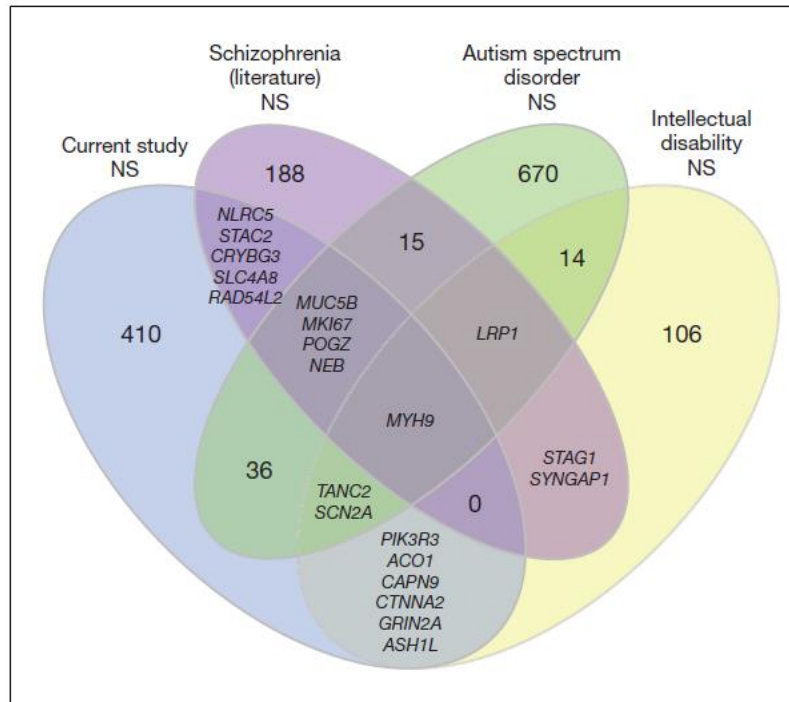


Figure 7. De nombreux gènes sont impliqués dans différentes maladies psychiatriques.

D'après Fromer et al., 2014.

Ces trois pathologies se rejoignent à trois niveaux : celui des origines génétiques, celui des voies de signalisation impliquées et enfin celui des signes psychiatriques partagés. Ce recouvrement des pathologies n'est évidemment pas total. De manière intéressante, tous les gènes ne sont pas impliqués dans les différentes pathologies : certains gènes sont identifiés pour une indication de DI et d'ASD (par exemple CHD8), d'autres sont identifiés uniquement pour la DI (SynGAP1) ou l'ASD (DYRK1A) (Krumm et al., 2014). L'autre information extrêmement importante tirée de ces données est que la synapse apparaît donc comme l'élément central de la physiopathologie de ces maladies psychiatriques. Il est intéressant de remarquer que le nombre des synapses évolue au cours de la vie, grâce à des processus précis qui ont lieu à des moments précis au cours de la vie de l'individu (formation et maturation des synapses au cours du développement embryonnaire et pendant l'enfance, élimination des synapses au cours de l'adolescence, et maintien des synapses au cours de la vie adulte) (Penzes et al., 2013). A ces périodes correspondent l'apparition des différentes pathologies : enfance et ID, enfance tardive et ASD, adolescence et schizophrénie et, plus tardivement avec la vieillesse, émergence des symptômes de la maladie d'Alzheimer (Figure 8) (Penzes et al, 2013).

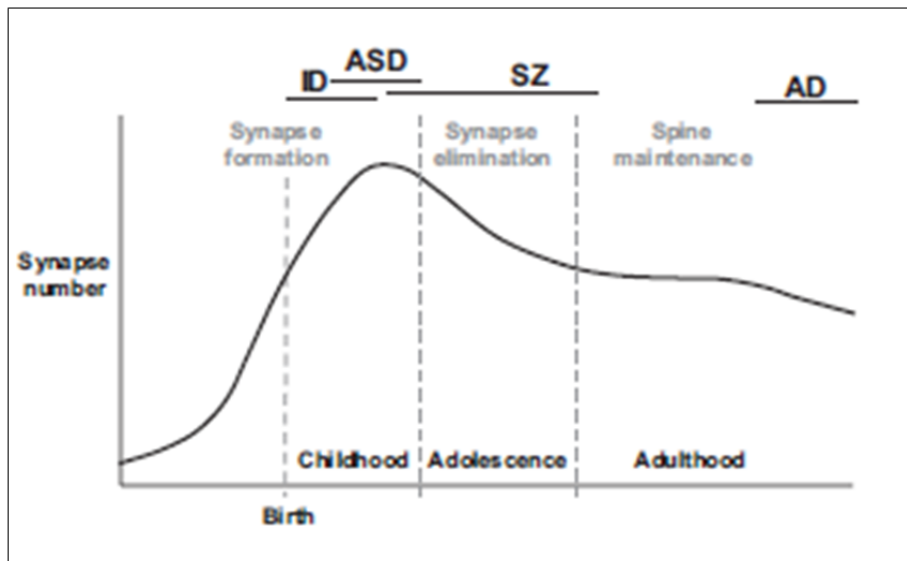


Figure 8. Evolution du nombre de synapses au cours de la vie.

Relation avec l'âge d'apparition des désordres psychiatriques (adaptée Penzes et al., 2013).

5. Perspectives de thérapies

Le développement du cerveau est caractérisé par une séquence de périodes dont certaines sont critiques et les défauts de développement du cerveau ont souvent été considérés comme irréversibles, à l'âge adulte. Cependant, les expériences réalisées dans les modèles murins des pathologies démontrent qu'il est possible, dans certains syndromes neurologiques comme ceux de l'X fragile, le syndrome de Rett, le syndrome de Down et la neurofibromatose de type I de corriger dans la souris adulte certains déficits moléculaires, électrophysiologiques et comportementaux par des manipulations génétiques et pharmacologiques. De plus, des études récentes suggèrent que la période critique de la plasticité peut être réactivée dans le cerveau adulte par des manipulations de l'environnement (enrichissement) ou par la pharmacothérapie. Ces études ouvrent donc des possibilités prometteuses telles que la combinaison d'approches pharmacologiques et comportementalistes ciblées chez l'adulte, afin d'améliorer les performances cognitives et relationnelles des nombreux patients atteints de troubles cognitifs (revue de Castren et al., 2012).

5.1. Thérapies actuelles et résultats

Les traitements actuels ciblent en grande partie l'environnement des enfants atteints de DI. La mise en place de plans éducatifs particuliers a permis de pallier certains déficits, notamment chez des enfants atteints du syndrome de Down. Pour les DI liées à des dysfonctionnements métaboliques, l'adaptation du régime alimentaire permet d'améliorer les capacités des patients, par exemple de ceux atteints de phénylcétonurie. Les traitements prénataux ont aussi montré leur efficacité, comme pour les cas d'hypothyroïdisme maternel. Enfin, les thérapies par remplacement des enzymes déficitaires (ERT : Enzyme Replacement Therapy) ont permis de restaurer les capacités

cognitives des patients pour certaines pathologies, comme par exemple le syndrome de Hurler. Cependant, bien que ce type de thérapie restaure les fonctions métaboliques, l'ERT se révèle insuffisante pour améliorer les déficits cognitifs (Piker & Walsh, 2013).

Les Rho-GTPases comme cibles thérapeutiques : Comme nous l'avons décrit, les Rho-GTPases sont au centre des voies de signalisation contrôlant la plasticité synaptique, voies qui sont souvent altérées dans la DI. Plusieurs études récentes montrent que des inhibiteurs des kinases en aval des Rho-GTPases peuvent dans certains modèles animaux améliorer certains paramètres physiologiques. Ainsi un inhibiteur des Rho kinases corrige les défauts morphologiques des épines et les caractéristiques de la transmission synaptique (Newey et al., 2005 ; Powell et al., 2012). Des approches similaires concernant les kinases PAK seront décrites dans la troisième partie.

X-Fragile et thérapie : Les approches thérapeutiques les plus prometteuses chez l'adulte sont actuellement celles visant le syndrome de l'X Fragile. La protéine FRMP régule localement la traduction de certains acteurs de la croissance dendritique, et ceci sous contrôle de l'activité des récepteurs mGluR5. Les premiers essais utilisant des antagonistes des récepteurs mGluR5, mais aussi un antibiotique inhibiteur des métalloprotéases, ont permis aux patients d'améliorer leurs comportements sociaux. (Berry-Kravis et al., 2012 ; Berry-Kravis et al., 2009 ; Leigh et al., 2013 ; Siller & Broadie, 2012). Nous verrons aussi dans le chapitre sur les kinases PAK que leur inhibition est l'une des voies possibles, dans la mesure où l'inhibition des trois kinases PAK du sous-groupe I soit par un peptide, soit par un inhibiteur chimique, supprime le phénotype des épines dendritiques anormales dans des modèles de souris invalidées pour le gène de l'X Fragile (Hayashi et al., 2004).

Par ailleurs, d'autres essais ont porté sur le syndrome de Rett lié à des mutations de MeCP2, une protéine de régulation de la transcription qui se lie à l'ADN. Il a été montré que MeCP2 régule l'expression du BDNF, une neurotrophine impliquée dans le développement du cerveau et la plasticité. La surexpression de BDNF chez les souris MeCP2-KO a permis de pallier les déficits cognitifs observés (Chang et al., 2006). Cependant, la barrière hémato-encéphalique est imperméable au BDNF, ce qui rend difficile les perspectives immédiates de thérapie pour les patients par le biais du BDNF. Il a été montré que l'IGF1 (Insulin Growth Factor 1) partage un certain nombre de propriétés et de fonctions avec le BDNF, notamment la modulation de la plasticité. Une première approche thérapeutique a montré que l'IGF1 traverse la barrière hémato-encéphalique et sans effet secondaire pour les patients, ce qui en fait un excellent candidat pour améliorer les fonctions cognitives de ceux atteints du syndrome de Rett (Pini et al., 2012).

5.2. Vers d'autres approches

Les recherches actuelles se tournent aussi vers les microARN, dont plus de la moitié sont exprimés dans les neurones, qui sont impliqués dans les régulations de l'expression des protéines et de la plasticité. Leurs rôles dans la régulation de l'expression des gènes de DI restent encore méconnus, cependant ils constituent une cible très intéressante pour d'éventuelles manipulations thérapeutiques (Piker & Walsh, 2013).

Si les **thérapies géniques et cellulaires** ont pu être envisagées pour les maladies neurodégénératives telles que la maladie de Parkinson, et bien que ces types d'approches aient suscité un vif engouement comme stratégies thérapeutiques des déficiences intellectuelles, il semble pourtant peu probable que de tels traitements soient un jour effectifs car il n'est pas connu de zone spécifique du cerveau qui serait affectée et que l'on pourrait donc cibler précisément (van Bokhoven, 2011). Par ailleurs, les effets au long terme de ces thérapies ne sont pas encore assez décrits (Stone et al., 2012). Cependant, une étude récente a montré que l'administration de cellules souches mésenchymateuses par voie intra-nasale améliore les fonctions cognitives et sensorimotrices chez la souris (Donega et al., 2013), donnant tout de même un avenir potentiel à ces approches.

L'utilisation de drogues a été envisagée mais cette stratégie n'est pas commercialement rentable car elle nécessite le développement d'une drogue par gène responsable de DI. Cependant, comme de nombreux gènes de DI convergent vers des voies de signalisation communes, l'utilisation de drogues dirigées contre ces voies pourrait devenir une stratégie potentielle de thérapie afin de toucher un plus large panel de patients atteints de déficits cognitifs (van Bokhoven, 2011).

Nous verrons plus loin que la caractérisation de la neurogenèse adulte comme base commune à un nombre important de DI pourrait ouvrir de nouvelles perspectives quant aux développements de stratégies thérapeutiques, en particulier basées sur des approches comportementalistes.

II. Neurogenèse adulte

1. Définition et historique

La neurogenèse définit le processus de génération de nouveaux neurones fonctionnels à partir de cellules souches neurales. Il a longtemps été considéré que ce processus se déroulait uniquement au cours du développement embryonnaire et durant une courte période post-natale. Cependant, depuis maintenant un demi-siècle, de nombreuses études ont permis de montrer que la neurogenèse perdure tout au long de la vie de l'individu, et ceci chez les différentes espèces de mammifères.

En 1962, en s'interrogeant sur la cinétique de prolifération des cellules gliales après lésions du cerveau adulte chez le rat, Altman et collaborateurs montrent que des cellules gliales mais aussi des neurones ont incorporé la thymidine tritiée administrée pour établir cette cinétique. Ces travaux ont permis d'élaborer l'hypothèse que de nouvelles cellules neuronales pouvaient apparaître tout au long de l'existence chez les différentes espèces de mammifère (Altman, 1962, Science). En poursuivant ces recherches, Altman & Das montrent en 1965 que la neurogenèse adulte hippocampique persiste chez des rats âgés de 8 mois, à un taux cependant inférieur à celui de la neurogenèse post-natale (Altman & Das, 1965). Depuis, de nombreuses études ont montré l'existence de neurogenèse adulte chez les différentes espèces de vertébrés. En 1984, Paton & Nottenbohm montrent que chez le canari mâle, la genèse de nouveaux neurones à chaque période nuptiale accompagne l'acquisition d'un nouveau répertoire de chant, corrélant l'apparition d'une plasticité de comportement à une neurogène adulte (Paton & Nottenbohm, 1984). Ces cellules nées à l'âge adulte présentent une morphologie neuronale, émettent des potentiels synaptiques et des potentiels d'action, et elles sont intégrées aux réseaux neuronaux existants. Dans les années 1990, l'étude de la neurogenèse adulte commence à prendre de l'ampleur grâce à, d'une part, la mise au point de cultures *in vitro* de cellules souches multipotentes dérivées de cellules souches adultes en présence des facteurs de croissance EGF et bFGF (Reynolds & Weiss, 1992; Richards et al., 1992; Ray et al., 1993) et d'autre part, à l'utilisation d'un analogue de la thymidine, le bromodéoxyuridine (BrdU) qui permet d'identifier les cellules qui se sont divisées et aussi de suivre le devenir des cellules nouveau-nées au cours du temps (Kuhn et al., 1996). Le point culminant de ces études fut la démonstration de l'existence de la neurogenèse adulte dans l'hippocampe chez l'Homme par Eriksson et collègues (Eriksson et al., 1998).

2. Niches neurogéniques, neurogenèse régénératrice et cellules souches de cancer

La neurogenèse adulte se produit principalement dans deux zones du cerveau chez les mammifères : la zone sous-ventriculaire (SVZ) qui borde le ventricule latéral (LV) et la zone sub-granulaire (SGZ) du gyrus denté (DG) de l'hippocampe (Figure 9). Cependant, il faut noter que ce processus de génération de nouveaux neurones a aussi lieu dans d'autres zones du cerveau mais de façon moins importante- (Feliciano & Bordey, 2013). De plus, il y a de grandes différences entre les espèces. Ainsi, comparé à la souris, l'Homme présente une neurogenèse hippocampique très

importante, une neurogenèse olfactive faible et il existe une neurogenèse adulte dans le striatum (Spadling et al., 2013 ; Ernst et al., 2014).

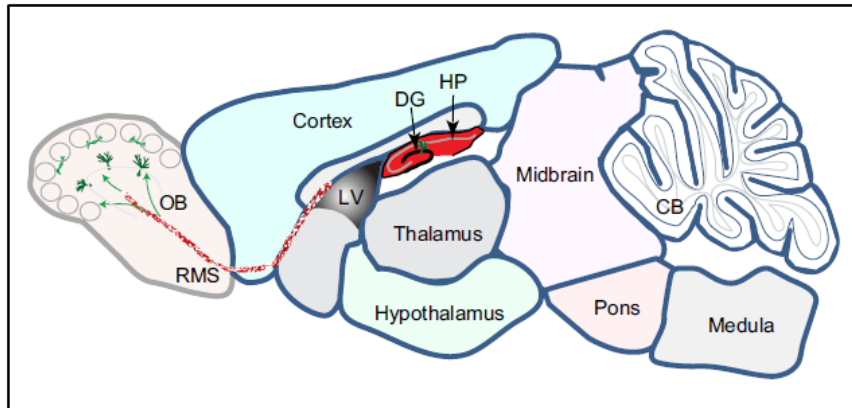


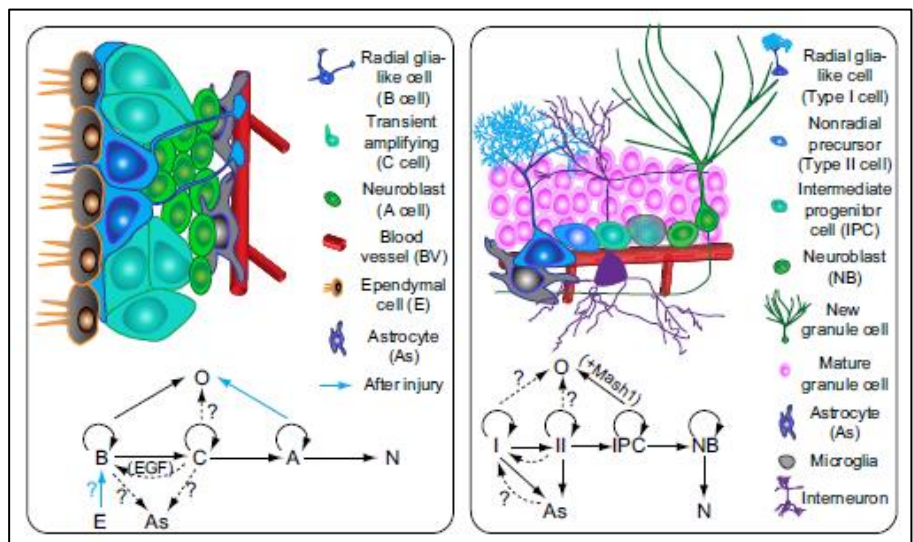
Figure 9. Section sagittale d'un cerveau de rongeur adulte.

Cette illustration met en évidence les deux régions restreintes qui montrent une neurogenèse adulte active : gyrus denté (DG) dans l'hippocampe (HP), ainsi que le ventricule latéral (LV), le flux migratoire rostral (RMS), et le bulbe olfactif (OB) (adaptée de Ming & Song, 2011).

Chez les vertébrés non mammifères, les cellules souches persistent dans de nombreux sites. Chez les mammifères, les cellules souches sont restreintes à des zones où plusieurs types cellulaires, appelées niches neurogéniques (Figure 10). Ces zones assurent un environnement physique (contact cellule/cellule, contact cellule/matrice extra-cellulaire, contact avec le liquide épendymaire) et procurent de nombreux signaux par des ligands membranaires (Delta/Notch ; Eph/ephrine, CAM, Cadherines, etc), des ligands de la matrice (sur les intégrines), des facteurs neurotrophiques et des neuromédiateurs. Les cellules souches quiescentes sont soumises à de très nombreux signaux et de nombreux travaux montrent que les différentes étapes de leurs genèses sont contrôlées par de nombreux facteurs physiologiques comme l'apprentissage, l'exercice physique, l'activité neuronale, ou autres comme les antidépresseurs.

Figure 10. Environnement de niche dans la SVZ et la SGZ.

Représentation schématique de la niche des cellules souches neurales de la zone sous-ventriculaire (SVZ, à gauche) et de la zone sub-granulaire (SGZ, à droite). N: neurones immatures. Adaptée de Ming & Song, 2011.



Des travaux récents montrent qu'il existe aussi une neurogenèse réactive qui se met en place suite à des lésions cérébrales, par un processus complexe, qui peut être soit une réactivation d'un réservoir cryptique de cellules souches, soit une activation de cellules gliales (Revue de Robel et al., 2011). Enfin, de nombreux travaux suggèrent que la réactivation des cellules souches neurales anormales et leur échappement aux contrôles physiologiques, à cause de mutations ou d'autres anomalies, seraient à l'origine des cellules souches de cancer, plus précisément de celles de glioblastome. Ceci expliquerait la grande similitude entre les cellules souches neurales adultes et celles dites de glioblastome, ce qui pose d'énormes problèmes pour définir des cibles thérapeutiques spécifiques (Bayin et al., 2014).

Plusieurs points furent sujets à de grandes controverses ces dernières années concernant, entre autres, la nature des cellules souches neurales, l'importance quantitative de la neurogenèse adulte chez l'Homme, le rôle de cette neurogenèse adulte dans les capacités cognitives et mnésiques chez l'Homme, et la participation de ces cellules souches à la cancérogénèse de certaines tumeurs cérébrales. Un autre aspect est bien évidemment la possibilité d'utiliser et de manipuler les cellules souches neurales dans le but de développer des approches thérapeutiques. Ce domaine des cellules souches embryonnaires et de celles induites (induced pluripotent stem cell) iPSC (Yamanaka, 2006) en pleine expansion est à l'aube de très nombreux bouleversements, voire de révolutions, tant du point de vue fondamental que du point de vue appliqué, comme en témoigne par exemple la fabrication d'un organoïde à partir des cellules humaines (Lancaster et al., 2013).

3. Importance du phénomène chez l'Homme

Chez l'Homme, Eriksson et collègues montrent l'apparition de nouveaux neurones par l'analyse post-mortem d'hippocampes de patients atteints de cancer, auxquels le BrdU avait été administré préalablement (Eriksson et al., 1998). Plus tard, une étude de Sanai et collègues en 2004 apporte les premiers éléments de connaissance concernant la neurogenèse de la zone sous-ventriculaire chez l'Homme. Cette étude montre que l'architecture de la SVZ humaine diffère de l'organisation observée chez les autres espèces de vertébrés. Toutefois, les cellules prélevées à partir de cerveau humain présentent *in vitro* les propriétés d'auto-renouvellement et de multipotence qui sont caractéristiques des cellules souches, et sont aussi capables de se différencier en neurones en l'absence de facteurs de croissance (Sanai et al., 2004). Cependant, cette étude a aussi entamé une longue controverse au sujet de l'existence du flux migratoire rostral chez l'Homme. En effet, ces auteurs ont constaté l'absence surprenante de flux migratoire de ces cellules nouveau-nées vers le bulbe olfactif, comme c'est le cas chez les modèles rongeurs (Sanai et al., 2004). Une seconde étude plus récente du même groupe confirme ce résultat (commentaire de Sanai et al., 2007; Sanai et al., 2011) tandis que deux autres études apportent des preuves de son existence (Curtis et al., 2007; réponse de Curtis et al. en 2007 au commentaire de Sanai et al., 2007; Wang et al., 2011).

Chez l'Homme, trois études distinctes ont montré que la neurogenèse persiste jusqu'à l'âge de 18 mois dans la SVZ et le bulbe olfactif mais que cette neurogenèse décroît au cours de l'enfance pour devenir presque inexistante à l'âge adulte dans le bulbe olfactif (Sanai et al., 2011; Wang et al., 2011). De plus, les nouveaux neurones issus de cette neurogenèse post-natale suivent majoritairement une voie de migration vers le cortex préfrontal (Sanai et al., 2011). Ces données ont

été confirmées par la publication de Bergmann et collègues en 2012 dans laquelle ils montrent que le bulbe olfactif humain n'intègre pas de nouveaux neurones à l'âge adulte (Bergmann et al., 2012).

La situation est très différente pour ce qui concerne la neurogenèse adulte hippocampique. En effet, en 2013, les travaux du laboratoire de Frisen ont confirmé l'existence de la neurogenèse hippocampique chez l'Homme (Spalding, et al., 2013). Ce travail a utilisé la brusque augmentation en ^{14}C dans l'atmosphère suite à des essais nucléaires dans les années 60, avec une dissémination atmosphérique. Sa fixation par les organismes vivants à ce moment et le déclin naturel de la radioactivité permet de dater l'évènement de fixation biologique et donc de synthèse. La mesure du ^{14}C dans l'ADN génomique permet de dater la division cellulaire et de quantifier l'âge des populations cellulaires. Utilisant cette technique très pointue, ces auteurs ont montré qu'un tiers de la population de neurones de l'hippocampe est appelé à être renouvelé et que 700 nouveaux neurones sont intégrés à l'hippocampe chaque jour, soit un turnover annuel de 1.75%. Par ailleurs, la neurogenèse hippocampique génère des nouveaux neurones à un taux assez constant au cours du vieillissement chez l'Homme. Ces données posent la question de l'importance fonctionnelle de cette neurogenèse dans différentes fonctionnalités du cerveau (tels les comportements émotionnels ou bien les processus d'apprentissage et de mémorisation).

Un article récent du même groupe montre que, chez l'Homme, les neuroblastes nouveau-nés dans la SVZ rejoignent par migration non le bulbe olfactif mais le striatum, qui jouxte les zones sous-ventriculaires (Ernst et al., 2014). Ces neurones nouveau-nés sont des interneurons et sont les premiers atteints dans la maladie d'Huntington.

4. Neurogenèse adulte comparée chez les rongeurs et chez l'Homme

La neurogenèse adulte a été beaucoup plus étudiée chez les modèles rongeurs que chez l'Homme. Cependant, quelques différences ont été établies entre les divers modèles.

La première porte sur la proportion de neurones renouvelés par la neurogenèse adulte. Chez la souris, la couche granulaire du bulbe olfactif (GCL : granule cell layer/ GrO : granule cell layer of the olfactory bulb) est constituée de deux populations distinctes de neurones. Les neurones de la partie externe de la GCL sont produits au cours de la neurogenèse post-natale, tandis que les neurones de la partie interne sont générés lors de la neurogenèse adulte (Lemasson et al., 2005). De plus, 50% de ces neurones apparus au cours de la neurogenèse post-natale sont renouvelés par le processus de neurogenèse adulte tandis que 86.8% des neurones de la couche interne sont remplacés à l'âge adulte. En revanche, il a été montré que 10% des cellules granulaires du DG sont produites au cours de la neurogenèse adulte hippocampique mais que ce processus ne contribue pas au remplacement des neurones (Imayoshi et al., 2008 ; Ninkovic et al., 2007). Chez l'Homme, la neurogenèse adulte dans le système SVZ/RMS/OB est presque inexistante (Sanai, 2011 ; Wang et al., 2011 ; Bergmann et al., 2012) tandis que la neurogenèse hippocampique contribue au renouvellement d'un tiers de la population du gyrus denté (Spalding et al., 2013).

Ensuite, il a été montré que la diminution la plus importante du nombre de neuroblastes dans le gyrus denté est observée au cours des premiers mois post-nataux chez la souris et chez l'Homme (Ben Abdallah et al., 2010 ; Knöth et al., 2010). Cependant, ce déclin est beaucoup plus

marqué chez les rongeurs que chez l'Homme. En effet, la neurogenèse adulte diminue d'un facteur 10 au cours des 9 premiers mois chez la souris (Ben Abdallah et al, 2010) et d'approximativement 4 fois tout au long de la vie chez l'Homme (Spalding et al., 2013).

La troisième différence réside dans l'impact de la neurogenèse adulte sur le nombre total de neurones du gyrus denté. Chez les différents modèles de rongeurs, il a été montré que la neurogenèse adulte permet d'accroître le nombre de neurones du DG (Imayoshi, 2008 ; Kempermann et al., 2003 ; Ninkovic et al. 2007). Chez l'Homme, il y a une disparition de ces neurones au cours du vieillissement, qui n'est pas compensée par la neurogenèse adulte. Les nouveaux neurones permettraient donc de maintenir un pool de neurones présentant des propriétés fonctionnelles spécifiques et non pas de remplacer les neurones perdus (Spalding et al., 2013) (Figure 11).

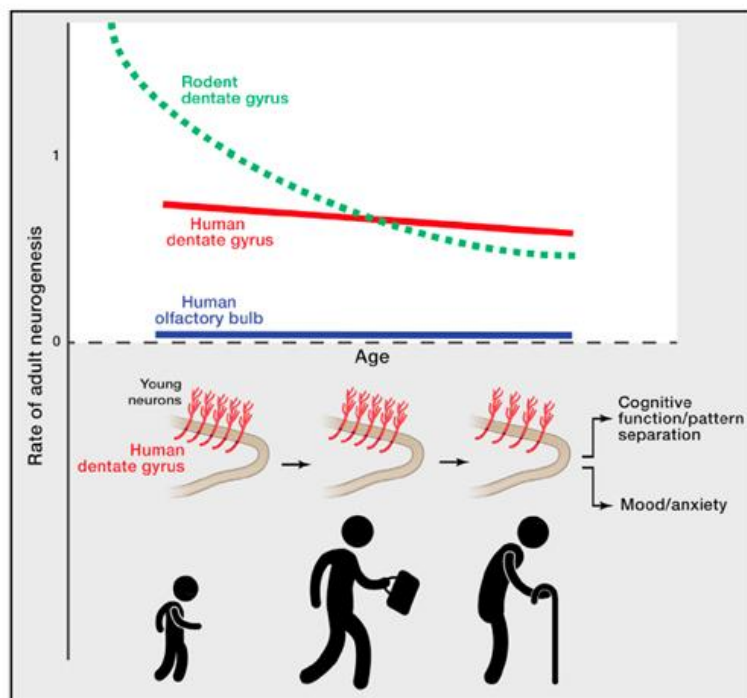


Figure 11. Comparaison des taux de neurogenèse adulte chez l'Homme et chez la souris.

Chez l'Homme, contrairement à la faible neurogenèse adulte observée dans le bulbe olfactif (ligne bleue), l'hippocampe continue de générer des neurones de façon soutenue au cours du temps, avec un faible déclin à l'âge adulte (ligne rouge). Le taux de neurogenèse observé chez l'Homme adulte est comparable à celui observé chez le rongeur d'environ 9 mois (intersection des lignes verte et rouge). Ces résultats suggèrent que les études faites chez le rongeur et mettant en évidence le rôle de la neurogenèse adulte hippocampique dans les fonctions cognitives (séparation de pattern) et dans le comportement émotionnel (anxiété) peuvent également être applicables à l'Homme adulte. (D'après Kheirbek & Hen, 2013).

Il faut noter qu'un certain nombre de marqueurs de neurogenèse validés dans différents modèles de rongeurs, comme par exemple DCX, Nestine, Sox2, Ki67, Prox 1 et NeuN, présentent des patterns d'expression similaires chez l'Homme permettant ainsi l'étude de la neurogenèse adulte humaine (Eriksson et al., 1998 ; Knoth et al., 2010). Ceci souligne les précautions qu'il faut prendre avant de généraliser à partir d'un modèle expérimental. Confirmant cette remarque, le laboratoire de Frisen vient de démontrer, toujours en utilisant cette technique de datation au ^{14}C des neurones nouveau-nés, l'existence d'une neurogenèse adulte importante dans le striatum, neurones issus de la zone sous ventriculaire et principalement des interneurons. De plus ces neurones nouveau-nés sont les premiers à disparaître au cours de l'évolution neurodégénérative de la maladie d'Huntington (Ernst et al., 2014).

5. Mécanismes cellulaires et moléculaires de la neurogenèse adulte

5.1. La cellule souche neurale

Les caractéristiques principales de la cellule souche neurale sont par définition, la capacité à s'auto-renouveler (c'est-à-dire à donner une cellule identique à elle-même après division) et la multipotence (capacité d'une cellule à générer l'ensemble des différents types cellulaires après différenciation) (Gage, 2000). Ces deux caractéristiques ont largement été étudiées *in vitro* par la mise au point de cultures de cellules prolifératives et différenciées à partir de cellules souches adultes de rongeurs (Reynolds & Weiss, 1992 ; Richards et al., 1992 ; Palmer et al., 1995 ; Babu et al., 2011) et d'Homme (Kukekov et al., 1999 ; Roy et al., 2000). Cependant, les progéniteurs neuraux cultivés *in vitro* en présence de facteurs de croissance peuvent se reprogrammer et acquérir des propriétés qui n'existent pas *in vivo* (Palmer et al., 1999 ; Kondo & Raff, 2000 ; Gabay et al., 2003).

Ces cellules souches quittent l'état de quiescence, par une division asymétrique générant une cellule qui va continuer à proliférer et une cellule souche, assurant ainsi le renouvellement du réservoir. Cette étape d'activation cruciale est régulée par de nombreux facteurs. Ainsi Notch et les effecteurs de sa voie de signalisation jouent un rôle dans le maintien des cellules souches à l'état de quiescence (Alexson et al., 2006 ; Revue par Imayoshi & Kageyama, 2011). Inversement, la signalisation via le récepteur à l'EGF favorise l'expansion des progéniteurs. Ces deux voies fondamentales assurent l'homéostasie du réservoir de cellules souches et sont interdépendantes dans la mesure où l'activation du récepteur à l'EGF induit l'ubiquitination et la dégradation de Notch (Aguirre et al., 2010). L'asymétrie de la division qui génère une cellule souche et un progéniteur est basée sur une réponse différentielle à l'EGF, elle-même due à une dégradation différentielle du récepteur à l'EGF, via la kinase DYRK1A (Ferron et al., 2010).

Les cellules issues de la SVZ possèdent des caractéristiques de cellules souches : elles sont en effet capables de proliférer au long terme et génèrent différents types cellulaires au cours de la différenciation (Reynolds & Weiss, 1992 ; Morshead et al., 1994 ; Gritti et al., 1996 ; Chiasson et al., 1999).

En revanche, si les cellules issues du DG conservent leur capacité à proliférer et leur multipotentialité, elles sont incapables de se renouveler et de proliférer indéfiniment. De plus, leur

prolifération est stimulée par le bFGF et la différenciation neuronale nécessite le BDNF au cours de la culture (Seaberg & van der Kooy, 2002 ; Bull & Bartlett, 2005 ; Clarke & van der Kooy, 2011). *In vivo*, différentes méthodes de traçage des cellules ont permis d'établir le lignage cellulaire des neurones nouveau-nés (revue de Bonaguidi et al., 2012). Une des ces techniques consiste à utiliser une construction permettant de marquer quelques rares cellules souches, grâce à l'expression de la recombinaison sous contrôle d'un enhancer du promoteur du gène de la Nestine, et avec une seule injection de tamoxiphène. Ainsi, Bonaguidi et collègues ont réussi à marquer quelques cellules souches au sein de l'hippocampe et à définir les distances maximales que peuvent avoir parcouru les cellules issues d'une même cellule souche neurale (NSC) (Bonaguidi et al., 2011). Ceci permet donc de repérer les descendants d'une cellule et d'analyser leur devenir grâce à des marquages phénotypiques. Les cellules souches sont quiescentes et présentent une morphologie de cellule gliale radiaire (RGL cell). Cette analyse clonale a permis de montrer qu'individuellement une cellule RGL donne naissance à des neurones et des astrocytes ainsi qu'à des nouvelles cellules RGL. Si cela ne permet pas d'affirmer que ces cellules gliales radiaires de la SGZ soient capables de se renouveler de manière quasiment infinie, ces résultats arguent pour un statut de cellules souches.

Les différentes théories proposées par les différents laboratoires pourraient être unifiées autour de l'hypothèse qu'il existerait au sein de l'hippocampe plusieurs populations distinctes de cellules aux propriétés plus ou moins prononcées de cellules souches (Bonaguidi et al., 2011). L'analyse de la croissance des neurosphères issues du DG montre des populations discrètes de cellules qui ne répondent pas toutes aux mêmes stimuli et suggère qu'il existe plusieurs populations distinctes de cellules souches neurales dans l'hippocampe (Walker et al., 2008).

La zone sous-ventriculaire est la principale source de neurogenèse adulte chez les rongeurs. Les cellules souches/progénitrices (neural stem/progenitors cells= NSPC) résident au niveau de la lumière du ventricule latéral parmi les cellules épendymaires. Ces NSPC, appelées cellules de type B, sont quiescentes et se divisent très lentement. Elles sont intégrées dans une organisation spatiale précise, leur permettant d'établir des contacts avec la lumière ventriculaire dans laquelle elles étendent un cil primaire riche en récepteurs qui joue un rôle important dans les signalisations induites par les facteurs du ventricule mais aussi dans l'intégration des signaux mécaniques (Figure 12).

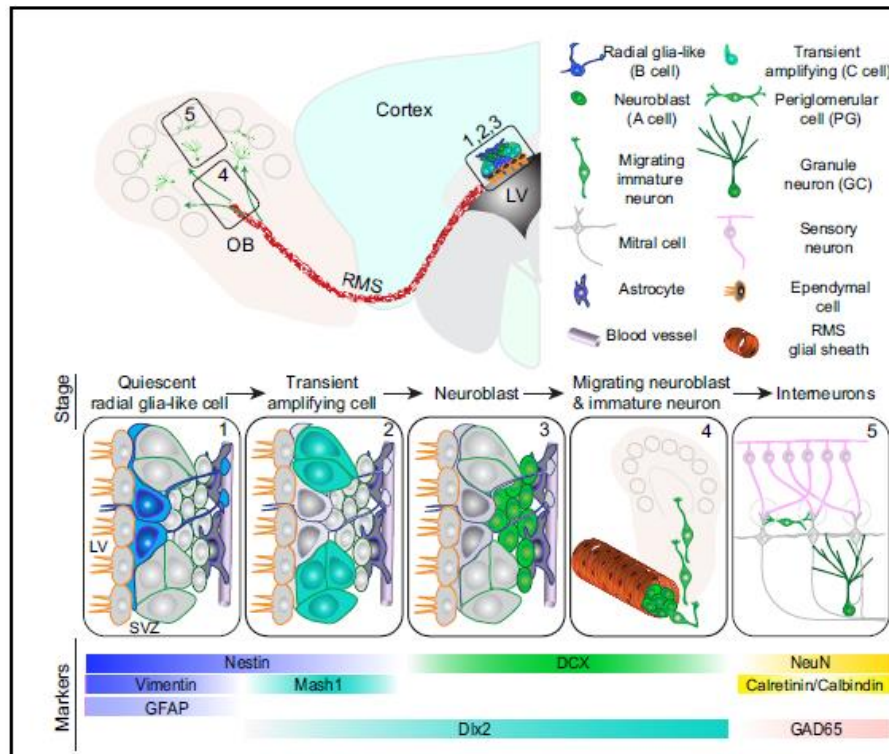


Figure 12. Neurogenèse adulte dans la zone sous-ventriculaire du ventricule latéral.

Résumé des cinq stades de développement durant la neurogenèse adulte dans la SVZ: (1) l'activation des cellules radiales gliales-like dans la zone sous-ventriculaire du ventricule latéral (LV); (2) la prolifération de progéniteurs; (3) la génération de neuroblastes; (4) la migration de neuroblastes dans le flux migratoire rostral (RMS) et la migration radiale des neurones immatures dans le bulbe olfactif (OB); et (5) l'intégration synaptique et la maturation des cellules granulaires (GC) et des neurones périglomérulaires (PG) dans le bulbe olfactif. Les expressions de marqueurs spécifiques des différents stades sont également indiquées. GFAP: glial fibrillary acidic protein; DCX: doublecortin; NeuN: neuronal nuclei; LTP: long-term potentiation (adaptée de Ming & Song, 2011).

Chez les rongeurs, la neurogenèse sous-ventriculaire est associée à des fonctions cognitives olfactives (reconnaissance sociale, relation mère-petit). Chez l'Homme, cette neurogenèse olfactive est de plus faible ampleur et diffère en quelques points importants. Au niveau des fonctions cognitives, son rôle est moindre que celui joué par la neurogenèse hippocampique. En raison de notre thématique concernant retard mental et neurogenèse adulte, nous préférons décrire ici cette dernière.

5.2. La neurogenèse hippocampique

Dans l'hippocampe adulte de mammifère, les cellules souches (NSPC) se situent dans la zone interne de la couche granulaire (SGZ) du gyrus denté (DG) et deviennent des neurones granulaires après activation et maturation. Chez la souris, la majorité des cellules nouveau-nées au cours de la neurogenèse adulte subissent un processus de mort cellulaire programmée au cours du premier mois après leur naissance et 80% des progéniteurs s'orientent vers un devenir neuronal. L'utilisation de rétrovirus infectant uniquement les cellules cyclantes a permis de marquer les progéniteurs afin de suivre leur devenir (Zhao et al., 2006) et d'étudier l'intégration fonctionnelle des neurones nouveau-

nés (van Praag et al. 2002). Pendant 3 à 4 semaines environ chez les rongeurs, se déroule le processus de maturation au cours duquel les cellules nouveau-nées immatures vont acquérir une identité neuronale de plus en plus marquée et devenir des cellules de la couche granulaire, intégrées aux réseaux neuronaux préexistants. Chez l'Homme, ce processus est beaucoup plus lent.

Les NSPC de la SGZ, appelées aussi type 1, sont quiescentes et présentent une morphologie de cellule gliale radiale (radial glial-like). Ces cellules projettent une extension radiale à travers la couche granulaire. Elles expriment les marqueurs de cellules souches Nestine, Sox2 et GFAP mais aussi Spot14 et BLBP. Leur devenir est régulé par des mécanismes permettant une homéostasie du réservoir de cellules souches. Certaines pathologies et, chez certaines espèces, le vieillissement affectent la taille de ce réservoir.

Ces cellules vont effectuer un certain nombre d'étapes avant de devenir des neurones fonctionnels (Figure 13). Nous décrivons dans un premier temps les différentes étapes de la neurogenèse adulte, puis nous décrivons brièvement quelques mécanismes de régulation et les voies de signalisation les contrôlant.

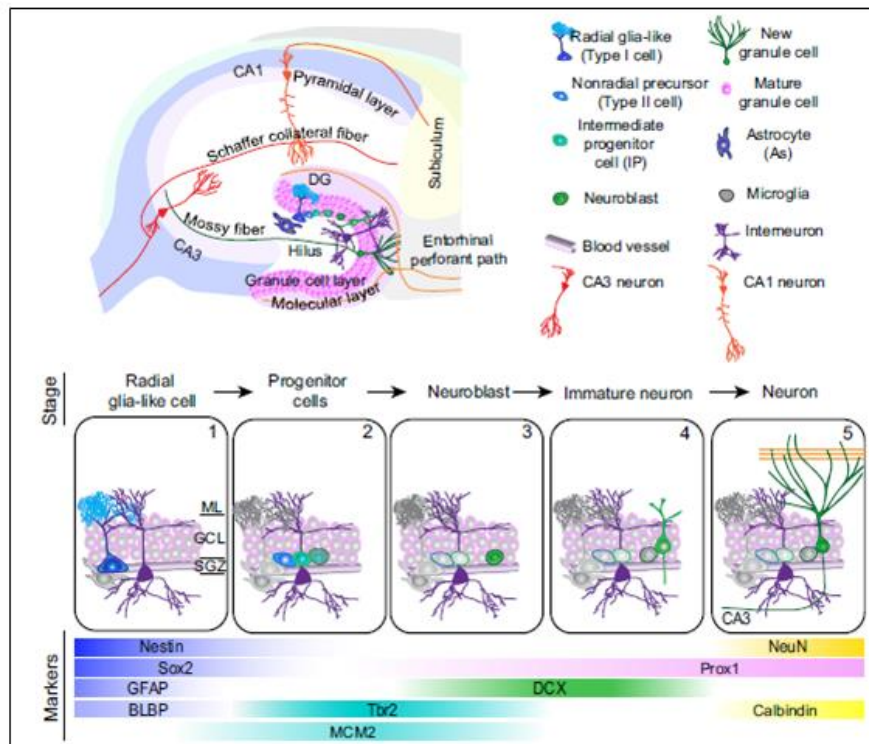


Figure 13. Neurogenèse adulte dans le gyrus denté de l'hippocampe.

Résumé des cinq stades de développement durant la neurogenèse hippocampique adulte: (1) l'activation des cellules radiales gliales-like quiescentes dans la zone sous-granulaire (SGZ); (2) prolifération de précurseurs non radiaux et progéniteurs intermédiaires; (3) la production de neuroblastes; (4) l'intégration des neurones immatures; et (5) la maturation des cellules granulaires. L'expression de marqueurs spécifiques des différents stades est également indiquée. ML: molecular layer; GCL: granule cell layer; SGZ: subgranular zone; GFAP: glial fibrillary acidic protein; BLBP: brain lipid-binding protein; DCX: doublecortin; NeuN: neuronal nuclei; LTP: long-term potentiation (adaptée de Ming & Song, 2011).

Introduction

Le type cellulaire 2 peut être divisé en deux sous-types 2a et 2b (progéniteurs neuraux intermédiaires = INP). Ces cellules sont prolifératives et le temps de leur cycle cellulaire a été estimé à environ 14h *in vivo* chez la souris adulte (Mandyam et al., 2007). Au cours de la neurogenèse postnatale, la majorité de ces progéniteurs opère des divisions symétriques pour donner à nouveau deux cellules progénitrices (45%) ou bien deux neuroblastes (neurones immatures) (45%), tandis qu'une minorité (10%) effectue une division asymétrique pour donner un progéniteur et un neuroblaste (Namba et al., 2011). Les cellules de type 2 migrent sur une courte distance dans la zone interne de la couche granulaire. Ces cellules expriment les marqueurs souches Nestine et Sox2 mais aussi Tbr2 et MCM2. Ces cellules de type 2 commencent la projection de filopodes à travers la couche granulaire vers la couche moléculaire du DG et la projection d'un axone à travers l'hilus vers le CA3. Ces cellules n'ont cependant pas encore de fonctions synaptiques intégrées au réseau préexistant mais sont toujours activées de façon tonique par le GABA des interneurons environnants (Ge et al., 2006).

Au cours de cette période on observe une première période critique dans le DG. Celle-ci a lieu assez tôt après la naissance des cellules et concerne une grande majorité des cellules nouveau-nées. Cette période critique de survie a lieu au cours de la transition entre le stade progéniteur et neuroblaste ; environ 56% des cellules nouveau-nées meurent. Les cellules mortes sont rapidement éliminées par le processus de phagocytose effectué par les cellules de la microglie (Sierra et al., 2010).

Au cours de la deuxième semaine de maturation, les cellules de type 2 deviennent des neuroblastes et sont toujours considérées immatures mais acquièrent une identité neuronale plus marquée. Ces cellules migrent un peu plus dans la couche granulaire, deviennent plus polarisées avec la croissance de l'axone à travers l'hilus vers le CA3 (Faulkner et al., 2008 ; Toni et al., 2008) et la projection de leurs dendrites vers la couche moléculaire du DG. Ces cellules reçoivent des entrées synaptiques GABA-ergiques lentes au niveau de leurs dendrites (Esposito et al. 2005 ; Ge et al., 2006). A ce stade de la maturation, le GABA exerce un effet dépolarisant (excitateur) pour ces progéniteurs qui possèdent une concentration intracellulaire en chlore très élevée liée à l'expression du transporteur des ions Cl⁻, NKCC1. Ces entrées GABA-ergiques sont indispensables à la maturation et la survie des neurones nouveau-nés. A ce stade de la maturation, il a effectivement été montré que la conversion de l'effet dépolarisant en effet hyperpolarisant (inhibiteur) cause des défauts de développement des cellules nouveau-nées qui présentent des anomalies d'épines dendritiques et d'intégration synaptique *in vivo* (Ge et al., 2006). Ces neuroblastes ne sont pas encore soumis à des entrées glutamatergiques, comme le confirme l'absence d'épines dendritiques dans la couche moléculaire à ce stade de la maturation (Zhao et al., 2006 ; Esposito et al., 2005).

Au cours de la troisième semaine, les neuroblastes deviennent des neurones immatures, qui expriment la doublecortine (DCX, une protéine cytoplasmique) et Prox1 (un facteur de transcription). De façon extrêmement surprenante, les souris KO-DCX ne présentent pas de défaut de neurogenèse adulte hippocampique tant au niveau de la prolifération et de la survie de cellules nouveau-nées qu'à celui de leur devenir phénotypique (neuronale ou gliale) (Germain et al., 2013). Ces nouvelles cellules granulaires immatures continuent à projeter leurs dendrites à travers la couche moléculaire et leur axone vers le CA3. De plus, des connexions afférentes et efférentes avec le réseau neuronal préexistant commencent à se former. Des épines dendritiques, dont la croissance et la mobilité sont maximales à cette période (Zhao et al., 2006 ; Toni et al., 2007), apparaissent et forment des

synapses avec les fibres (axones) afférents de la voie perforante venant du cortex entorhinal. La formation des synapses résulte de la maturation de filopodes en épines dendritiques. Les filopodes ciblent principalement des boutons axonaux formant déjà une synapse avec une épine d'un autre neurone (Toni et al., 2007). Les nouveaux neurones immatures reçoivent des entrées glutamatergiques au niveau de leurs épines dendritiques (Esposito et al., 2005 ; Ge et al., 2006 ; Zhao et al., 2006 ; Mongiat et al., 2009). De plus, ces neurones immatures expriment le transporteur du chlore KCC2 (responsable de l'exportation du chlore), ce qui engendre une conversion des entrées GABA-ergiques, qui étaient jusqu'alors excitatrices (dépolarisantes), en inhibitrices (hyperpolarisantes) (Ge et al., 2006). Les entrées GABA-ergiques mises en jeu au cours de la neurogenèse adulte partagent les mêmes caractéristiques et ont les mêmes propriétés fonctionnelles que celles existantes au cours des neurogenèses embryonnaires et postnatales (Laplagne et al., 2006). La connexion efférente s'établit de la même façon. Le bouton axonal (mossy fibres bouton) de la nouvelle cellule granulaire forme une synapse avec le dendrite du neurone pyramidal du CA3, au niveau d'une région riche en épines (thorny excrescence) libre ou déjà impliquée dans un bouton. Cette connexion efférente devient individuelle après deux mois de maturation (Faulkner et al., 2008 ; Toni et al., 2008) (Figure 14).

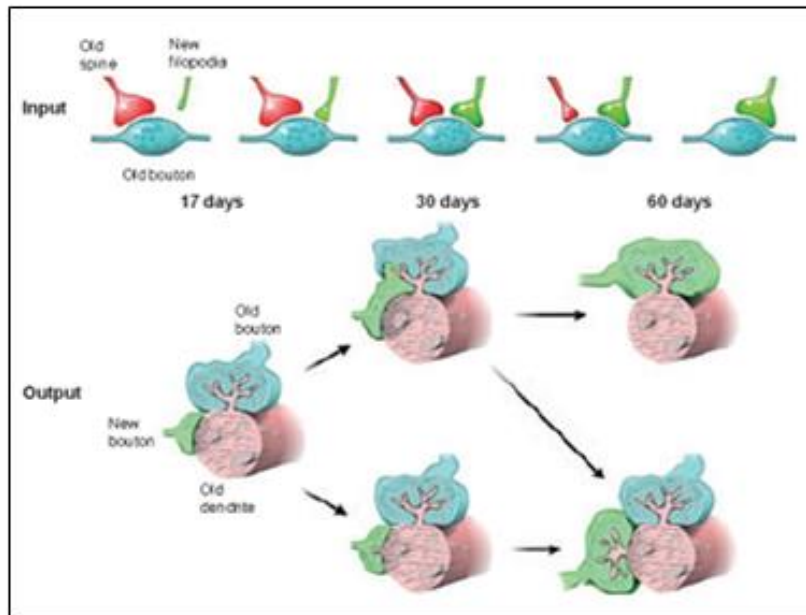


Figure 14. Illustration schématique de la séquence hypothétique d'événements impliqués dans l'intégration synaptique des neurones nouveau-nés à l'âge adulte dans le réseau glutamatergique.

Panneau haut : Un filopode d'un neurone nouveau-né (vert) est attiré par une synapse pré-existante entre un bouton axonal (bleu) et un autre neurone (rouge). Quand les filopodes se stabilisent et mûrissent sous forme d'épines dendritiques, un bouton multi-synaptique est formé. Progressivement, l'épine du neurone nouveau-né augmente en taille, et l'épine provenant d'un autre neurone se réduit jusqu'à se rétracter, changeant le bouton multi-synaptique en bouton mono-synaptique. Panneau bas : en arrivant dans la région CA3, les fibres moussues projettent sur les dendrites des cellules pyramidales. Après environ un mois, les fibres moussues contactent les protrusions tortueuses, certaines d'entre elles étant partagées avec des neurones pré-existants (adaptée de Toni & Sultan, 2011).

A quatre semaines, les nouveaux neurones matures présentent toutes les caractéristiques morphologiques des cellules granulaires du DG. Ils projettent des dendrites arborant des épines jusqu'à la couche externe de la couche moléculaire et des axones dans le CA3. De plus, les nouveaux neurones expriment NeuN (Neuronal Nuclei) et Prox1. Cependant, la maturation des cellules nouveau-nées se prolonge entre 2 à 4 mois après la naissance de la cellule. Les connexions efférentes deviennent pleinement matures en 8 à 16 semaines (Faulkner et al., 2008).

Plusieurs autres voies majeures régulent la neurogenèse adulte. Ainsi l'activation de voie canonique de Wnt, l'inhibition de la dégradation de la beta-caténine, favorisent la prolifération des progéniteurs (revue par Zhang et col., 2011). De manière intéressante, les travaux du groupe d'Olivier Raineteau montrent que Wnt contrôle la neurogenèse de populations cellulaires favorisant le lignage vers le phénotype neuronal et la production de futurs neurones glutamatergiques, dans des sous-domaines de la zone ventriculaire (Azim et al., 2014). De même Sonic hedgehog via une signalisation de Smoothed au niveau du cil primaire, est impliqué dans la prolifération des progéniteurs (au moins pour la SVZ) (Han et al., 2008).

6. L'activité neuronale régule la neurogenèse adulte

6.1. Dans l'hippocampe

Les neurones immatures vont, au cours de leur maturation, exprimer successivement différents types de canaux ioniques et de sous-unités de récepteurs aux neurotransmetteurs qui leur confèrent des sensibilités spécifiques à l'activité neuronale environnante.

Ainsi les jeunes neuroblastes expriment le canal chlore NKCC1 qui favorise l'entrée de Chlore, rendant ainsi les cellules hyperexcitables. Dans ces cellules, l'ouverture du canal du récepteur GABA_A provoque un flux sortant d'ions chlorure déplaçant le potentiel de membrane vers une valeur plus dépolarisée et pouvant atteindre le seuil de déclenchement d'un potentiel d'action sodique (Ben Ari et al., 2007).

En 2009, une étude a montré qu'une seconde période critique de survie dépendante de l'activité des récepteurs au NMDA se produit trois semaines après la naissance des nouveaux neurones, à cette même période où ces cellules commencent à établir des synapses et à recevoir des entrées glutamatergiques. La survie ou la mort de ces cellules seraient influencées par les informations qu'elles reçoivent, conférant un rôle particulier à ces cellules dans les processus d'apprentissage et de mémorisation au moment de leur intégration dans les réseaux préexistants (Tashiro et al., 2006). Dans ce même moment, les nouvelles cellules granulaires présentent une période critique de la potentialisation à long terme au cours de leur maturation c'est-à-dire un seuil d'induction de la LTP plus faible et une amplitude de LTP plus importante en réponse à des stimulations (Schmidt-Hieber et al., 2004; Ge et al., 2007). La même étude a montré que cette période critique est dépendante de l'expression de la sous-unité NR2B des récepteurs au NMDA. L'inhibition pharmacologique de cette sous-unité NR2B abolit totalement la LTP dans ces neurones nouveau-nés mais pas dans les neurones matures (Ge et al., 2007). Cette période critique de plasticité synaptique pourrait faciliter l'intégration fonctionnelle de ces nouveaux neurones afin

d'établir des modifications à long terme du réseau préexistant (Ramirez-Amaya et al., 2006; Wiskott et al., 2006) mais aussi conférer un avantage à ces nouveaux neurones pour établir et stabiliser des connexions afférentes et efférentes (Tashiro et al., 2006; Toni et al., 2008). Ainsi, cette propriété particulière des nouvelles cellules granulaires pourrait participer à la plasticité neuronale de l'hippocampe (Ge et al., 2008) (Figure 15).

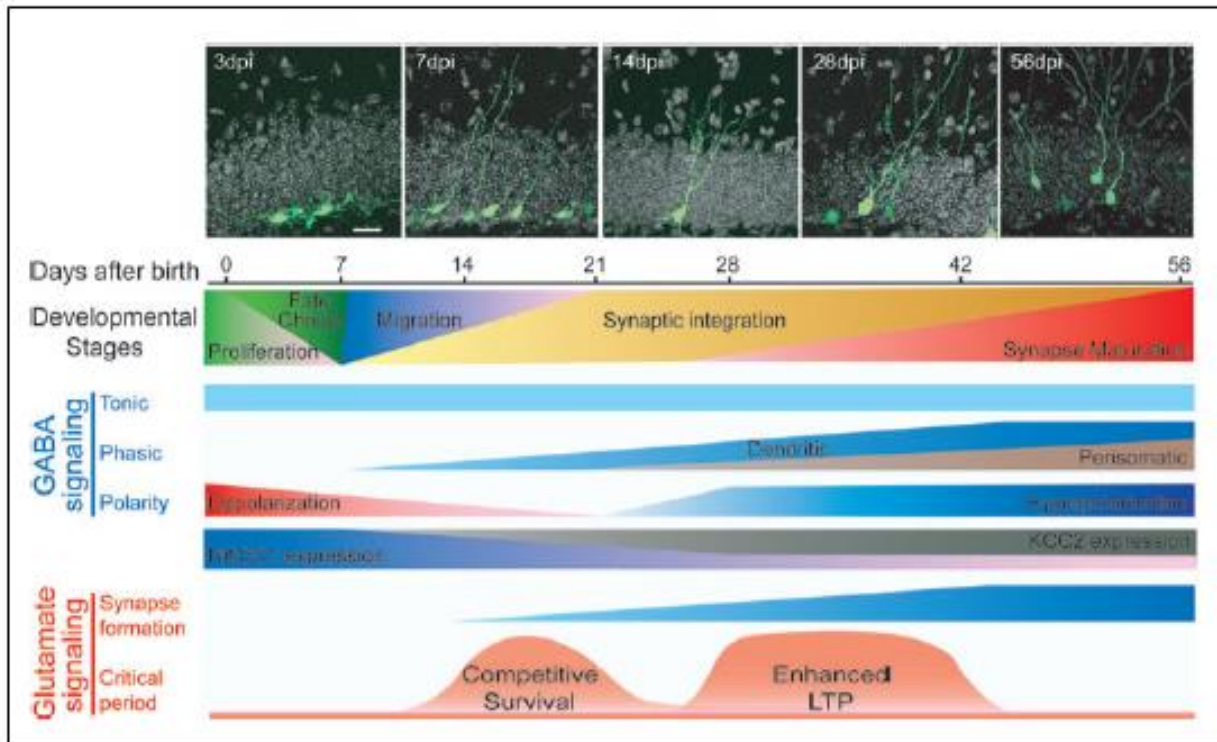


Figure 15. Intégration synaptique des nouveaux neurones granulaires du gyrus denté de l'hippocampe de souris adulte.

D'après Ge et al., 2008

Une étude plus détaillée de ce phénomène a permis de montrer que les neuroblastes issus des mêmes cellules souches montrent des niveaux de différenciation différents le long de l'axe septo-temporal de l'hippocampe, avec des vitesses de maturation plus rapide du côté temporal (Piatti et al., 2011). La stimulation de la neurogenèse adulte par l'activité physique a un effet plus prononcé sur la maturation des neurones coté septum, si bien que sous ces conditions, les deux populations évoluent avec la même cinétique. En jouant sur l'expression de canaux ioniques rectificateurs Kir2.1, ces auteurs montrent le rôle de l'activité électrique dans les processus de maturation des neurones. Une autre étude a analysé le développement des épines dendritiques dans les neurones nouveau-nés en fonction d'une induction de la LTP une à deux semaines avant l'analyse, et ceci à différents stades de la différenciation des neurones nouveau-nés (Ohkawa et al., 2012). Ils constatent que cette stimulation a des effets très différents suivant le niveau de maturation du neuroblaste ; les cellules âgées de 12 et 21 jours montrent une augmentation du nombre d'épines ou un élargissement des synapses, respectivement, alors que les cellules âgées de 16 jours répondent par une diminution de la densité des épines. Ceci démontre aussi qu'il existe une fenêtre temporelle de régulation de la maturation des neurones nouveau-nés par l'activité neuronale. De plus, les

neurones immatures, de par leur excitabilité accrue, sont recrutés en plus grand nombre lors de l'activation des réseaux neuronaux (Marin-Burgin et al., 2012). Ceci suggère que les différents profils d'activation entrant dans le gyrus puissent être décodés par le recrutement spécifique des différentes classes d'âge des populations de neurones nouveau-nés.

De manière très intéressante, il a été montré que les états d'anxiété, de stress associés à des états dépressifs affectent la neurogenèse adulte, principalement dans l'hippocampe qui est une des structures du cerveau impliquée dans la dépression, et que le traitement chronique avec des antidépresseurs stimule fortement la neurogenèse hippocampique (David et al., 2010).

6.2. Modulation de la neurogenèse adulte hippocampique par la sérotonine et la dopamine

Les neurones sérotoninergiques du noyau du raphé dorsal envoient des projections dans le gyrus denté et la signalisation liée à la sérotonine est impliquée dans la régulation de l'humeur (Jacobs et al., 2000). L'augmentation de la transmission sérotoninergique régule positivement la neurogenèse dans l'hippocampe, comme l'ont montré deux études dans lesquelles des traitements antidépresseurs agissant sur les transporteurs de la sérotonine provoquent une augmentation de la neurogenèse (Malberg et al., 2000 ; Santarelli et al., 2003).

De même, la diminution de la dopamine entraîne la réduction de la prolifération des progéniteurs neuronaux dans la SVZ et la SGZ chez la souris. Cette prolifération réduite des précurseurs se retrouve aussi chez les patients atteints de la maladie de Parkinson, suggérant que le dérèglement du système dopaminergique conduit à une altération de la neurogenèse adulte chez ces patients (Höglinger et al., 2004). Une autre étude a montré que la dopamine diminue la capacité des nouveaux neurones à exprimer une LTP. La dopamine serait un régulateur important de l'activité des nouveaux neurones liée aux informations perçues par les connexions afférentes dans l'hippocampe (Mu et al., 2011).

6.3. Dans la zone sous-ventriculaire et dans le bulbe olfactif

En 2009, l'équipe de P-M Lledo montre que les nouveaux neurones de la couche granulaire du bulbe olfactif présentent une période critique entre 2 et 8 semaines après leur naissance pendant laquelle ils possèdent une potentialisation à long terme (LTP) améliorée (Nissant et al., 2009). Cette fenêtre de temps correspond à celle pendant laquelle les neurones nouveau-nés opèrent des modifications dépendantes de l'expérience en réponse à un stimulus odorant (Magavi et al., 2005).

En 2005 et 2008, deux études établissent l'existence d'une période critique pour la survie des nouveaux neurones, entre 14 et 30 jours après la naissance de ces cellules (Yamaguchi & Mori, 2005 ; Mouret et al. 2008). Ces nouveaux neurones sont localisés principalement dans les couches internes de la couche granulaire, et leur survie et élimination sont influencées par l'apprentissage. A ce même moment, les synapses se forment et les nouveaux neurones commencent à recevoir des entrées de glutamate. Au cours de cette période, la survie des nouvelles cellules granulaires est dépendante de l'expérience sensorielle (Mouret et al., 2008). De plus, il a été montré que l'apoptose des nouveaux neurones est plus importante en période post-prandiale. Ces données suggèrent aussi que cette réorganisation structurale des circuits neuronaux par la mort des cellules nées au cours de la

neurogenèse adulte lors de la période post-prandiale est influencée par les expériences sensorielles vécues durant les périodes de veille (Yokoyama, 2011). Une autre étude introduit l'existence d'une autre période critique de survie. Au cours de leur migration dans le flux rostral migratoire (RMS), les neuroblastes commencent à exprimer les récepteurs au NMDA. La libération de glutamate par les astrocytes environnants, l'expression et la signalisation liée à ces récepteurs sont indispensables à la régulation de l'apoptose des cellules nouveau-nées. Le blocage pharmacologique ou la perte de fonction des récepteurs au NMDA, et plus particulièrement de la sous-unité NR1, provoquent une augmentation de la mort cellulaire dans le RMS. Cette perte de fonction n'est que partiellement compensée par l'expression des autres sous-unités des récepteurs au NMDA (Platel et al., 2010). L'ensemble de ces données montre que les neurones nés au cours de la neurogenèse adulte dans le BO participent aux processus d'apprentissage et de mémorisation.

La survie, la maturation et l'intégration des cellules nouveau-nées, aussi bien dans le bulbe olfactif que dans le gyrus denté, sont dépendantes des activités neuronale et synaptique locales.

7. Neurogenèse adulte et mémoire

Les recherches actuelles sur la relation entre la genèse de nouveaux neurones et les fonctions mnésiques sont axées autour de deux grandes questions réciproques, à savoir le rôle de la neurogenèse adulte dans les processus d'apprentissage et de mémorisation, et l'influence de l'apprentissage sur la neurogenèse adulte. Plusieurs méthodes récurrentes pour l'étude de la relation entre neurogenèse adulte et mémoire sont décrites dans l'encart ci-dessous. L'hippocampe est sectorisé en deux zones qui sont impliquées de façon différentielle dans l'adaptation des comportements. L'hippocampe dorsal (ou septal) a un rôle préférentiel dans les processus d'apprentissage et de mémorisation tandis que l'hippocampe ventral (ou temporal) est plus particulièrement impliqué dans les comportements émotionnels (Bannerman et al., 2004). Nous ne traiterons donc que du rôle de l'hippocampe septal dans les processus d'apprentissage et de mémorisation.

Tâches comportementales et neurogenèse adulte.

Trois tâches comportementales dépendantes de l'hippocampe permettent l'étude de la neurogenèse adulte. L'épreuve du clignement palpébral conditionné dans la version « trace » est une épreuve de mémoire associative au cours de laquelle l'animal établit une association simple entre un stimulus conditionnel (un son ou une lumière) à un stimulus conditionné (un choc péri-orbital) dont les présentations sont espacées par un intervalle de temps. La piscine de Morris est une épreuve de mémoire spatiale au cours de laquelle les individus doivent établir des associations multiples entre les indices présents dans l'environnement afin de construire une représentation mnésique de l'espace, dans le but de localiser et rejoindre une plateforme immergée. L'expérience de peur conditionnée au contexte est une épreuve de mémoire contextuelle émotionnelle au cours de laquelle les animaux associent un choc électrique au contexte dans lequel il est reçu et qui conduit à l'expression d'une réponse d'immobilisation (freezing) lors de la réexposition à ce même contexte.

Dès 1967, Altman & Das formulent l'hypothèse que les neurones nouveau-nés au cours de la neurogenèse adulte hippocampique pourraient être impliqués dans certains aspects du comportement qui se développent et s'établissent à l'âge adulte (Altman & Das, 1967). En 1997, Kempermann et collègues montraient une corrélation entre la stimulation de la neurogenèse adulte hippocampique et l'amélioration des capacités mnésiques. Depuis, de nombreuses études montrent l'implication de la neurogenèse adulte hippocampique dans les fonctions cognitives en décrivant une corrélation entre les taux de prolifération et de survie des cellules nouveau-nées, et les performances comportementales obtenues au cours des différentes tâches dépendantes de l'hippocampe. Par exemple, une meilleure performance dans l'épreuve du clignement palpébral a été corrélée à une augmentation de la prolifération (Lemaire et al., 1999) et de la survie (Leuner et al., 2004) des cellules granulaires nouveau-nées chez la souris. Cependant, l'épreuve de la piscine de Morris apporte des résultats très divers. Les études de Kempermann & Gage en 2002 chez la souris et de Drapeau et collègues chez le rat en 2003, montrent en utilisant le test de la piscine de Morris une corrélation positive entre l'apprentissage spatiale et le nombre de nouveaux neurones. De nombreux autres exemples corrélient différents types de mémoires à la neurogenèse hippocampique (pour revues Aimone & Gage, 2011 ; Koehl & Abrous, 2011).

7.1. Manipulations expérimentales de la neurogenèse et effets sur les performances mnésiques.

Différentes méthodes d'étude de l'implication de la neurogenèse adulte hippocampique dans les processus d'apprentissage et de mémorisation ont été développées. Le traitement avec un anti-mitotique, le MAM (pour methylazoxymethanol acetate) fut la première approche pharmacologique développée en 2001 par Shors et collègues (Shors et al., 2001). Les résultats obtenus sont hétérogènes. En effet, les souris traitées présentent des déficits comportementaux dans les épreuves de clignement palpébral et de peur conditionnée au contexte mais en revanche, le traitement de provoque pas d'altérations des performances mnésiques dans le test de la piscine de Morris (Shors et al., 2001, 2002). L'équipe de Serge Laroche a par ailleurs montré que ce traitement ne modifie pas non plus les performances dans le test de reconnaissance d'objet alors qu'il bloque l'amélioration des performances associées à l'élevage en environnement enrichi (Bruehl-Jungerman et al., 2005). De plus, en raison de l'effet anti-mitotique du MAM sur l'ensemble des cellules de l'individu (et non uniquement sur les progéniteurs neuraux) mais aussi de ses effets toxiques, les résultats sont difficiles à interpréter (Dupret et al., 2005). Pour parer à ces problèmes, de nouveaux agents pharmacologiques sont à présent employés comme le 5-Fluorouracil (Mustafa et al., 2008), le témozolomide (Garthe et al., 2009) ou encore l'AraC (cytosine arabinoside ; Mak et al., 2007). Ces agents altèrent la mémoire de travail et la navigation spatiale.

L'irradiation totale ou partielle de l'hippocampe constitue la seconde approche d'étude de la causalité entre neurogenèse adulte et mémoire. Cette technique permet de cibler l'hippocampe et d'épargner la neurogenèse dans les autres zones du cerveau (Santarelli et al. 2003 ; Snyder et al. 2005 ; Clelland et al., 2009). L'irradiation engendre des déficits dans la réponse de peur conditionnée au contexte (Saxe et al., 2006). L'épreuve de mémoire spatiale a donné des résultats plus divers. Il a été montré que l'irradiation aux rayons X de souris âgées de 2 mois provoque des déficits d'apprentissage et de mémorisation spatiale dans le test du labyrinthe de Barnes (plateforme circulaire et éclairée percée de trous ; un seul de ces trous permet à l'animal de s'enfuir ; l'animal

utilise les indices spatiaux situés dans la pièce pour situer et mémoriser la localisation de ce trou) mais pas dans le test de la piscine de Morris (Raber et al., 2004). D'autres études montrent également que l'irradiation ne provoque pas d'effets sur l'acquisition d'une tâche de mémoire spatiale (Madsen et al., 2003 ; Snyder et al., 2005 ; Meshi et al., 2006 ; Saxe et al., 2006). Une autre étude réalisée sur des souris âgées de 3 mois a montré des résultats exactement opposés à ceux obtenus par Raber et collègues (Rola et al., 2004). De plus, Snyder et collègues montrent des déficits de rétention à long terme suite à l'irradiation (Snyder et al., 2005).

Bien que dans l'ensemble, le traitement au MAM et l'irradiation affectent la mémoire associative sans perturber la mémoire spatiale, il ressort tout de même une certaine disparité dans les résultats obtenus par ces deux méthodes qui génèrent de nombreux effets secondaires (inflammation et toxicité). Ceci pourrait être dû à l'absence d'une technique d'ablation spécifique de la neurogenèse adulte dans le DG. Dans ce but, la génération de lignées transgéniques de souris permettant de cibler une sous-population particulière de cellules pourrait préciser les fonctions des cellules nées au cours de la neurogenèse adulte dans les processus d'apprentissage et de mémorisation. Les souris GFAP-TK sont le premier modèle transgénique créé dans ce domaine. Chez ces souris, l'injection de ganciclovir provoque l'ablation des progéniteurs neuraux exprimant la GFAP (Garcia et al., 2004) et il a été montré que l'absence de neurogenèse adulte provoque une diminution du temps d'immobilisation (freezing) au cours du test de peur conditionnée au contexte (Saxe et al., 2006). Depuis, plusieurs autres modèles d'ablation de la neurogenèse ont été créés comme les souris Nestin/Bax (induction de la mort cellulaire des précurseurs exprimant la nestine inducible par traitement à la doxycycline ; Dupret et al., 2008), les souris $Tlx^{f/z}/CRE^{ER}$ (blocage de la prolifération cellulaire ; Zhang et al., 2008), le modèle NSE-DTA/NesCRE^{ERT2} (induction de la mort des précurseurs neuraux après injection de tamoxifène ; Imayoshi et al., 2008). Ces modèles murins de déplétion de la neurogenèse adulte présentent généralement des déficits de mémoire spatiale et mais développent des réactions hétérogènes dans les tests de peur conditionnée au contexte. Un dernier modèle d'altération de la maturation des cellules nées au cours de la neurogenèse adulte (mutation du gène *PC3tis21*) montre des déficits dans les épreuves de peur conditionnée au contexte et de mémoire spatiale (Farioli-Vecchioli et al., 2008, 2009).

7.2. Rôle de la neurogenèse adulte hippocampique dans la consolidation de la mémoire

La neurogenèse adulte hippocampique ne jouera pas seulement un rôle dans l'acquisition et la mémorisation de nouvelles données mais participerait aussi à la consolidation de cette mémoire (Kitamura et al., 2009). Il a été montré que les nouveaux neurones âgés de 3 à 4 semaines sont nécessaires dans l'acquisition de nouvelles informations spatiales mais aussi la consolidation de la mémoire spatiale dans l'épreuve de la piscine de Morris (Farioli-Vecchioli et al., 2008). De plus, chez le rat, le blocage spécifique de la neurogenèse adulte par inhibition de la voie Wnt, particulièrement impliquée dans la genèse des nouveaux neurones, provoque des déficits de consolidation de la mémoire spatiale, dans le test de la piscine de Morris (Jessberger et al., 2009)

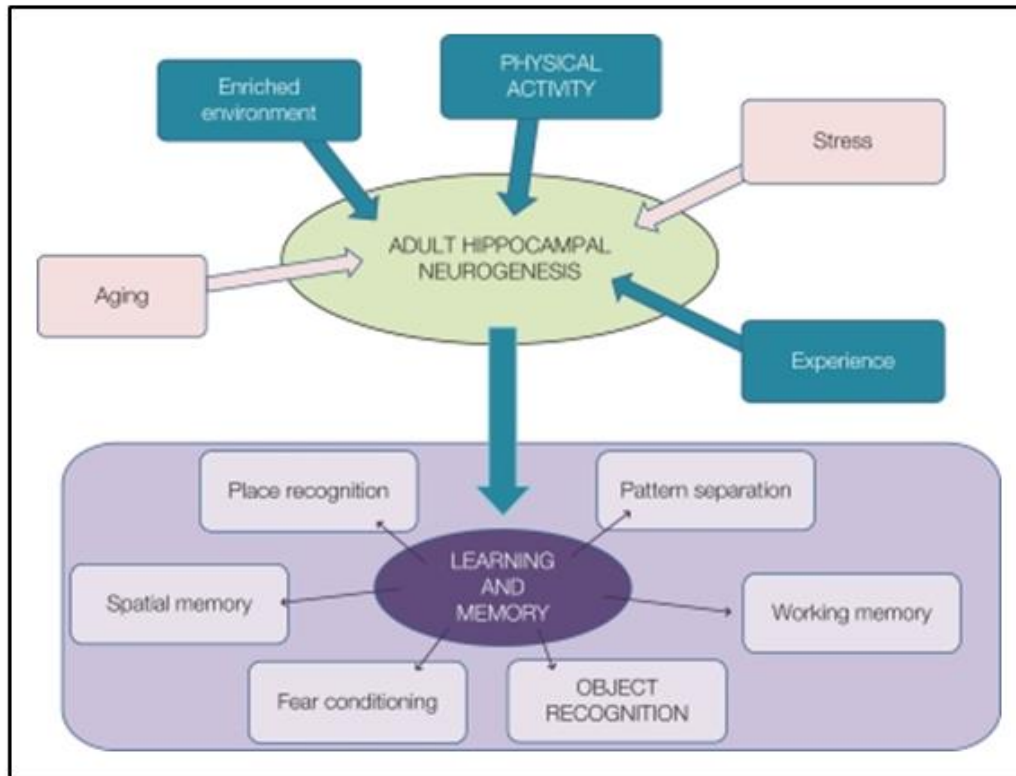


Figure 16. La régulation de la neurogenèse adulte peut moduler les processus d'apprentissage et de mémorisation.

D'après Lafenetre et al., 2011.

7.3. Régulation de la neurogenèse adulte par l'apprentissage

Les tâches d'apprentissage peuvent réguler de façon distincte les différentes étapes de la neurogenèse adulte. L'apprentissage dans l'épreuve de la piscine de Morris peut être divisé en deux phases : la « phase précoce » au cours de laquelle les animaux apprennent la tâche, et la « phase tardive », au cours de laquelle les animaux maîtrisent la tâche. L'équipe de Nora Abrous a montré que la phase précoce de l'apprentissage ne modifie pas le taux de prolifération des progéniteurs tandis qu'elle provoque une augmentation de la survie ainsi qu'une complexité accrue de l'arborisation dendritique des neurones nouveau-nés (Döbrössy et al., 2003 ; Dupret et al., 2007 ; Tronel et al., 2010). Par ailleurs, la réalisation de meilleures performances au cours de la phase tardive de l'apprentissage induit une augmentation de la survie des cellules produites avant l'apprentissage et provoque l'apoptose de celles nées au cours de la phase précoce de cet apprentissage. Cependant, les résultats portant sur la phase tardive sont contradictoires (Ambrogini et al., 2004 ; Döbrössy et al., 2003). Enfin, il a aussi été observé une augmentation de la prolifération au cours de la phase tardive de l'apprentissage permettant d'apporter un pool de nouveaux neurones à l'hippocampe (Anderson et al., 2011 ; Dupret et al., 2007).

Ces résultats montrent qu'il pourrait exister une fenêtre critique de temps, entre une et deux semaines après la naissance des cellules, pendant laquelle ces nouvelles cellules pourraient être influencées par les processus d'apprentissage. Cette période critique est concomitante à celle où les cellules nouveau-nées commencent à se différencier et à recevoir des entrées glutamatergiques.

L'ensemble de ces résultats souligne la relation étroite et réciproque entre la neurogenèse adulte et les processus cognitifs : la neurogenèse adulte participe à l'apprentissage hippocampo-dépendant et aux processus de mémorisation tandis que les expériences d'apprentissage et de mémorisation interviennent dans la régulation de la prolifération mais aussi de la survie et de l'intégration des neurones nouveau-nés.

8. Neurogenèse adulte et physiopathologie de la mémoire

8.1. Vieillesse

Plusieurs revues récentes font le point de nos connaissances sur la relation entre anomalies de la neurogenèse adulte et défauts cognitifs (Lazarof & Mattson, 2010 ; Winner et al., 2011 ; Braun & Jessberger, 2014). De nombreux arguments suggèrent que la diminution de la neurogenèse adulte avec l'âge, bien que moins prononcée chez l'Homme que chez les rongeurs, est vraisemblablement une des causes du déclin cognitif accompagnant le vieillissement (Lazarof & Marr, 2013) (Figure 17). Les mécanismes et les populations cellulaires affectés sont peu connus. Il est possible que ce soit l'ensemble des mécanismes qui soit plus ou moins dégradé.

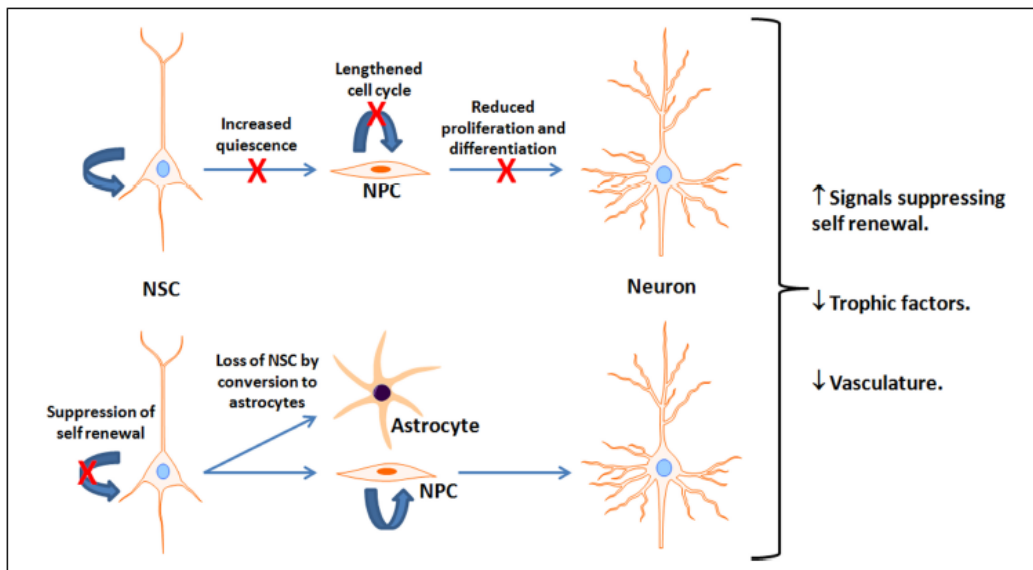


Figure 17. Mécanismes possibles expliquant la neurogenèse réduite liée à l'âge.

Cette figure décrit les déficits liés à l'âge ou les facteurs supresseurs interférant avec la neurogenèse. Il n'est pas clairement identifié quel mécanisme est le plus important et il s'agit probablement d'une combinaison de facteurs multiples. NSC, neural Stem Cells ; NPC, neural progenitor cells ; X indique une réduction dans la voie (adaptée de Lazarov & Marr, 2013).

8.2. Maladie d'Alzheimer

Il est évident que le rôle de la neurogenèse adulte se pose de manière cruciale dans la maladie d'Alzheimer. L'hippocampe est une structure particulièrement vulnérable aux dommages à des stades précoces de la maladie d'Alzheimer (AD). Bien qu'il y ait de nombreuses observations suggérant fortement cette relation de causalité entre défaut de neurogenèse adulte chez les patients AD et déficits de mémoire, la démonstration rigoureuse d'un lien causal n'a pas encore été obtenue (Mu & Gage, 2011). Plusieurs gènes impliqués dans l'AD régulent la neurogenèse adulte. La protéine APP et ses différents fragments protéolytiques jouent des rôles dans la prolifération, la survie et la différenciation des futurs neurones. On observe dans certains modèles de souris transgéniques (double mutation APP swedish et mutation du gène de la préséniline 1) des anomalies de division des progéniteurs (Demars et al., 2010). De même dans les souris de la lignée Tg2576 qui montrent des déficits cognitifs et l'apparition de dépôts de plaques amyloïdes dans le cerveau adulte, Claire Rampon et collaborateurs mettent en évidence une altération du gyrus, avec un défaut de maturation des neurones nouveau-nés (Krezymon et al., 2013).

8.3. Déficience intellectuelle

Les premières données concernant DI et neurogenèse adulte ont été obtenues pour les trois formes syndromiques les plus fréquentes, à savoir de syndrome de Down, celui de Rett et de l'X Fragile (Revue de Pons-Espinas et al., 2013). MeCP2 joue un rôle dans la maturation des neurones nouveau-nés ; la perte de fonction de MeCP2 induit un retard dans leur maturation avec une réduction du développement dendritique accompagné de défauts d'expression de gènes (Smrt et al., 2007). Des résultats obtenus avec des cellules souches pluripotentes induites (iPSC) provenant de patients atteints du syndrome de Rett montrent que ces résultats peuvent être étendus à l'Homme (Kim et al., 2011). Pour l'X Fragile, dans les modèles animaux, l'absence d'expression de FMRP1 induit une augmentation de la prolifération associée à une diminution de la différenciation neuronale et une augmentation de celle gliale (Luo et al., 2010). En utilisant un système de délétion inductible, Guo et collègues montrent que l'engagement phénotypique vers une différenciation gliale se fait au détriment de la différenciation neuronale (Guo et al., 2011). Dans le bulbe olfactif, les souris KO ont une augmentation de la densité des épines qui présentent une morphologie normale. Par contre, en inactivant l'expression du gène *fmr1* par silencing, Scotto-Lomassese et collègues montrent que les épines, toujours présentes avec une densité élevée, sont plus longues mais reçoivent une innervation glutamatergique normale (Scotto-Lomassese et al., 2011). Ces travaux suggèrent que la protéine FRMP1 n'est pas nécessaire pour la mise en place des structures mais qu'elle l'est pour leur régulation dynamique par l'activité neuronale ou par les autres systèmes de régulation.

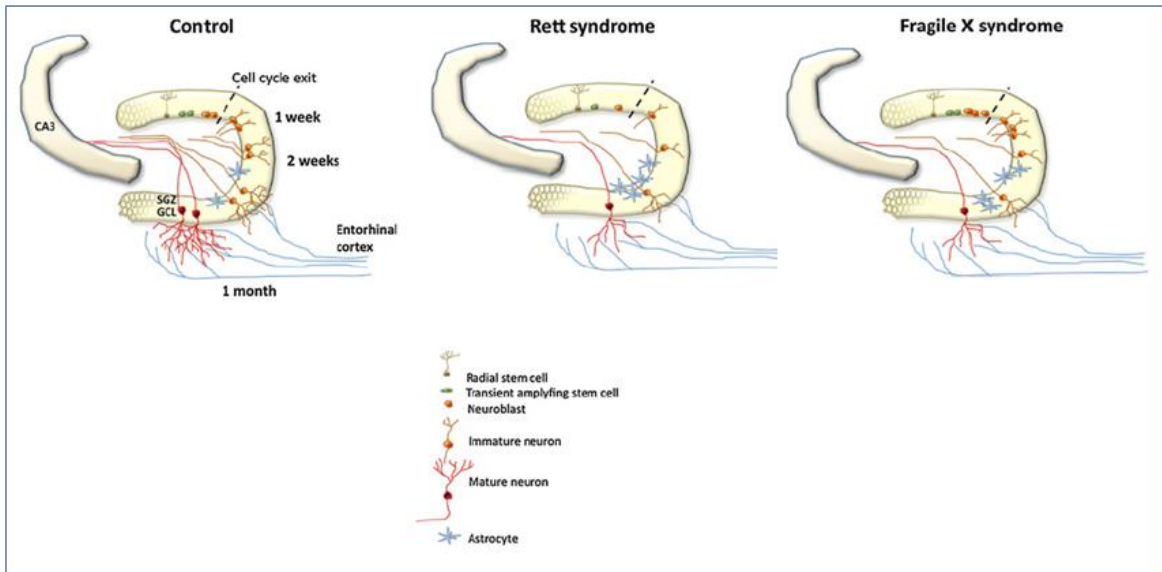


Figure 18. Anomalies de neurogenèse adulte hippocampique dans le syndrome de Rett et l’X fragile.

D’après Pons-Espinas et al., 2013.

Enfin, notons qu’il n’y a pas encore de description de l’implication d’un gène de DI non syndromique dans la neurogenèse adulte.

III. Les p-21 activated kinases dans la signalisation neuronale

Les p21-activated kinases (PAK) sont des effecteurs importants et parmi les mieux caractérisés de la voie de signalisation des Rho-GTPases Rac1 et Cdc42 (cell division cycle 42). Les kinases PAK ont été identifiées dans le cytosol des cellules du cerveau de rat (Manser et al., 1994 ; Manser et al., 1995) et constituent un groupe de sérine/thréonine kinases très conservé (Dan et al., 2001). Deux sous-groupes I et II de ces kinases ont été établis en fonction de leurs caractéristiques structurales et de leurs mécanismes de régulation (Eswaran et al., 2008). Le groupe I comprend les kinases PAK 1 à 3 qui présentent entre elles une forte identité de séquence, tandis que les PAK 4 à 6 constituent le groupe II et ne présentent que 40% d'identité de séquence avec les PAK 1 à 3 (Bokoch, 2003 ; Arias-Romero & Chernoff, 2008). Alors que le mécanisme de régulation des kinases du groupe II fait intervenir une conformation monomérique permettant une inhibition en *cis*, celui des kinases du groupe I fait appel à des dimères qui génèrent des interactions inhibitrices en *trans* (Eswaran et al., 2008). Les PAK des deux sous-groupes présentent des propriétés biochimiques et des localisations subcellulaires très distinctes, suggérant des mécanismes fondamentalement différents entre les deux groupes (Abo et al., 1998; Cotteret et al., 2003; Cotteret and Chernoff, 2006).

Cette partie sera consacrée aux descriptions structurales et fonctionnelles des kinases PAK du sous-groupe I, dont fait partie PAK3. Parmi ces trois kinases, PAK1 et PAK3 sont fortement exprimées dans le cerveau. De plus en plus de données montrent leur implication dans la mise en place du cerveau et dans le fonctionnement neuronal avec en corollaire, leur implication dans les pathologies neurologiques, incluant les maladies neurodégénératives et psychiatriques ainsi que les tumeurs du cerveau (revue de Kreis & Barnier, 2009).

1. Structure

1.1. Domaine de régulation

La partie N-terminale des kinases PAK du sous-groupe I constitue une région régulatrice et présente plusieurs sous-régions. Le domaine de liaison aux Rho-GTPases sous leur forme liée au GTP (p21 binding domaine = PBD) permet l'activation des kinases PAK (Sells & Chernoff, 1997 ; Lei et al., 2000 ; Manser et al., 1994 ; Lu et al., 1997 ; Bokoch et al., 1998). Le PBD est formé de 40 acides aminés dont 16 d'entre eux constituent la séquence consensus et minimale de liaison aux Rho-GTPases, appelé le domaine CRIB (Cdc/Rac Interaction Binding ; Burbelo et al., 1995). Les autres acides aminés du domaine PBD contribuent à renforcer l'affinité de PAK pour Rac1 et Cdc42 (Knaus et al., 1998 ; Sells & Chernoff, 1997 ; Lei et al., 2000). Le PBD présente 88% d'identité de séquence entre PAK1 et PAK2, et 90% entre PAK1 et PAK3. Les spécificités d'interactions des différentes kinases PAK avec les différents membres de la famille des GTPases de la famille Rac et Cdc42 ne sont pas connues. Toutefois, mon équipe a montré que PAK3 lie *in vitro* préférentiellement la GTPase Cdc42 plutôt que Rac1 et que l'intersectine, un activateur spécifique de Cdc42, active plus PAK3 que ne le fait Tiam, un GEF spécifique de Rac1 (Kreis et al., 2007). Par ailleurs, l'un des inhibiteurs des

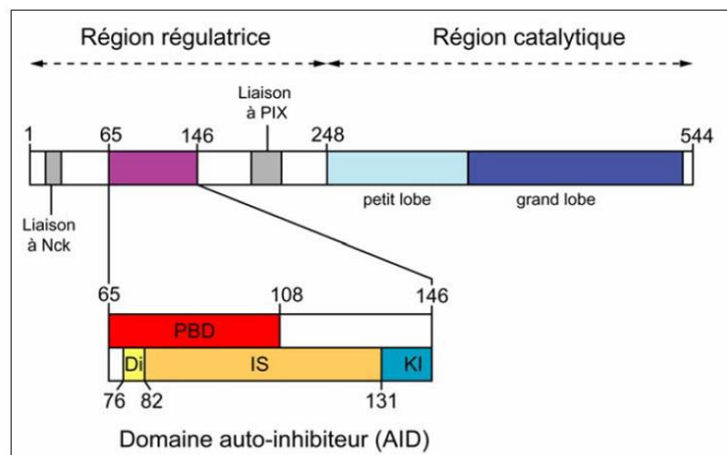
kinases PAK, l'IPA3 empêche l'activation des kinases PAK en se liant au domaine de fixation des Rho-GTPases (Deacon et al., 2008 ; Viaud & Peterson, 2009).

Plusieurs motifs riches en proline (PXXP) sont impliqués dans des interactions avec des domaines SH3 de partenaires protéiques. Les adaptateurs Nck2 et Grb2 permettent le recrutement des kinases PAK à la membrane, et les facteurs d'échange PIX, régulateurs de l'activité des GTPases de la famille Rac et Cdc42, permettent le recrutement des kinases PAK au niveau des adhésions focales (Galisteo et al., 1996 ; Bokoch et al., 1996, Puto et al., 2003 ; Bagrodia et al., 1998 ; Manser et al., 1998). Ces séquences d'interaction protéine/protéine sont très conservées entre les PAK 1, 2 et 3 (Bokoch 2003). Toutefois, la séquence du premier domaine riche en proline qui permet l'interaction avec les adaptateurs Nck présente des différences à l'origine de spécificité d'interaction. Ainsi PAK3 interagit préférentiellement avec l'adaptateur Nck2 et cette interaction est impliquée dans la régulation de la transmission synaptique exercée par PAK3 (Thévenot et al., 2011). Enfin Grb2 interagit spécifiquement avec PAK1 qui possède une séquence riche en proline additionnelle, dans son domaine régulateur.

Le PBD, présent sur les kinases PAK des sous-groupes I et II, chevauche le domaine d'auto-inhibition (autoinhibitory domain : AID). Seules les kinases PAK 1 à 3 possèdent le domaine AID dont la fonction est d'inhiber le domaine kinase situé à l'extrémité C-terminale. Les études structurales par cristallographie ont montré que ce domaine AID est constitué de 3 sous-domaines (Lei et al., 2000). Le domaine de dimérisation (Di) se situe dans la partie N-terminale du domaine AID et est constitué de 8 acides aminés. Ce domaine Di interagit avec le domaine Di d'une autre kinase PAK, formant ainsi un feuillet β qui stabilise les dimères. La formation de dimères, via leurs domaines Di, participe à la régulation de l'activité catalytique des PAK. Le domaine « autoinhibitory switch » (IS), constitué de 3 hélices α et d'un feuillet β , vient interagir, à l'état inactif, avec le grand lobe du domaine kinase, permettant au segment inhibiteur de la kinase (Ki, positionné en C-terminal du domaine AID) de venir se loger dans le site catalytique de son partenaire lors de la dimérisation) afin d'inhiber son activité (voir partie III.2.1.) (Lei et al., 2000 ; Parrini et al., 2002) (Figure 19).

Figure 19. Schéma des différentes régions fonctionnelles des kinases PAK du groupe I.

La région régulatrice aminoterminale 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 dimérisation et l'inhibition du domaine catalytique. La numérotation des acides aminés fait référence à la séquence de PAK3. Adaptée de Lei et al., 2000.

La région catalytique située à l'extrémité C-terminale porte l'activité kinase des kinases PAK. En son extrémité N-terminale, le domaine kinase est constitué d'un petit lobe, et d'un grand lobe en C-terminal (Figure 19). Le petit lobe est constitué d'un feuillet β et de deux hélices α tandis que le grand lobe comporte uniquement des hélices α . L'agencement tridimensionnel des deux lobes définit une cavité correspondant au site catalytique de la kinase (Lei et al., 2000 ; Parrini et al., 2002). Les trois kinases PAK du sous-groupe I présentent aussi une forte identité de séquence pour le domaine kinase, 93% d'identité entre PAK1 et PAK2, et 95% entre PAK1 et PAK3 (Arias-Romero & Chernoff, 2008). Le mécanisme par lequel les kinases PAK phosphorylent leurs substrats reste encore à ce jour à élucider bien que les séquences consensus des sites de phosphorylation par PAK aient été décrites (Arias-Romero & Chernoff, 2008) (Figure 20).

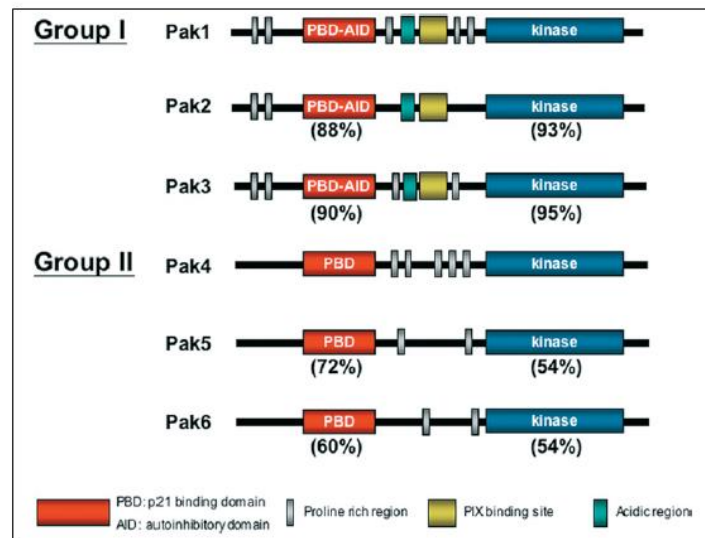


Figure 20. Comparaison structurale des kinases PAKs des groupes I et II.

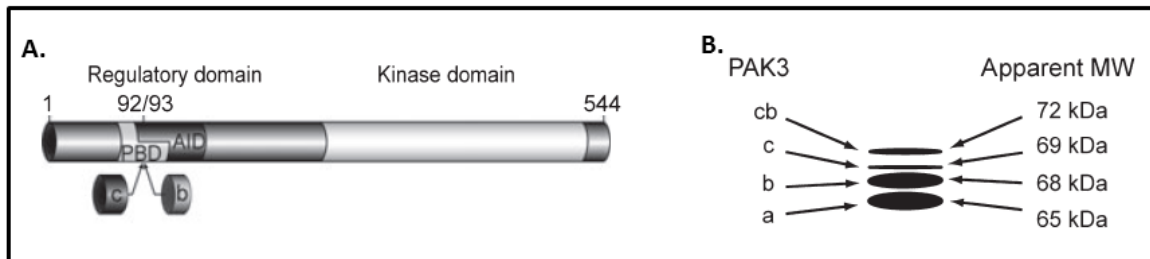
Les PAKs du groupe I possèdent une très forte identité de séquences entre elles, particulièrement au niveau de leur domaine kinase. Le groupe I, contrairement au groupe II possède des domaines de liaison à Nck, Grb2 et PIX, ainsi qu'un domaine d'auto-inhibition (Arias-Romero & Chernoff, 2008).

1.2. PAK3 et ses variants d'épissage

L'épissage alternatif joue un rôle important dans la complexité fonctionnelle produite par le génome. Plus de la moitié des gènes code pour plusieurs variants d'épissage et, en moyenne, un gène code pour trois protéines. Par exemple, le gène *Dscam* de drosophile code pour plus de 64 000 espèces moléculaires. Enfin, des anomalies de l'épissage alternatif sont impliquées dans de nombreuses pathologies. L'épissage alternatif supporte aussi des fonctions cellulaires et est impliqué dans les mécanismes de la plasticité neuronale.

Mon équipe a mis en évidence deux exons alternatifs pour le gène *pak3*, dénommés b et c et localisés entre les exons 2 et 3. Cette insertion touche le chevauchement entre le domaine PBD et le domaine IS de la région régulatrice. Ces exons b et c codent pour des inserts de 15 et 21 acides aminés respectivement. Quatre protéines PAK3a, PAK3b, PAK3c et PAK3cb sont codées par le gène *pak3* (Rousseau et al., 2003 ; Kreis et al., 2008). Les deux exons b et c sont apparus successivement

au cours de l'évolution. L'exon c apparaît avec les tétrapodes et l'exon b avec les mammifères uniquement. Les différents variants d'épissage sont exprimés à divers niveaux dans les neurones dès le développement embryonnaire (Kreis et al., 2008). Dans le cerveau adulte, ils sont relativement très exprimés. Ainsi PAK3b est détecté à un niveau identique à PAK3a dans le cerveau adulte de souris alors que Pak3cb est plus faiblement détecté, et PAK3c très faiblement exprimé (Kreis et al., 2008) (Figure 21).



(A) Représentation schématique de la protéine PAK3. Les inserts c et b se localisent dans la région d'interaction avec les GTPases et au début du domaine d'auto-inhibition, dans le domaine IS. (B) Représentation de l'abondance relative de chaque protéine dans le cerveau de souris, selon leur poids moléculaire apparent. Les isoformes a et b sont les plus abondantes, c étant la moins exprimée (Kreis et al., 2008).

L'insertion des exons b et c dans le domaine de régulation modifie profondément les propriétés biochimiques et fonctionnelles des variants d'épissage. D'une part, le domaine AID de PAK3b n'inhibe pas l'activité kinase de PAK3a (Rousseau et al., 2003). D'autre part, lorsque les différents variants sont exprimés dans des fibroblastes, PAK3a requiert l'activation par Cdc42 tandis que PAK3b, c et cb sont constitutivement actives. Les insertions au niveau de la zone de chevauchement entre les domaines PBD et AID confèrent une affinité moindre pour les Rho-GTPases et déstabilisent la conformation de la région régulatrice, levant l'inhibition du domaine kinase par le domaine AID. Cette activité kinase constitutive est mesurable *in vitro* et aussi observable *in vivo* dans les fibroblastes transfectés avec les différents variants d'épissage a, b, c et cb comme en témoigne une très nette diminution du nombre d'adhésions focales et d'importants changements morphologiques. L'ensemble de ces résultats suggère fortement que les différents variants d'épissage pourraient avoir des fonctions cellulaires distinctes (Rousseau et al., 2003 ; Kreis et al., 2008). Notons que ces variants d'épissage sont localisés dans différents compartiments subcellulaires, comme cela a été montré par des expériences de fractionnement réalisées à partir de lysats de cerveau. Certains variants sont enrichis dans la fraction contenant les densités post-synaptiques alors que d'autres co-purifient avec la fraction enrichie en éléments pré-synaptiques (Combeau et al., 2012). La présence des variants d'épissage est une spécificité de PAK3 comparée aux autres membres de cette famille, bien que chez l'Homme, deux ARN messagers produits par l'épissage alternatif aient été identifiés pour PAK1. Cependant, il n'y a aucune donnée sur les propriétés biochimiques et fonctionnelles de ces deux variants de PAK1 (Kreis & Barnier, 2009).

2. Régulations

2.1. Modèle de trans-inhibition

Les expériences de cristallographie de Lei et collègues ont montré que PAK1 forme des homodimères par l'interaction des domaines régulateurs de deux kinases (Lei et al., 2000). Depuis, il a été montré que les homodimères et hétérodimères de ces kinases (PAK1 et PAK3) existent *in vivo* (Parrini et al., 2009 ; Combeau et al., 2012). La formation de ces dimères constitue un des éléments clés de la régulation de l'activité de ces kinases, en les maintenant dans un état inactif. Les études réalisées sur PAK1 de Lei en 2000 et de Parrini en 2002 ont montré, d'une part, que deux kinases PAK1 s'associent par l'interaction de leur domaine de dimérisation Di. Toutefois, cette séquence n'est pas indispensable pour la dimérisation. D'autre part, ces études ont mis en évidence que les parties N-terminale et C-terminale de chacune des kinases interagissent entre elles fortement et que les acides aminés arginine 438 et lysine 439 du grand lobe du domaine kinase ainsi que la leucine 107 du domaine IS sont indispensables à cette interaction. Ainsi, le domaine IS est replié sur le grand lobe du domaine catalytique ce qui favorise le positionnement du domaine Ki dans le sillon du site catalytique. Le domaine Ki de chaque kinase interagit avec le site catalytique de son partenaire, ce qui induit une trans-inhibition de l'activité de l'autre monomère (Lei et al., 2000 ; Parrini et al., 2002).

En ce qui concerne PAK3, nous avons démontré que PAK3a peut aussi former des homodimères et que la leucine 102 du domaine IS, l'arginine 436 et la lysine 437 du grand lobe du domaine kinase sont aussi les acides aminés clés de la formation de ce complexe dimérique (Combeau et al., 2012). Les kinases PAK du sous-groupe I présentant de fortes identités de séquence, PAK1 et PAK3 peuvent théoriquement s'associer sous forme de complexes hétérodimériques (Parrini et al., 2002). Nous avons démontré qu'effectivement PAK3 forme des hétérodimères avec PAK1. Toutefois, de manière extrêmement surprenante, nous avons observé que PAK3a s'associe préférentiellement sous forme hétérodimérique avec PAK1, que sous forme d'homodimère. Grâce à l'obtention de séquences spécifiques, nous avons montré l'existence de ces hétérodimères dans le cerveau de souris adulte. L'insertion des séquences codées par les exons alternatifs affecte légèrement l'hétérodimérisation avec PAK1 et très fortement l'homodimérisation avec PAK3a. Cependant, la co-transfection de PAK1 avec PAK3a ou PAK3b a révélé que l'hétérodimérisation avec PAK1 régule l'activité kinase de PAK3a mais pas celle de ses variants d'épissage (Combeau et al., 2012). D'autres mécanismes de régulation, comme la régulation post-transcriptionnelle ou bien la dégradation des protéines, pourraient intervenir dans la modulation de l'activité constitutive des variants d'épissage de PAK3 (Figure 22).

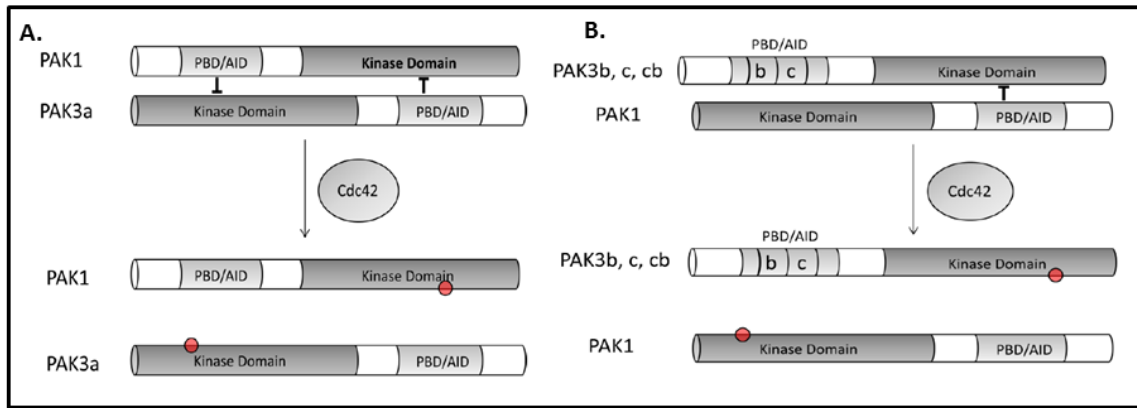


Figure 22. Modèle de trans-inhibition des kinases PAK.

A : Modèle de trans-inhibition symétrique de PAK3a par PAK1. La formation d'hétérodimères PAK1/PAK3a permet d'inactiver chaque partenaire, puis le recrutement de Cdc42 permet de dissocier le dimère, de libérer le domaine kinase et donc d'activer chaque partenaire. B : Modèle de trans-inhibition asymétrique des variants d'épissage de PAK3 par dimérisation avec PAK1. La dimérisation de PAK1 avec PAK3b, c, ou cb permet d'inhiber leur domaine kinase. PAK1 est ainsi également inhibée car elle ne peut être phosphorylée par les variants d'épissage. Ce complexe est dissocié par le recrutement de Cdc42 et permet ainsi à chaque kinase de phosphoryler son partenaire afin de l'activer (adaptée du mémoire de thèse G. Combeau).

2.2. Activation par les Rho-GTPases Rac1 et Cdc42

Les Rho-GTPases sont de petites protéines G et constituent une sous-famille des Ras. Elles interviennent dans de nombreuses fonctions nécessaires à la vie cellulaire, en aval de stimuli extracellulaires. RhoA, Rac1 et Cdc42 sont les trois membres principalement étudiés de cette famille. Les Rho-GTPases cyclent entre un état dit actif lorsqu'elles sont liées au GTP, et dit inactif lorsqu'elles sont liées au GDP. L'activation des Rho-GTPases est finement régulée par les Rho GEF (Guanine Exchange Factor) et le retour à l'état GDP est effectué par les Rho GAP (GTPase Activating Protein). Les Rho-GTPases possèdent un mécanisme propre de régulation impliquant les GDP Dissociation Inhibitors (GDI). Les GDI interagissent avec les formes GDP des GTPases de la famille Rho. Il existe trois gènes, GDI1 avec une expression ubiquitaire, GDI2 restreint aux cellules hématopoïétiques et GDI3 exprimé dans le cerveau, les poumons et les testicules. Les RhoGDI sont cytoplasmiques. Les GDI inhibent la dissociation du GDP, c'est à dire qu'ils stabilisent les Rho-GTPases sous leur forme liée au GDP. De plus, les GDI assurent la solubilisation des formes liées au GDP en masquant la queue lipidique N-ter des GTPases de la famille Rho/Rac /Cdc42 à l'intérieur de leur poche hydrophobe. Les trois GDI interagissent avec certains membres des Rho-GTPases. Ainsi GDI1 interagit avec RhoA, Rac et Cdc42 alors que GDI3 interagit avec RhoG et RhoB. Les activités des RhoGDI sont régulées. La phosphorylation RhoGDI par PAK1 peut servir de rétrocontrôle positif pour permettre une activation soutenue de Rac, dans des processus tels que la mobilité cellulaire (DerMardirossian et al., 2004).

Au sein des complexes dimériques, la séquence consensus CRIB est exposée à la surface des kinases ce qui permet le recrutement des Rho-GTPases. L'étude de Parrini et collègues en 2009 a

montré que l'activation de PAK1 est séquentielle. Les homodimères de PAK1 sont recrutés à la membrane et acquièrent ainsi une conformation semi-ouverte. Les résidus sérine 199 et 204 peuvent alors être phosphorylés mais ce n'est pas le cas de la thréonine 423 située dans le site catalytique. La kinase est alors encore inactive. Cet état favorise la liaison aux Rho-GTPases induisant un changement de conformation qui achève d'activer les kinases du dimère par trans-phosphorylation des thréonines 423 de chacun des domaines catalytiques par l'autre kinase (Parrini et al., 2009) (Figure 23).

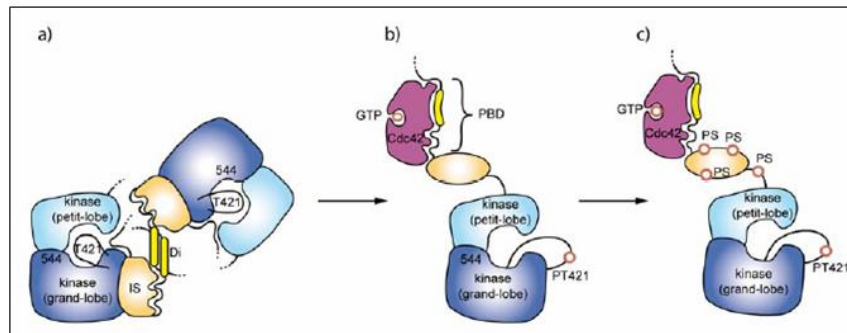


Figure 23. Mécanismes d'activation des PAK du groupe I.

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'occlut 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 une forme inactive. Adaptée de Lei et al., 2000.

Les kinases PAK du groupe I possèdent aussi une région polybasique riche en acides aminés chargés positivement. Les travaux du groupe de Peterson montrent que cette région interagit avec les phosphatidylinositides diphosphates PIP_2 qui sont des co-activateurs puissants des kinases PAK. Plus précisément, les GTPases et les phosphatidylinositols sont tous deux nécessaires pour induire le changement de conformation de la kinase et, de ce fait, PAK nécessite que les deux voies Rho-GTPases et PIP_2 soient activées pour qu'elle soit recrutée à la membrane et à son tour activée. La kinase PAK est ainsi un détecteur de coïncidence, de simultanéité dans l'activation des deux voies (Malecka et al., 2013). Cette séquence polybasique est présente dans les trois kinases du sous-groupe I. De manière intéressante, la mutation de DI R67C de PAK3 est localisée dans cette séquence et pourrait affecter ce mécanisme de régulation par les lipides.

2.3. Recrutement membranaire

Le recrutement membranaire des kinases PAK joue un rôle important dans leur activation et s'effectue par deux voies impliquant deux partenaires des kinases PAK. Dans le cytosol, les kinases PAK interagissent avec le second domaine SH3 des adaptateurs protéiques Nck1 et Nck2, via leur premier motif riche en proline (Bagrodia et al., 1995 ; Bokoch et al., 1996 ; Galisteo et al., 1996). Cependant, PAK3 se lie préférentiellement à Nck2 *in vitro* et *in vivo* (Thévenot et al., 2011). Via leur

domaine SH2, les adaptateurs Nck sont capables de se lier aux résidus tyrosines phosphorylés de certains ligands et récepteurs membranaires, comme les récepteurs à activité tyrosine kinase ou les éphrines (Bokoch, 2003, Xu et al., 2009). Suite à l'activation de ces ligands et récepteurs, Nck/PAK avec le récepteur permet le rapprochement de PAK à la membrane, ce qui favorise son activation par les Rho-GTPases. Le recrutement par Nck pourrait être ciblé pour réguler l'activation de PAK, comme cela a été montré pour le complexe PAK1/Nck1 dans l'angiogenèse (Kiosses et al., 2002) (Figure 24).

PAK peut aussi être recrutée à la membrane via un motif riche en proline non-canonique par l'intermédiaire de PIX (Manser et al., 1998 ; Bagrodia et al., 1998). PIX interagit également fortement avec GIT via le domaine SHD de GIT (Spa2 homology domain) (Zhang et al., 2003 ; Zhang et al., 2005). Au niveau des adhésions focales, GIT interagit avec la Paxiline. Ainsi, le complexe PAK/PIX/GIT permet le rapprochement de PAK à la membrane et son activation par les Rho GTPases. De plus, PIX a une activité GEF et participe donc à la liaison de Rac1 ou Cdc42 (Manser, et al., 1998 ; Kutsche et al., 2000 ; Baird et al., 2005). Le complexe PIX/GIT joue un rôle important dans la plasticité synaptique en interagissant avec Shank (Park et al., 2003) (Figure 24).

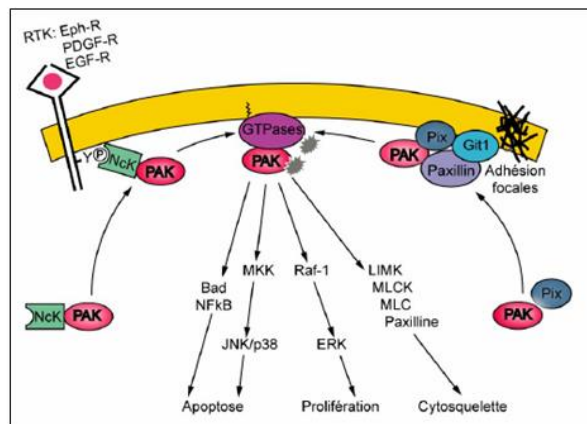


Figure 24. Les deux voies de recrutement membranaire de PAK.

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. Adaptée du mémoire de P. Kreis.

Les données récentes du groupe de Peterson impliquant les lipides membranaires comme co-activateurs, pose la question de savoir si, d'une manière générale, les kinases PAK nécessitent deux phénomènes simultanés, d'une part un recrutement membranaire, et d'autre part une interaction avec le domaine PBD pour induire le changement conformationnel permettant la transactivation de la kinase. Certains partenaires suffisent-ils à effectuer ces deux actions ? Toutes les combinaisons entre recruteur et *activateur* existent-elles ? Comment relier ce modèle à celui du dimère asymétrique ? Toutes ces questions montrent que les mécanismes intimes de la régulation des kinases PAK sont loin d'être compris, un point pourtant important au regard des recherches entreprises pour identifier des inhibiteurs de ces kinases dans des approches thérapeutiques en cancérologie.

Bien que la majorité des études des mécanismes de régulation et d'activation aient été réalisées sur PAK1, les fortes identités de séquence entre les différentes kinases PAK du sous-groupe I ont permis d'extrapoler ces mécanismes à PAK2 et PAK3. Nous verrons plus loin qu'il existe des particularités pour PAK3 qui interagit préférentiellement avec Cdc42 et Nck2, possède des inserts dans la région cruciale du domaine de régulation et présente aussi des préférences dans la formation d'hétérodimères.

3. Expression tissulaire et localisation subcellulaire des kinases PAK

Au niveau tissulaire, PAK1 est localisée dans le cerveau, la rate et le muscle, tandis que PAK2 est ubiquitaire. PAK3 est la kinase du sous-groupe I à être exprimée plus spécifiquement dans le cerveau (Arias-Romero & Chernoff, 2008). Dans le cerveau, PAK1 et PAK3 sont exprimées dans le cortex (couche IV et couches II, III et V respectivement) et dans l'hippocampe (Manser et al., 1994 ; Manser et al., 1995 ; Allen et al., 1998). PAK3 est de plus exprimée dans l'amygdale et le bulbe olfactif (McPhie et al., 2003). Au niveau cellulaire, PAK1 et PAK2 sont exprimées dans les neurones, les astrocytes et enrichies dans les oligodendrocytes. Des expériences de RT-PCR à partir de cultures de neurones et d'astrocytes ont montré que PAK3 est exprimée principalement dans les neurones (Kreis et al., 2008). Ce résultat a été confirmé par d'autres auteurs par des approches transcriptomiques (Cahoy et al., 2008 ; Liu et al., 2012). Dans le cerveau adulte, PAK3 s'exprime dans les régions principalement composées par les cellules post-mitotiques (Allen et al., 1998).

Au niveau subcellulaire, dans les neurones, PAK1 et PAK3 copurifient avec les densités post-synaptiques (Hayashi et al., 2004 ; Combeau et al., 2012). Les analyses immunohistochimiques montrent que PAK3 possède un marquage discret avec un enrichissement sous forme de « puncta », au niveau des densités post-synaptiques et du cytoplasme des épines dendritiques (Rex et al., 2007). Mon équipe a observé qu'effectivement, PAK3 est enrichie au niveau des densités post-synaptiques et des zones riches en actine dans les épines dendritiques, alors que PAK1 présente une localisation plus diffuse dans l'épine (Combeau et al., 2012). Toutefois, les kinases PAK1 et PAK3 co-localisent partiellement dans les épines dendritiques. Les formes actives/phosphorylées des kinases PAK sont principalement localisées dans les dendrites et au niveau de la densité post-synaptique (PSD) (Hayashi et al., 2004 ; Zhang et al., 2005). Les différents variants d'épissage de PAK3 sont exprimés dans les neurones (Rex et al., 2007 ; Combeau et al., 2012).

4. Fonctions cellulaires des kinases PAK

4.1. Régulation du cytosquelette d'actine

Les kinases PAK sont les principaux effecteurs des Rho-GTPases, régulateurs clés du cytosquelette d'actine. Ce rôle de régulateur intervient donc aussi dans les processus de polarité, de migration et d'adhésion cellulaire.

Un des mécanismes de régulation du cytosquelette d'actine par les kinases PAK est la voie de la LIM kinase 1 (LIMK1), qui est l'un des principaux effecteurs des kinases PAK. La phosphorylation par les kinases PAK active la LIMK1, laquelle peut alors phosphoryler la cofiline, qui devient alors inactive et inhibe ainsi la dépolymérisation des filaments d'actine (Arber et al., 1998 ; Yang et al., 1998 ; Edwards et al., 1999). Ainsi, la voie de signalisation Rho-GTPases/PAK participe à la formation et à la stabilisation du cytosquelette d'actine au sein de structures comme les lamellipodes ou les filopodes.

Les kinases PAK régulent aussi le cytosquelette d'acto-myosine par l'intermédiaire de l'activité de la myosine qui interagit avec l'actine. Les kinases PAK phosphorylent la Myosin Light Chain II (MLC, chaîne régulatrice) et ainsi l'activent. Parallèlement, les PAK peuvent inhiber la voie de la MLC en phosphorylant la MLCK (MLC Kinase, kinase activatrice de la MLC) (Bokock, 2003 ; Zhao & Manser, 2005). Au niveau neuronal, ce mécanisme de régulation du cytosquelette d'actine fait intervenir les partenaires protéiques PIX et GIT, les Rho-GTPases et PAK dans la formation et la stabilisation des épines dendritiques (Zhang et al., 2005). Les kinases PAK peuvent aussi phosphoryler la MLC VI qui intervient dans le trafic membranaire et la migration cellulaire (Buss et al., 1998).

Les kinases PAK ciblent, de plus, des protéines de réarrangements du cytosquelette d'actine. La Filamine A (FLNa) est phosphorylée par PAK1, et ainsi activée, contrôle la stabilité du cytosquelette en le connectant à la membrane. Par ailleurs, FLNa peut se lier au domaine PBD de PAK1 et réguler de cette manière son activité, effectuant un feedback positif (Szczepanowska, 2009 ; Vladamudi et al., 2002). PAK1 régule aussi le complexe Arp2/3 qui contrôle la complexification du cytosquelette (nucléation et ramification). La phosphorylation de la sous-unité p41-ARC de ARP 2/3 favorise l'association de ce complexe dans le lamellipode d'une cellule en migration (Dummler et al., 2009).

4.2. Régulation de l'expression génique

Au sein de la cellule, les kinases PAK stimulent des voies de signalisation impliquées dans la régulation de l'expression génique. PAK1 intervient dans la régulation de l'expression génique par le biais de la voie des MAP Kinases (Mitogen-Activated Protein kinase) ERK et l'activation de JNK (JUN N-terminal Kinase). Cette voie de signalisation est la mieux décrite et permet la phosphorylation et la translocation nucléaire de certains facteurs de transcription (Kumar et al., 2006). PAK1 régule aussi d'autres facteurs de transcription, tel le facteur nucléaire κ B (NF κ B). Elle active par liaison les récepteurs aux hormones stéroïdes et aux récepteurs nucléaires androgènes. Les kinases PAK peuvent, elles aussi, être transloquées au noyau et réguler ainsi directement la transcription. Cependant, la mise en évidence de trois séquences de localisation nucléaire pour PAK1 et de

seulement une pour PAK2 et PAK3 suggère qu'il s'agit d'une spécificité de PAK1 (Li et al., 2002 ; Singh et al., 2005).

De par leur activation par de multiples voies de signalisation, les kinases PAK permettent l'intégration des différents signaux et participent à de nombreux processus cellulaires comme la polarité cellulaire, la migration, la prolifération, la transformation cellulaire mais aussi l'apoptose (Bokoch, 2003).

4.3. PAK et cancer

Les kinases PAK sont fréquemment associées au développement de cancers en raison de leurs rôles dans la prolifération, la migration, la régulation du cytosquelette d'actine et la survie cellulaire. Plusieurs revues récentes résument nos connaissances à ce sujet (Eswaran et al., 2009 ; Ye & Field, 2012 ; Radu et al., 2014). Synthétiquement, la surexpression des gènes *pak1* et *pak4* ainsi que la variation du nombre de copies de ces deux gènes sont les caractéristiques les plus communes observées dans de nombreux cancers. *pak1* est surexprimé dans les cancers du sein, du foie et du colon (Dummler et al., 2009 ; Kumar et al., 2006). L'expression de PAK1 peut aussi être contrôlée par des microARN comme le microARN-7, un mécanisme pouvant être dérégulé dans certains cancers (Reddy et al., 2008 ; Ye & Field, 2012). PAK1 peut être aussi activée par la présence de mutations dans des activateurs des Rho-GTPases, en particulier des mutations activatrices des GEF. Notons aussi leur activation suite à l'inactivation des GAP de Ras, en particulier les neurofibromatoses. Enfin, il est intéressant de noter que PAK3, à deux exceptions près qui demandent confirmation, n'a jamais été trouvée associée à des cancers (Liu et al., 2010 et Greenman et al., 2007).

5. Fonctions neuronales des kinases PAK, rôles dans la plasticité

5.1. Plasticité, synapses et épines dendritiques

La plasticité synaptique est la modification de l'efficacité de la transmission synaptique faisant suite à l'activité synaptique, c'est-à-dire que cela correspond à la capacité des synapses à modifier la transmission synaptique en fonction de leur histoire, de leur activité.

Ce concept fut découvert par Bliss et collègues, en 1973 en montrant qu'une stimulation à haute fréquence de la voie perforante de l'hippocampe entraîne une augmentation persistante de l'efficacité de la transmission synaptique dans le gyrus denté. Cette augmentation, qui se maintient plusieurs jours, a été dénommée « potentialisation à long-terme » ou LTP. Elle a depuis été mise en évidence au niveau de très nombreuses synapses. Très rapidement, ce phénomène initialement décrit par des méthodes électrophysiologiques est apparu pouvant être le support physiologique de l'apprentissage et de la mémoire. Depuis, les bases moléculaires et cellulaires de la plasticité synaptique ont été largement étudiées, mais il reste encore beaucoup de questions sans réponse.

La plasticité peut être analysée à plusieurs niveaux d'échelle : au niveau synaptique, au niveau de l'épine dendritique, au niveau d'un neurone, au niveau d'un réseau neuronal. Il existe aussi une échelle de temps correspondant à des mécanismes différents, impliquant des courants ioniques de sodium dans les premières millisecondes, des entrées calciques dans les quelques secondes, des translocations de protéines, des phosphorylations dans les premières minutes, des synthèses

protéiques locales et enfin dans les premières heures une régulation génique avec activation transcriptionnelle.

Nous décrivons quelques propriétés de la plasticité synaptique qui met en jeu des mécanismes structuraux et fonctionnels des synapses et des épines dendritiques.

La synapse est une structure fonctionnelle composée de deux parties, d'une part l'élément présynaptique correspondant à la zone active où les vésicules vont libérer leur contenu et d'autre part, la zone post-synaptique, largement pourvue de récepteurs aux neurotransmetteurs synaptiques, eux même organisés grâce à la densité post-synaptique. Entre ces deux zones, la fente synaptique est aussi un espace structuré, traversée par des réseaux moléculaires de récepteurs/ligands transmembranaires et autres protéines transmembranaires homophiliques (Eph et ephrine, neurexines et neuroligines, N-Cadherine, N-Cam, etc) qui assurent la cohésion régulée entre les éléments pré et post-synaptiques. La synapse est souvent entourée de prolongements gliaux qui jouent un rôle important dans la recapture des neurotransmetteurs, dans la libération de neuromodulateurs et dans d'autres mécanismes pouvant aussi être impliqués dans la plasticité. Nous ne décrivons que la synapse excitatrice glutamatergique, caractérisée entre autre par la présence d'une structure dense aux électrons accolée au côté post-synaptique de la synapse, dénommée densité post-synaptique. La densité post-synaptique a une forme de disque d'environ 200-500 nm de diamètre et une épaisseur d'environ 60 nm. Cette taille varie toutefois suivant l'identité du neurone, et son histoire, mais aussi de l'activité électrique du réseau neuronal. Elle comprend la partie membranaire post-synaptique et la zone sous membranaire et est constituée de plusieurs centaines de protéines correspondant à des récepteurs, des protéines d'échafaudage, des protéines de signalisation, et des protéines du cytosquelette d'actine. Les principales protéines composant la densité post-synaptique sont la Calcium-calmoduline kinase II et la PSD95. La densité présente une structure hétérogène, asymétrique dans son épaisseur et selon l'axe radial. Ainsi, les récepteurs NMDA sont plus centraux alors que les AMPA sont relativement répartis de manière homogène. Toutefois la répartition asymétrique des récepteurs au glutamate est en relation avec leur devenir puisque les récepteurs centraux sont fortement ancrés aux protéines d'échafaudage, les périphériques étant plus sujet à l'internalisation. Verticalement, on observe aussi une asymétrie dans la distribution de protéines : la PSD-95 est à la surface alors que Shank est plus interne. La CaMKII se trouve elle sur la face interne cytoplasmique de la structure. La densité est fortement relié au cytosquelette d'actine via sa face interne grâce aux protéines cortactine et α -actinine. La structure des densités post-synaptiques est dynamique. Ainsi des expériences de stimulation à haute fréquence induisant une LTP s'accompagne d'une augmentation de la taille de la densité post-synaptique, principalement due au recrutement des molécules de la CamKII. De même, des expériences de FRAP montrent un rapide turn-over de la F-actine au voisinage de la densité dans les épines, ainsi que de l' α -actinine et la cortactine.

La plasticité repose sur deux grandes familles de récepteurs au glutamate que sont les récepteurs AMPA et les récepteurs NMDA. Le glutamate libéré par la terminaison synaptique va activer les récepteurs AMPA et ouvrir les canaux permettant une entrée d'ions sodium et une sortie d'ions potassium. Ceci va provoquer une légère dépolarisation de la membrane plasmique, qui passe

de -80mV à -40mV, ce qui va permettre de levée de blocage par l'ion magnésium qui inhibe l'ouverture du récepteur NMDA. Son ouverture va permettre une entrée massive de calcium qui va être le déclencheur de nombreux événements et en particulier l'activation de plusieurs kinases. Le signal calcique est extrêmement complexe (canaux calciques, réserves calciques, etc.). Le calcium intracellulaire module quasiment toutes les fonctions neuronales, allant des réponses à très court terme aux réponses à long terme. Le nombre des récepteurs synaptiques AMPA et NMDA est régulé par de nombreux mécanismes tels que l'exocytose adressant les récepteurs à la membrane, l'endocytose retirant les récepteurs de la membrane, le recyclage des vésicules, la mobilité de surface distribuant les récepteurs entre zone synaptique et zone extra-synaptique, leur biosynthèse et dégradation. Chacun de ces processus est régulé par des voies de signalisation dépendant de l'activité neuronale, mettant en jeu un certains nombres de kinases.

Le deuxième élément important est l'épine dendritique qui correspond à un domaine fonctionnel du neurone et qui est le support structural des synapses excitatrices glutamatergiques. Les épines sont de petites protrusions à la surface des dendrites, constituées d'une tête et d'un cou, très riche en actine. Les densités post-synaptiques sont localisées dans la tête de l'épine. Il est maintenant largement admis que la morphologie et la dynamique des épines dendritiques sont étroitement liées à la plasticité synaptique. Plusieurs classifications des épines ont été établies d'après leur forme. Les petites épines évoluent rapidement, par exemple dans des expériences de potentiation à long terme, alors que les grosses synapses sont beaucoup plus stables et voient leur morphologie évoluer sur des lapses de temps beaucoup plus longs (de un mois à une année). Certaines hypothèses associent des fonctions spécifiques à ces différents types de synapses.

L'activité neuronale favorise la formation et la maturation des épines dendritiques. Ainsi *in vivo*, les neurones de striatum présentent un grand nombre d'épines. Cependant, une fois en culture les épines disparaissent, excepté si on ajoute à la culture des neurones corticaux générant un signal électrique. D'autres études ont démontré l'effet d'une stimulation électrique sur la polymérisation de l'actine. Par exemple, la profiline est recrutée au niveau des épines dendritiques suite à une activation des récepteurs. Cette stimulation, obtenue également par libération répétée de glutamate, a pour conséquence un élargissement stable des épines dendritiques (Matsuzaki et al., 2004 ; Richards et al., 2005). Cette modification morphologique des épines est en partie due à l'invasion de l'épine par les microtubules sous l'effet de l'activité neuronale (Hu et al., 2008 ; Gu et al., 2009). Ceci favorise le recrutement de polyribosomes permettant une traduction locale des protéines nécessaires à une réponse rapide suite à un stimulus (Ostroff et al., 2002). Les microtubules favorisent également le recrutement de mitochondries dont le rôle est encore mal compris (Li et al., 2004).

In vivo, l'activité neuronale est indispensable à la régulation de la dynamique des épines dendritiques. Cette dynamique se traduit par le fait que certaines épines dendritiques se rétractent tandis que d'autres apparaissent (Figure 25). Les voies de signalisation qui contrôlent le cytosquelette d'actine joue un rôle important dans la mise en place et le remodelage des épines dendritiques et des densités post-synaptiques. Ces voies impliquant épines et densités sont très largement intriquées et conditionnent le nombre de récepteurs synaptiques au glutamate.

Enfin, de plus en plus d'études démontrent qu'une altération de cette plasticité synaptique est à l'origine de nombreux déficits neurologiques et intellectuels (Nadif Kasri et al., 2009) et de

nombreux travaux ont démontré le rôle central du cytosquelette d'actine sur la dynamique des épines dendritiques et l'expression synaptique des récepteurs ionotropiques au glutamate (voir revue de Penzes et al., 2014). Ainsi, les premières anomalies morphologiques d'épines dendritiques associées à des cas de déficience intellectuelle furent rapportées en 1974 par Purpura. Ainsi, chez des patients atteints du syndrome de l'X fragile, les épines présentent un cou fin et allongé et une tête de taille plus importante. Cette étude fut une des premières à avancer l'hypothèse d'une relation entre anomalies structurales des épines et défauts cognitifs observés chez les patients (Figure 25).

Les kinases PAK sont des effecteurs des GTPases de la famille Rac et Cdc42 et participent à la formation et à la maturation des épines dendritiques ainsi qu'à la dynamique structurale des densités post-synaptiques.

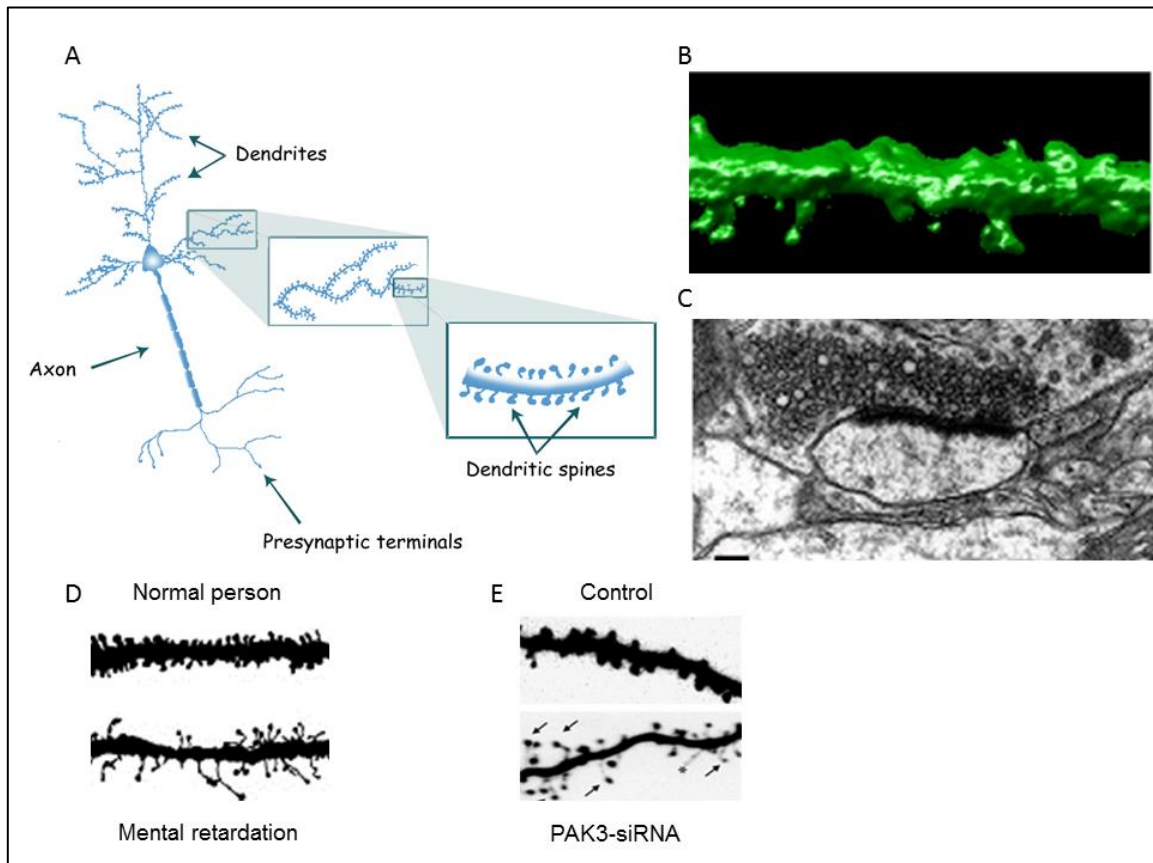


Figure 25. Morphologie des épines dendritiques et déficience intellectuelle.

A. Représentation schématique de la structure d'un neurone. B. Morphologie des épines dendritiques. C. Microscopie électronique d'une synapse avec accumulation de vésicules de neurotransmetteur en pré-synaptique et fort marquage de la densité post-synaptique. D. Illustration de dendrites apicales de neurones pyramidaux du cortex cérébral humain. Dendrite d'un enfant de 6 mois (panel haut) ; dendrite d'un enfant de 10 mois atteint de déficience intellectuelle (panel bas) : les épines sont anormalement longues, fines et tordues avec une densité modifiée (Purpura, 1974). E. Effet de l'extinction de l'expression de *pak3* par utilisation d'un siRNA sur des tranches organotypiques : diminution de la densité et augmentation de la longueur des protrusions (Boda, et al., 2004).

5.2. Rôle des kinases PAK dans la plasticité synaptique

Différentes approches ont été menées pour étudier le rôle des kinases PAK dans la plasticité synaptique. La première évidence de leur rôle fut apportée par le laboratoire de Tonegawa qui exprima le domaine auto-inhibiteur de PAK3 sous contrôle du promoteur de la CamKII pour inhiber les kinases PAK du sous-groupe I dans le cerveau antérieur post-natal conduisant à des anomalies de morphologie des épines dendritiques et des défauts de LTP (Hayashi et al., 2004). Peu après, Dominique Muller montrait, en exprimant dans des tranches organotypiques d'hippocampe les formes mutées de PAK3, que cette kinase joue un rôle dans la plasticité synaptique et la morphogénèse des épines dendritiques (Boda et al., 2004). Pour analyser le rôle des kinases PAK dans la formation des épines, le laboratoire d'Horwitz transfectait des formes actives ou inactives des kinases PAK1 et PAK3 dans des neurones d'hippocampe en culture (Zhang et al., 2005). Enfin, les invalidations des gènes *pak3* et *pak1* démontrèrent des rôles discrets des kinases PAK dans la morphologie neuronale et la plasticité (Meng et al., 2005 ; Asrar et al., 2009). Mon équipe, de même, démontra que les différentes mutations du gène PAK3 responsables de DI affectent spécifiquement certaines étapes de la spinogénèse (initiation versus maturation) (Kreis et al., 2007).

Dans cette partie, je me consacrerai à détailler le rôle de PAK1 dans la plasticité synaptique et la physiologie neuronale, et je reviendrai plus en détail sur les fonctions neuronales de PAK3 dans la partie III.6.

5.3. Rôle de la kinase PAK1 dans la morphologie des épines dendritiques

Les kinases PAK sont des effecteurs majeurs de la voie des Rho-GTPases impliquées dans la régulation du cytosquelette d'actine, mise en jeu au cours de la morphogénèse et la restructuration des épines dendritiques. Ainsi, l'étude de Hayashi et collègues en 2004 a révélé que l'activité neuronale stimule l'activation des kinases PAK au niveau de l'épine dendritique. De plus, en exprimant spécifiquement le domaine auto-inhibiteur des kinases PAK dans les hémisphères et dans l'hippocampe, cette étude montre que l'inhibition des trois kinases PAK1/2/3 entraîne un déficit d'épines à la surface des dendrites ainsi que des défauts morphologiques de ces dernières. Ces épines dendritiques sont de longueur plus petite avec une tête plus grande présentant une densité post-synaptique (PSD) « perforée » (c'est-à-dire, une tête d'épine présentant deux PSD). Ainsi, les kinases PAK jouent un rôle majeur dans la morphogénèse des épines dendritiques (Hayashi et al., 2004).

Dans des tranches organotypiques d'hippocampe de rat, l'équipe de Dominique Muller a montré que le knock-down de PAK1 n'induit pas de modification de la densité ni de la morphologie des épines dendritiques. L'expression d'une forme constitutivement active de PAK1 (gain de fonction) engendre une augmentation du nombre d'épines présentant une petite tête. Ce phénotype n'est que partiellement sauvé par la co-transfection avec un ARN interférent de PAK3 suggérant un rôle spécifique de chacune de ces deux kinases dans ce processus (Boda et al., 2008).

Toutefois, l'inactivation du gène *pak1* chez la souris engendre un phénotype assez faible. Les souris présentent un cerveau de taille normale, sans anomalie structurale des régions du système nerveux central. Les neurones ne présentent pas de défauts numériques et morphologiques des épines dendritiques matures et des synapses. Cependant, ces épines matures présentent des défauts de régulation de la cofiline dépendante de l'activité des récepteurs au NMDA. Cette dérégulation entraîne une diminution de l'actine filamenteuse au niveau des épines dendritiques. Ces résultats suggèrent que PAK1 est un intermédiaire important de la régulation du cytosquelette d'actine liée à l'activation de l'épine via les récepteurs NMDA (Asrar et al., 2009).

Afin de mieux comprendre les fonctions coordonnées de PAK1 et de PAK3, l'équipe de Z. Jia a créé le double knock-out (DK) de ces deux kinases. Si les souris DK naissent avec un cerveau de taille normale, celui-ci ne se développe pas de la même façon que celui du WT après la naissance. Les souris DK présentent une microcéphalie à maturité, et les analyses IRM ont révélé que toutes les régions cérébrales sont sous-développées, en particulier le cortex frontal (préfrontal) et l'hippocampe. Ce phénotype est dû à une compaction plus dense des cellules, qui possèdent aussi un soma plus petit. Dans l'hippocampe, les neurones DK émettent des axones et des dendrites moins longs que ceux des WT, et l'arborisation dendritique est moins élaborée. De plus, les dendrites possèdent principalement des filopodes (épines immatures) à leur surface, indiquant que PAK1 et PAK3 sont nécessaires à la maturation des épines. Par ailleurs, les épines matures présentent une PSD plus large que chez les WT et la densité de synapses est moins importante. L'analyse moléculaire a révélé que ces neurones présentent un défaut de cofiline phosphorylée et d'actine filamenteuse. La cofiline sous sa forme phosphorylée est inactive et la polymérisation de l'actine est régulée par le ratio de la cofiline active/inactive. Ainsi, chez les souris DK, le défaut de cofiline phosphorylée entraîne une augmentation de l'activité de la cofiline qui dépolymérise les filaments d'actine, ce qui explique la diminution d'actine filamenteuse. Cette dérégulation du cytosquelette d'actine explique les défauts morphologiques des épines observés chez ces souris (Huang et al., 2011).

Par des expériences menées dans des cellules d'hippocampe en culture, Zhang et collègues ont disséqué la voie de signalisation impliquée, montré que le facteur d'échange PIX permet l'activation de Rac1 et que la ou les formes actives de PAK se concentre(nt) au niveau des densités post-synaptiques. L'expression de formes mutées de PAK1 comme de PAK3 affecte la densité des épines matures (Zhang et al., 2005). Ces auteurs placent la MLC en aval dans cette voie. Des travaux plus récents montrent que Shank contrôle l'expression synaptique des récepteurs NMDA via la voie Rac/PAK/cofiline/Actine (Duffney et al., 2013), suggérant d'ailleurs un lien entre autisme et cette voie de signalisation.

5.4. Rôle des kinases PAK dans la plasticité

Les altérations morphologiques observées chez les différents mutants sont associées à des déficits fonctionnels de plasticité synaptique. Chez les souris exprimant le domaine auto-inhibiteur des PAK, les neurones corticaux des couches II/III présentent une augmentation de la transmission synaptique et une transmission bidirectionnelle modifiée (avec une augmentation de la LTP et des défauts de LTD) (Hayashi et al., 2004). La souris KO PAK1 montre une sévère diminution de la LTP (Asrar et al., 2009). Les souris DK PAK1 et PAK3 ont une transmission synaptique améliorée mais présentent une forte modification de la plasticité synaptique bidirectionnelle (une réduction de la LTP et de la LTD). Ces résultats suggèrent que les anomalies morphologiques observées provoquent

d'importants déficits de plasticité et de transmission synaptique, qui pourraient contribuer aux défauts d'apprentissage et de mémorisation observés chez ces souris DK (Huang et al., 2011). Ces données montrent que les kinases PAK, et en particulier les kinases PAK1 et PAK3, jouent chacune un rôle dans la plasticité, que ce rôle est vraisemblablement spécifique à chacune des kinases, bien que l'on ne connaisse pas précisément les mécanismes moléculaires impliquant chacune de ces kinases. De même, les deux grandes voies Actine et CREB semblent impliquées, mais les démonstrations rigoureuses du rôle de chacune des kinases PAK dans ces voies et le lien avec les défauts de plasticité restent à établir.

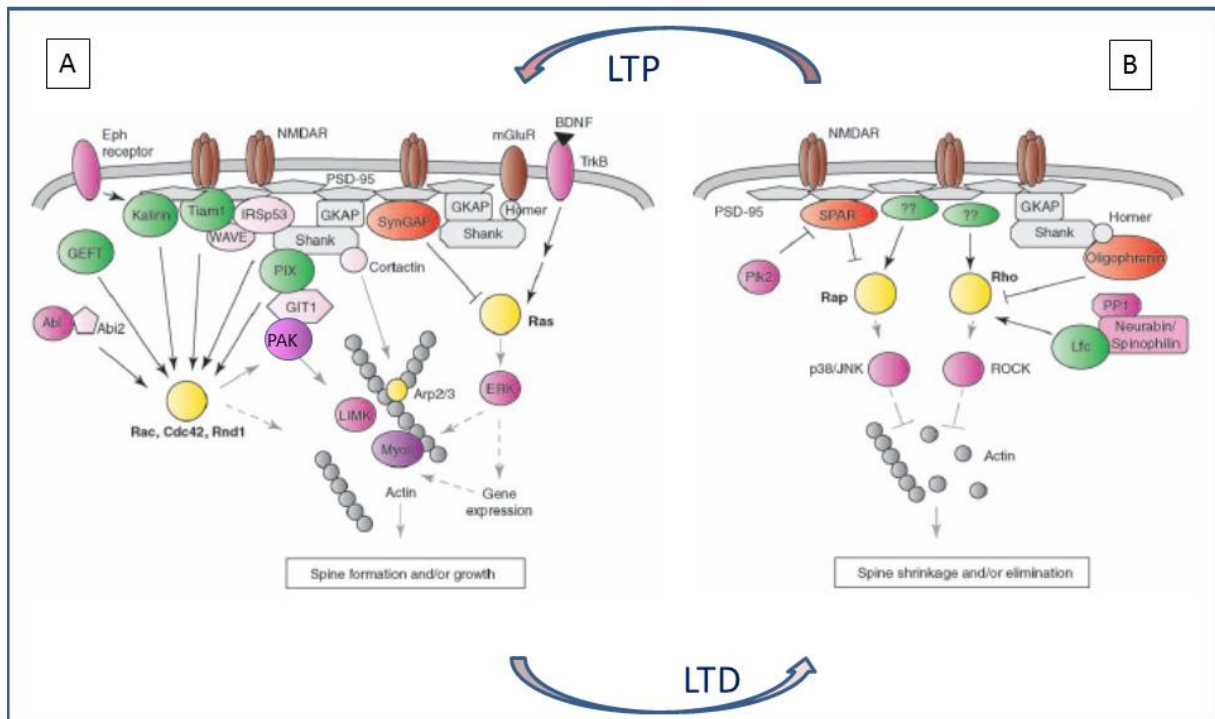


Figure 26. Les kinases PAK sont au centre d'une voie qui régule la plasticité.

Organisation des protéines de signalisation dans les processus de plasticité synaptique. (A) La majorité des protéines de signalisation sont reliées à Shank et PSD-95 et participent directement ou indirectement à la polymérisation de l'actine. Beaucoup d'entre elles sont des régulateurs des Rho-GTPases. Les protéines PAK servent de lien avec la voie de signalisation de l'actine. (B) En cas de rétraction ou d'élimination de l'épine, d'autres protéines de signalisation permettent la déstabilisation des réseaux d'actine (adaptée Tada et Sheng, 2006).

5.5. Rôle des kinases PAK dans l'apprentissage et la mémorisation

Les kinases PAK sont impliquées dans la régulation de la plasticité synaptique, via leur rôle dans le contrôle du cytosquelette d'actine, et PAK3 est responsable de déficience intellectuelle chez l'Homme. Ainsi, les études ont cherché à associer les défauts morphologiques et ceux de la plasticité à des déficits comportementaux.

Au niveau comportemental, les souris transgéniques exprimant le AID des kinases PAK dans l'hippocampe et le cortex ne sont pas plus sujettes à l'anxiété que les souris contrôles. Elles ne présentent pas de défaut locomoteur et sensorimoteur, ni de déficit d'apprentissage et de mémoire spatiale. Cependant, ces souris montrent des défauts de consolidation de cette mémoire spatiale à long terme (21 jours après apprentissage) (Hayashi et al., 2004).

Le test de comportement du labyrinthe surélevé a révélé que les souris DK pour PAK1 et PAK3 sont plus anxieuses. Dans ce test, elles explorent moins les bras ouverts (avec vue sur le vide) du labyrinthe que les WT. De plus, ces souris DK présentent des capacités d'apprentissage et de mémorisation très altérées. Après 3 jours d'entraînement, ces souris parcourent une plus grande distance avant de rejoindre la plate-forme dans le test de la piscine de Morris (Huang et al., 2011). Ces résultats sont étonnants car aucune des souris simple KO PAK1 ou PAK3 ne présente des déficits cognitifs aussi forts. Ceci suggère fortement que PAK1 et PAK3 ont des fonctions redondantes dans l'adaptation du comportement, ou qui peuvent être compensées par la seconde kinase suite à l'absence de la première.

Concernant la souris KO PAK3, je reviendrai en détail sur les anomalies cellulaires, biochimiques et comportementales qu'elle présente dans la partie I des résultats.

6. Fonctions neuronales spécifiques de PAK3

6.1. Implication dans la déficience intellectuelle : les mutations de PAK3

Le gène *pak3* (p21-activated kinase) a longtemps été considéré comme appartenant à la classe de gènes responsables de DI non syndromique. A ce jour, six mutations ont été identifiées. Seule une d'entre elles est située dans la région régulatrice, quatre autres sont localisées dans le domaine catalytique et une, localisée dans un intron ne permet vraisemblablement pas la synthèse d'une protéine stable (Figure 27 et Tableau 1). La première mutation du gène *pak3* a été identifiée par le laboratoire de Christopher Walsh (Allen et al., 1998). Cette mutation consiste en une substitution de base C en base T, ce qui change le codon CGA qui code pour un résidu arginine en position 419, en un codon TGA codant pour un codon STOP. Il en résulte une protéine tronquée dans son domaine catalytique avec une perte de l'activité kinase et une perte de la thréonine T421 qui est un site d'autophosphorylation suite à l'activation par Rac1/Cdc42. Cette protéine tronquée est toujours capable de se lier à Rac1 et Cdc42, *in vitro*. Les patients porteurs de cette mutation non-sens sont atteints de déficience intellectuelle légère à modérée. De plus, cette première étude de mutation de PAK3 rapporte aussi l'absence de signes physiques (ou manifestations minimales)

associée à cette mutation R419X. Un seul homme atteint de la mutation R419X présente une microcéphalie avec cependant une architecture normale du cortex et de l'hippocampe, sans autre anomalie phénotypique au niveau du cerveau ou d'autres parties du corps. Ceci permet de classer le retard mental associé à une mutation de PAK3 dans la catégorie des déficiences intellectuelles non syndromiques.

La deuxième mutation de *pak3* fut identifiée en 2000 par le laboratoire de Jamel Chelly (Bienvenu et al., 2000). Il s'agit aussi d'une substitution de base dans l'exon codant 2, conduisant une substitution de la cystéine par l'arginine en position 67. Cette mutation provoque la perte du site de restriction HhaI. Cette mutation faux-sens est localisée dans la région régulatrice de la kinase, juste en amont du domaine de liaison aux Rho-GTPases Rac1 et Cdc42. Elle est présumée diminuer l'interaction avec ces Rho-GTPases et réduire ou invalider l'activation de PAK3 (Bienvenu et al., 2000). Les patients présentent un retard mental modéré à sévère sans autre signe clinique associé. Jusqu'à la récente mise en évidence d'une nouvelle mutation de *pak3*, la mutation R67C était considérée comme celle provoquant le phénotype le plus sévère chez l'Homme. Cette mutation diminue fortement la liaison à la GTPase Cdc42 ainsi que son activation par celle-ci (Kreis et al., 2007).

La mutation A365E fut la troisième observée en 2003 au sein d'une famille australienne sur 6 générations. La mutation consiste en une substitution de base C en A ce qui provoque un échange d'acide aminé en position 365 de la kinase. Le résidu alanine (hydrophobe) est remplacé par un résidu glutamate (acide fort). Ce changement de nature de l'acide aminé dans une région très conservée de la kinase pourrait provoquer une déstabilisation locale de la structure de la protéine affectant ainsi le domaine catalytique, ce qui pourrait provoquer la pathologie. Les patients ne présentent pas d'autres signes cliniques que le retard mental lui-même. Les évaluations cognitives ont révélé des QI compris entre 60 et 80, soit une déficience intellectuelle légère chez les patients atteints de cette mutation. Cependant certains hommes possèdent des oreilles de taille un peu plus grande que la normale. Les patients ont présenté une ou plusieurs anomalies du développement cognitif telles qu'un retard d'apprentissage, du développement de la marche et du langage, des défauts d'interactions sociales sans pour autant empêcher une insertion professionnelle (Gedeon et al., 2003). Cette mutation abolit complètement l'activité kinase (Kreis et al., 2007).

La mutation W446S fut identifiée en 2007. Cette mutation faux-sens dans l'exon 7 par substitution d'une base G en C engendre l'échange de l'acide aminé tryptophane en sérine en position 446 dans le domaine kinase. Elle est supposée invalider l'activité catalytique. Cette mutation affecte aussi les femmes hétérozygotes porteuses de la mutation, contrairement aux trois études précédentes où seuls les hommes mutés sont atteints de retard mental. Les patients présentent une déficience intellectuelle légère à modérée, une tête de petite taille ou une microcéphalie, des grandes oreilles, des défauts d'apprentissage et d'élocution, et quelques désordres psychiatriques (défauts de l'attention, agitation, anxiété, agressivité) (Peippo et al., 2007).

En 2008, une mutation dans l'intron 6 a été identifiée par Rejeb et collègues. Cette mutation entraîne un décalage du cadre de lecture ; il en résulte l'apparition d'un codon stop prématuré en position 128, dans la région régulatrice de PAK3. La protéine synthétisée possède alors 128 acides aminés. Cette mutation entraîne donc une perte de fonction de la kinase. Les signes cliniques

associés à cette mutation sont une déficience intellectuelle modérée, des défauts d'élocution, quelques signes physiques (une petite tête ou microcéphalie, un petit nez, une grande bouche avec des lèvres étalées) et des désordres psychiatriques (Rejeb et al., 2008).

Très récemment, une sixième mutation faux-sens a été identifiée dans le domaine kinase. La substitution d'une base G par une base T entraîne l'échange de l'acide aminé lysine en résidu asparagine, en position 389 de la kinase. Cette mutation abolit l'activité kinase et confère un effet dominant-négatif à cette protéine PAK3-K389N. Les patients porteurs de cette mutation sont atteints de retard mental sévère associé à des anomalies structurales du cerveau (agenèse du corps calleux, hypoplasie du cervelet), des déficits cognitifs et moteurs (faible développement de la marche et du langage) et des anomalies dermatologiques (ichtyose). Cette mutation confère donc le phénotype le plus fort de déficience intellectuelle associée à d'autres signes cliniques et permet de situer le gène *PAK3* au centre du continuum entre DI syndromique et non syndromique (Magini et al., 2014).

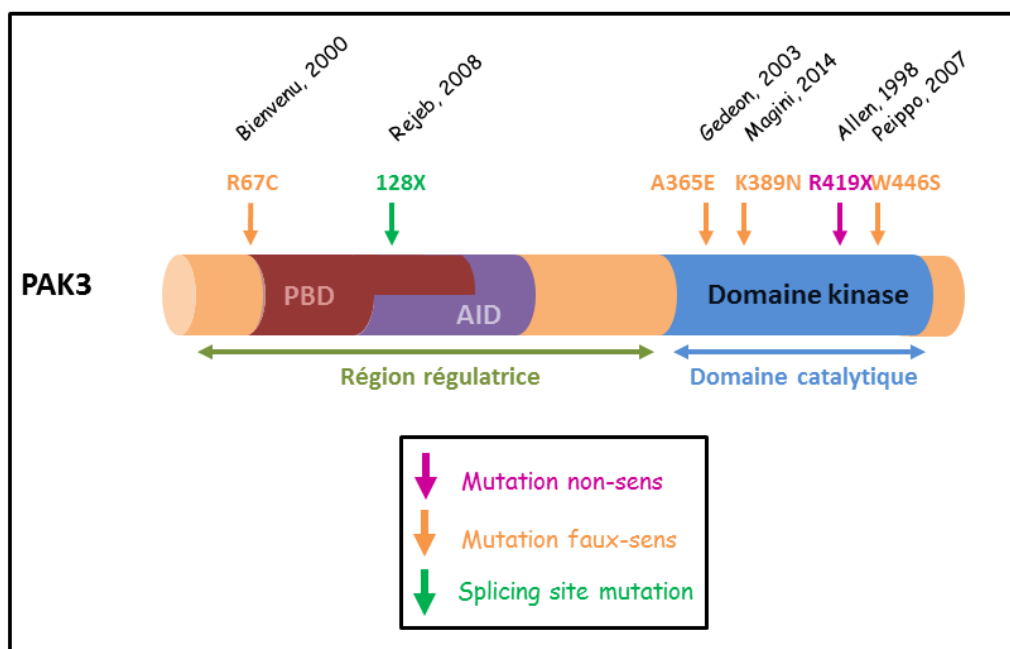


Figure 27. Les six mutations de PAK3.

Une seule des 6 mutations est localisée dans la région régulatrice ; les 5 autres abolissent le domaine kinase.

La description des six familles portant les mutations dans le gène *pak3* suggère fortement que PAK3 est impliquée dans les mécanismes cellulaires et moléculaires qui sous-tendent les fonctions cognitives. Si initialement on pouvait penser que les formes de DI attachées à ce gène seraient non syndromiques, force est de constater qu'il existe une relation complexe entre la nature de la mutation et les phénotypes des patients qui restent toutefois assez homogènes pour une même mutation, au sein d'une même généalogie (Cf Introduction partie I). L'approche menée dans mon équipe a permis de montrer les différences biochimiques générées par ces mutations. Enfin, on peut remarquer qu'en dépit des fortes identités de séquence que partagent PAK1 et PAK3, la perte de fonction de PAK3 ne semble pas être totalement compensée par les autres kinases du sous-groupe I, suggérant le rôle spécifique de PAK3 dans la plasticité synaptique.

Introduction

Références	Allen et al., 1998	Bienvenu et al., 2000	Gedeon et al., 2003	Peippo et al., 2007	Rejeb et al., 2008	Magini et al., 2014
Mutation	Truncating c.1255C>T p.R419X	Missense c.199C>T p.R67C	Missense c.1049C>A p.A365E	Missense c.1337G>C p.W446S	Frame- shift c.276+4A>G	Missense c.1167G>T p.K389N
Number of patients examined (N)	4	6	13	5	2	2 (+ 1 fetus)
Mental retardation (n/N)	Mild 4/4	Moderate 5/6	Borderline to mild 13/13	Mild 2/5	Mild 2/2	Severe 2/2
Stature	Normal range	Normal Range	Normal range	Normal range	Normal range	Normal range
Small head size (n/N)	4/4	NR	NR	4/5	2/2	2/2
Appearance (n/N)	Long ears 1/4	Unspecific	Long ears 7/13 High palate 1/13 Prominent nose 1/13	Long ears 4/5 High palate 5/5 High bridged nose	Long ears 2/2 High palate 2/2	Long ears 2/2
Oral motor feature (n/N)	NR	Poor and Inarticulate speech 4/6	Inarticulate speech 1/13	Poor and inarticulate speech 4/5 Open mouth appearance 4/5 Prolonged/persistent drooling 5/5	Poor and inarticulate Speech in 2/2 Appearance 1/2	Poor speech 2/2
Behavioural/ psychological problems (n/N)	2/4	None	3/13	5/5	2/2	
Neurological) symptoms (n/N)	None	None	Epilepsy 1/13	Epilepsy 1/5 Chronic hydrocephaly 1/5 Shuffling gate 2/5	Epilepsy 1/2	Epilepsy 2/2 Corpus callosum agenesis 2/2 Cerebellar hypoplasia 2/2
Neuropsychological profile (n/N)	Not available	Unspecific	Not available	Impaired spatial cognitive skills and deficits in attention and executive functions 4/4	Impaired spatial cognitive skills and deficits in attention and executive functions 1/2	Ichthyosis

Tableau 1. Caractéristiques cliniques des patients hommes atteints de déficience intellectuelle liée aux différentes mutations du gène *pak3*.

Les mutations R67C et K389N provoquent les cas de retards mentaux les plus sévères. Quelques cas d'épilepsie (5 sur les 32 patients) et plusieurs défauts dysmorphiques ont été observés chez certains patients, en particuliers des anomalies faciales et une tête de plus petite taille que la moyenne. La dernière mutation identifiée provoque des anomalies structurales du cerveau.

6.2. PAK3 et plasticité synaptique

Comme exposé dans la partie d'introduction I.3.2.4 sur la déficience intellectuelle, trois gènes portés par le chromosome X appartiennent à la voie de régulation du cytosquelette d'actine de l'épine dendritique. Ces gènes codent pour l'oligophérine (une GAP de Rho, Rac et Cdc42), PIX (une GEF) et PAK3. De nombreuses études ont montré l'importance de ces protéines dans la morphologie des épines dendritiques et la régulation de la plasticité.

En amont de PAK3, les régulateurs de Rac1 et Cdc42 participent aux processus de régulation.

Le knock-down de l'oligophérine-1 dans des tranches organotypiques d'hippocampe de rat induit une réduction de la taille des épines dendritiques. OPHN1 régule négativement l'activation des Rho-GTPase et permet ainsi de maintenir la taille des épines dendritiques (Govek et al., 2004).

Les études du groupe de Horwitz ont montré que le complexe GIT/PIX/PAK3 permet l'activation de la kinase PAK3 par Rac1 et Cdc42, en la recrutant à la membrane (Zhang et al., 2005). Ce module de signalisation régule la morphologie des épines dendritiques par l'intermédiaire de l'activation de la MLC, phosphorylée par PAK3. La mise en évidence de cette voie a été effectuée par des expériences de knock-down et de sauvetage du phénotype sur tranches organotypiques d'hippocampe de rat ou de culture de neurones transfectés. Par expression de formes mutantes dans des tranches organotypiques, il a été montré que quel que soit l'élément de cette voie de signalisation qui fasse défaut, les neurones présentent des anomalies de densité et de morphologie des épines dendritiques et des synapses, démontrant ainsi l'importance de cette voie (Nodé-Langlois et al., 2006).

La suppression de l'expression de PAK3 par la méthode de l'ARN interférent dans des tranches organotypiques de rat entraîne une augmentation du nombre de filopodes et d'épines présentant une petite tête (épines immatures) et une réduction du nombre d'épines présentant une large tête (épines matures) (Boda et al. 2004 ; Boda et al., 2008). PAK3 serait donc impliquée dans l'étape d'initiation de formation de l'épine dendritique. En accord avec cette hypothèse, mon équipe avait montré que PAK3 interagit préférentiellement avec Cdc42 plutôt que Rac1 (Kreis et al., 2007). Cdc42 est la GTPase qui contrôle la formation des filopodes, une des premières étapes dans la formation des épines en explorant le voisinage du dendrite, en établissant les premiers contacts avec des éléments présynaptiques et en répondant fortement à des signaux attractifs et de signalisation (Scott et al., 2003). Cdc42 est spécifiquement localisée et activée au niveau de l'épine dendritique suite à une stimulation par le glutamate (Murakoshi et al, 2011). De plus, la mutation R67C, qui supprime l'activation par la voie Cdc42, diminue la densité des épines, peut-être au niveau de leur initiation (Kreis et al., 2007).

De même, les mutations DI qui affectent l'activité kinase induisent un défaut de maturation des épines, suggérant que PAK3 est impliquée dans plusieurs étapes de la synaptogénèse (Kreis et al., 2007). Ainsi, une autre étude récente montre que PAK3 est un régulateur négatif de la croissance des épines dendritiques et que ce rôle est dépendant de l'activité synaptique. La stimulation de l'épine permet le recrutement de PAK3 à la tête de l'épine, ce qui participe à la stabilisation à long terme de l'épine stimulée (Dubos et al., 2012). Certains des mécanismes impliquant PAK3 sont indépendants de la régulation du cytosquelette d'actine. Ainsi, l'interaction PAK3/Nck2, qui régule la transmission synaptique, le fait sans lien avec la dynamique des épines. Elle pourrait passer par une voie couplant

Nck2, GIT1 et les éphrines B, et réguler l'expression des récepteurs AMPA à la synapse (Thévenot et al., 2011 ; Essman et al., 2008).

La souris invalidée pour le gène *pak3* (Meng et al., 2005) présente un phénotype cognitif assez léger sans signe d'altération du cytosquelette d'actine. Très étonnamment, alors que les mutations de PAK3 entraînent, chez l'Homme, une déficience intellectuelle modérée à sévère associée à des défauts d'apprentissage et des désordres psychiatriques, ces souris ne présentent pas de défaut phénotypique majeur. Aucune anomalie de développement et de macrostructure des différentes régions du cerveau n'a été constatée. Les neurones de ces souris KO ne présentent de surcroît aucun défaut morphologique des épines dendritiques et des synapses, ni du cytosquelette d'actine. Par ailleurs, l'expression et l'activation des différents intermédiaires (LIMK, cofiline) de la voie de régulation du cytosquelette d'actine ne sont pas affectées. Cependant, ces neurones présentent tout de même un léger défaut d'un sous-type de LTP (de late-phase LTP, L-LTP), associé à une très forte diminution de la phosphorylation de la serine 133 du facteur de transcription CREB (cAMP-responsive element binding protein), facteur qui est impliqué dans l'établissement de la L-LTP et de la mémoire. Au niveau comportemental, ces souris présentent un léger déficit de mémorisation dans le test d'aversion gustatif mais aucun autre phénotype comportemental (Meng et al., 2005). L'absence d'un phénotype fort chez la souris invalidée pour *pak3* a suggéré l'existence de processus de compensation par les autres kinases PAK du sous-groupe I, intervenant dans la régulation de la plasticité et des processus d'apprentissage et de mémorisation. Toutefois, il apparaît de plus en plus évident que dans certains cas, dans certaines pathologies neurologiques, les modèles souris ne récapitulent que partiellement ou faiblement les défauts développementaux, neurodégénératifs, cognitifs ou comportementaux observés chez l'Homme. Nous verrons qu'un examen plus approfondi de cette souris KO réalisé par nos collaborateurs et auquel j'ai participé, révèle un phénotype plus complexe qui, au moins pour certains points, rappelle les descriptions cliniques des patients (Farley et al., en préparation).

Concernant les effets des mutations de déficience intellectuelle sur la formation des dimères, il a été montré que la mutation R67C ne modifie pas l'hétérodimérisation avec PAK1. Chez les patients porteurs de la mutation R67C, la conservation de l'interaction entre PAK3-R67C et PAK1 pourrait donc maintenir PAK1 dans un état inactif. Le phénotype relativement sévère associé à la mutation R67C pourrait donc être dû à un défaut d'activation de PAK3 auquel s'ajouterait une perte d'activation de PAK1. Il a aussi été montré que les mutations A365E et R419X du domaine kinase abolissent l'interaction avec PAK1, favorisant ainsi la formation d'homodimères de PAK1 et n'impactant donc pas la régulation de son activation. Ainsi, certaines mutations de PAK3 pourraient agir par effet dominant négatif sur PAK1 et les défauts cognitifs associés à ces mutations seraient liés à des défauts de signalisation imputables à PAK1 et à PAK3 (Combeau et al., 2012)

L'une des questions posées est de savoir s'il existe une compensation ou des fonctions communes entre les kinases neuronales PAK1 et PAK3. Par exemple, la co-transfection d'une forme constitutivement active de PAK1 et d'un ARN interférent de PAK3 suffit à sauver l'effet du knock-down de PAK3. Cependant, l'expérience inverse ne rétablit pas parfaitement le phénotype obtenu suite à l'extinction de l'expression de PAK1 (Boda et al., 2008). Les études *in vivo* des différents modèles murins knock-out (simple et double) de PAK1 et PAK3 viennent corroborer l'existence de

phénomènes de compensation entre les PAK du sous-groupe I, au moins chez la souris. En effet, certains déficits (morphologie des épines dendritiques, défauts fonctionnels et comportementaux) sont absents chez les souris simple KO (Meng et al, 2005 ; Asrar et al., 2009) mais les souris DK PAK1/PAK3 présentent des phénotypes sévères aux mêmes niveaux d'analyse (Huang, Zhou et al., 2011). Ceci suggère que chacune des kinases peut être compensée par les fonctions de l'autre kinase dans les souris simple KO mais que la synergie de leurs fonctions est indispensable au développement des épines et des synapses impliquées dans les fonctions synaptiques qui sous-tendent les processus d'apprentissage et de mémorisation. Cependant, ce phénomène compensatoire a été très peu étudié dans le cas des mutations de PAK3 responsables de déficience intellectuelle chez l'Homme.

La voie de signalisation impliquant l'OPHN1, PIX, GIT, Cdc42 régule l'activité kinase de PAK3. La liaison de PAK3 à Cdc42, de même que la régulation de son activité par OPHN1 et PIX/GIT, semblent jouer un rôle précis dans la formation des épines dendritiques stables et matures, par des mécanismes impliquant l'activité neuronale. Si certaines données suggèrent fortement un rôle important de PAK3 dans la régulation du cytosquelette d'actine et la morphologie des épines dendritiques, d'autres éléments suggèrent qu'il existe des voies indépendantes de l'actine.

De manière intéressante, mais sans que l'on puisse distinguer s'il s'agit de fonction des kinases PAK ou d'une isoforme neuronale précise, deux articles récents montrent que PAK intervient dans une voie impliquant les récepteurs au glutamate. L'inhibition de l'expression de Shank3 par ARN interférant diminue les courants NMDA via une voie impliquant Rac1 et PAK (Duffney et al., 2013). Shank se localise à l'extrémité des filaments d'actine, et, peut-être via son complexe avec GIT/PIX, active Rac et PAK, tout en interagissant indirectement avec les récepteurs NMDA. De même, SAP102, un membre de la famille de PSD95, régule les courants AMPA en contrôlant le trafic de ces récepteurs, via une voie Ephrine/PAK (Murata & Constantine-Paton, 2013). Ceci n'est pas sans rappeler les travaux du laboratoire d'Ampero-Palmer (Essman et al., 2008 ; Segura et al., 2007) montrant le rôle des complexes GIT/ephrine et Nck2/GIT dans la croissance des épines et la stabilisation des récepteurs AMPA à la synapse. De même, les travaux de mon équipe soulignent le rôle spécifique du complexe Nck2/PAK3 dans la régulation de ces courants (Thévenot et al., 2011).

6.3. Rôle développemental dans la migration

Au cours du développement embryonnaire, les interneurones GABA-ergiques du cortex sont générés par des progéniteurs dans les zones prolifératives du subpallium. Les interneurones immatures migrent de façon tangentielle depuis le subpallium vers le cortex. Dans le cortex, la migration devient radiale et les cellules migrent alors vers la plaque corticale où elles prennent leur position définitive et se différencient en interneurones.

L'étude de Cobos et collègues du laboratoire de Rubenstein, en 2007 a montré que les facteurs de transcription Dlx1 et Dlx2 favorisent la migration tangentielle des interneurones immatures en inhibant la croissance de l'axone et des dendrites. Cette inhibition de la croissance neuritique est réalisée par l'intermédiaire de PAK3 dont l'expression est réprimée par Dlx1 et Dlx2 au cours de la migration. Enfin, Dlx1 et Dlx2 sont indispensables au bon positionnement et à la survie des interneurones GABA-ergiques dans la plaque corticale (Cobos et al., 2007). En accord avec ces données, l'étude de Dai et collègues en 2014 a révélé que Dlx1 réprime l'expression de PAK3 dans les

neurones pyramidaux et les interneurons de l'hippocampe, permettant ainsi la régulation de l'arborisation dendritique et de la morphologie des épines (différenciation terminale) de ces neurones (Dai et al., 2014).

Une étude récente réalisée par l'équipe de Christine Métin, en collaboration avec mon équipe, a montré le rôle majeur de PAK3 dans la migration des interneurons corticaux au cours du développement. PAK3 est impliquée dans la distribution des cellules de l'éminence ganglionnaire médiane (EGM) au cours de développement du cortex. En effet, les différentes formes de PAK3 exprimées dans les cellules (kinase-dead, constitutivement active, ou incapable de lier les Rho-GTPases) induisent un retard de migration et des défauts de distribution des cellules de l'EGM dans la plaque corticale et la SVZ. Ceci est dû à une vitesse de migration plus faible, au suivi de trajectoires anormales lié à des défauts numériques et morphologiques (longueur, inversement de polarité et nombres de croisement) des projections neuritiques. Enfin, les cellules exprimant les différentes formes de PAK3 montrent des défauts de translocation du noyau nécessaire à la migration des cellules (Viou et al., en révision).

Il est intéressant de noter que PAK1 joue aussi un rôle important dans la migration des interneurons corticaux au cours du développement du système nerveux central (Causeret et al., 2009). Cependant, ni les simples KO PAK1 ou PAK3, ni le double KO PAK1/PAK3 ne présentent de défaut structural de cerveau à la naissance (Asrar, 2009 ; Huang et al., 2011). L'étude de la migration de ces interneurons dans le modèle double KO PAK1/PAK3 permettrait de mieux caractériser les fonctions de PAK1 et de PAK3 au cours du développement embryonnaire et post-natal.

6.4. Rôle dans la sortie du cycle cellulaire et la différenciation neuronale

Souopguy et collègues ont analysé, dans le but d'identifier les gènes impliqués dans la voie proneurale qui contrôle le déterminisme neuronal des progéniteurs neuraux, les territoires d'expression des gènes exprimés à ce stade de développement et ont ainsi sélectionné l'homologue du gène *pak3* chez le xénope (Souopgui et al., 2002). Son territoire d'expression est similaire à celui de la neurogénine. En utilisant des morpholinos ou des formes constitutivement actives ciblées à la membrane de PAK3, ils démontrent que l'expression de *pak3* est inhibée par Notch mais activée par la neurogénine, et que PAK3 contrôle la sortie des phases prolifératives des précurseurs et leur différenciation en neuroblastes. Plusieurs travaux indépendants confirment ce rôle lors de la différenciation des neurones sensitifs de la larve du xénope (Park et al., 2011). Dans un autre système, au cours du développement embryonnaire du pancréas, Gérard Gradwohl et collègues montrent que PAK3, dont l'expression se trouve stimulée par la neurogénine, est aussi impliquée dans l'arrêt de la prolifération des précurseurs des cellules bêta du pancréas (Piccand et al., 2014). Ces données suggèrent que PAK3 pourrait posséder ces fonctions, à savoir le contrôle de la sortie du cycle cellulaire et la régulation de la différenciation neuronale, dans différents types cellulaires au cours du développement embryonnaire. Les mécanismes moléculaires par lesquels PAK3 contrôle cette étape ne sont pas connus.

Introduction

En conclusion, PAK1 et PAK3 jouent plusieurs rôles dans les différentes étapes de la mise en place des épines et des synapses ainsi que dans leur plasticité structurale et fonctionnelle. Néanmoins, il demeure que la régulation du trafic des récepteurs synaptiques, via la dynamique des épines sous contrôle du cytosquelette d'actine et des densités synaptiques, constitue le support de la plasticité synaptique dont les défauts permettent d'expliquer les déficits cognitifs associés aux mutations de PAK3 chez les patients atteints de déficience intellectuelle. Les mécanismes moléculaires, les voies de signalisation et les fonctions propres à chacune des kinases PAK1 et PAK3 sont loin d'être élucidés. Plusieurs autres fonctions de PAK3 ont été caractérisées principalement au cours du développement embryonnaire. On ne connaît pas actuellement les conséquences de ces fonctions développementales sur les capacités cognitives adultes, ni si PAK3 pourrait avoir des fonctions similaires qui impacteraient aussi le fonctionnement cérébral chez l'adulte.

RESULTATS

Objectifs de mon travail de thèse

Je présenterai mon travail de thèse en deux parties. Dans la première partie intitulée « Rôle de PAK3 dans la physiologie neuronale », j'ai étudié les mécanismes moléculaires et cellulaires par lesquels la kinase PAK3 régule la plasticité synaptique. Un objectif que nous nous étions fixé était de débiter l'analyse des fonctions d'un gène impliqué dans la déficience intellectuelle dans un animal modèle, afin de mener des études intégrées. J'ai donc eu la responsabilité de mettre en place la lignée de souris *pak3* KO que mon équipe venait de recevoir. J'ai établi un certain nombre de protocoles et de tests afin de contrôler l'élevage et de mettre en place les techniques d'extraction d'ADN de queues de souris et de génotypage par PCR. La lignée, la méthodologie utilisée ainsi que les contrôles que j'ai effectués sont présentés dans « Matériels et Méthodes ». Grâce à cette souris KO, j'ai pu analyser le rôle de la kinase PAK3 dans la différenciation neuronale en comparant les caractéristiques de la différenciation des neurones d'hippocampe mutés et normaux (partie 1.1). J'ai, par ailleurs, participé à la caractérisation de deux mécanismes de signalisation spécifique de PAK3. Ainsi, j'ai analysé le rôle de l'interaction entre PAK3 et l'adaptateur Nck2 dans la spinogénèse et la synaptogénèse (partie 1.2). Et j'ai également réalisé les expériences de biochimie confirmant que les hétérodimères entre PAK1 et PAK3, que mon équipe avait identifiés, peuvent se faire aussi avec des protéines douées d'activité kinase (1.3). Enfin, j'ai participé à la caractérisation phénotypique de la souris *pak3*-KO. Le but était d'entreprendre l'étude des défauts de structures du cerveau et d'ultrastructure des épines dendritiques, afin de les relier à la physiologie neuronale et aux caractéristiques cognitives et comportementales des souris KO, travaux réalisés par Cyrille Vaillend et Séverine Farley (Partie 1.4).

La seconde partie concerne l'étude du rôle de la kinase PAK3 dans la neurogenèse adulte. J'ai initié ce sujet au sein de mon équipe et avec l'aide de nombreux collaborateurs et collaboratrices. J'ai de plus pris en charge la nouvelle lignée Knock-in que mon équipe a générée et venait de recevoir. Nous avons tout d'abord analysé l'expression de *pak3* dans les cellules souches en présence de facteurs de croissance et suite à leur retrait (Partie 2.1). Ceci nous a conduit à suspecter un rôle de PAK3 dans la biologie des cellules souches, ce que nous avons analysé sur des cellules invalidées pour le gène *pak3* et permis de mettre en évidence un rôle important de PAK3 dans certaines étapes de la prolifération et différenciation de ces cellules (Partie 2.2). Nous avons ensuite cherché à savoir comment les mutations de déficience intellectuelle affectent le rôle de PAK3 dans la neurogenèse adulte. Nous présenterons la nouvelle souris knock-in pour la seule mutation de PAK3 à préserver l'activité kinase mais toutefois responsable d'un des phénotypes les plus sévères chez les patients (Partie 2.3). Nous avons analysé la prolifération des cellules souches et progéniteurs ainsi que leur devenir (Partie 2.4). Nos résultats démontrent pour la première fois l'implication d'une mutation non syndromique dans la neurogenèse adulte.

I. Rôle de PAK3 dans la physiologie neuronale

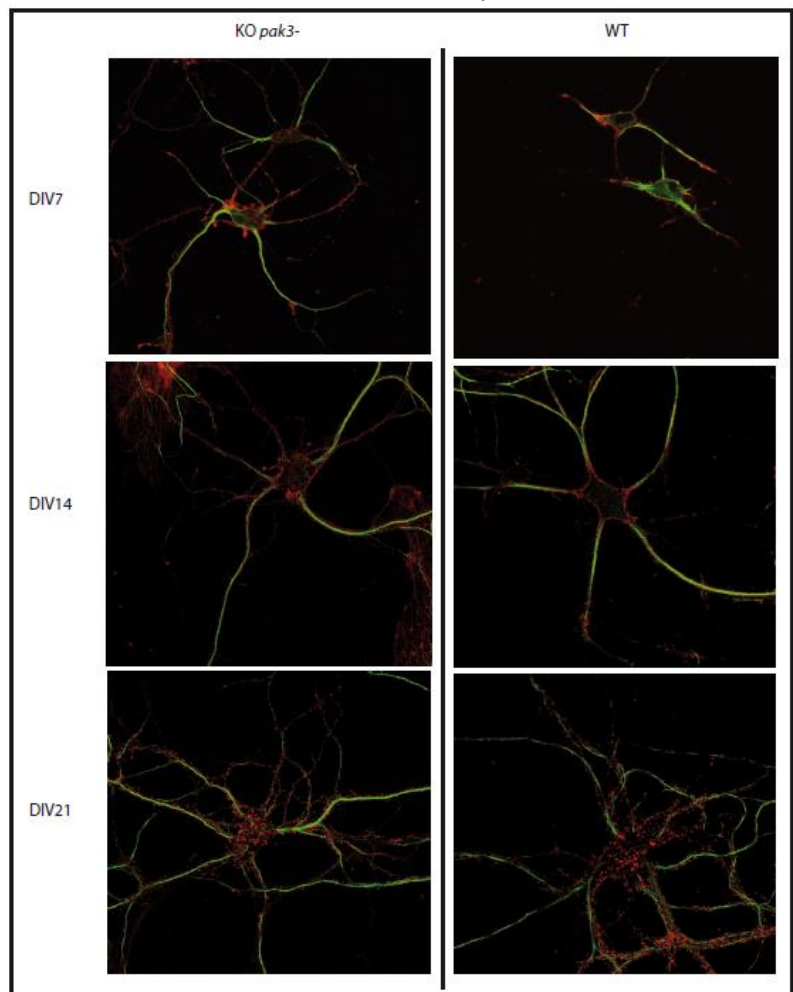
1. Rôle de PAK3 dans la neuritogenèse, la spinogenèse et la synaptogenèse des neurones d'hippocampe

1.1. Neuritogenèse.

Les kinases PAK jouent un rôle important dans la croissance axonale (Robles et al., 2005 ; Xu & Henkemeyer, 2009). De plus, alors que PAK1 contrôle la spécification axonale (Jacobs et al., 2007) PAK3 joue un rôle dans la neuritogenèse (Cobos et al., 2007). Pour ces raisons, nous avons trouvé étonnantes les données de Meng qui montrent que l'inactivation du gène *pak3* n'entraîne pas d'altération de la différenciation morphologique des neurones d'hippocampe. Nous avons envisagé l'hypothèse que la mutation du gène induise un délai dans le décours temporel de la différenciation de ces cellules et, de ce fait, les défauts de différenciation seraient passés inaperçus lors de l'analyse de Meng. Nous avons donc recherché une différence entre les neurones KO-*pak3* et les neurones sauvages au cours de leur différenciation. Pour cela, des neurones KO et WT, isolés à partir de cerveaux prélevés sur des embryons E18, sont mis en culture pendant 7 jours, 14 jours et 21 jours, avant d'être analysés. Nous avons réalisé deux marquages, l'un des dendrites grâce à une immunofluorescence MAP2, l'autre des cônes de croissance par un marquage de l'actine filamenteuse (actine-F) par la phalloïdine. Les protocoles se rapportant à cette partie sont détaillés dans le « matériels et méthodes ».

Figure 28. Mise en place des dendrites durant les stades précoces de développement.

Les neurones de souris mutée (KO *pak3*- à gauche) et sauvage (WT à droite) sont fixés 7 (DIV7) ou 14 (DIV14) ou 21 (DIV21) jours après leur mise en culture puis un marquage MAP2-FITC (en vert) et phalloïdine-Alexa 568 (en rouge) est réalisé. Les images ont été acquises en microscopie confocale.



En première analyse, les neurones *pak3*⁻ se différencient comme les neurones sauvages (WT), quelques soient les paramètres observés : nombre de dendrites, arborisation dendritique, longueur des dendrites (Figure 28).

1.2. Spinogenèse et densités post-synaptiques

Nous avons ensuite analysé la mise en place des densités post-synaptiques. Dans un premier temps, nous avons transfecté un plasmide permettant l'expression d'une protéine DsRed-PSD-95 fourni par D. Muller. La quantification du nombre de puncta PSD-95+ n'a pas permis de mettre en évidence de différence entre les deux génotypes. Toutefois l'expression exogène d'une protéine structurale de la densité post-synaptique peut forcer le système et masquer des différences. Nous avons donc, dans un second temps, analysé la mise en place des densités post-synaptiques grâce à un marquage de la protéine PSD-95 endogène. La quantification des spots de PSD-95 a ensuite été effectuée par pointage, à partir de segments de dendrites de 50 µm (Figure 29.). La moyenne des comptages des 10 à 15 neurones analysés pour chaque condition est présentée Figure 30.

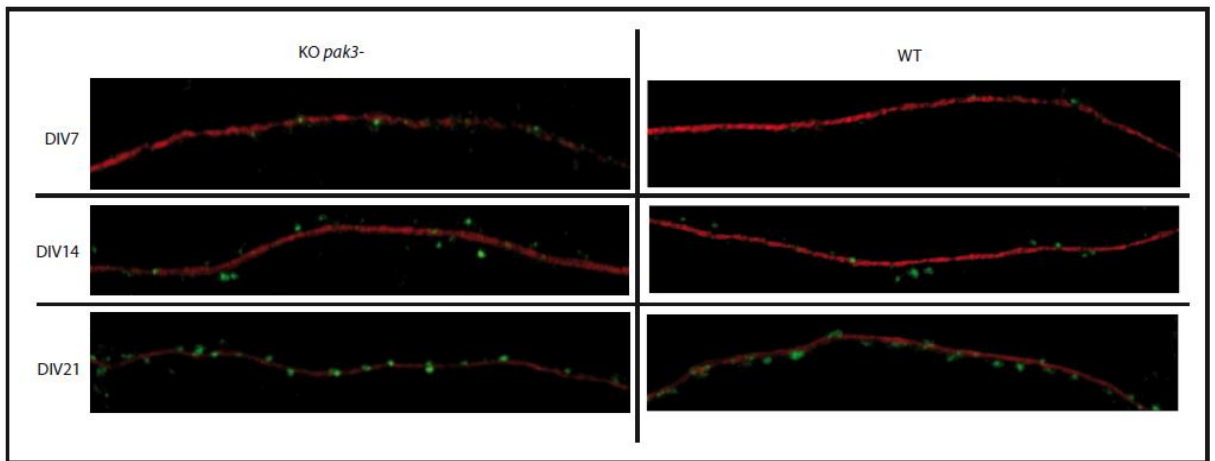
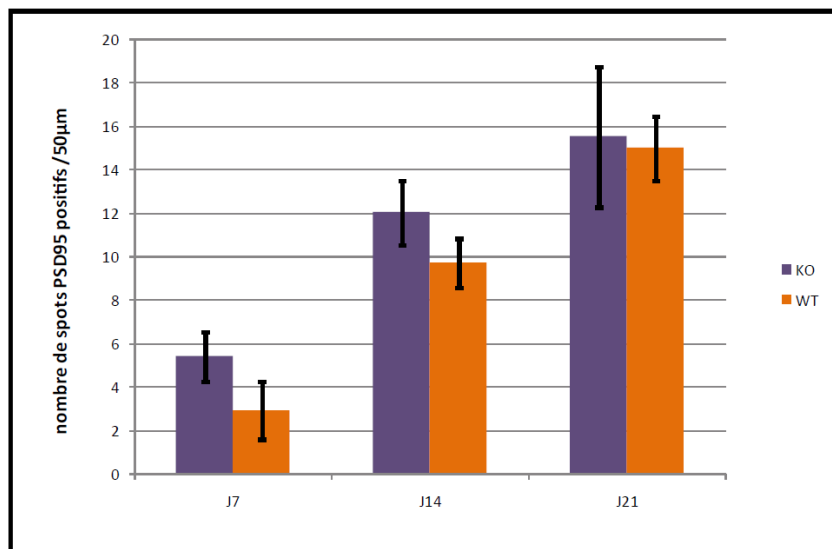


Figure 29. Segments de 50 µm de dendrites issus de neurones d'hippocampe mutés (KO *pak3*⁻ à gauche) ou sauvages (WT, à droite) à différents stades du développement.

Les neurones issus d'embryons E17 WT et KO différenciés sur lamelles, sont fixés aux jours suivants : J7, J14, J21, Le double immuno-marquage MAP2-Alexa 556 (en rouge) et PSD-95-FITC (en vert) permet de compter les densités post-synaptiques sur une portion de dendrite.

Figure 30. Densité des puncta de PSD-95 sur des dendrites, au cours de la différenciation.

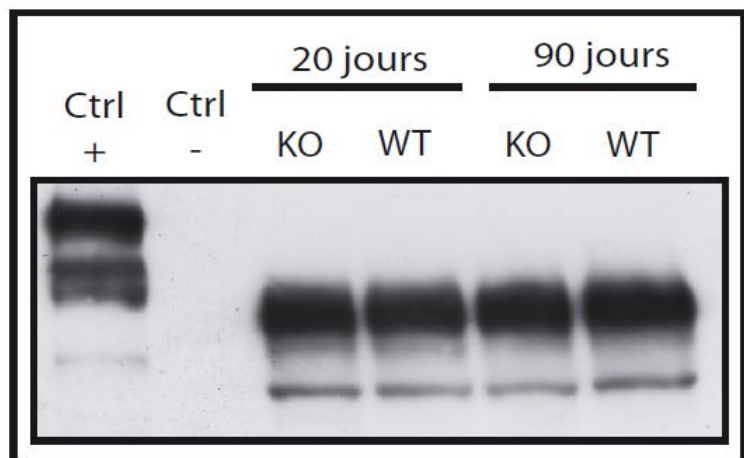
Graphique représentant la moyenne du comptage de 10 à 15 neurones par condition (KO : en violet, ou WT : en orange) au cours de la différenciation des neurones.



Nous observons une augmentation du nombre de densités synaptiques au cours de la différenciation, aussi bien chez les KO que chez les WT (Figure 30), qui s'accompagne d'un accroissement de la taille des densités (Figure 29). Le dénombrement montre qu'il y a toujours un peu plus de densités chez les neurones KO comparés aux neurones WT ceci, d'autant plus que les neurones sont peu différenciés. Ce résultat n'est cependant pas statistiquement significatif. Par ailleurs, nous avons analysé l'expression de la protéine PSD-95 au cours de la différenciation, par western blot (Figure 31). En première analyse, nous n'observons pas de différence entre individus WT et KO. Nous envisageons de poursuivre cette analyse biochimique en réalisant des western blots à partir de lysats de cerveaux d'embryons E17 afin de quantifier cette expression.

Figure 31. Les souris invalidées pour le gène *pak3* ne présentent pas de différence dans l'expression de PSD-95 par rapport aux souris sauvages.

*Résultat du western blot réalisé avec un anticorps monoclonal anti-PSD-95 sur les cerveaux de souris sauvages (WT) ou invalidées pour le gène *pak3* (KO) âgés de 20 (P20) et 90 jours (A90). Le contrôle positif (ctrl +) correspond à un lysat de cellules COS7 transfectées avec le plasmide GFP-PSD95. Le contrôle négatif (ctrl -) est constitué par des cellules COS7 transfectées avec un plasmide eGFP. (Expérience réalisée une fois). 40 µg de protéines ont été déposés dans chaque puits.*



1.3. Synaptogenèse

L'expression d'une protéine PAK3 tronquée entraîne une diminution des courants AMPA (Boda et al., 2004) alors que l'analyse électrophysiologique des souris KO effectuée par Meng (Meng et al., 2005) n'a pas montré de dysfonctionnement dans les réponses médiées par les récepteurs AMPA ou NMDA, indiquant une possible compensation de l'absence de PAK3 durant le développement. Par ailleurs, mon équipe a récemment établi que PAK3 régulerait de façon négative la transmission synaptique via son interaction avec l'adaptateur protéique Nck2 (Thévenot et al., 2011). Or, Nck2 interagit avec les éphrines B et stabilise les récepteurs AMPA synaptiques via son interaction avec GRIP, une protéine d'ancrage des récepteurs AMPA. Ces données suggèrent que PAK3 pourrait réguler le recrutement synaptique des récepteurs AMPA et/ou modifier la stabilisation des synapses. Nous nous sommes donc intéressés à l'expression de la sous-unité GluR2 des récepteurs AMPA chez les souris invalidées pour le gène *pak3*.

Nous avons, dans un premier temps, analysé la quantité de récepteurs GluR2 présents dans les lysats de cerveaux de souris KO et WT, jeunes (P20) et adultes (A90) par western blot avec un anticorps spécifique du récepteur GluR2. Cette analyse ne montre pas de différence importante dans l'expression de cette sous-unité entre les KO et les WT. Nous constatons la diminution de l'expression de GluR2 chez les mâles de 90 jours comparés aux jeunes de 20 jours (Figure 32).

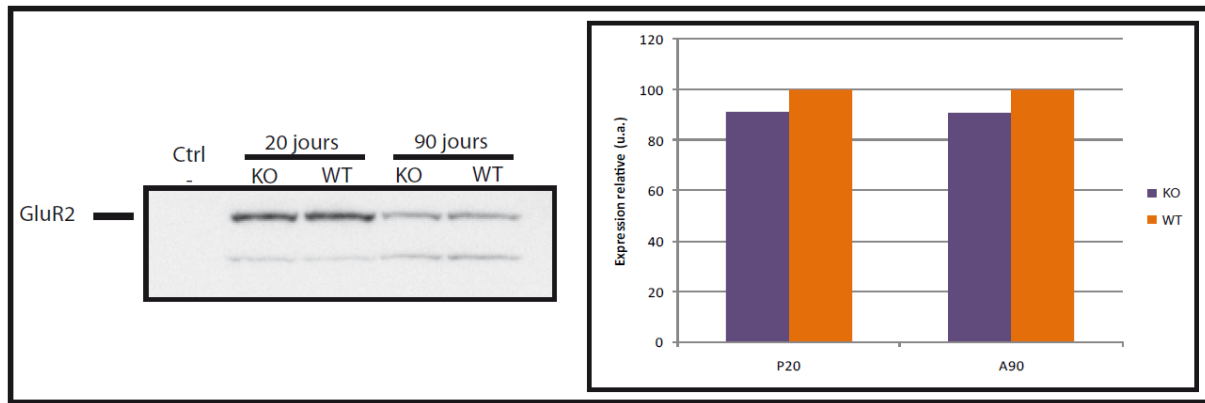


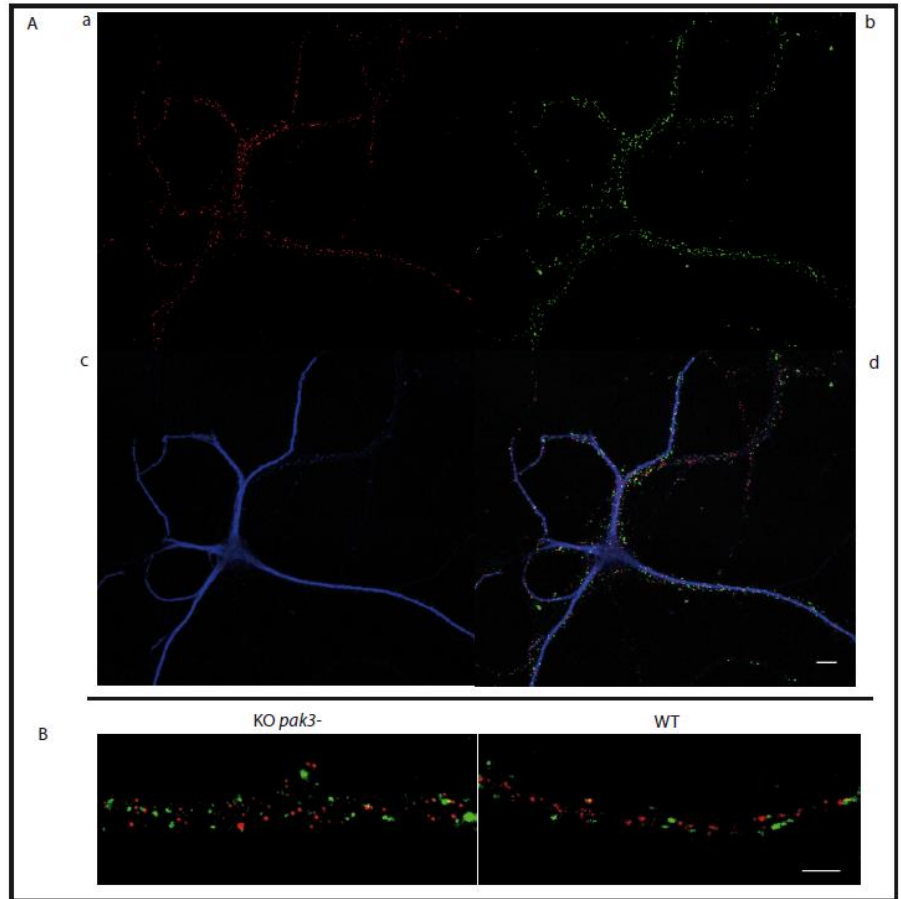
Figure 32. Les souris invalidées pour le gène pak3 ne présentent pas de différence dans l'expression de GluR2 par rapport aux souris sauvages.

A. Résultat du western blot réalisé avec l'anticorps monoclonal anti-GluR2 sur les cerveaux de souris sauvages (WT) ou invalidées pour le gène pak3 (KO) âgés de 20 (P20) et 90 jours (A90). Le contrôle négatif (ctrl -) est constitué par des cellules COS7 transfectées avec un plasmide eGFP. B. Expression relative de GluR2, exprimée en unité arbitraire (u.a.). L'intensité du signal de l'individu muté est rapportée à celle de l'individu sauvage au même âge.

Pour identifier les synapses fonctionnelles, nous avons développé et réalisé un double marquage immunologique GluR2 et V-GLUT1 sur des neurones d'hippocampe mis en culture et analysés à J14. Le marquage GluR2 est réalisé avec un anticorps spécifique de la partie extracellulaire de la sous-unité GluR2 du récepteur AMPA (Monoclonal 6P4 de Millipore) dont la particularité est de reconnaître le récepteur sur des cellules vivantes, non fixées ni perméabilisées. Le marquage V-GLUT1, effectué après fixation et perméabilisation, reconnaît le transporteur vésiculaire du glutamate spécifiquement accumulé au niveau des zones présynaptiques de synapses excitatrices. La juxtaposition d'un marquage présynaptique avec un marquage post-synaptique est un critère morphologique de l'existence d'une synapse fonctionnelle. Le marquage MAP2 permet de relier ces éléments aux dendrites. Les expériences d'immunofluorescence que nous avons menées nous ont permis de mettre au point le triple marquage des neurones d'hippocampe. Les premiers résultats obtenus sur les neurones KO suggèrent qu'il n'y a pas de défaut évident de recrutement de la sous-unité GluR2 au niveau des synapses (Figure 33).

Figure 33. Analyse des synapses par double marquage présynaptique/post-synaptique.

A. Neurone WT différencié à J14. a. Marquage des structures post-synaptiques avec l'anti-GluR2 extracellulaire (Alexa 568, Rouge), b. marquage des éléments présynaptiques par l'anticorps anti V-GLUT1 (FITC, vert), c. marquage du dendrite avec MAP2 (Alexa633-bleu), d. superposition. La barre d'échelle représente 10 μ m. B. Segment de dendrite doublement marqué GluR2 (rouge) et V-GLUT1 (Vert) de neurones à DIV 14 KO (à gauche) et WT (à droite). La barre d'échelle représente 5 μ m. Images acquises au microscope confocal.



2. Rôle de PAK3 dans la transmission synaptique via Nck2

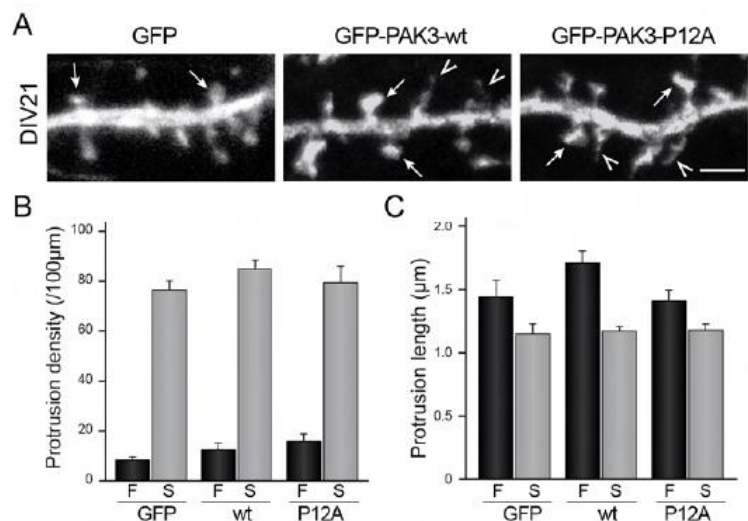
Comme décrit dans l'introduction, le premier domaine riche en proline de PAK3 interagit avec le domaine SH3 de Nck2. Les adaptateurs Nck jouent un rôle important dans la signalisation des kinases PAK et dans la signalisation neuronale. Jusqu'à très récemment, seul Nck1 était étudié et cet adaptateur interagit avec de nombreux substrats des récepteurs à activité tyrosine kinase ou des tyrosine kinases cytoplasmiques. Le second adaptateur Nck2, aussi dénommé Grb4, constitué de 3 domaines SH3 et 1 domaine SH2, est aussi exprimé dans le cerveau ; il transduit la signalisation reverse des ligands des Eph récepteurs, les Ephrines B (Cowan & Henkemeyer, 2001) et participe à la formation des épines dendritiques via son interaction avec GIT1 (Segura et al., 2007).

Pour comprendre le rôle des complexes Nck/PAK dans la signalisation neuronale, mon équipe a analysé ces interactions et a montré que PAK3 co-immunoprécipite principalement avec Nck2 dans le cerveau, de même que PAK3 lie Nck2 avec plus d'affinité que Nck1 *in vitro*. Alors que l'interaction entre PAK1 et Nck1 est régulée par l'activité de la kinase, PAK3 interagit avec les adaptateurs Nck indépendamment de son activité kinase. En effet, la sérine 20 du domaine riche en proline, (dont la phosphorylation régule l'interaction PAK/Nck1), n'est pas autophosphorylée ni phosphorylée par les kinases Akt, PKA et CamKII. Mon équipe a, de plus, analysé le rôle de cette interaction dans la physiologie neuronale. L'injection d'un peptide qui inhibe l'interaction entre PAK3 et Nck1/2 dans des neurones pyramidaux de la couche 5 de cortex visuel dans des tranches organotypiques de souris provoque une augmentation de 40% de la réponse évoquée, alors que l'injection d'un peptide identique mais avec une mutation ponctuelle qui n'a pas d'effet sur l'interaction, n'entraîne pas cette augmentation.

J'ai participé à la caractérisation du mutant ponctuel de PAK3 (mutation de la proline P12A de PAK3 impliquée dans l'interaction avec les domaines SH3 des adaptateurs Nck) qui n'interagit plus avec Nck2 mais interagit toujours avec Nck1. J'ai montré que l'expression de ce mutant dans les neurones d'hippocampe en culture ne modifie pas la densité d'épines dendritiques ni la différenciation morphologique (Figure 34).

Figure 34. PAK3 agit sur la spinogénèse via son interaction avec Nck2.

A. La mutation P12A n'affecte pas la maturation des épines dendritiques. Les neurones d'hippocampe ont été transfectés avec les constructions GFP comme contrôle ou GFP-PAK3-WT ou GFP-PAK3-P12A, 18 jours après leur mise en culture puis fixés à 21 jours. B et C. Analyse quantitative de la densité de protrusion ou de leur longueur. Aucune différence significative n'a été observée entre les trois constructions.



Nous avons également démontré que l'expression de la protéine PAK3 dans les neurones d'hippocampe induit une diminution de l'amplitude des courants excitateurs post-synaptiques spontanés (mEPSC) dépendants des récepteurs AMPA tandis que celle du mutant de PAK3 qui n'interagit pas avec Nck2 n'a pas d'effet sur ces courants. Ceci montre que PAK3 régule négativement la transmission synaptique via son interaction spécifique avec l'adaptateur Nck2. Nous proposons le modèle suivant (Figure 35) : PAK3 régulerait le niveau de Nck2 disponible pour l'interaction avec les éphrines B et la stabilisation des récepteurs AMPA. Le peptide inhibiteur de l'interaction libère Nck2 qui peut alors stabiliser les récepteurs du glutamate alors que la surexpression de PAK3 diminue la quantité de Nck2 disponible pour ces complexes avec les éphrines B.

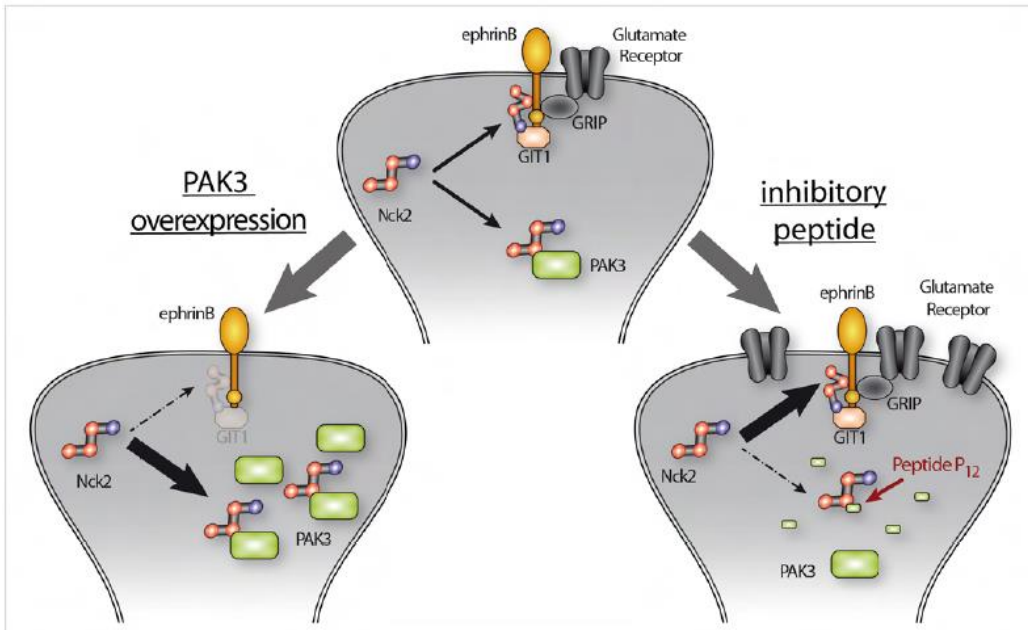


Figure 35. Modèle de régulation de la transmission synaptique par PAK3.

Nck2 régule la stabilisation des récepteurs au glutamate (au centre). La surexpression de PAK3 titre Nck2 et induit une diminution de la stabilisation des récepteurs au glutamate dépendante de Nck2 (à gauche). A l'inverse, le peptide inhibiteur P12 inhibe la formation des complexes, permettant la libération de Nck2 et la stabilisation des récepteurs au glutamate dépendante de Nck2 (à droite).

3. Mécanisme de régulation : régulation de PAK3 par hétérodimérisation

Comme décrit dans l'introduction, les kinases PAK peuvent former des dimères et ce mécanisme de dimérisation participe à la régulation de l'activation des kinases PAK. Mon équipe s'est posé la question de savoir si PAK3 peut former des dimères, si ces dimères permettent un mécanisme de trans-inhibition. Sachant que les kinases PAK1 et PAK3 sont co-exprimées dans les neurones, y-a-t-il possibilité que PAK3 et PAK1 forment des hétérodimères ? Enfin, les inserts codés par les exons alternatifs étant localisés au sein de la région impliquée dans la formation des dimères, les variants d'épissage de PAK3 ont-ils une activité kinase constitutive lorsqu'ils sont exprimés dans des fibroblastes parce qu'ils ne peuvent pas former d'homodimères ? Pour répondre à ces questions, mon équipe a analysé les dimères PAK *in vitro* par co-immunoprécipitation dans des cellules transfectées ainsi que par double hybride et, *in vivo* par des expériences de co-immunoprécipitation dans des extraits de cerveaux avec des séra spécifiques de chaque isoforme.

Les résultats que mon équipe a obtenus montrent que PAK3 forme des homodimères, tout comme PAK1. Toutefois, PAK3 forme plus d'hétérodimères avec PAK1 que d'homodimères avec elle-même. De manière étonnante, les variants d'épissages sont capables de former des homodimères (par exemple PAK3b/PAK3b), et aussi des dimères avec PAK3a. Ils forment encore plus préférentiellement des hétérodimères avec PAK1. Toutefois, PAK3a forme plus facilement des dimères que PAK3b ne le fait. Dans cette partie du travail, les cellules ont été transfectées avec des formes kinase-dead des kinases PAK auxquelles nous avons ajouté une étiquette HA ou Flag. J'ai, pour ma part, montré que les homodimères de PAK3a *in vitro* étaient effectivement dus à l'interaction entre les deux kinases et non pas à l'interaction entre les étiquettes HA et Flag (Figure 36).

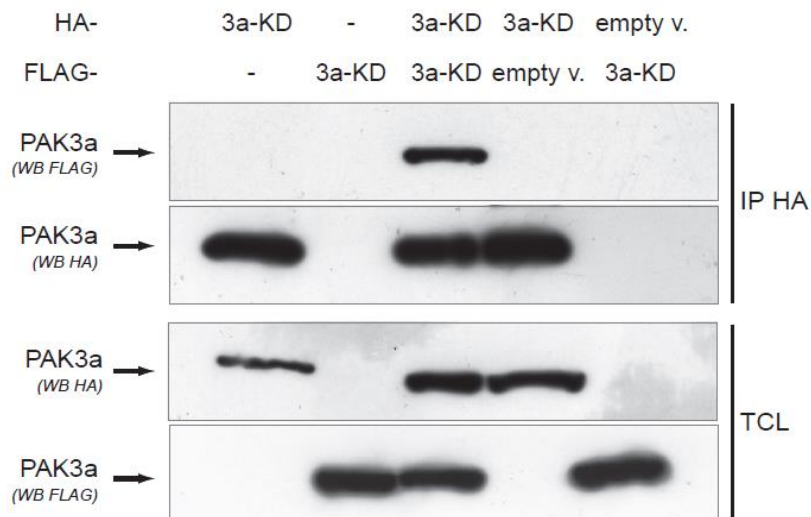


Figure 36. PAK3a forme des homodimères.

Les lysats de cellules HeLa transfectées avec des vecteurs HA-vide ou FLAG-vide (empty v.) ou avec des plasmides codants HA-PAK3a-KD, FLAG-PAK3a-KD, ou les deux, sont immunoprécipités HA (IP HA). Les lysats cellulaires totaux (TCL) sont contrôlés en utilisant les anticorps correspondants comme indiqué (3^{ème} et 4^{ème} lignes). Les protéines immunoprécipitées HA sont révélées par western blot anti-HA et les protéines PAK3 co-immunoprécipitées PAK3a sont révélées par un western blot anti-Flag. L'image présentée est représentative de trois expériences indépendantes.

L'ensemble des études *in vitro* portant sur la dimérisation des kinases PAK a été réalisé à partir de cellules transfectées avec des formes kinase-dead de ces kinases, formes moins toxiques pour les cellules. De plus, PAK1 forme plus facilement des homodimères lorsque des formes inactives de la kinase sont transfectées (Parrini et al., 2002). J'ai voulu comparer la co-immunoprécipitation entre les formes kinase-dead et les formes wild-type. Pour cela, j'ai transfecté des cellules avec des formes KD et WT de PAK1 et PAK3a, auxquelles nous avons ajouté des étiquettes HA ou Flag. J'ai ensuite co-immunoprécipité en utilisant un anticorps dirigé contre l'étiquette HA. Par western blot, j'ai vérifié que l'hétérodimérisation entre PAK1 et PAK3a est bien spécifique via l'interaction entre ces deux kinases et non entre leurs étiquettes respectives (les deux premières pistes). J'ai aussi montré que l'interaction entre PAK1 et PAK3a est maintenue lorsque des formes wild-type sont transfectées dans les cellules (piste 5). Il avait été montré pour PAK1 que, suite à la transphosphorylation d'un résidu du domaine régulateur par l'autre monomère actif, le complexe dimérique se dissocie. De ce fait, Lei et Parrini, dans leurs études sur l'homodimérisation, avaient utilisé des protéines dépourvues d'activité kinase (Lei et al., 2000 ; Parrini et al., 2002). De manière étonnante, nous avons pu mettre en évidence une relativement grande quantité de complexes formés avec les protéines sauvages suggérant que, pour PAK3, cette dimérisation n'est pas altérée par la phosphorylation des partenaires ou que le site régulateur impliqué n'est pas phosphorylé. J'ai de plus observé que PAK3a-WT co-immunoprécipite mieux que PAK3a-KD avec PAK1-KD (pistes 3 et 4) (Figure 37). Ces résultats suggèrent que PAK3a-WT forme plus facilement des hétérodimères que la protéine inactive, contrairement à PAK1. Ainsi, la régulation de la stabilité des dimères par autophosphorylation pourrait varier entre les différentes kinases PAK.

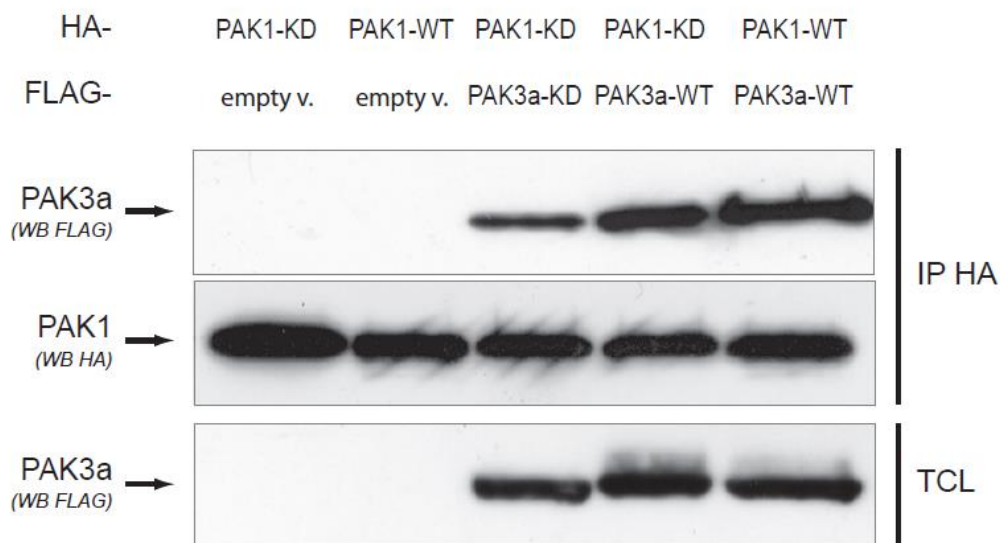


Figure 37. Les formes WT des kinases PAK interagissent entre elles.

Les cellules ont été transfectées avec HA-PAK1-KD et FLAG-PAK3a-KD (3^{ème} piste), HA-PAK1-KD, et FLAG-PAK3a-WT (4^{ème} piste), et HA-PAK1-WT et FLAG-PAK3a-WT (5^{ème} piste). Les protéines HA ont été immunoprécipitées puis les protéines Flag co-immunoprécipitées sont révélées par western blot anti-FLAG. La co-transfection de PAK1 avec un vecteur vide (empty v.) constitue le contrôle (2^{èmes} piste). L'image présentée est représentative de trois expériences indépendantes.

Nous avons montré par RT-PCR sur cellule unique, en aspirant le cytoplasme de neurones isolés (collaboration avec M. Amar et Philippe Fossier, NBCM) puis en réalisant des PCR multiples, que *pak1* et *pak3* sont co-exprimés dans tous les neurones. Dans certains neurones, nous avons montré la co-expression de deux variants différents de PAK3. Avec des anticorps spécifiques, nous avons montré que PAK1 et PAK3 co-localisent au sein de certaines structures comme les adhésions focales lorsqu'elles sont co-exprimées dans les fibroblastes et qu'elles sont colocalisées dans les épines dendritiques des neurones d'hippocampe différenciés en culture. De plus, à partir d'extraits de cerveau adulte, nous avons montré que PAK3 et PAK1 co-immunoprécipitent et co-purifient avec les densités post-synaptiques purifiées de cerveaux de souris. Ces résultats démontrent qu'*in vivo*, PAK1 et PAK3 forment des hétérodimères.

Enfin, nous avons montré, en utilisant des combinaisons de formes kinase-dead avec des formes wt, co-immunoprécipitées et activées par la GTPase constitutivement active GST-Cdc42-V12, que le complexe hétérodimérique de PAK3 avec PAK1 permet l'inhibition de PAK3a (sans insert) par PAK1 mais pas celle des variants d'épissage. Ce travail démontre que l'hétérodimérisation permet de créer un réseau de signalisation des kinases et qu'il existe une hiérarchie dans les formations des complexes de kinases. Nous avons, de plus, montré que les mutations responsables de retard mental affectent différemment l'hétérodimérisation avec PAK1, expliquant peut-être pourquoi la mutation R67C est responsable de l'un des plus sévères déficits. En effet, la protéine PAK3-R67C continue à interagir avec PAK1, conduisant vraisemblablement à un complexe affecté dans sa capacité à être activé, puisque nous avons montré que la mutation R67C diminue l'activation par Cdc42. De ce fait, cette mutation affecterait aussi la signalisation de PAK1, connue pour être également impliquée dans la plasticité synaptique (Asrar et al., 2008).

En conclusion, nos données suggèrent fortement que la formation d'hétérodimères PAK1/PAK3 relie les signalisations neuronales de PAK1 et PAK3, dans les processus physiologiques mais aussi dans la physiopathologie. Ce travail a été publié en 2012 dans J. Biol. Chem. (Combeau et al., 2012).

4. Description phénotypique de la souris invalidée pour le gène *pak3*

Chez les souris KO, les premières analyses de Meng montrent que le cerveau ne présente pas d'anomalie macroscopique et microscopique. Cependant, l'analyse plus fine de ces mêmes souris réalisée par Séverine Farley et Cyrille Vaillend au CNRS (Farley et al., *en préparation*) montre une microcéphalie d'environ 8% alors que le poids des animaux est identique, comparé aux souris sauvages. Il existe, par ailleurs, des différences significatives dans les volumes de certaines structures comme l'hippocampe ventral ou les ventricules latéraux. De plus, les souris KO adultes présentent une diminution de 19.7% de la densité de synapses excitatrices, qui s'accompagne d'anomalies structurales des densités post-synaptiques (plus petites chez les KO). Ces données sont, bien évidemment, à mettre en regard des descriptions cliniques des patients avec des mutations du gène *pak3*, lesquels présentent dans un certain nombre de cas des microcéphalies de légères à sévères (Voir Tableau 1).

L'analyse du phénotype comportemental montre aussi des différences ténues mais significatives. Ainsi, le test de suspension par la queue semble indiquer une augmentation du comportement de résignation, suggérant un état dépressif, tandis que le test de nage forcée indique le contraire. Mais ce résultat peut être, en partie, biaisé par l'expression de différentes stratégies motrices dans les deux génotypes. La mesure de l'anxiété dans un champ ouvert (open field) montre que les souris KO présentent une réduction de celle-ci. Par contre, aucune différence entre les deux génotypes n'est observée dans le labyrinthe suspendu, ni dans le test des boîtes noires, suggérant une altération des réponses émotionnelles dépendantes du contexte expérimental. De plus, l'analyse des latences à consommer de la nourriture dans un environnement nouveau, dans un test d'hypophagie induite par la nouveauté, confirme que cette apparente diminution de l'anxiété pourrait aussi s'interpréter comme une diminution de l'inhibition comportementale. Au niveau cognitif, les souris KO ont des performances comparables aux WT lors des périodes d'habituation et de conditionnement. Cependant, elles présentent un déficit de mémoire de rétention à long terme (24h), mais pas à court terme (1h), suggérant un déficit de consolidation mnésique impliquant l'amygdale et/ou l'hippocampe. Enfin, dans les tests d'interaction sociale, les souris KO montrent une diminution de l'intérêt pour l'interaction sociale et ont tendance à éviter les nouvelles interactions sociales au profit de congénères déjà identifiés. L'ensemble de ces résultats a conduit nos collaborateurs à explorer la physiologie du stress et de l'axe hypothalamo-hypophysaire chez ces animaux. Il est intéressant de faire le lien avec la surexpression de PAK3 dans les tumeurs à ACTH suggérant une relation entre hormones glucocorticoïdes et PAK3. Les phénotypes comportementaux et cognitifs des souris KO pourraient être mis en rapport avec un dysfonctionnement de cette physiologie.

Il est connu que les apprentissages induisent une augmentation de l'expression du BDNF, une neurotrophine qui joue un rôle important dans la plasticité synaptique. C'est pourquoi nous avons analysé par PCR quantitative l'expression des gènes PAK3 et du BDNF suite à un apprentissage lors des expériences de conditionnement de peur. Effectivement, cette augmentation est perceptible chez les souris WT et est augmentée, mais de manière non significative chez les souris KO (Figure 38).

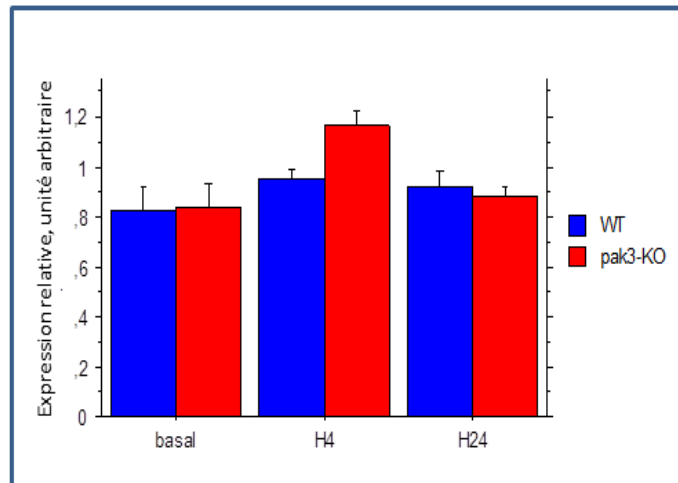


Figure 38. Expression du BDNF chez les souris KO et WT en conditions basales, ou bien 4 h et 24 h après la séance d’acquisition d’une peur conditionnée au contexte.

Nous avons aussi cherché à caractériser, de manière relative, l’importance des synapses excitatrices et des synapses inhibitrices par une mesure des niveaux d’expression de deux gènes spécifiques de ces deux types de synapses, à savoir VGlut, un transporteur du glutamate pour les synapses excitatrices, et VIAAT, transporteur vésiculaire des acides aminés inhibiteurs, qui signe les synapses inhibitrices. L’analyse de l’expression de ces deux marqueurs est identique dans les deux génotypes suggérant qu’il n’y aurait pas d’anomalie dans le nombre de synapses excitatrices et inhibitrices centrales.

L’ensemble de ce travail démontre, une fois de plus, la difficulté de relier gène de retard mental, anomalie morphologique et fonctionnelle du cerveau et des neurones et défauts cognitifs et/ou de comportement. Il est intéressant de remarquer que ce type d’analyses poussées permet de déceler des composantes phénotypiques qui sont difficilement quantifiables chez les patients et qui étaient passées inaperçues dans l’étude initiale des souris KO par le groupe de Meng et ses collaborateurs. Ainsi, ce type de caractérisation fine du phénotype des modèles murins devrait permettre de faire ressortir les caractéristiques communes à un certain nombre de déficiences intellectuelles et d’identifier les spécificités propres à chaque modèle. Cette étape est cruciale afin de poser les jalons pour tester des approches thérapeutiques grâce à la l’identification et à la définition des « read-out » ou critères biochimiques, morphologiques ou phénotypiques de ces modèles animaux.

A travers ces quatre études, il ressort que les études biochimiques et les études comportementales apportent des éclairages totalement différents mais complémentaires sur le rôle d’un gène de déficience intellectuelle dans les mécanismes de la plasticité neuronale. Un des objectifs à poursuivre pourrait être d’atteindre un niveau de compréhension qui nous permette de corréliser les caractéristiques biochimiques à celles de la plasticité. Ceci nécessite le développement de modèles animaux permettant une étude intégrée des voies de signalisation. En raison de la complexité des anomalies comportementales et cognitives observées chez les patients, l’animal modèle choisi reste la souris.

II. PAK3 et neurogenèse adulte

Le projet majeur de ma thèse a porté sur le rôle de la kinase PAK3 dans la régulation de la prolifération des précurseurs neuraux au cours de la neurogenèse adulte dans deux modèles murins de déficience intellectuelle. La justification a été décrite au sein de l'introduction. Brièvement, il a été montré, qu'au cours du développement embryonnaire, PAK3 joue un rôle dans les étapes de division terminale et de différenciation terminale dans le cerveau et le pancréas (Souopgui et al., 2002 ; Piccand et al., 2013). Ceci nous a conduit à envisager l'hypothèse que PAK3 puisse jouer un rôle dans la neurogenèse adulte dont les défauts pourraient sous-tendre les déficits cognitifs chez les patients.

1. Expression de PAK3 dans les cellules souches/progéniteurs.

Jusqu'à maintenant, il est admis que PAK3 s'exprime uniquement dans les cellules post-mitotiques (Allen et al., 1998 ; Kreis et al., 2007). J'ai alors caractérisé l'expression de PAK3 au cours de la neurogenèse adulte.

Dans un premier temps, j'ai tenté de révéler l'expression de PAK3 par immunohistochimie sur coupe de cerveau adulte. Je proposais de corrélérer l'expression de PAK3 à celle de certains marqueurs spécifiques des différents stades de différenciation comme Sox2 et Nestine pour les NSPC, DCX pour les neuroblastes et NeuN pour les neurones matures identifier l'étape dans laquelle PAK3 s'exprime. De plus, comme une partie des neuroblastes présente une activité mitotique, l'analyse de la co-expression de PAK3 avec un marqueur des cellules cyclantes (par exemple Ki67 ou phospho-histone H3) aurait permis de spécifier l'expression de PAK3 au cours de la neurogenèse adulte. J'ai testé tous les anticorps disponibles sur le marché ou produits par mon équipe, sous de nombreuses conditions de marquage (avec ou sans démasquage de l'antigène, rôle de la température dans la liaison antigène-anticorps, entre autres) mais aucun anticorps utilisé ni les différentes conditions de marquage effectuées ne m'ont permis d'aboutir à un marquage spécifique de PAK3, conditions testées lors de l'utilisation de tranches issues d'animaux KO.

Pour caractériser l'expression de PAK3, j'ai alors opté pour des approches biochimiques, moléculaires et cellulaires *ex vivo*. Pour cela, les cellules souches/progéniteurs (NSPCs) issues de la SVZ et du DG d'individus WT (sur fond C57/Bl6) ont été cultivées en monocouche sur support traité avec la poly-lysine et la laminine, et en présence des facteurs de croissance (EGF et bFGF), d'après le protocole décrit par l'équipe de Kempermann (Babu et al., 2011). Les NSPC sont issues de nouveau-nés (P4) et de mâles adultes. Après amplification de ces NSPC, la culture est maintenue en condition proliférative pendant 48h puis une partie de cette culture est arrêtée et analysée (temps 0h). L'autre partie est induite à différencier par retrait des facteurs de croissance. La différenciation est arrêtée après 24h, 48h ou 120h de culture. A chacun de ces temps, les ARN et les protéines ont été purifiés. Afin de montrer que PAK3 est bien exprimée au cours la différenciation, j'ai aussi analysé l'expression de certains marqueurs clés comme Nestine (marqueur des NSPC) ou DCX (marqueur des neuroblastes). Après immunoprécipitation de PAK3 dans les différents lysats protéiques, l'analyse par western blot, de l'expression de PAK3, corrélée à celle de DCX, a apporté un résultat novateur. En effet, de manière extrêmement intéressante, je montre que les NSPC cultivées en présence de facteurs de croissance n'expriment pas PAK3 alors que le retrait des facteurs de croissance induit rapidement une très forte augmentation de son expression (dès 24 heures). Cette augmentation est

concomitante à celle de l'expression de DCX au cours de la différenciation. L'expression de PAK3 est maximale à 48h après la mise en différenciation, temps au cours duquel l'expression de DCX est aussi fortement augmentée (Figure 39). Cette dernière continue toutefois à augmenter après 48h ou 120h après le retrait des facteurs. Ceci a été observé avec les trois types de cultures réalisés, à savoir les cellules souches/progéniteurs issus des jeunes animaux âgés de 4 jours, isolées à partir des deux zones neurogéniques et de la SVZ d'animaux adultes.

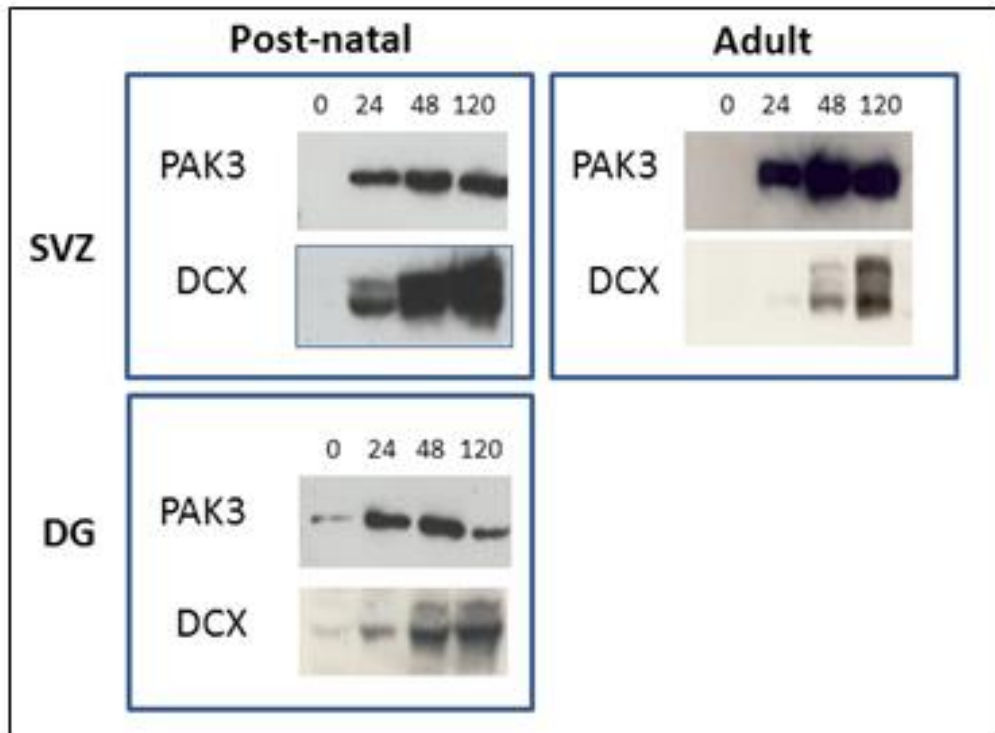


Figure 39. Le retrait des facteurs de croissance induit une très forte expression de PAK3 dans les cultures de cellules souches neurales issues des 2 niches SVZ et SGZ, dans les souriceaux et chez l'adulte.

Les cellules souches/progéniteurs ont été purifiées, amplifiées en cultures monocouches en présence de facteurs de croissance, avant d'être privées de facteurs de croissance au temps t=0. Les cellules sont lysées au temps t=0, et après 24, 48 et 120 h après le retrait des facteurs et la protéine PAK3 est immunoprécipitée avant d'être révélée par western blot. Dcx est directement analysée par western blot dans les lysats cellulaires normalisés par analyse de l'expression de l'actine.

J'ai ensuite analysé l'expression de *pak3* ainsi que celles des marqueurs de cellules souches, Nestine et des progéniteurs, DCX par PCR quantitative. Nous observons que l'expression génique de *pak3* augmente respectivement d'un facteur 20 et 13 entre 0 h et 24h dans les cellules issues de la SVZ et du DG de nouveau-nés. Dans ces deux modèles cellulaires, cette augmentation importante de l'expression de *pak3* est corrélée à une diminution de l'expression de Nestine (d'un facteur 4 pour la SVZ, et 2,8 pour le DG) et à une très nette augmentation de l'expression de DCX (d'un facteur 56 pour la SVZ et 14,5 pour le DG). Dans les cellules issues de la SVZ adulte, l'expression de *pak3* augmente d'un facteur 5 de façon concomitante à la diminution de l'expression de Nestine (d'un facteur 4) et à l'augmentation de celle de DCX (d'un facteur 14,5) (Figure 40). Les valeurs sont rapportées à l'expression du gène d'intérêt dans le cerveau de nouveau-né (P4), pris comme référence pour tous les gènes et les échantillons.

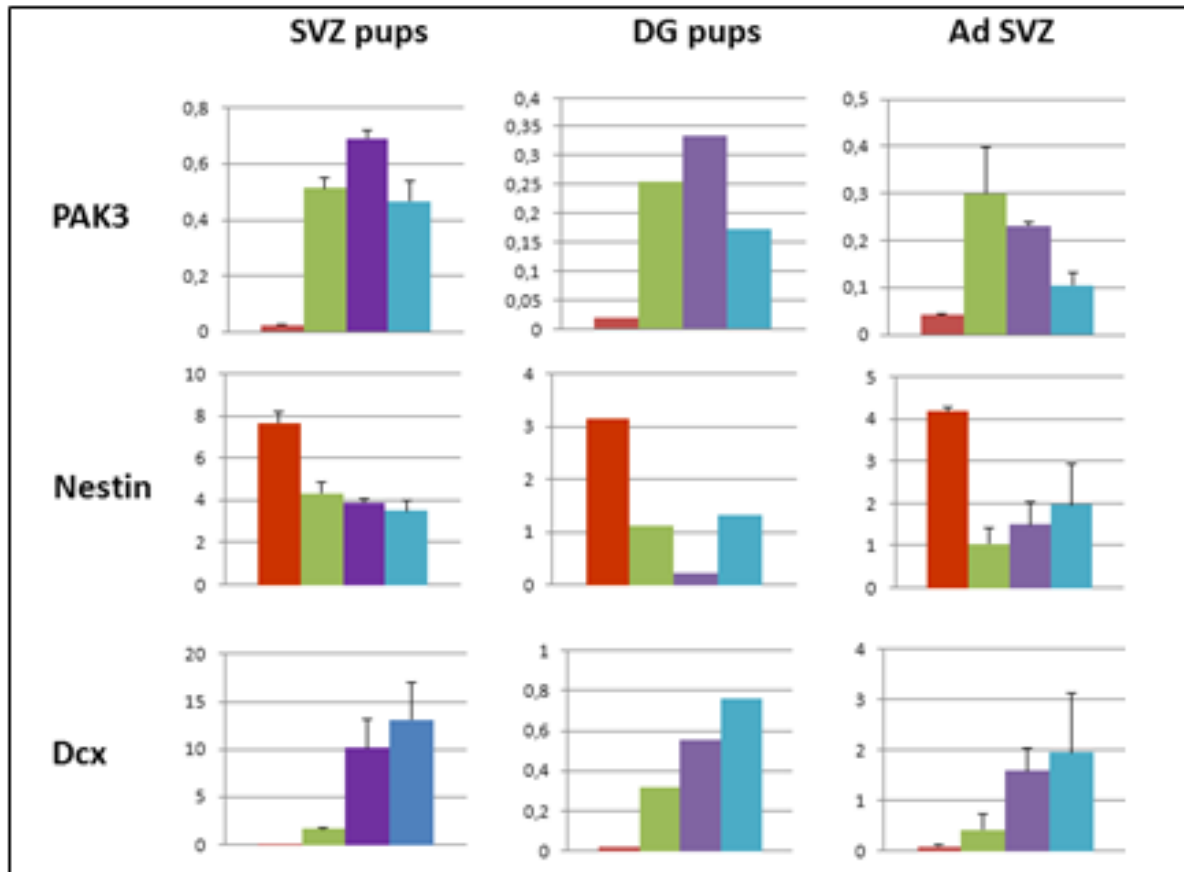


Figure 40. Analyse par PCR quantitative de l'expression de PAK3, de Nestine et de Dcx dans les cultures de cellules souches/progéniteurs issues des 2 zones neurogéniques de nouveau-nés ou d'adultes suite au retrait des facteurs de croissance.

Les cellules ont été cultivées comme précédemment décrit, les ARN ont été purifiés, quantifiés et vérifiés avant d'être rétro-transcrits. Les ADNc ont été amplifiés avec les couples d'amorces validés et des couples de gènes de référence (Voir Matériels et méthodes). Les valeurs sont exprimées relativement au niveau d'expression de chaque gène dans le cerveau de souris P4 de lignée C57Bl6. Rouge, temps 0h ; vert : temps 24h ; violet : temps 48h ; bleu : temps 120h (n=2 pour les SVZ et 1 pour le DG).

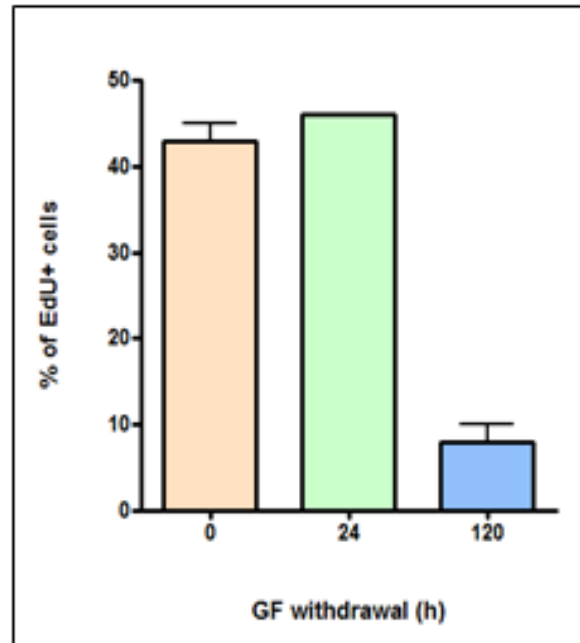
Nous avons ensuite regardé la cinétique de sortie de prolifération suite au retrait des facteurs de croissance. Pour cela, un analogue de la thymidine (l'EdU) est ajouté 4 heures avant l'arrêt de la culture par fixation des cellules. L'EdU s'incorpore lors de la réplication de l'ADN au cours de la phase S. Le décompte des cellules EdU-positives reflète la proportion de cellules en phase S au moment de l'arrêt de la culture. Ce marqueur permet une meilleure description des cinétiques courtes puisqu'il ne recense que les cellules en phase S, dont la durée correspond à la moitié du temps d'un cycle total (Bragado Alonso et al., 2014). Au temps 0 h, c'est-à-dire en présence des facteurs de croissance et 24 h après la mise en différenciation, environ 45% des cellules sont EdU-positives tandis que 120 h après le retrait des facteurs mitogènes, seuls 9% des cellules sont encore cyclantes (

Figure 41). Cette expérience a, pour le moment, été réalisée avec des cellules issues de la SVZ d'animaux adultes (mais une seule fois). Cette analyse au niveau cellulaire, combinée à celles

obtenues par western blot et PCR quantitative, montrent que l'expression de PAK3 est induite dès 24h après retrait des facteurs de croissance alors même que les cellules sont toujours en prolifération (voir Figure 39). De plus, une analyse morphologique montre que les NSPCs à t=0h présentent une morphologie de cellules souches/progéniteurs, et que le retrait des facteurs de croissance entraîne le développement de prolongements associés à la différenciation neuronale.

Figure 41. Les cellules souches/progéniteurs cessent de se diviser plus de 24 h après le retrait des facteurs de croissance.

Les cellules de la SVZ adultes de souris C57Bl6 ont été cultivées comme précédemment décrit, puis ensemencées sur des lamelles recouvertes de laminine. Les cellules sont incubées 4h avant fixation avec de l'EdU, fixées et l'EdU est révélé par réaction chimique (Click-it). Les divisions cellulaires sont analysées au temps t=0, 24 h et 120 h après le retrait des facteurs de croissance. Le pourcentage de cellules EdU+ est calculé par rapport au nombre de noyaux DAPI.



L'ensemble de ces résultats montre que PAK3 est fortement exprimée suite au retrait des facteurs de croissance dans les cellules souches/progéniteurs au cours de la neurogenèse adulte, de façon concomitante à la diminution de l'expression du marqueur de cellules souches (Nestine) et à l'augmentation de l'expression du marqueur DCX, spécifiquement exprimé dans le lignage neuronal. De manière surprenante et en contradiction avec les connaissances acquises jusqu'à présent, l'expression de PAK3 augmente très fortement juste avant l'arrêt de la prolifération. PAK3 serait donc exprimée dans les cellules cyclantes, et non pas uniquement dans les cellules post-mitotiques. Nos résultats montrant que l'expression de PAK3 précède la diminution de la prolifération suggèrent fortement que PAK3 pourrait contrôler la sortie du cycle cellulaire.

Trois remarques découlent aussi de ces observations. D'une part, vu le ratio entre la durée de la phase S et celle du cycle total, décrits par Bragado Alonso et collègues (2014), nous pouvons déduire qu'environ 90 % des cellules même issues d'animaux adultes prolifèrent en présence d'EGF et de FGF. La deuxième remarque est que le retrait des facteurs de croissance induit une chute rapide de la prolifération, mais notre cinétique se devra d'être plus précise pour comprendre ce qui passe entre 24 h et 120 h. Enfin, 5 jours après retrait des facteurs, nous observons encore environ 15 à 20% des cellules en mitose, ce qui est en accord avec les travaux de Costa et al., 2011, montrant que certaines cellules prélevées directement de la SVZ peuvent effectuer 5 divisions en absence de facteur de croissance.

2. Rôle de PAK3 dans la biologie des cellules souches

Les kinases PAK jouent de nombreux rôles dans l'ensemble des mécanismes cellulaires, mais très peu de données portent sur leur implication dans la biologie des cellules souches et des progéniteurs. Comme énoncé dans l'introduction, les cellules souches et les progéniteurs neuraux possèdent trois caractéristiques particulières. Par division asymétrique, ces cellules sont capables de donner une cellule identique à elle-même et une cellule plus différenciée; il s'agit de la capacité d'autorenouvellement. Ces NSPC sont aussi multipotentes.

Nous avons montré que PAK3 n'est pas exprimée dans les cellules souches prolifératives mais que son expression est induite par le retrait des facteurs de croissance alors que les cellules sont encore cyclantes. Nous nous sommes donc intéressés aux rôles éventuels de PAK3 dans la régulation des différentes propriétés cardinales des cellules souches/progéniteurs.

Cette partie de mes travaux a été réalisée en comparant la souris WT à la souris KO, créée par l'équipe de Z. Jia en 2005 (Meng et al., 2005). Les souris KO sont invalidées pour le gène *pak3* suite à l'insertion d'un codon stop suivi d'une cassette néomycine dans l'exon 6, ce qui entraîne la perte totale d'expression de PAK3 chez les souris KO. Cette lignée, les contrôles que j'ai effectués pour valider cette inactivation, et les méthodes pour obtenir les petits WT et mutés sont décrits dans la partie « matériels et méthodes ».

2.1. Analyse de la formation des neurosphères dans le modèle des souris KO

Pour comprendre le rôle de PAK3 dans la biologie des cellules souches, j'ai tout d'abord réalisé le test des neurosphères (Pastrana et al., 2011). Pour cela, après dissociation, les NSPC de SVZ et de DG issus de nouveau-nés (P2-P4) WT et KO ont été cultivés en suspension en présence des facteurs de croissance EGF et bFGF sans sérum pendant 7 jours. Dans ces conditions, les cellules souches et les progéniteurs prolifèrent de façon clonale et forment ainsi des neurosphères primaires, que nous avons dénombrées. Deux protocoles de dissociation, l'un mécanique, l'autre enzymatique, ont été utilisés pour dissocier les cellules des zones neurogéniques dissociées. Pour la SVZ, ces deux techniques donnaient les mêmes résultats de fréquence de formation des neurosphères alors que pour le DG, la seconde méthode enzymatique permet d'obtenir une plus haute fréquence. Seuls les résultats obtenus pour le DG avec cette technique sont présentés ici. Les cellules sontensemencées à même densité pour les deux génotypes, et je n'ai pris en compte que les sphères formées d'au moins 10 cellules. La fréquence de formation de neurosphères est calculée en rapportant le nombre de neurosphères ainsi formées au nombre de cellulesensemencées. Nous observons, 7 jours aprèsensemencement, que la fréquence de neurosphères primaires formées est significativement plus importante à partir des NSPC de SVZ et de DG de souris KO, comparée au WT (SVZ, fréquence de neurosphères primaires formées à partir des cellules WT : $9,50.10^{-3} \pm 1,25.10^{-3}$ versus $1,46.10^{-2} \pm 1,76.10^{-3}$ à partir du KO, n=13, one-way ANOVA *** p<0,001 ; DG : $2,70.10^{-2} \pm 4,24.10^{-3}$ à partir du WT versus $3,88.10^{-2} \pm 5,70.10^{-3}$ à partir du KO, n=10, one-way ANOVA * p=0,011) (Figure 42).

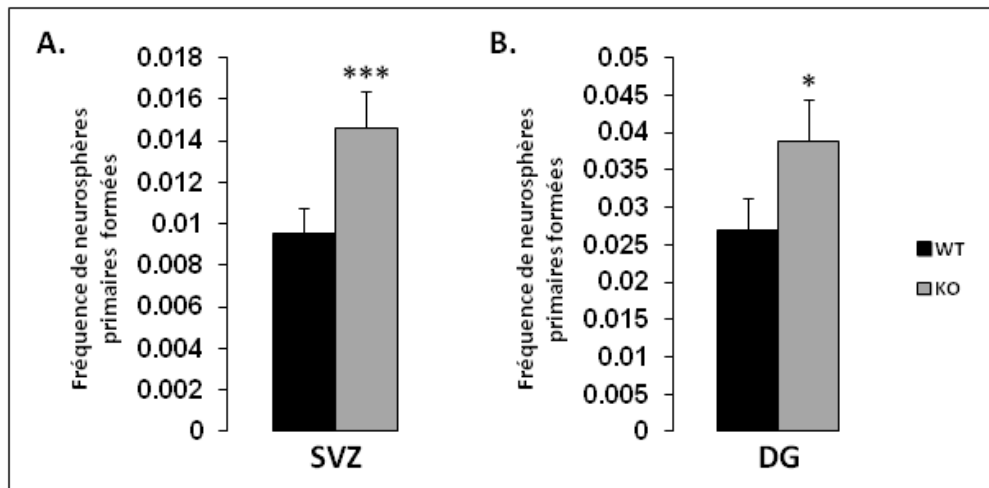


Figure 42. La fréquence de neurosphères primaires formées à partir des cellules souches/progéniteurs issues de la SVZ et du DG d'individus invalidés pour le gène *pak3* augmente, en comparaison avec le WT.

Les cellules de SVZ et DG d'animaux nouveau-nés des deux génotypes sont mis en cultures à une densité cellulaire précise en suspension dans un milieu sans sérum et en présence des facteurs de croissance EFG et bFGF. Après 6 à 10 jours suivant les zones, le nombre de neurosphères de plus de 10 cellules est compté.

Au cours d'observations rapides, les neurosphères primaires de SVZ des souris KO nous ont paru de plus grande taille que celles des individus WT, ce qui m'a conduit à mesurer leur diamètre. Je montre qu'à 6 jours de culture, la proportion de neurosphères de petite taille est plus importante chez le WT que chez le KO (Figure 43).

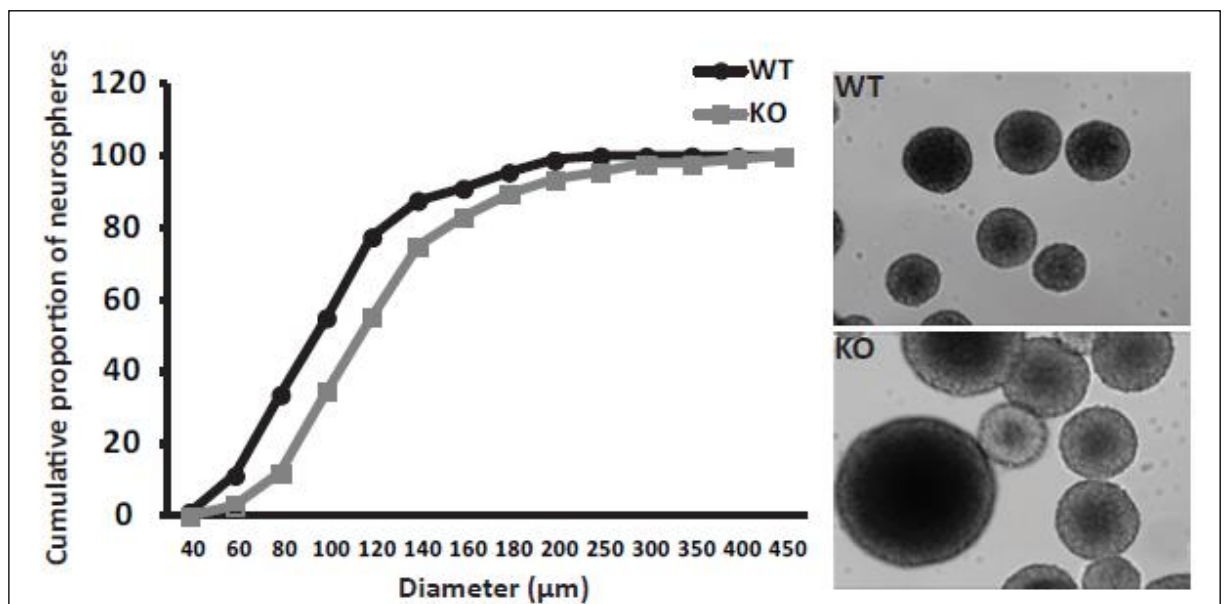


Figure 43. Tailles des neurosphères primaires issues des SVZ de nouveau-nés WT et KO.

Les neurosphères précédentes sont prises en photo et les diamètres mesurés à l'aide d'un programme d'ImageJ.

Ainsi, nos résultats montrent que l'inactivation du gène *pak3* entraîne une augmentation de la fréquence de formation des neurosphères ainsi qu'une augmentation de leur taille. De plus, PAK3 est exprimée dans les cellules suite au retrait des facteurs de croissance.

Plusieurs hypothèses permettent d'expliquer ces observations.

La première est qu'il y a peut-être, dans les tissus disséqués des niches neurogéniques, un plus grand nombre de cellules souches et/ou progéniteurs. Certains auteurs proposent qu'il soit possible de distinguer ces deux populations d'après la taille des neurosphères formées, les cellules souches générant de plus petites neurosphères que les progéniteurs (Azari et al., 2011). Le gène *pak3* pourrait influencer la taille du réservoir de cellules souches. Cette hypothèse sera plus longuement présentée dans la section discussion. Toutefois, n'ayant pas observé d'expression de PAK3 dans les cellules souches/progéniteurs cultivés en présence de facteurs de croissance, nous ne favorisons pas cette hypothèse.

Une seconde hypothèse est que l'absence de PAK3 affecte les propriétés cardinales des cellules souches, à savoir la capacité à s'auto-renouveler et la multipotence. D'une part, l'inactivation du gène *pak3* pourrait affecter la division asymétrique des cellules souches et des progéniteurs. Ainsi, les cellules KO-*pak3* effectuent majoritairement des divisions symétriques, produisant ainsi deux cellules identiques qui continuent de proliférer. D'autre part, il a été montré, chez le xénope, que PAK3 favorise la différenciation neuronale au détriment de la différenciation gliale (Souopgui et al., 2002). Ainsi, il est possible que l'inactivation de *pak3* affecte la multipotence des cellules souches/progéniteurs. Les cellules KO-*pak3* s'orienteraient préférentiellement vers un phénotype glial aux capacités prolifératives plus élevées que celles des cellules neuronales. Cette hypothèse sera analysée *ex vivo* et présentée ci-dessous.

La troisième hypothèse serait que les cellules issues des animaux KO prolifèrent plus, en effectuant davantage de divisions, donnant ainsi plus de sphères qui dépassent les dix cellules et des sphères plus volumineuses. Cette hypothèse sera présentée ci-dessous.

La quatrième hypothèse concerne un rôle de PAK3 dans la régulation de l'apoptose. En effet il a été montré que PAK1 protège de la mort cellulaire en activant une voie ERK/Bad (Ong et al., 2011 ; Wong et al., 2013). Cette hypothèse sera invalidée par des tests *in vivo* (Cf partie Résultats III.3.4.4).

La cinquième hypothèse serait que les cellules des deux génotypes répondent différemment aux facteurs de croissance. D'une part, ces facteurs activent artificiellement les cellules souches et les forcent à proliférer. D'autre part, les kinases PAK sont activées par ces facteurs. Nous avons fait varier la concentration des facteurs EGF et FGF, sans voir de différence entre les sphères WT et les KO, ce qui nous a conduit à abandonner cette hypothèse.

Enfin, deux études distinctes ont montré que PAK3 contrôle la sortie du cycle cellulaire dans deux systèmes biologique différents (Cf Introduction) (Souopgui et al., 2002 ; Piccand et al., 2013). Ceci nous permet de proposer que PAK3 pourrait aussi réguler la sortie du cycle cellulaire des progéniteurs neuraux. Cette hypothèse a des conséquences à deux niveaux dans les expériences de neurosphères. D'une part, si une cellule quitte précocement les phases prolifératives, la sphère aura moins de dix cellules et ne sera pas comptabilisée. D'autre part, dans une sphère, il y a une

hétérogénéité des cellules qui se divisent et se différencient. Une augmentation des proportions des cellules qui sortent de la prolifération induit une taille de sphère plus petite. L'exploration de cette hypothèse est présentée ci-dessous.

2.2. Réservoir

Nous pouvons émettre plusieurs hypothèses permettant d'expliquer nos résultats. Tout d'abord, il est possible que le réservoir de cellules souches soit augmenté chez les souris KO. Ainsi, suite au prélèvement de la SVZ et du DG puis de la mise en culture, nous ensemençons le même nombre de cellules, et parmi celles-ci, il y a plus de cellules souches pour les individus KO que pour les individus WT. Pour explorer cette hypothèse, il serait intéressant de quantifier le réservoir de cellules souches chez les souris WT et KO (par FACS, ou autre technique immunohistochimique). (Voir Discussion). Nous avons choisi dans un premier temps d'analyser l'expression de gènes caractéristiques des cellules souches neurales dans les neurosphères issues des zones neurogéniques d'animaux WT et mutés, par PCR quantitative. Pour effectuer cette analyse, les neurosphères primaires de SVZ ont été dissociées et les cellules ont été cultivées en monocouche sur support traité avec la poly-lysine et la laminine, en présence de facteurs de croissance, pendant 48 heures. Ensuite, les ARN ont été extraits et après reverse-transcription puis PCR quantitative, nous avons analysé l'expression des gènes *Bmi*, *Nestine* et *Sox2*, marqueurs des cellules souches (Figure 44, n=2). Nous montrons que l'absence de *PAK3* n'affecte pas l'expression génique de ces marqueurs de cellules souches, confortant l'hypothèse que l'inactivation de *PAK3* n'altère pas le pool de cellules souches et en accord avec le fait que *pak3* n'est pas exprimé dans les cellules souches, au moins en présence de facteurs de croissance. Les analyses complémentaires sont discutées plus loin.

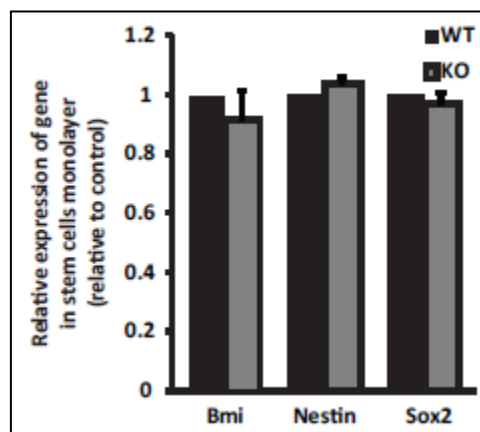


Figure 44. Analyse de l'expression des gènes caractéristiques de l'état cellules souches.

*Les ARN de cellules dissociées et cultivées en monocouches sur laminine, en présence de facteurs de croissance sont analysés comme précédemment décrit, et analysés avec des couples d'amorces spécifiques des gènes *Bmi*, *nestine* et *Sox2*. L'expression est exprimée relativement à celle du génotype WT.*

2.3. L'inactivation du gène *pak3* n'affecte pas les propriétés cardinales des cellules souches

Sachant que les kinases PAK du groupe I sont impliquées dans la division cellulaire et la différenciation des neuroblastes, il est aussi possible que l'inactivation de *pak3* affecte les propriétés cardinales des cellules souches, à savoir l'auto-renouvellement et la multipotence. Dans un premier temps, nous avons analysé la capacité d'auto-renouvellement des cellules souches/progéniteurs. Pour cela, les neurosphères primaires de SVZ et de DG issus d'individus WT et KO ont été dissociées puis ensemencées à nouveau en suspension en présence de facteurs de croissance et sans sérum. Ainsi, après 7 jours de culture, des neurosphères secondaires sont formées. Cette capacité des cellules souches à s'auto-renouveler est théoriquement infinie. Toutefois alors que les cellules issues de la SVZ ont des capacités élevées à s'autorenouveler après de nombreux passages, les cellules issues du DG perdent cette capacité après 4 passages (Seaberg et al., 2005). Nous avons donc analysé l'auto-renouvellement et observé que pour la SVZ, les cellules dissociées forment des colonies, et ce même au huitième passage. Nous observons aussi que la fréquence des neurosphères formées est toujours supérieure chez le KO comparé au WT. La situation est différente, pour le DG, et les cellules ne forment plus de neurosphères après le quatrième ou cinquième passage. De plus, la différence entre les génotypes est plus faible (n=3 pour chaque passage et chaque zone étudiée) (Figure 45).

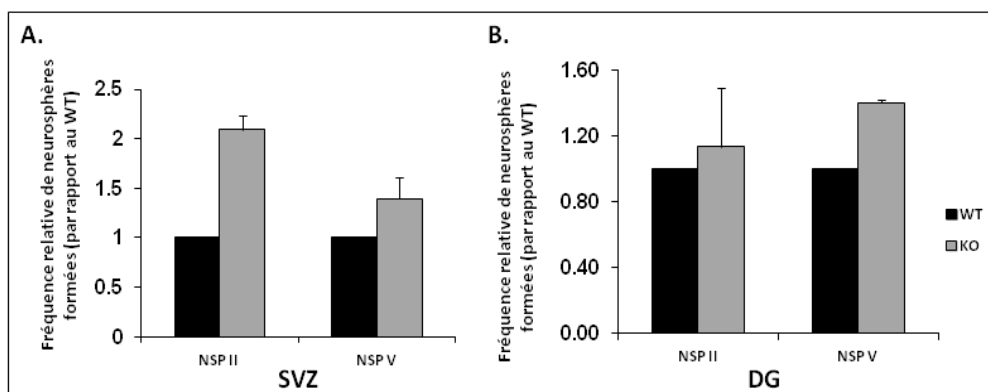


Figure 45. Analyse du potentiel d'auto-renouvellement des cellules souches issues des SVZ et DG de souriceaux des deux génotypes.

*Les neurosphères primaires sont dissociées puis les cellules sont ensemencées à concentration constantes en présence de facteurs de croissance et sans sérum. Une semaine après les sphères sont dénombrées et utilisées pour un nouveau passage. Seules les cellules souches possèdent cette propriété d'autorenouvellement, quasi infini pour la SVZ, plus limité pour le DG. Les cellules souches invalidées pour *pak3* sont douées d'autorenouvellement.*

Nous avons ensuite analysé l'effet de l'inactivation de PAK3 sur la multipotence. Pour cela, des neurosphères primaires de SVZ et de DG d'individus WT et KO ont été mises à différencier sur support traité avec la poly-lysine et en l'absence de facteur de croissance, durant 7 jours. Dans ces conditions, les neurosphères adhèrent au support rapidement et les cellules commencent à émettre des prolongements et à migrer en dehors de la sphère. Après fixation, des marqueurs spécifiques de chacun des types cellulaires (neuronal, glial et oligodendrocytaire) permettent de révéler, par immunofluorescence, le phénotype cellulaire. L'analyse rapide des neurosphères de SVZ et de DG

d'individus KO montre que les trois types cellulaires sont générés à l'issue des 7 jours de différenciation, comme pour les sphères WT (Figure 46). Sachant que chaque sphère a une origine clonale, ces résultats suggèrent que l'inactivation du gène *pak3* n'affecte pas la multipotence des cellules souches. On peut noter toutefois, d'une part, des différences dans la répartition des différents types cellulaires au sein de la neurosphère, suggérant une implication de PAK3 dans les processus migratoires, ce qui a été montré par Cobos (Cobos et al., 2007) et, d'autre part, dans l'émission des prolongements neuritiques, confirmant le rôle de PAK3 dans certains mécanismes de la différenciation.

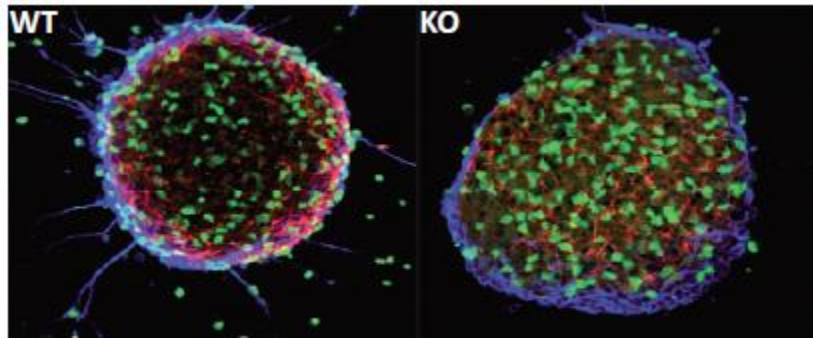


Figure 46. Les cellules souches *pak3*- sont multipotentes

*Les neurosphères primaires sont déposées sur un substrat de polylysine et cultivées pendant 7 jours en absence de facteur de croissance. Dans ces conditions, les cellules issues d'une cellule souche, se différencient dans les trois lignages neuronal (marquage beta-tubuline, Bleu), astrocytaire (GFAP, vert) et oligodendrocytaire (Olig2, rouge). Les sphères *pak3*- sont composées des trois types cellulaires prouvant les capacités multipotente de la cellule souche.*

L'ensemble de ces résultats montre que l'absence de PAK3 n'affecte pas les propriétés cardinales des cellules souches.

2.4. PAK3 régule la prolifération des cellules souches/progénéiteurs

PAK3 pourrait jouer un rôle dans la régulation de la prolifération des progéniteurs neuraux (cellules de type II ou transient amplifying progenitors TAP). En effet, les kinases PAK sont impliquées à plusieurs niveaux de la physiologie cellulaire et notamment dans la prolifération. PAK3 pourrait donc très bien jouer un rôle particulier dans la régulation de la prolifération des NSPC. Afin de montrer l'implication de PAK3 dans ce mécanisme, nous avons analysé la prolifération des cellules WT et KO par test ELISA colorimétrique basé sur la détection immunologique du BrdU incorporé. Pour cela, les neurosphères primaires de SVZ et de DG d'individus WT et KO ont été dissociées puis les cellules ont été ensemencées en monocouche sur support traité avec la poly-lysine et la laminine. Les cellules ont été cultivées pendant 48h dans deux conditions différentes : soit en présence de facteurs de croissance (EGF 10 ng/ml, FGF2 5 ng/ml), qui permettent la prolifération des cellules, soit en absence de facteur de croissance. Quatre heures avant l'arrêt de la culture, soit 44 h après l'ensemencement, le BrdU est ajouté au milieu. Cet analogue de la thymidine s'incorpore dans l'ADN au cours de la phase S du cycle cellulaire et permet donc de quantifier la prolifération des cellules. Après traitement des cellules, le signal associé au BrdU est révélé par immunomarquage permettant

Résultats

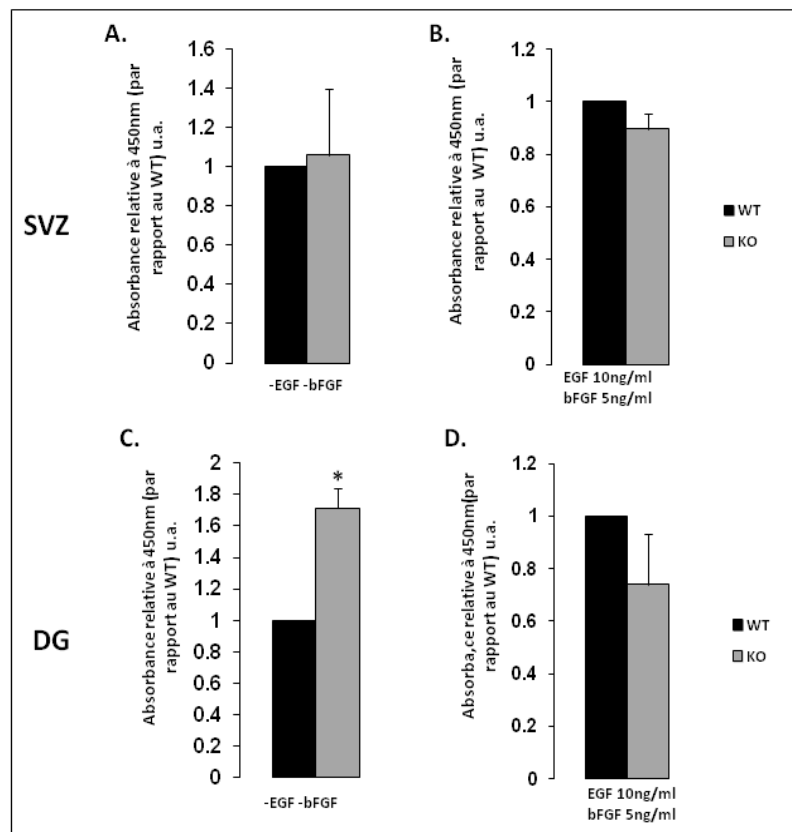
un dosage colorimétrique et une lecture par photométrie. La prolifération, analysée par l'incorporation du BrdU, est exprimée de manière relative au génotype WT, pour chaque condition.

En présence d'EGF et de β FGF, les cellules issues des neurosphères primaires de SVZ et de DG prolifèrent de la même façon chez le WT et chez le KO (SVZ KO : $0,895 \pm 0,058$ unité arbitraire par rapport à la SVZ WT, $n=3$, one-way ANOVA NS $p=0,120$; DG KO : $0,741 \pm 0,191$ unité arbitraire par rapport au DG WT, $n=2$, one-way ANOVA NS $p=0,222$) (Figure 47, B. et D.). Par contre, en absence de facteur, la prolifération des deux types cellulaires est beaucoup plus faible. Toutefois nous observons, et ce de manière significative, que les cellules issues du DG KO continuent à proliférer beaucoup plus que ne le font les cellules WT. Ceci n'est pas observé pour les cellules issues de la zone sous-ventriculaire (SVZ KO : $1,08 \pm 0,340$ unité arbitraire par rapport à la SVZ WT, $n=3$, one-way ANOVA NS $p=0,436$; DG KO : $1,713 \pm 0,129$ unité arbitraire par rapport au DG WT, $n=2$, one-way ANOVA * $p=0,016$) (Figure 47, A. et C.).

En présence de facteurs de croissance, les NSPC du DG ne sortent donc pas du cycle cellulaire et se maintiennent dans l'état prolifératif. L'absence de différence entre WT et KO est à relier à l'absence d'expression de PAK3 dans ces cellules cultivées dans ces conditions. Par contre, cultivée en absence de facteur de croissance, les cellules expriment PAK3. Par contre, dans le DG, ces cellules KO arrêtent moins de proliférer que ne le font les cellules WT. Ceci est en accord avec un rôle de PAK3 dans la sortie du cycle cellulaire. Le fait que nous ne trouvons pas le même résultat avec les cellules issues de la SVZ montrent une fois de plus que les NSPC de ces deux zones sont très différentes, et nous pouvons faire plusieurs hypothèses pour expliquer cette absence de différence entre le KO et le WT (temps de passage en G_0 différents pour les deux types cellulaires, sensibilité de la méthode, etc.).

Figure 47. Prolifération des cellules souches/progénéiteurs.

Les cellules de neurosphères primaires des deux zones et des deux génotypes sont dissociées et cultivées en plaque 96 puits en présence de différentes concentration de facteurs de croissance et incubées 4 heures avant la fixation avec du BrdU. L'incorporation de BrdU est mesurée par test immunologique colorimétrique.



Résultats

Nos résultats montrent que PAK3 est exprimée dans les cellules souches/progéniteurs dès qu'elles sont cultivées en absence de facteur de croissance, mais que PAK3 ne régule pas les propriétés cardinales des cellules souches, à savoir l'autorenouvellement et la multipotence. PAK3 semble toutefois jouer un rôle dans la capacité des cellules à sortir des phases prolifératives.

Pour analyser de manière plus intégrée le rôle de la kinase PAK3 dans la neurogenèse adulte, et pour savoir si on pouvait relier des mutations responsables de retard mental à des défauts de neurogenèse adulte, nous avons étudié la neurogenèse adulte dans la souris knock-in de la mutation R67C (Bienvenu et al., 2000) responsable d'un des phénotypes les plus sévères chez l'Homme.

3. La mutation R67C

3.1. Description moléculaire du modèle

La mutation R67C a été identifiée en 2000 par Bienvenu et collègues au sein d'une famille française. Comme décrit dans l'introduction, cette mutation consiste en une substitution de base C en T dans l'exon 2, ce qui se traduit par un changement d'acide aminé arginine (R) en cystéine (C) en position 67 de la kinase, dans sa partie N-terminale. Cette mutation faux-sens cause aussi la perte d'un site de restriction HhaI au niveau de la séquence génomique (Bienvenu et al., 2000).

Lorsque j'ai débuté mon projet de thèse, cette mutation R67C était celle qui conférait le phénotype de déficience intellectuelle le plus sévère chez l'Homme. De plus elle reste la seule mutation du gène *pak3* impliquée dans la DI qui ne supprime pas l'activité kinase, ces mutations pouvant avoir comme modèle la souris invalidée pour le gène. Afin de mieux comprendre les différents rôles de la kinase PAK3 dans la physiologie neuronale et dans la déficience intellectuelle chez l'Homme, mon équipe a donc porté son choix sur cette mutation et a créé le premier modèle murin porteur d'une mutation de PAK3 à l'origine de déficience intellectuelle chez l'Homme, dont je présente la stratégie de recombinaison en Figure 48 et dans la partie matériels et méthode.

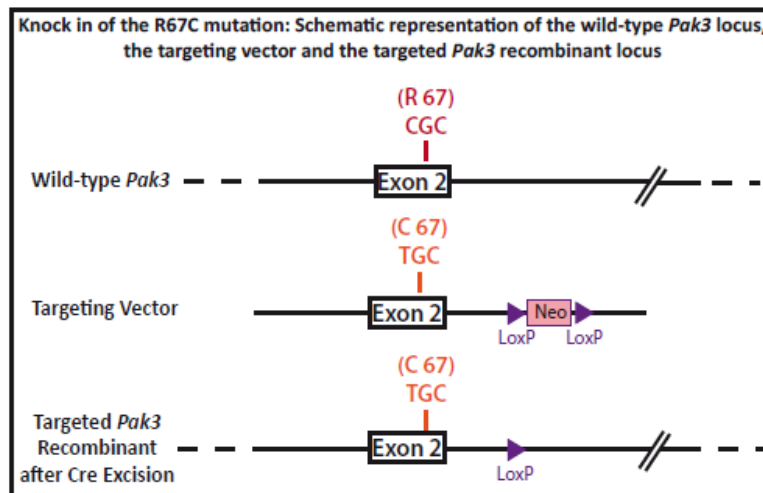


Figure 48. Représentation schématique des loci sauvage et recombiné, et de la stratégie de recombinaison

La stratégie de recombinaison est décrite dans « Matériels & Méthodes ».

La suppression de ce site de restriction HhaI a permis de vérifier que notre modèle transgénique porte bien la mutation R67C. Pour cela, l'ADN de queue de souris WT et KI a été extrait puis le fragment génomique comportant l'exon 2 a été amplifié par PCR à l'aide d'amorces spécifiques des séquences des introns. Les fragments WT et KI de PCR ont ensuite été purifiés. D'une part, ces fragments WT et KI purifiés ont été digérés par l'enzyme de restriction HhaI. Suite à cette digestion, trois fragments de respectivement 270, 227 et 122 paires de bases sont attendus chez le WT car les deux sites de restriction HhaI sont conservés. Chez le KI, deux fragments de 497 et 122bp respectivement sont attendus suite à la suppression d'un site de restriction HhaI. Comme le montre la Figure 49, les résultats obtenus concordent avec les prédictions. Les fragments non digérés (ND)

WT et KI présentent une unique bande lors de la migration sur gel d'agarose. Le fragment WT a été digéré en trois bandes qui migrent aux tailles attendues tandis que la digestion du fragment KI produit effectivement deux bandes qui migrent à 497 et 122 paires de bases (bp).

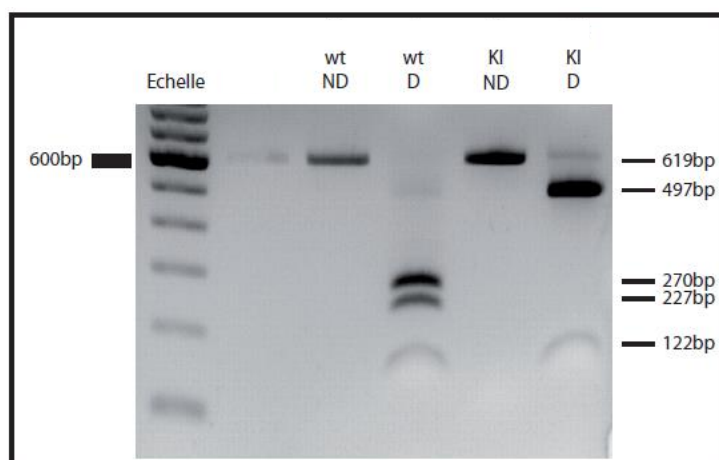


Figure 49. L'ADN issu de la souris KI porte effectivement la mutation R67C.

Cette mutation entraîne la suppression d'un site de restriction de l'enzyme *HhaI*. Les ADN non digérés du WT et du KI présentent une unique bande à 619 bp (pistes 3 et 5). Suite à une digestion par l'enzyme de restriction *HhaI*, l'ADN WT est digéré en 3 fragments de tailles égales à 270, 227 et 122 bp respectivement (piste 4), tandis que l'ADN KI produit deux fragments de 497 et 122 bp (piste 6).

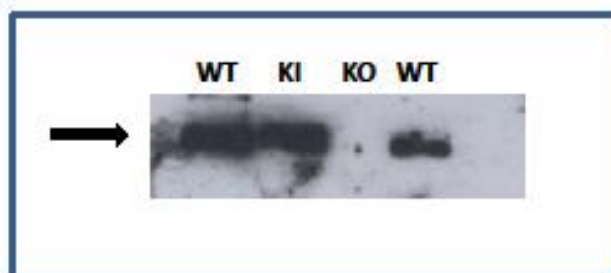
D'autre part, ces fragments WT et KI de PCR ont été clonés puis ont été séquencés : nous avons confirmé la présence de la substitution de base C en T dans l'échantillon d'ADN purifié à partir de l'animal KI.

3.2. Expression de PAK3 dans le cerveau

Nous avons vérifié que la protéine PAK3 portant la mutation R67C s'exprime dans le cerveau des souris *pak3*-R67C. Pour cela, nous avons immunoprécipité la protéine PAK3 dans le cerveau d'un individu mâle de 2 mois, de génotype KI et d'un frère de génotype WT (Figure 50). Nous avons fait parallèlement la même analyse avec des mâles WT et mutés de la lignée *pak3*-KO et révélé les protéines immunoprécipitées par un anticorps spécifique de PAK3. Ceci montre que la protéine PAK3 mutée est exprimée à un niveau relativement identique dans le cerveau des souris KI comparé aux WT. Nous avons confirmé ce résultat par qPCR à partir d'ARN total de cerveau de souris mâles adultes (Figure 50).

Figure 50. Caractérisation des protéines PAK3 dans les cerveaux des deux modèles transgéniques KO et KI.

200 mg de protéines cytosoliques de cerveaux C57Bl6 WT ou transgéniques ont été immunoprécipités et révélés par des anticorps spécifiques de PAK3.



3.3. Caractérisation phénotypique de la souris KI-R67C.

Dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe de Serge Laroche (avec Cyrille Vaillend et Roseline Poirier et les étudiantes en Master 2, Charlotte Castillon et Delphine Le Verger), une première caractérisation phénotypique des souris KI a été effectuée.

L'analyse morphologique par IRM des structures de cerveau montre que les cerveaux des souris KI présentent une microcéphalie et certaines anomalies structurales, en particulier des ventricules et de certains noyaux ventraux. Les souris KI présentent de légères anomalies de comportement, tels quelques traits d'anxiété et un déficit d'exploration, permettant aussi de conclure que les anomalies dans les tests d'apprentissage et mémoire ne sont pas liées à des problèmes comportementaux non cognitifs. Ces souris ont aussi passé de nombreux tests pour identifier des défauts d'apprentissage et de mémoire. Ainsi leurs performances de reconnaissance sont meilleures que les WT alors que, si elles ne présentent pas globalement de défauts dans le test de la piscine de Morris, l'efficacité de la trajectoire qu'elles effectuent trois jours plus tard est moins bonne qu'elle ne l'est pour les WT. De plus ces souris présentent de légères anomalies lors des tests de peur contextuelle, ainsi que dans les tests d'extinction de peur conditionnée. Ainsi si les souris KI ne présentent pas de déficit majeur, elles présentent un certain nombre de défauts, certains pouvant dépendre des structures hippocampiques et à mettre en relation avec des défauts possibles de neurogenèse adulte (Le Verger, M2, juin 2014).

Dans les tests d'apprentissage, les souris KI ne présentent pas globalement de gros défauts. Toutefois les analyses plus fines réalisées montrent que les souris KI présentent des retards dans l'acquisition des repères, dans le cadre de tests de séparations de pattern, peut-être dus à des déficits attentionnels. De plus les souris KI présentent des anomalies dans les tâches de discrimination contextuelle (Castillon, M2, Juin 2014).

L'ensemble de ces résultats montre que la souris R67C présente de légers défauts comportementaux, d'apprentissage et de mémoire qu'il est difficile pour le moment de comparer avec ceux décrits pour la souris KO (Meng et al., 2005 ; Farley et al., ms en préparation).

3.4. La mutation de déficience intellectuelle R67C affecte la neurogenèse adulte

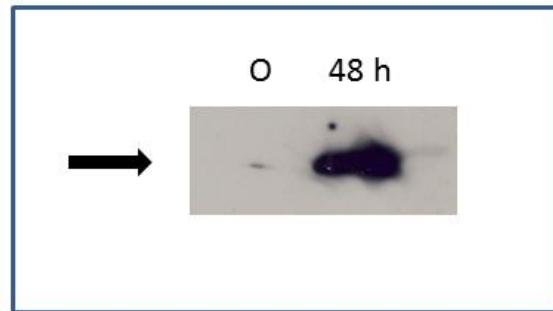
3.4.1 La mutation R67C n'affecte pas l'expression de PAK3 dans les cellules souches/progéniteurs.

J'ai ensuite vérifié que la mutation R67C ne modifie pas l'expression de PAK3 au cours de la neurogenèse adulte. Pour cela, j'ai appliqué le même protocole que dans la partie « matériels et méthodes ». Les NSPC issues de la SVZ de mâles adultes ont été cultivés en présence de facteurs de croissance afin d'amplifier la culture. Après passage, les cellules sont maintenues en conditions prolifératives pendant 48h puis la culture est arrêtée (t=0h) ou bien prolongée en l'absence de facteurs de croissance durant 48h pour induire la différenciation des cellules (t=48h). Les protéines sont extraites puis PAK3 est immunoprécipitée. Par western blot, j'ai analysé l'expression de PAK3 et de DCX, pour montrer que les cellules acquièrent une identité neuronale plus marquée. J'observe

que PAK3 n'est pas exprimée dans les NSPC mais que le retrait des facteurs de croissance entraîne une forte expression de PAK3 (Figure 51). La mutation R67C n'affecte donc pas l'induction de l'expression de PAK3 dans les cellules NSPC induites par le retrait des facteurs de croissance comme chez les animaux WT. Nous avons confirmé ces résultats par Q-PCR.

Figure 51. La mutation R67C ne modifie pas l'expression de la protéine mutée dans les cellules souches/progéniteurs suite au retrait des facteurs de croissance

Les cellules NSPC de la SVZ d'adultes de génotype pak3-R67C sont cultivées avec des facteurs de croissance. L'expression de PAK3 est analysée par immunoprécipitation et western blot immédiatement (0 h) ou 48 h après retrait des facteurs de croissance.



3.4.2 La mutation R67C diminue la prolifération des NSPCs/précurseurs neuraux dans les deux zones neurogéniques.

Puisque nous avons montré que PAK3 est exprimé dans une population de cellules prolifératives dans une situation précise, (partie II.1. des résultats), nous avons cherché à déterminer l'implication de PAK3 au cours de la neurogenèse adulte. Pour cela, nous avons analysé la prolifération des NSPC et leur devenir 7 jours plus tard. Cette analyse a été réalisée dans la zone sous-ventriculaire (SVZ) et le bulbe olfactif (BO), et aussi dans le gyrus denté (DG) de l'hippocampe de souris mâles WT et KI âgés d'environ 12 semaines.

Pour l'analyse de la prolifération des précurseurs au temps 2 heures après injections, les souris ont reçu deux injections à 50 mg de BrdU/kg séparées de deux heures, puis ont été sacrifiées deux heures après la deuxième injection. Pour l'analyse du devenir des cellules nouveau-nées, les souris ont reçu trois injections à 100 mg de BrdU/kg séparées de 4 heures puis ont été sacrifiées 7 jours après injection. Brièvement, les souris ont été anesthésiées avant d'être perfusées, le cerveau est disséqué et subit une post-fixation avant congélation (Cf matériels & méthodes). Les cerveaux sont ensuite coupés au cryostat, en réalisant des coupes sériées de 14 µm. Après traitement des tissus, la totalité des cellules BrdU+ a été dénombrée dans la zone sous-ventriculaire (SVZ), le bulbe olfactif (uniquement à 7 jours) et la zone subgranulaire (SGZ) du gyrus denté (DG) selon une progression antéro-postérieure, par microscopie optique. Le volume de la zone d'intérêt et la densité cellulaire ont été déterminés informatiquement, permettant d'obtenir le nombre total de cellules BrdU-positives par individu.

Après un court pulse de BrdU (temps 2 heures), le nombre total de cellules BrdU-positives est significativement réduit dans chacune des deux zones neurogéniques chez les souris KI, en comparaison avec les souris WT (Figure 52) (A. : nombre total de cellules BrdU-positives dans la SVZ : 8173 ± 852 cellules chez le WT, n=6, versus 6295 ± 410 cellules chez le KI, n=5, test de Student: * p = 0,048 ; B. dans la SGZ: 789 ± 95 cellules chez le WT versus 514 ± 27 cellules chez le KI, test de

Résultats

Student : ** $p = 0,007$). Ces données montrent que PAK3 intervient dans la régulation de la prolifération des précurseurs neuraux dans chacune des deux zones neurogéniques du cerveau adulte. Deux hypothèses permettent d'expliquer ce résultat. Soit la mutation R67C de *pak3* affecte la taille du réservoir de cellules souches, ce qui entraînerait une production plus faible de précurseurs neuraux. Soit la mutation R67C de *pak3* engendre un défaut d'activation des cellules quiescentes.

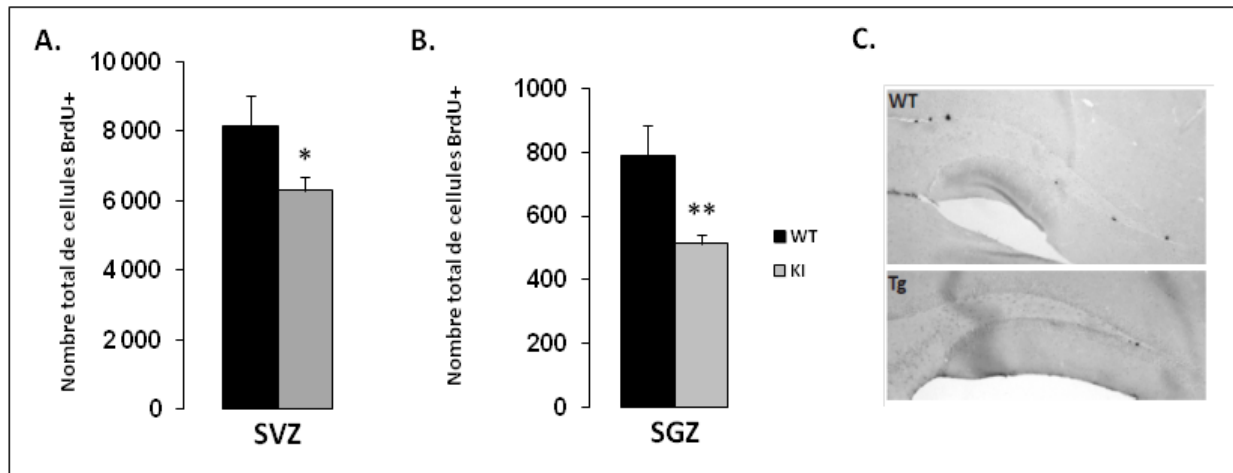


Figure 52. La mutation R67C diminue la prolifération des précurseurs dans les zones sous-ventriculaire (SVZ, A.) et sub-granulaire (SGZ, B.) du cerveau adulte.

Les souris mâles de 2 mois, WT et KI, de même fratrie, ont été injectées 2 fois avec du BrdU, injections séparées de 2 h, et euthanasiées 2 heures plus tard. Les graphes représentent la moyenne du nombre total de cellules BrdU-positives \pm la SEM, pour l'ensemble des individus. WT (en noir) ; KI (en gris). test de Student: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Ensuite, nous nous sommes intéressés au nombre de cellules BrdU+ dans la SVZ et la SGZ, 7 jours post-injections, afin d'évaluer le devenir des cellules nées 7 jours plutôt. Dans la SVZ et la SGZ, le nombre total de cellules BrdU-positives est significativement plus faible chez les souris KI par rapport aux souris WT (A. : SVZ : 10377 ± 1294 cellules chez le WT, $n=5$, versus 6651 ± 822 cellules chez le KI, $n=4$, test de Student : * $p = 0,028$; et B. : SGZ : 1436 ± 76 cellules chez le WT versus 1037 ± 108 cellules chez le KI, test de Student : ** $p = 0,006$) (Figure 53).

Résultats

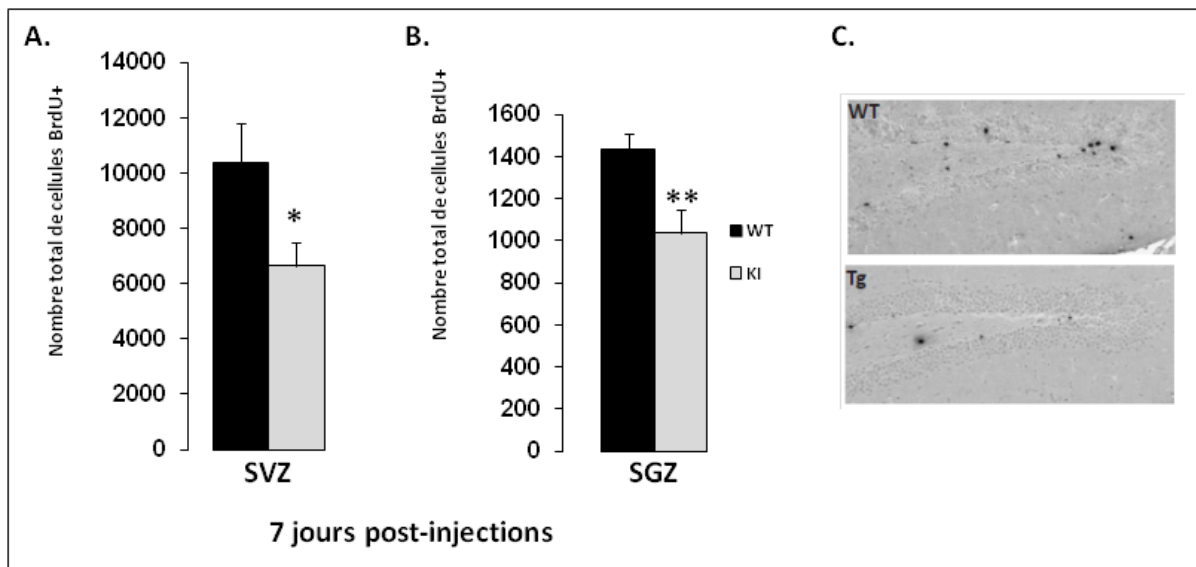


Figure 53. La mutation R67C diminue le nombre de cellules BrdU+ 7 jours après injections dans les zones sous-ventriculaire (SVZ, A.) et sub-granulaire (SGZ, B.) du cerveau adulte.

Les souris mâles de 3 mois, WT et KI, de même fratrie, ont été injectées 3 fois avec du BrdU, injections séparées de 4 h, et euthanasiées 7 jours plus tard. Les graphes représentent la moyenne du nombre total de cellules BrdU-positives \pm la SEM, pour l'ensemble des individus. WT (en noir) ; KI (en gris). Test de Student: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Les différentes modalités d'injection appliquées pour chacun des groupes expérimentaux ne nous permettent pas de comparer directement entre eux les résultats obtenus à 2 heures et 7 jours. Nous avons donc rapporté le nombre total de cellules BrdU-positives obtenu chez le KI par rapport à celui déterminé chez le WT (Tableau 2).

		Groupe 2 h	Groupe 7 j
(WT - KI)/ WT (%)	SVZ	23	36
	DG	35	28

Tableau 2. Evolution de la diminution relative des cellules BrdU+ dans les zones neurogéniques des KI comparées aux WT, au cours du temps.

Dans la SVZ, cette comparaison montre que le différentiel de prolifération entre les WT et les KI s'est accentué entre 2 heures et 7 jours. Les souris KI présentent 23% de cellules BrdU-positives de moins que les WT à 2 heures, et 36% de moins que les WT à 7 jours. Cette accentuation du phénotype peut être due à différents mécanismes.

- les cellules nouveau-nées des individus KI pourraient faire moins de cycles successifs de division, soit parce qu'elles se divisent moins vite, soit parce qu'elles atteignent plus rapidement le stade neuroblaste immature, en effectuant plus rapidement leur division terminale (Cf. plus loin 2.4.3).

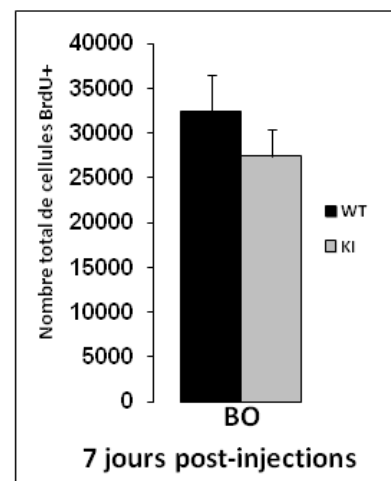
- il est connu que les kinases PAK interviennent dans la régulation de l'apoptose. Ainsi, chez la souris mutée, le phénomène de mort cellulaire pourrait être plus important entre 2 heures et 7

jours, comparé aux individus WT. Il est aussi possible que l'arrêt précoce de la division confère aux cellules nouveau-nées KI une fragilité qui provoquerait l'apoptose de ces cellules.

- enfin, au cours des sept premiers jours, une partie des cellules nées dans la SVZ pourraient avoir commencé à migrer le long du flux rostral migratoire ou ont déjà atteint le bulbe olfactif. De plus, plusieurs travaux ont montré l'implication de PAK3 dans la migration et la distribution des interneurons corticaux au cours du développement embryonnaire. Chez les souris KI, les cellules nouveau-nées pourraient alors avoir quitté la SVZ plus précocement que chez le WT. J'ai donc analysé le taux de neurogenèse dans le bulbe olfactif 7 jours après administration de BrdU. Les individus KI présentent une légère diminution non significative du nombre total de cellules BrdU-positives par rapport aux souris WT (32348 ± 4203 cellules chez le WT, $n=5$, versus 27421 ± 2974 cellules chez le KI, $n=5$, test de Student : NS $p = 0,183$) (Figure 54). Ces résultats suggèrent que la mutation R67C n'affecte pas la migration des cellules nouveau-nées âgées de 7 jours, dans le bulbe olfactif.

Figure 54. Analyse du nombre de cellules nouveau-nées dans le bulbe 7 j post-injections.

Les souris mâles de 3 mois, WT et KI, de même fratrie, ont été injectées 3 fois avec du BrdU, injections séparées de 4 h, et euthanasiées 7 jours plus tard. Les graphes représentent la moyenne du nombre total de cellules BrdU-positives \pm la SEM, pour l'ensemble des individus. WT (en noir) ; KI (en gris). Test de Student: NS.



A l'inverse, dans le DG, la comparaison entre les groupes 2 heures et 7 jours post-injections indique que le différentiel de prolifération entre les individus WT et KI a diminué. Par rapport au WT, le différentiel est de 35% entre les souris WT et KI à 2 heures pi, et de 28% à 7 jours post-injections (Tableau 2). Cette diminution du différentiel entre WT et KI peut être due à une dérégulation de la longueur des phases du cycle des cellules de type II (TAP), les cellules se diviseraient alors plus rapidement, permettant de compenser le défaut de prolifération initial. La mutation R67C pourrait aussi avoir un effet protecteur vis-à-vis de l'apoptose dans ce type cellulaire.

3.4.3 PAK3 et sortie du cycle cellulaire.

L'une des hypothèses, permettant d'expliquer les différences de prolifération observées à 2 heures et 7 jours entre les souris WT et KI, est l'implication de PAK3 dans la sortie du cycle cellulaire.

Ainsi, à 7 jours, il est possible que les individus WT et KI présentent une différence dans la proportion de cellules toujours cyclantes. Pour étayer cette hypothèse, nous avons déterminé la proportion de cellules nouveau-nées toujours dans le cycle cellulaire à 7 jours post-injections de BrdU. Pour cela, le marqueur nucléaire de prolifération Ki67 a été révélé et la proportion de cellules Ki67-positives dans une population de 30 cellules BrdU-positives a été quantifiée par individu, sur 3

individus par génotype. Nous observons le même pourcentage de cellules BrdU-positives et Ki67-positives chez les individus WT et KI ($5,6 \pm 1,72\%$ chez les souris WT versus $10,6 \pm 6,20\%$ chez les individus KI, test de Student NS $p=0,24$) (Figure 55). A 7 jours, la mutation R67C ne semble pas affecter la sortie du cycle cellulaire des cellules/progéniteurs. Cependant, cette analyse a été réalisée trop tardivement après les injections de BrdU. En effet, il a été montré qu'*in vivo*, après injection de BrdU, une importante partie des cellules BrdU-positives (environ 77%) sont déjà sorties du cycle cellulaire à 24h post-injection. Ces mêmes auteurs ont, de plus, montré que les cellules ayant incorporé le BrdU au moment de l'injection effectuent six à sept cycles (Mandyam et al., 2007). Nous avons donc entrepris une analyse en cours de réalisation, pour couvrir une sortie du cycle cellulaire plus rapide (Cf. Discussion).

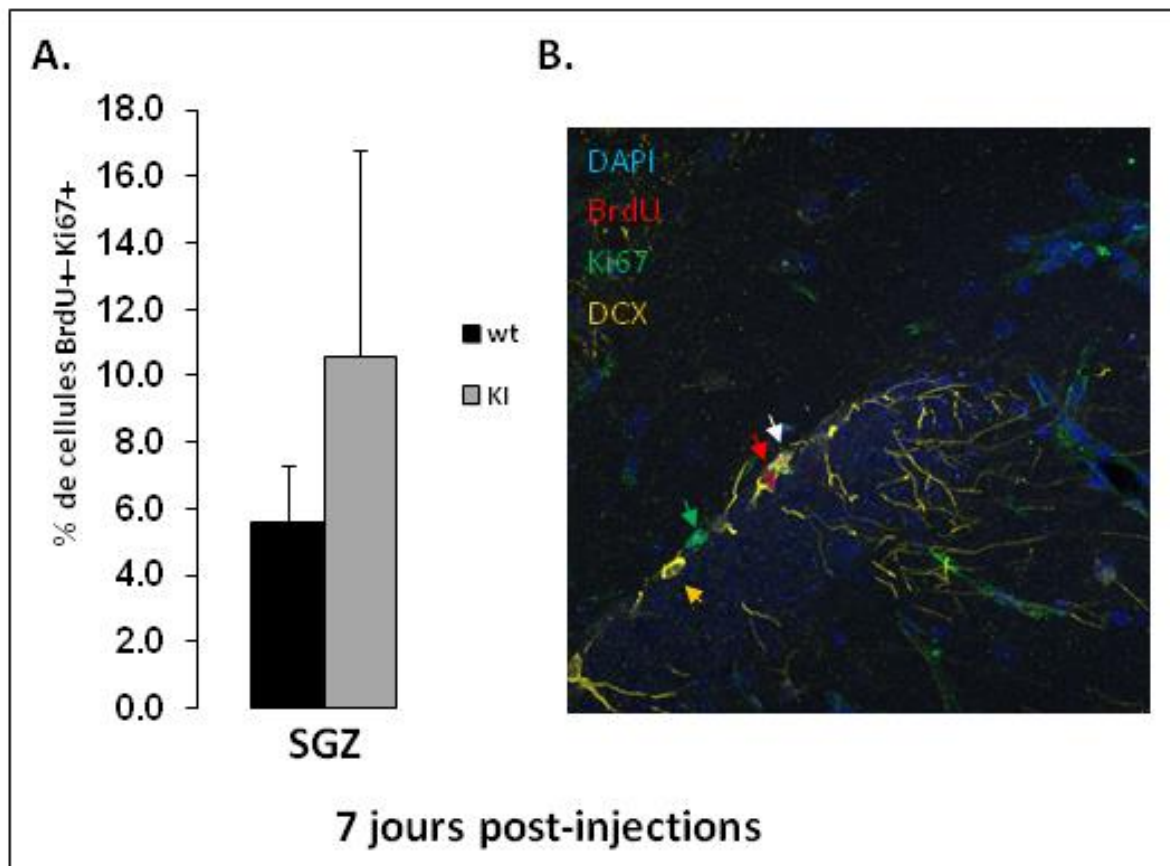


Figure 55. Sortie du cycle cellulaire des cellules nouveau-nées âgées de 7 jours.

Le marquage du BrdU incorporé révèle les cellules nouveau-nées âgées de 7 jours, tandis que le marquage Ki67 révèle les cellules en division au moment de l'euthanasie. Les cellules double-positives sont des cellules qui continuent à se diviser alors que les cellules seulement positives pour le BrdU sont des cellules qui sont sorties de la phase proliférative. Le marquage est réalisé sur des coupes de gyrus denté de mâle WT et KI de 3 mois. A. Pourcentage des cellules nouveau-nées toujours cyclantes 7 jours après. B. Illustration des marquages BrdU et Ki67.

3.4.4 Dans le DG, les cellules nouveau-nées de la souris KI ne meurent pas de façon prématurée par rapport au WT

Les caspases (pour cystein-aspartate proteases) sont spécifiquement activées au cours de l'apoptose. Ces enzymes sont synthétisées sous forme de procaspases comprenant un prodomaine, une grande et une petite sous-unité. Lors de la mort cellulaire programmée, l'activation d'une caspase est due au clivage du prodomaine, ce qui permet à la grande sous-unité de se replier sur la petite. Dans cette conformation, deux caspases peuvent alors interagir par leurs petites sous-unités.

D'une manière générale, les kinases PAK (sans doute PAK1) sont décrites comme participant à une voie anti-apoptotique impliquant en aval de PAK1 Raf-1 et MEK, BAD et NfκB (Ong et al., 2011, PNAS ; Johnson et al., 2005). Pour expliquer la différence du nombre total de cellules BrdU-positives, j'ai quantifié la proportion de cellules ayant la caspase 3 clivée, (dénommée Cleaved Caspase 3 : ClCasp3+) parmi les cellules nouveau-nées à 7 jours, en réalisant un marquage immunohistochimique permettant de la révéler. J'ai dénombré la proportion de cellules ClCasp3-positives dans une population de 30 cellules BrdU-positives par individu, pour 3 individus de chaque génotype. La co-localisation des marqueurs a été évaluée par microscopie confocale. Nous observons que la proportion de cellules ClCasp3+ & BrdU+ par rapport à la population de cellules BrdU+ totale est identique entre le WT et le KI (Figure 56) (pourcentage de cellules ClCasp3+&BrdU+ chez le WT : $1 \pm 1,01\%$ versus $0 \pm 0\%$ chez les souris KI ; test de Student : $p=0,19$). Bien que les cellules nouveau-nées (BrdU+) soient moins nombreuses à 7 jours chez les individus KI, cette différence dans le nombre de cellules BrdU⁺ ne semble pas être due à une mort accrue par apoptose de ces cellules comparé au WT.

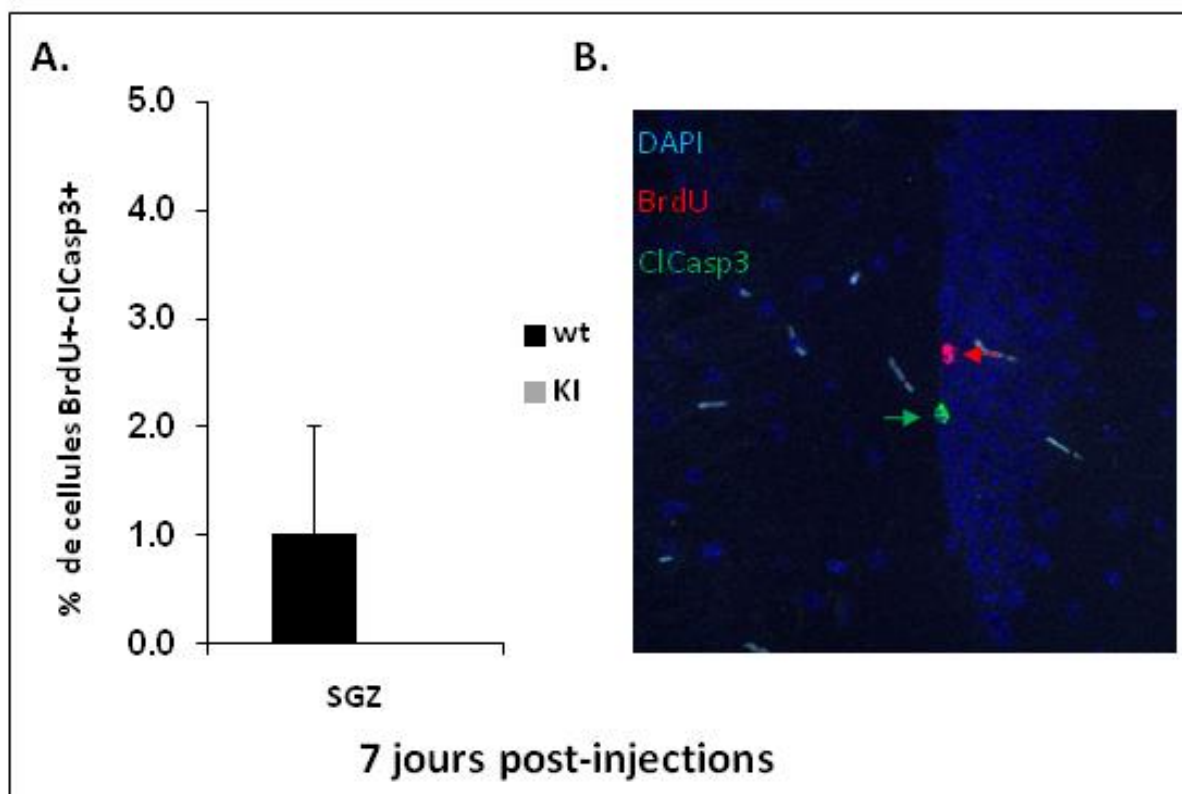


Figure 56. La diminution de la prolifération observée chez la souris KI n'est pas due à une mort prématurée des cellules.

Le marquage Cleaved Caspase 3 révèle les cellules apoptotiques. Le double marquage BrdU+/CIcasp3+ indiquerait des cellules nouveau-nés âgés de 7 jours et apoptotiques. A. pourcentage des cellules nouveau-nées apoptotiques. B. Illustration des marquages BrdU et CIcasp3.

Cependant, le peu de cellules BrdU+ CIcasp3+ pourrait avoir biaisé ce résultat. Il serait judicieux de quantifier la proportion de cellules CIcasp3-positives dans une population de cellules DCX-positives. En effet, DCX est un marqueur de cellules immatures donc nées récemment. Ces données permettraient de répondre partiellement à l'hypothèse d'une mort cellulaire réduite chez la souris KI dans le DG.

3.4.5 Devenir des cellules nouveau-nées au cours de la neurogenèse adulte chez les souris KI-R67C.

Comme détaillé dans l'introduction, les cellules nouveau-nées au cours de la neurogenèse adulte traversent différents stade de différenciation. Il a été montré que la kinase PAK3 est impliquée dans la différenciation au cours du développement embryonnaire du xénope et des cellules pancréatiques (Souopgui et al., 2002 ; Piccand et al., 2013). Nous avons donc analysé le devenir des cellules nouveau-nées au cours de la neurogenèse adulte chez les souris KI-R67C.

Tout d'abord, la proportion de neuroblastes immatures (DCX-positifs) au sein de la population de cellules nouveau-nées (BrdU+) a été quantifiée à 7 jours. 30 cellules BrdU-positives par individu (3 individus par génotype) ont été analysées et la co-localisation des marqueurs BrdU et DCX a été vérifiée par microscopie confocale. Nous observons une augmentation significative de la proportion des cellules BrdU+ DCX+ parmi les cellules BrdU+, dans les cerveaux KI comparés aux cerveaux WT ($75,5 \pm 0,97\%$ chez les KI ; $53,6 \pm 3,31\%$ chez le WT, test de Student ** $p=0,002$) (Figure 57). Ainsi, bien que moins nombreuses à 7 jours, les cellules nouveau-nées exprimant la protéine PAK3-R67C présentant un phénotype plus immature sont proportionnellement plus nombreuses.

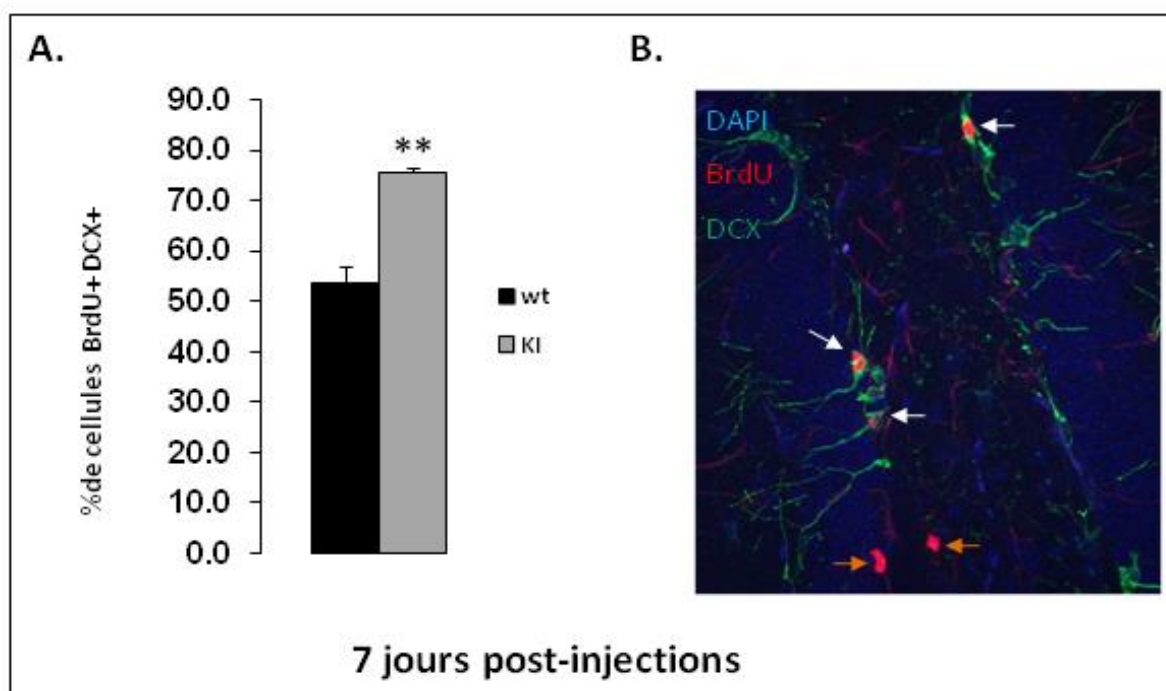


Figure 57. Analyse de la différenciation des cellules nouveau-nées dans le gyrus denté de mâles KI de 3 mois.

A. Décompte des cellules doublement positives BrdU Dcx dans le gyrus denté (moyenne sur 30 cellules par animal, et 3 animaux par génotype). Les coupes de cerveaux ont été analysées par immunofluorescence avec des anticorps dirigés contre le BrdU incorporé et Dcx, un marqueur de progéniteurs mitotiques et neuroblastes immatures. B. Image en microscopie confocale dans le gyrus d'un mâle.

Plusieurs hypothèses permettent d'expliquer ce résultat. En effet, la protéine Doublecortine DCX est un marqueur des progéniteurs prolifératifs mais aussi des cellules neuronales post-mitotiques immatures (Brown et al., 2003). Il est ainsi possible que la mutation R67C retarde l'engagement dans la différenciation neuronale, c'est à dire l'acquisition de marqueurs de différenciation tardive (expression de β III-tubuline ou NeuN). Le fait que les cellules soient incapables d'effectuer leur division terminale les maintiendrait plus longtemps au stade de cellules prolifératives exprimant Dcx. Toutefois, n'ayant pas observé d'augmentation du nombre des cellules BrdU+, nous pensons que ce n'est pas le cas. Une seconde possibilité serait que les cellules exprimant PAK3-R67C effectuent leur division terminale plus tôt et s'engagent vers un phénotype de différenciation

terminale (neuronale ou autre) plus rapidement. Elles auraient alors dépassé cette phase pendant laquelle les progéniteurs mitotiques et neuroblastes post-mitotiques immatures expriment la doublecortine (Cf discussion).

Afin d'évaluer si l'effet de la mutation de déficience intellectuelle observé à 7 jours post-injections persiste et impacte la différenciation terminale, nous avons analysé le devenir des cellules nouveau-nées 28 jours après injections de BrdU. Pour cela, les souris ont reçu trois injections à 100mg de BrdU/kg séparées de 4 heures puis ont été sacrifiées 28 jours après les injections. Nous avons examiné le phénotype des cellules 28 jours post-injections, en analysant la co-localisation du marqueur de neuroblastes immatures DCX avec le BrdU, par microscopie confocale. Nous observons que les souris WT et KI présentent la même proportion de cellules DCX-positives au sein d'une population de 20 cellules nouveau-nées BrdU-positives ($46,6 \pm 4,52\%$ chez les souris WT versus $44,0 \pm 7,01\%$ chez les individus KI, test de Student NS $p=0,38$) (Figure 58 A.). Ainsi, le décalage dans la progression phénotypique observé à 7 jours chez la souris KI est résorbé au bout de 28 jours.

Le décalage dans la cinétique de maturation des cellules des souris KI par rapport aux individus WT à 7 jours pourrait induire un déficit de neurones nouveau-nés matures. Nous avons donc analysé la proportion de cellules nouveau-nées matures (NeuN-positives), c'est à dire présentant un phénotype de neurone mature. La proportion de cellules BrdU-positives & NeuN-positives dans une population de 20 cellules nouveau-nées BrdU-positives a été déterminée par microscopie confocale, 28 jours post-injections de BrdU, et ce dans 3 animaux. Nous observons une légère diminution non significative de la proportion de cellules matures NeuN-positives chez les souris KI par rapport aux individus WT ($81,9 \pm 7,25\%$ chez les souris WT versus $74,2 \pm 9,66\%$ chez les souris KI, test de Student NS $p=0,27$) (Figure 58 B. et C.). Les conséquences de la mutation R67C ne semblent donc pas affecter de manière drastique le nombre de neurones nouveau-nés matures.

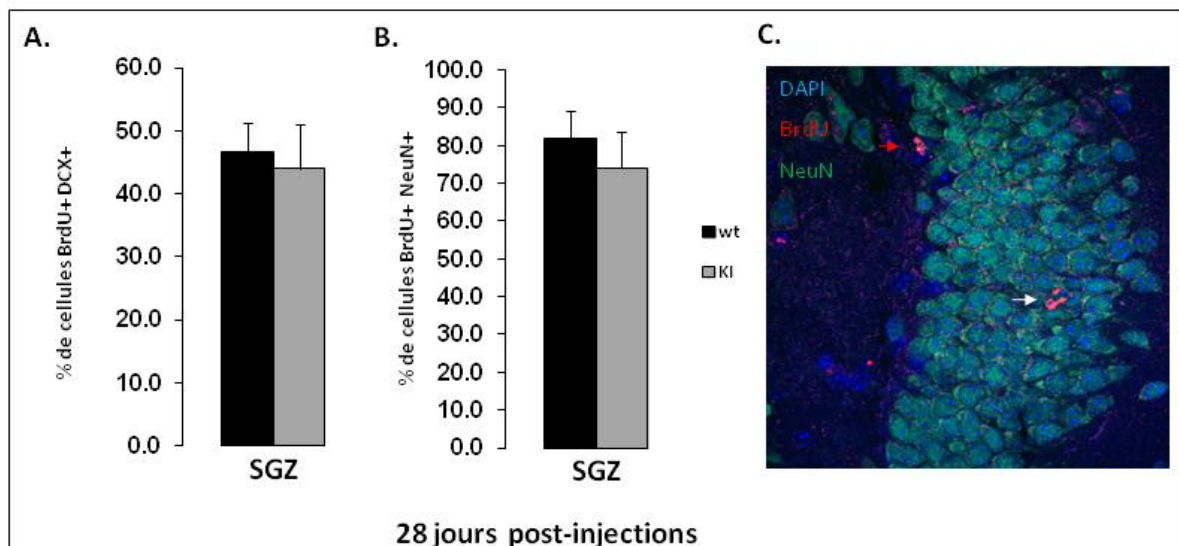


Figure 58. Analyse de la maturation des neurones âgés de 28 j dans le DG des animaux KI.

- A. Analyse par double marquage BrdU et Dcx, un marqueur des neurones immatures
- B. Analyse par double marquage BrdU et NeuN, un marqueur des neurones matures
- C. Image en microscopie confocale. La flèche rouge indique une cellule BrdU+, NeuN- alors que la flèche blanche indique une cellule doublement-positif.

28 jours post-injections, les souris KI présentent un nombre identique de cellules BrdU+ comparées aux WT. La proportion des cellules nouveau-nées immatures BrdU+ Dcx+ et des cellules nouveau-nées matures BrdU⁺, NeuN⁺ dans les deux génotypes est la même, suggérant que les anomalies de prolifération observées à 2 heures post-injections et celles de différenciation observées à 7 jours post-injections ne se traduisent pas par des différences qui perdurent (Castillon, M2, 2014).

Ainsi l'ensemble de ces résultats suggère que la mutation KI affecte le déroulé temporel de la prolifération et de la différenciation des cellules souches adultes et des progéniteurs neuraux, posant la question de leur intégration fonctionnelle dans les réseaux neuronaux qui dépend de l'adéquation entre leur progression dans leur parcours phénotypiques (morphologie, localisation, expression de canaux et de récepteurs, etc.) et les signaux chimiques et physiques qu'elles reçoivent.

En conclusion, j'ai montré pour la première fois, qu'un gène responsable d'une forme non syndromique de déficience intellectuelle joue un rôle majeur dans la neurogenèse adulte. En effet, j'ai montré que PAK3 est exprimée dans les cellules souches neurales issues des deux zones neurogéniques du cerveau adulte, au moment où, bien qu'elles prolifèrent, elles sont induites à arrêter de proliférer et/ou à se différencier. De plus, j'ai montré *in vivo* dans le premier modèle murin reproduisant une mutation humaine que nous avons créé, qu'une mutation de DI affecte la neurogenèse hippocampique. Dans les deux modèles murins analysés, chacun représentatif d'un type de mutation de PAK3 responsable de déficience intellectuelle chez l'homme, par des approches *in vitro* et *in vivo*, j'ai montré que la kinase PAK3 est impliquée dans la régulation de la prolifération des cellules souches/progéniteurs, probablement en régulant leur sortie du cycle cellulaire.

Toutefois, les approches menées dans les deux modèles de déficience intellectuelle associée aux mutations du gène *pak3* donnent des résultats opposés. Nous développerons dans la discussion un argumentaire démontrant que ces deux modèles sont compatibles et illustrent le même rôle de PAK3 dans la neurogenèse adulte. Nous donnerons les premiers arguments indiquant que la mutation PAK3-R67C n'induit pas une perte de fonction de la protéine PAK3 mais un changement fonctionnel dû à une interaction plus forte avec la GTPase Rac1.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Notre problématique est de comprendre comment les voies de signalisation supportent les fonctions cognitives et les interactions sociales, en étudiant un gène, localisé sur le chromosome X, pour lequel des mutations ont été identifiées chez des hommes de 6 familles atteints de déficience intellectuelle. Ce gène possède l'avantage d'être le plus proche orthologue d'un autre gène extrêmement étudié dans la signalisation cellulaire mais aussi dans les pathologies du cancer. Si la problématique semblait initialement simple, force est de constater que PAK3 se trouve au centre de plusieurs problématiques soulignées par son rôle dans des maladies psychiatriques, comme la déficience intellectuelle, et les maladies neurodégénératives, comme la maladie d'Alzheimer. Ceci est sans doute à mettre en regard avec cette notion que **PAK3 est une protéine multifonctionnelle**. Cette multifonctionnalité, analysée dans le cadre de la plasticité synaptique mais aussi au cours du développement embryonnaire, est aussi présente au niveau de la neurogenèse adulte. En étudiant le rôle de PAK3 dans la neurogenèse adulte, nous analysons les diverses fonctions de PAK3, en particulier la régulation de la prolifération cellulaire, la différenciation et la migration.

Chez l'Homme, les mutations du gène *pak3* sont associées à des déficits cognitifs développés au cours de l'enfance et de l'adolescence. Les déficits cognitifs observés chez les patients atteints de déficience intellectuelle pourraient être sous-tendus par des défauts de neurogenèse adulte. Nous avons analysé ce processus au sein de deux modèles murins, représentatifs des deux types de mutations affectant PAK3, la souris Knock-out pour analyser les mutations qui inactivent le domaine kinase et la souris Knock-in pour la mutation R67C qui affecte la liaison aux GTPases. Nous intégrerons dans cette discussion les résultats présentés dans les deux parties de ce mémoire, reliant les rôles de *pak3* dans la différenciation neuronale à ceux dans la neurogenèse adulte.

1. Les souris KO et KI, modèles des différentes mutations de DI du gène *pak3*

Actuellement, chez l'Homme, six mutations de PAK3 ont été identifiées comme étant à l'origine de déficience intellectuelle modérée à sévère. Quatre mutations sont localisées dans le domaine kinase et abolissent l'activité catalytique de PAK3. Une mutation est située dans une séquence intronique et entraîne la synthèse d'une protéine tronquée et vraisemblablement instable. La dernière mutation, R67C, est une mutation faux-sens localisée dans le domaine régulateur qui n'affecte pas le domaine kinase.

Le modèle d'inactivation du gène *pak3* (KO) nous permet d'étudier les effets de la perte de fonction de PAK3. En effet, ce modèle KO créé par Zengping Jia porte un codon stop suivi d'une cassette néomycine dans l'exon 6 ce qui entraîne la perte totale du domaine kinase de PAK3 et mime en partie les 5 mutations affectant l'activité kinase, à savoir la mutation non-sens R419-Stop, les trois mutations faux-sens dans le domaine kinase et la mutation dans l'intron qui affecte l'épissage et provoque un changement de phase et la synthèse d'une protéine tronquée de moins de 150 acides aminés (Meng et al., 2005). Toutefois, ces cinq mutations ne sont pas équivalentes. Les trois mutations faux-sens du domaine kinase et la mutation non-sens R419X qui permet la synthèse d'une protéine tronquée, pourraient agir en dominant négatif, c'est-à-dire titrer des régulateurs et partenaires en les séquestrant, les empêchant d'agir dans leur voie de signalisation parallèle. De ce fait, il est possible que la sévérité du phénotype de déficience intellectuelle ne soit pas uniquement

liée à la perte de l'activité kinase, mais aussi aux effets dominants-négatifs de ces protéines mutées. Le modèle KO analysé dans ce travail est sensé générer une protéine tronquée, d'environ 220 acides aminés. Toutefois, cette protéine n'est pas détectée ni par nous (Cf description de la lignée dans les Matériels et Méthodes), ni par l'équipe de Z. Jia (Meng et al., 2005). Cette protéine est soit instable, soit n'a pas été synthétisée, suite à l'action du système de contrôle de qualité des ARN (Nonsense-mediated mRNA decay). Ceci suggère fortement que le codon stop introduit dans le 6^{ème} exon codant conduit à l'absence de la partie N-terminale de la protéine qui aurait pu fonctionner comme dominant négatif comme le fait le domaine auto-inhibiteur. Dans ce modèle, il n'y a pas de mécanisme d'interférence avec les autres voies. Si ce modèle permet l'étude de la perte de fonction de PAK3, il ne permet cependant pas d'évaluer les effets dominants négatifs potentiels des mutants. L'étude des modèles exprimant les différentes protéines PAK3 mutées décrites ci-dessus permettrait certainement de mieux comprendre la relation entre les phénotypes observés chez les patients porteurs de ces mutations et la nature de la mutation.

Comme nous le verrons plus loin, nous proposons que la souris KO reflète un défaut dans la voie de signalisation Cdc42/PAK3 alors que le modèle KI-R67C mettrait en évidence une nouvelle voie associant Rac1 et PAK3.

Ce fut donc pour moi un objectif de mettre en place les deux premières lignées transgéniques de PAK3 au sein de l'équipe. J'ai joué un rôle important dans cette orientation prise par mon équipe afin de développer les modèles animaux, bien qu'il soit évident que les temps d'expérimentation avec ces approches sur l'animal soient extrêmement longs et que la conduite de l'élevage des lignées demande un travail conséquent et rigoureux avec parfois des accidents indépendants de notre volonté.

2. Les mutations de PAK3 : changement de fonction et perte de fonction

De par leur liaison à Rac1 ou Cdc42, les kinases PAK permettent l'intégration de différents signaux et participent à divers processus cellulaires (Bokoch, 2003). Seule la mutation R67C est localisée dans la région régulatrice, au niveau d'une séquence qui participe à la spécificité d'interaction avec les GTPases (Knaus et al., 1998). Mon équipe a montré que la mutation R67C diminue l'interaction avec Cdc42, et augmente celle avec Rac1 (Kreis et al., 2007). Il est donc envisageable que le changement d'affinité pour les Rho-GTPases induit par la mutation R67C provoque un changement de fonction de PAK3, dans la régulation de la neurogenèse adulte.

Les GTPases de la famille Rac et Cdc42 ont des fonctions cellulaires différentes et possèdent leurs propres régulateurs et leurs propres effecteurs. Schématiquement, Rac est impliqué dans la formation des lamellipodes alors que Cdc42 est impliqué dans celle des filopodes (Heasman & Ridley, 2008). L'équipe de Sebastian Jessberger a montré que Rac1 et Cdc42 ont des rôles spécifiques aux différents stades de la neurogenèse adulte dans l'hippocampe. Ainsi, Cdc42 favorise particulièrement la prolifération des cellules souches et progéniteurs, ce qui n'est pas le cas pour Rac1. De plus, Rac1 et Cdc42 interviennent à des étapes différentes de la différenciation et de la maturation des cellules nouveau-nées. Cdc42 est impliquée dans les étapes précoces de la croissance dendritique tandis que

Rac1 participe à la maturation des dendrites. Enfin, Cdc42 et Rac1 sont toutes deux impliquées dans la maturation et la stabilisation des épines dendritiques (Vadodaria et al., 2013).

Toutefois, les résultats obtenus *ex vivo* sur la caractérisation du rôle de PAK3 dans la prolifération ne vont pas dans le même sens que celui de Cdc42 qui est impliqué positivement dans la prolifération des progéniteurs. En effet, nous proposons que PAK3 régule la sortie du cycle cellulaire, favorisant ainsi l'arrêt de la prolifération cellulaire (Cf ci-après). Toutefois, nous n'avons pas d'argument direct permettant de relier Cdc42 à PAK3 dans la biologie des cellules souches neurales. Il serait possible que PAK3 soit activée par un mécanisme indépendant de cette GTPase (Cf. introduction sur les kinases PAK). Il existe de nombreuses possibilités faisant intervenir d'autres GTPases de la famille Cdc42, des GEF tels que les membres de la famille PIX, les lipides membranaires, etc.

Nos données *in vivo* concernant la prolifération des cellules souches et des progéniteurs chez la souris KI seraient compatibles avec le rôle de Rac1 dans la neurogenèse adulte décrit par l'étude de Vadodaria et collègues (2013). Nous observons ainsi une diminution de la prolifération des cellules souches et progéniteurs chez la souris KI-R67C comparée à la souris WT qui pourrait s'expliquer par la diminution de l'interaction Cdc42/PAK3 et une augmentation de celle avec Rac1.

Ainsi, de manière inattendue, la mutation R67C est responsable d'un phénotype au niveau de la neurogenèse adulte qui ne serait pas dû à une perte de fonction de PAK3 mais qui serait dû au recrutement de PAK3 par Rac1, créant une nouvelle voie de signalisation non physiologique.

Nos études *ex vivo* sur la biologie des cellules souches et *in vivo* dans la neurogenèse adulte démontrent que PAK3 joue un rôle important dans la neurogenèse adulte. Nous avons mis en évidence plusieurs anomalies dans nos modèles, et nous proposons ici de discuter le rôle de PAK3 dans les différentes phases de la neurogenèse adulte et dans différentes problématiques.

3. PAK3 et réservoir de cellules souches

Les données rapportant l'implication des kinases PAK dans l'homéostasie et la prolifération de cellules souches sont quasiment inexistantes. Cependant, nous montrons que la fréquence de formation des neurosphères est plus importante à partir des cellules de SVZ et de DG d'individus invalidés pour le gène *pak3* que d'individus WT. Il est possible que le réservoir de cellules souches soit plus grand chez les individus KO que chez les individus WT. Ainsi, plus de cellules souches sont prélevées au moment de la dissection de la SVZ et du DG et sont mises en culture, ce qui engendre une fréquence plus importante de neurosphères primaires. Nos premières données ne nous permettent pas de nous prononcer sur le rôle de PAK3 dans la régulation du réservoir de cellules souches. Toutefois, nos expériences *ex vivo* montrent que PAK3 n'est pas exprimée dans les cellules cultivées en présence de facteurs de croissance ; il semble donc assez improbable que la kinase PAK3 puisse réguler directement, par un mécanisme « cellule-autonome », la prolifération des cellules souches.

Les résultats obtenus sur les neurosphères primaires pourraient être dus à une augmentation de la taille du réservoir des cellules souches. Cette population est difficile à caractériser (revue de

Morshead & van der Kooy, 2004) mais elle fait l'objet de nombreuses études. La population de cellules souches en division représente 1% des cellules qui se divisent dans le DG, cellules identifiées sur la base de caractéristiques morphologiques de cellules souches ayant incorporées le BrdU (Encinas et al., 2011). Cette population n'est donc pas identifiable par les approches basées sur l'incorporation de BrdU. Cette population qui alimente le pool de progéniteurs est soumise à une homéostasie. Ce pool qui génère par division asymétrique des progéniteurs prolifératifs et des cellules souches est sensible à la fréquence des divisions et diminue fortement avec l'âge (Encinas et al., 2011). Certaines pathologies l'affectent et son maintien est sous le contrôle de plusieurs voies de signalisation activées par des facteurs intrinsèques et par des signaux liés à la niche neurogénique. L'identification des cellules souches neurales adultes nécessite l'utilisations de deux critères, soit un critère morphologique et l'expression d'un marqueur, les cellules souches neurales adultes du DG présentant une morphologie de gliale radiaire (Encinas et al., 2011), soit deux marqueurs, la nestine et la GFAP, ou la prominine et la nestine (Walker et al., 2013),.

Il existe plusieurs approches possibles pour apprécier la taille du réservoir :

- 1) Les cellules souches neurales adultes possèdent une forte activité aldéhyde déshydrogénase qui peut être utilisée pour caractériser et purifier cette population. Il existe des kits commerciaux pour mesurer cette activité enzymatique (Aldéfluor). Plusieurs études utilisent cette approche (voir les revues de Balber 2011 (2011) pour d'autres types de cellules souches. Une approche combinant deux critères, l'expression du marqueur prominine à la surface des cellules et une forte activité ALDHL permet de mettre en évidence une population de NSPC dans la moelle épinière qui présente des propriétés identiques à celles de la SVZ (Obermair et al., 2011). Toutefois cette population englobe les cellules souches et les progéniteurs prolifératifs.
- 2) Une seconde approche pourrait être de regarder l'activité du transporteur Bcrp1/ABCG2 qui permet l'efflux du colorant Hoechst 33342, dans les NCS adultes (Kim & Morshead, 2003). Par cytométrie de flux en présence de Hoechst, on peut isoler et quantifier cette population. Toutefois Mouthon et collaborateurs (2006) mentionne que c'est le transporter ABCB1 qui est présent chez l'adulte.
- 3) Une troisième possibilité serait de repérer les cellules souches par marquage immunologique des marqueurs spécifiques des cellules souches. Plusieurs marqueurs sont possibles, comme Sox2, GFAP, Nestine, etc. Cette méthode est utilisée par Aguirre et al, 2010. Je propose donc que l'on réalise des doubles marquages Nestine/GFAP sur des coupes d'hippocampe et de SVZ. Ces 2 régions contiennent les principaux réservoirs de cellules souches adultes, et nous avons montré qu'elles génèrent plus de neurosphères primaires chez les animaux KO que chez les WT. Nous avons effectué les mises au point pour le triple marquage Nestine, GFAP et Sox2 et présentons ci-dessous le type d'images obtenues par microscopie confocale (Figure 59). Les conditions sont décrites dans la section « Matériels et Méthodes ». Toutefois, la quantification par cette technique nécessite de compter sur tout l'axe rostrocaudal d'une série d'animaux WT et mutés. Nous allons préférer la quatrième approche, utilisant des gènes rapporteurs.

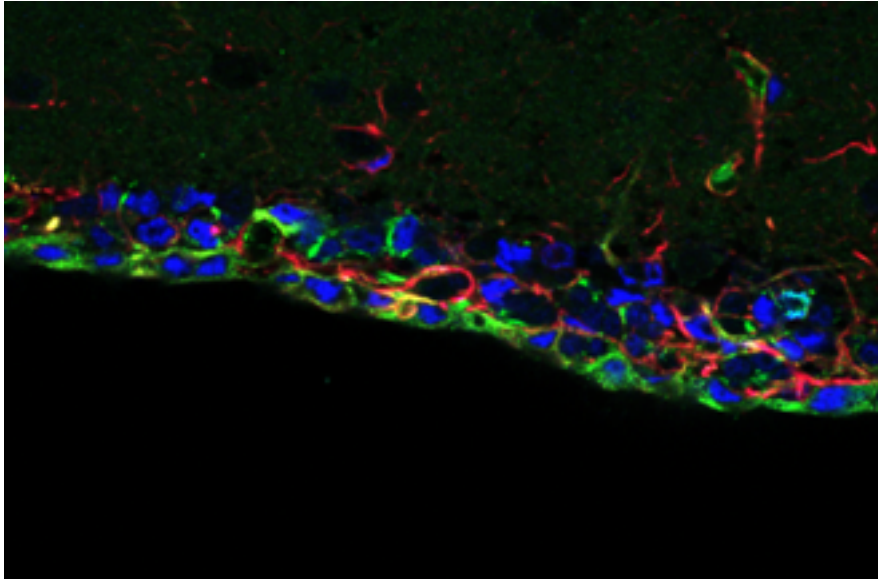


Figure 59. Identification des cellules souches par triple marquage immunologique Nestine, GFAP et Sox2.

Les marqueurs Nestine, GFAP, Sox2 sont révélés respectivement en vert, en rouge et en bleu, sur une coupe de SVZ adulte. La cellule jaune représente la seule cellule souche sur cette coupe.

4) La quatrième possibilité serait d'utiliser des approches génétiques. Plusieurs groupes ont utilisé les éléments régulateurs des promoteurs de gènes comme Nestine, Gli-1 et Glast exprimant directement un marqueur comme la protéine GFP, ou une activité Cre inducible ou non pour caractériser les cellules souches. Ainsi Encinas et collaborateurs (2011) utilisent des souris Nestin-GFP pour mettre en évidence les cellules souches de morphologie radiale. DeCarolis et collaborateurs mettent en évidence des différences dans les populations caractérisées par les constructions Nestin-Cre et Glast-Cre (DeCarolis et al., 2013). Nous sommes en train de réaliser les croisements de souris exprimant une recombinase inducible sous le contrôle du promoteur Nestine (Nestin-Cre, Lagace et al., 2007), avec une souris exprimant une GFP après excision d'un codon stop en 5' grâce à ses séquences lox, et les souris *pak3*⁻. Il faut initialement vérifier que la séquence rapportrice ne « fuit » pas en absence d'induction de l'activité Cre, par la Tamoxifène, et que le tamoxiphène permet bien l'expression de la GFP dans les cellules souches et progéniteurs, et spécifiquement dans les cellules Nestine-positives en réalisant un double marquage Nestine et GFP. Nous réaliserons alors un marquage GFP et GFAP et quantifierons le nombre de cellules doublement positives par rapport à la population totale des cellules GFAP, ceci à plusieurs temps après induction par le Tamoxifène. Cette approche nous permettra aussi d'analyser certaines caractéristiques de la différenciation et du devenir des cellules nouveau-nées.

Rappelons que le pool de cellules souches neurales est hétérogène car composé de cellules souches quiescentes et de cellules souches activées. Au cours de la neurogenèse adulte, la signalisation Notch intervient dans le maintien du réservoir de cellules souches (Revue de Pierfelice et al., 2011). D'une part, Notch active les protéines de la famille Hes/Hey qui suppriment l'expression du gène proneural *Ascl1*. Par cette voie, les cellules souches sont maintenues dans un état indifférencié. La voie de signalisation en aval de Notch1 favorise la prolifération des cellules souches

neurales tout en les maintenant indifférenciées. Ce processus permet de garder une sous-population de cellules souches actives. Cependant, la voie Notch permet aussi de maintenir les cellules en quiescence. Les différents effets de Notch sur l'activation/la prolifération et la quiescence des cellules souches peuvent être dépendants de la quantité ou bien de l'expression oscillatoire ou prolongée de Notch. Les multiples fonctions de Notch peuvent aussi s'expliquer par l'existence de plusieurs paralogues de Notch qui peuvent être exprimés différemment par les divers types cellulaires présents au sein de la niche neurogénique. De plus, il est possible qu'une sous-population de cellules souches intègre les signaux provenant de différentes cibles de Notch. Ces deux derniers mécanismes permettraient alors l'expression sélective d'un paralogue de Notch et d'une de ses cibles ou l'expression combinée de différentes cibles de Notch, régulant ainsi l'activation et la quiescence des cellules souches neurales (Giachino & Taylor, 2014). De manière intéressante, Notch est un régulateur de l'expression de PAK3, tout au moins au cours de la neurogenèse embryonnaire (Souopgui et al., 2002). Au cours du développement embryonnaire, l'expression de *pak3* est inhibée par Notch. L'activation de l'expression de *pak3* fait intervenir successivement les facteurs de transcription Neurogénine2 et NeuroD1. Dans notre modèle, la voie de régulation de l'expression de *pak3* est inconnue.

Par ailleurs, chez les souris invalidées pour le gène *pak3*, il a été montré que la phosphorylation du facteur de transcription CREB est diminuée dans le cerveau (Meng et al., 2005). Ce facteur de transcription intervient dans la régulation de l'expression de nombreux gènes, tels ceux codant pour le facteur neurotrophique BDNF et le neuropeptide VGF, impliqués dans la régulation de la plasticité synaptique mais aussi dans la régulation de la prolifération des progéniteurs neuraux au cours de la neurogenèse adulte (Yu & Chen, 2011; Thakker-Varia et al., 2014). La voie PAK3/CREB/BDNF pourrait donc jouer un rôle dans la neurogenèse adulte, et plus précisément, dans les différentes niches neurogéniques. Il est possible que l'expression de PAK3 par les cellules (différenciées) régule les expressions de BDNF et VGF par l'intermédiaire de CREB, participant ainsi à la régulation du réservoir de cellules souches.

La régulation du réservoir de cellules souches via la voie Notch ou bien par le biais du BDNF et de VGF permet d'envisager deux mécanismes qui pourraient être, en partie, « non cellule-autonome ». Ces deux mécanismes hypothétiques permettraient d'expliquer l'augmentation de la fréquence de neurosphères primaires formées à partir des cellules issues des individus KO. Afin d'analyser le réservoir de cellules dans nos modèles, différentes approches expérimentales sont envisageables.

4. Rôle de PAK3 dans la sortie du cycle cellulaire des progéniteurs neuraux

Deux études ont impliqué la kinase PAK3 dans la régulation de la sortie des phases prolifératives des cellules précurseurs, dans deux systèmes biologiques différents. Souopgui et collègues ont montré que PAK3 provoque la sortie des phases prolifératives au cours du développement embryonnaire du xénope (Souopgui et al., 2002) ; l'équipe de Gérard Gradwohl a aussi mis en évidence cette même fonction dans l'arrêt de la prolifération précurseurs des cellules bêta du pancréas au cours du développement embryonnaire de la souris (Piccand et al., 2013).

Nos résultats *ex vivo* montrent que PAK3 est exprimée suite au retrait des facteurs mitogènes par les cellules encore prolifératives. L'absence d'anticorps dirigés contre PAK3, qui permettent de révéler par immunofluorescence la présence de PAK3 dans les cellules mitotiques ou en train d'effectuer la division terminale, est un problème que nous essayons de circonvenir. Nos analyses *ex vivo* comparées du WT et du KO montrent que l'absence de PAK3 entraîne un défaut de sortie du cycle cellulaire. En effet, après le retrait des facteurs de croissance, les cellules issues du DG d'individus KO continuent à proliférer, au contraire des cellules WT qui semblent sortir du cycle cellulaire. Ainsi, ces données sont compatibles avec les résultats obtenus au cours du développement embryonnaire par Souopgui et collègues (2002) d'une part, et par Piccand et al., (2013) d'autre part. PAK3 favorise donc la sortie du cycle cellulaire des progéniteurs neuraux. Pour la souris KI, nous proposons que la mutation R67C supprime la voie Cdc42/PAK3 et donc impacte la sortie du cycle cellulaire, mais nous ne savons pas quel rôle peut avoir le nouveau module de signalisation Rac1/PAK3. Serait-il possible qu'il favorise une différenciation rapide des progéniteurs ? Ceci pourrait être compatible avec l'augmentation du nombre de cellules nouveau-nées Dcx-positives observée 7 jours après injection de BrdU.

5. Rôle de PAK3 dans la spécification phénotypique et la survie

L'étude réalisée au cours du développement embryonnaire du xénope, par activation ou inhibition de la kinase, montre que PAK3 favorise spécifiquement le lignage neuronal (Souopgui et al., 2002). Chez l'Homme, les patients atteints de mutation de PAK3 présentent des déficits cognitifs, peut-être liés à des défauts de spécification du lignage neural. Nous nous sommes donc intéressés au devenir des progéniteurs neuraux au cours de la neurogenèse adulte dans notre modèle murin de déficience intellectuelle KI-R67C. Bien que les cellules nouveau-nées prolifèrent moins chez les souris KI à 7 jours, par rapport aux souris WT, la proportion de neuroblastes immatures nouveau-nés (révélés par le marquage BrdU-positif et DCX-positif) est plus important chez les souris KI. Ces données suggèrent que PAK3 pourrait réguler le choix du déterminisme phénotypique des précurseurs neuraux.

La population de neuroblastes immatures (DCX-positives) est composée de cellules prolifératives et post-mitotiques. Nous avons analysé la proportion de cellules toujours cyclantes (BrdU-positives et Ki67-positives) à 7 jours et nous n'avons pas observé de différence entre les souris

WT et KI. De plus, nous observons un déficit de cellules BrdU-positives à 7 jours chez les KI, laissant supposer que les cellules BrdU DCX sont majoritairement post-mitotiques.

Dans l'hypothèse d'un changement de fonction de la protéine PAK3-R67C, liée au changement d'affinité pour Rac1 et Cdc42, il est possible que les cellules exprimant cette PAK3 mutée sortent plus précocement des phases prolifératives et, par conséquent, s'engagent dans la différenciation terminale plus rapidement. Cependant, cette sortie du cycle cellulaire et l'engagement trop rapide dans la différenciation des neuroblastes immatures pourraient altérer les propriétés de ces cellules et en particulier leur intégration fonctionnelle dans les réseaux neuronaux préexistants. Ainsi, bien que ces neuroblastes KI-R67C aient entamé leur différenciation terminale, leur maturation pourrait être bloquée ou retardée. Pour conforter cette hypothèse, il serait intéressant de déterminer la proportion de neuroblastes immatures cyclants (BrdU+ DCX+ Ki67+) et celle de neuroblastes immatures (BrdU+ DCX+ Ki67-). Cette altération pourrait aussi être régulée par une mort cellulaire accrue de ces cellules, mais nos analyses ne nous permettent pas de favoriser cette hypothèse. En effet, la détermination de la proportion de cellules apoptotiques (Caspase 3 clivée-positives) au sein de la population de cellules nouveau-nées (BrdU+) à 7 jours a produit des résultats identiques entre les souris WT et KI.

Les cellules nouveau-nées connaissent deux périodes critiques de survie au cours de la première et de la troisième semaine après leur naissance. De plus, les kinases PAK3 sont connues pour participer à la régulation de la mort cellulaire programmée. Nos résultats ne nous permettent pas de nous prononcer sur un rôle éventuel de PAK3 dans ces deux périodes de survie. Ce phénotype est certainement dû au défaut de prolifération initial, observé dès 2 heures post-injections.

6. Rôle de PAK3 dans la différenciation neuronale

Comme PAK3 est impliquée spécifiquement dans la différenciation neuronale, nous avons analysé le devenir des cellules nouveau-nées. D'une part, nous avons analysé si le phénotype immature des cellules persistait au cours de la différenciation terminale. Nos résultats montrent que le blocage ou le retard de maturation est résorbé à 28 jours et que les cellules effectuent leur différenciation terminale de manière identique entre les souris WT et KI, bien que légèrement plus faible chez les souris KI. Étonnamment, ces données indiquent que la mutation R67C n'affecte pas la différenciation terminale des cellules. Ce phénotype est surprenant compte-tenu des déficits cognitifs associés à cette mutation. Cependant, il est possible que ces déficits soient liés à des rôles plus subtils de PAK3 dans l'intégration aux réseaux préexistants mais également dans la maturation des synapses.

En effet, bien que notre approche en conditions « cellule autonome » ne nous ait pas permis de mettre en évidence un défaut de mise en place des épines dendritiques chez les souris KO, il est possible qu'*in vivo* d'autres mécanismes de régulation de cette mise en place (tels les contacts cellule-cellule ou l'activité neuronale) interviennent via un processus impliquant PAK3. Ainsi, il a été montré que PAK3 contrôle la formation des nouvelles épines et leur maturation suite à une stimulation glutamatergique (Dubos et al., 2012). Toutefois, mes résultats apparaissent en contradiction avec ceux récemment publiés concernant le rôle de PAK3 dans la différenciation des

interneurones (Dai et al., 2014). Comme nous l'avons décrit dans l'introduction, les gènes *dlx* contrôlent la migration et la différenciation des interneurones, principalement en inhibant l'expression de deux gènes *pak3* et *neuropiline* (Cobos et al., 2007). Or les interneurones forment aussi une arborisation dendritique et forment des épines dendritiques à leur surface, bien que moins nombreuses que sur les neurones pyramidaux glutamatergiques. Une des explications possibles est qu'une analyse réalisée dans des neurones d'hippocampe ne permette pas de démontrer une voie à priori identifiée dans les interneurones. Dans ces neurones d'hippocampe, la protéine PAK3 endogène est exprimée alors que l'on ne connaît pas le statut de *Dlx*. Une autre possibilité serait qu'un mécanisme de compensation se mette en place dans les neurones invalidés, qui masque les effets de l'absence de la protéine PAK3.

De même PAK3 devrait, comme PAK1, réguler le cytosquelette d'actine mais les souris KO ne montrent pas d'anomalie de la dynamique des épines. Finalement, il y a de nombreuses différences entre les informations sorties des modèles cellulaires et celles obtenues dans les modèles animaux, pouvant être dues à des mécanismes de compensation, d'interactions géniques, de mécanismes non cell-autonomes. Un des problèmes est, par exemple, de savoir si PAK3 régule la plasticité synaptique via la voie de la LIM kinase. Les travaux de l'équipe Z. Jia semblent indiquer que le KO de PAK1 affecte l'état de phosphorylation de la cofiline alors que PAK3 impacterait le niveau de phosphorylation de CREB, par un mécanisme inconnu (Meng et al., 2005 ; Asrar et al., 2007). Il est intéressant de remarquer que récemment, plusieurs voies impliquant PAK régulent l'adressage ou l'expression des récepteurs au glutamate via des voies indépendantes de la LIM kinase, mais pouvant impliquer les protéines adaptatrices de la densité post-synaptiques comme Shank et SAP102, en relation avec le cytosquelette d'actine (Duffney et al., 2013 ; Murata & Patton-Constantine, 2014). De même, une seconde voie en train d'émerger est celle des Eph/ephrine, dont la signalisation réverse participe à la formation des épines et à la stabilisation des récepteurs AMPA, pour laquelle nous montrons un rôle spécifique de PAK3 grâce à la formation des complexes PAK3/Nck2 (Thévenot et al., 2011). Enfin, si les travaux du groupe de D. Muller ont montré que PAK3 régule la dynamique des épines mise en jeu par l'activité synaptique, les mécanismes moléculaires ne sont pas identifiés (Dubos et al., 2012).

L'activité neuronale est un des mécanismes qui régulent la neurogenèse adulte. Elle participe à la maturation et à l'intégration des neurones matures dans les réseaux établis (Ge et al., 2006 ; Marin-Burgin et al., 2012). Mon équipe a mis en évidence que PAK3 régule négativement la transmission synaptique via son interaction avec Nck2 (Thévenot et al., 2011). L'analyse électrophysiologie de l'intégration des nouveaux neurones chez les souris invalidées pour le gène *pak3* permettrait d'impliquer PAK3 dans ces étapes de la neurogenèse adulte dépendante de l'activité neuronale.

7. Rôle de PAK3 dans la migration des cellules au cours de la neurogenèse adulte

Au cours du développement embryonnaire de la souris, l'équipe de John Rubenstein a montré que l'expression de *pak3* est régulée négativement par les facteurs de transcription Dlx1 et Dlx2. Cette répression de PAK3 participe à la migration tangentielle des interneurons immatures au cours du développement embryonnaire. De plus, une étude récente, réalisée par l'équipe de Christine Métin et à laquelle mon équipe a participé, a mis en évidence l'implication de PAK3 dans la distribution des interneurons de l'éminence ganglionnaire médiane (EGM) au cours du développement du cortex (Viou et al., manuscrit en préparation).

La migration des cellules nouveau-nées au cours de la neurogenèse mérite une étude à part entière et n'a pas été finement analysée dans notre travail. Nous avons cependant montré que la diminution des cellules BrdU-positives à 7 jours dans la SVZ n'est pas liée à une migration précoce de ces cellules vers le bulbe olfactif. Le rôle de la migration des neurones dans les processus de différenciation et de d'intégration fonctionnelle des cellules nouveau-nées dans le gyrus est peu documenté, au contraire de ce qui est décrit pour la SVZ et la migration à travers le flux de migration rostrale.

8. Spécificités fonctionnelles de PAK3 dans la neurogenèse adulte

Mon équipe a activement recherché les particularités de la kinase PAK3 pouvant être à l'origine de ses fonctions propres dans la plasticité synaptique, travaux auxquels j'ai participé (Thévenot et al., 2011 ; Combeau et al., 2012), mettant clairement en évidence que, de par sa séquence primaire, PAK3 possède des partenaires régulateurs différents de ceux de PAK1. Sur la base des approches biochimiques, et des analyses effectuées dans des cellules ou des neurones transfectés en culture, il est difficile de pouvoir affirmer que les caractéristiques identifiées soient responsables de plasticité chez l'animal. La création de modèles animaux exprimant les mutants ponctuels d'interaction avec Nck2 ou Cdc42 est donc indispensable pour poursuivre ces analyses.

L'un des points intrigants est l'existence des exons alternatifs de PAK3 qui génèrent des variants d'épissage aux propriétés biochimiques très différentes des isoformes classiques PAK3a et PAK1 (Rousseau et al., 2003 ; Kreis et al., 2008). Abondants dans le cerveau adulte, localisés dans des compartiments précis du neurone, conservés au cours de l'évolution, ces variants pourraient aussi être le support de fonctions spécifiques de PAK3 dans la plasticité synaptique. L'ensemble des études réalisées jusqu'ici montre que PAK3 joue très probablement un rôle à différentes étapes clés de la neurogenèse adulte. Il se pourrait que les variants d'épissage de PAK3 soient exprimés de façon variable au cours de la neurogenèse adulte. Ainsi, chaque variant pourrait intervenir dans la régulation d'une des étapes clés de la neurogenèse, expliquant ainsi les multiples fonctions de PAK3 au cours de ce processus.

~*~*~*~

En conclusion, notre étude a mis en évidence l'implication de PAK3 dans la régulation de la sortie du cycle cellulaire des progéniteurs au cours de la neurogenèse adulte. L'implication de PAK3 dans la différenciation des cellules nouveau-nées au cours de ce processus n'a pas cependant été clairement révélée par nos analyses. Cependant, il est admis que les neurogenèses embryonnaire et adulte présentent des mécanismes de régulation communs. Il est donc possible que la kinase PAK3 conserve ses fonctions tout en étant impliquée de façon variable au cours du développement embryonnaire et de la neurogenèse adulte.

Nous pouvons toutefois proposer que PAK3 se situe au centre du cercle vertueux de la neurogenèse adulte et de la plasticité synaptique. En effet, Il y a une relation réciproque entre la neurogenèse adulte et la plasticité neuronale. Les neurones nouveau-nés qui sont des éléments clés de la mémoire spatiale et de celle impliquée dans la séparation de motifs, peuvent participer à l'activité locale des réseaux neuronaux. Or l'activité neuronale est aussi un des stimuli de la neurogenèse adulte (Voir Figure 15). Comme nous l'avons décrit, l'expression de *pak3* est augmentée suite à des stimulations de l'hippocampe, dans des tranches organotypiques de rat stimulées par des trains de stimulation à haute fréquence (téta bursts) (Boda et al., 2002) et PAK3 est impliquée sans doute à plusieurs niveaux dans les mécanismes de la plasticité synaptique. D'autre part, comme nous l'avons démontré, PAK3 est un régulateur de la neurogenèse adulte, et nous proposons que, soit par régulation de son activité, soit par régulation de son expression, PAK3 puisse réguler la neurogène adulte. Ainsi PAK3 est au centre de cette boucle Plasticité synaptique/Neurogenèse adulte impliquée dans les processus de mémoire et apprentissage (Figure 60, D'après Inokuchi, 2011). Ainsi la régulation physiologique de PAK3 pourrait être indispensable au fonctionnement neuronal, et ses mutations avoir des effets drastiques dans les fonctions cognitives.

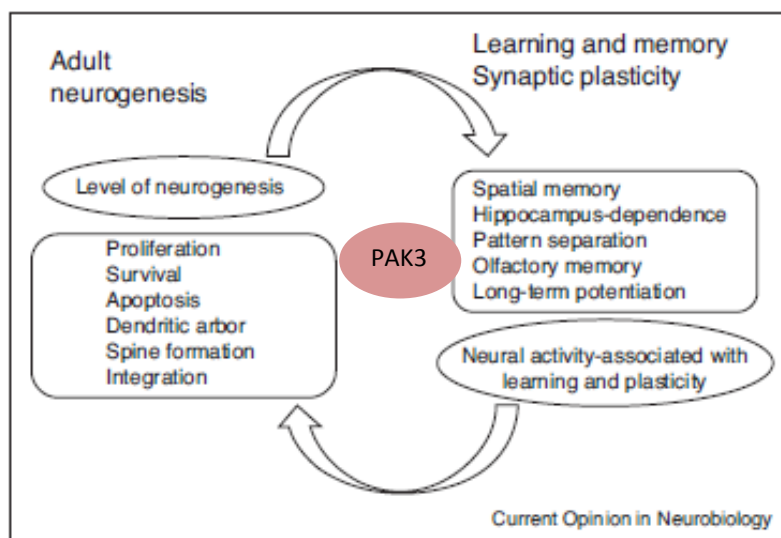


Figure 60. La neurogenèse adulte et la plasticité synaptique sont intimement liées par des régulations réciproques.

PAK3 agit sur ces deux processus. D'après Inokuchi, 2011.

Le tableau et le schéma suivant proposent un modèle intégrant les données acquises jusqu'ici et celles apportées par mon travail de doctorat.

		Regulatory domain R67C	Kinase domain R419X, A365E	
Phénotype chez l'Homme	Déficience intellectuelle	moderate	mild	Allen, 1998, Bienvenu, 2000
Activité Kinase et Régulation	Activité Kinase	=	0	Kreis, 2007
	Liaison à Cdc42	↘	=	Kreis, 2007
	Liaison à Rac1	↗	=	
	Interaction avec Nck2	↘	=	Thévenot, 2011
	Interaction avec PAK1	=	↘	Combeau, 2012
Plasticité synaptique	Initiation de l'épine dendritique	↘		Kreis, 2007 Dubos 2012
	Maturation de l'épine dendritique		↘	Kreis, 2007
	LTP		↘	Meng 2005
Neurogenèse	Prolifération des cellules souches/progéniteurs	↘	↗	
	Différenciation	altérée	?	
Modèle animal		Knock-in R67C	KO	

Tableau 3. Les mutations affectant les différentes régions (régulatrice et kinase) de PAK3 sont à l'origine de changements de fonction de cette kinase.

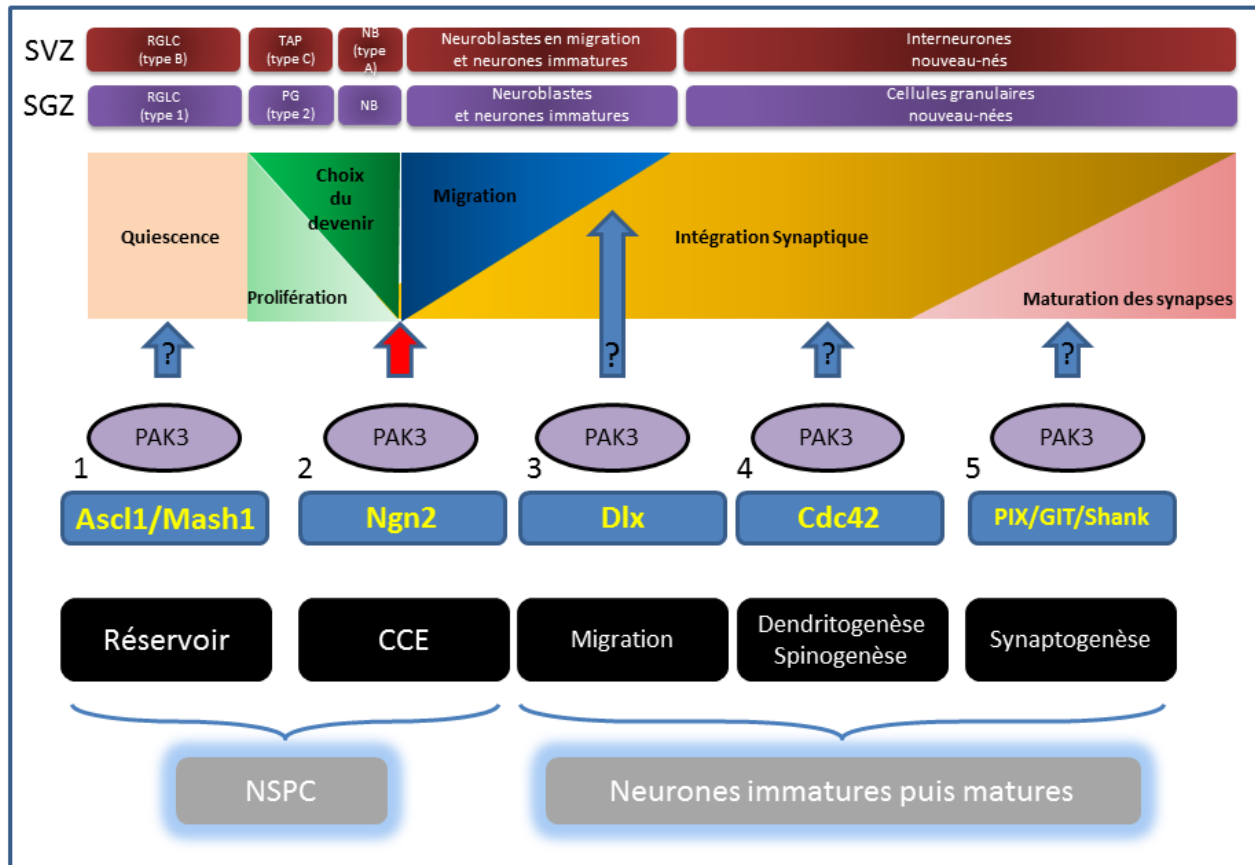


Figure 61. Rôles hypothétiques et démontrés de la protéine multifonctionnelle PAK3 dans la neurogenèse adulte.

La cellule souche parcourt différentes étapes tout au long de sa vie pour donner naissance à un neurone mature, fonctionnellement intégré dans les réseaux neuronaux préexistants et apportant sa contribution spécifique dans les mécanismes de la plasticité et les processus d'apprentissage et de mémorisation qui en découlent (Ge et al., 2008). La cellule souche est donc tout d'abord quiescente, activée, proliférative, s'engage dans un lignage, migre, survie, reçoit les premiers signaux GABAergiques reflétant l'activité neuronale, émet des prolongements, développe son arborisation dendritique, reçoit des premières afférences glutamatergiques, projette son axone et établit ses synapses.

PAK3 pourrait réguler plusieurs étapes de ce périple cellulaire, et en particulier durant 5 étapes cruciales.

- 1- PAK3 pourrait participer au maintien du réservoir par sa fonction dans le contrôle d'un état cellulaire post-mitotique. Ainsi PAK3 est une cible directe de Ascl1/Mash1 qui joue un rôle clé dans ce processus (Castro et al., 2001) ;
- 2- PAK3 contrôle la sortie de la phase proliférative (Flèche rouge), comme nous l'avons démontré dans ce mémoire de thèse, travail corroborant ses fonctions au cours du développement embryonnaire dans le cerveau et le pancréas (Souopgui et al., 2002 ; Piccand et al. 2013).

- 3- PAK3 contrôlerait la migration des neuroblastes dans le gyrus denté mais aussi vers le bulbe olfactif, comme cela a été proposé au cours du développement embryonnaire (Cobos et al., 2007 ; Viou et al., ms en préparation).
- 4- PAK3 contrôle l'intégration synaptique en favorisant la différenciation des neurites (Dai et al., 2014) et la mise en place des synapses par des voies spécifiées par ses partenaires propres comme Cdc42 et Nck2 (Boda et al., 2004 ; Kreis et al., 2007 ; Thévenot et al., 2012)
- 5- Enfin, PAK3 participe à la maturation des synapses par des mécanismes dépendants de son activité kinase, dans des processus dépendant de l'activité neuronale (Boda et al., 2004 ; Kreis et al., 2007 ; Dubos et al., 2013). Ces mécanismes font intervenir les complexes avec les protéines PIX, GIT et Shank (Zhang et al., 2005 ; Nodé-Langlois et al., 2006 ; Park et al., 2003)

Ceci place donc PAK3 au centre des mécanismes moléculaires et cellulaires de la neurogenèse adulte et des mécanismes de la plasticité qui sous-tendent apprentissage et mémoire. La perte de fonction ou le changement de fonction de PAK3 dus aux mutations de déficience intellectuelle seraient donc responsables d'un déficit de neurones nouveau-nés fonctionnels vraisemblablement responsables au moins en partie des altérations des capacités cognitives et des anomalies comportementales.

MATERIELS ET METHODES

1. Description de la lignée *pak3*-

L'inactivation du gène *pak3* a été réalisée par le laboratoire de Zhengping Jia, au Sick Children Hospital de Toronto, et la lignée, créée sur fond hétérogène SV129/CD1, est le premier modèle d'inactivation du gène *pak3* et actuellement le seul disponible (Meng *et al.*, 2005). La stratégie d'inactivation a été la suivante (Figures 8A et 9A) : un codon stop a été introduit en phase dans la séquence codante de l'exon 6 du gène *pak3*, suivi d'une cassette néomycine. De ce fait le gène recombiné code pour une protéine tronquée correspondant aux 220 acides aminés amino-terminaux de la protéine ne possédant que le domaine régulateur.

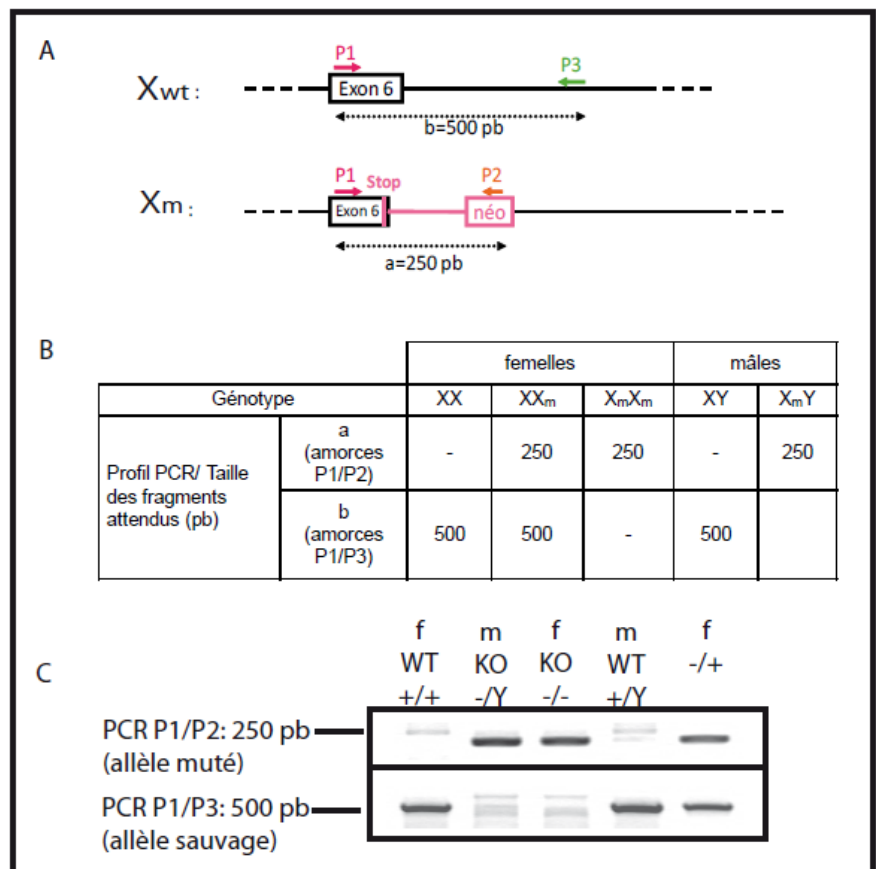
1.1. Développement d'une méthode optimisée de génotypage.

Lors de ces travaux, nous avons développé plusieurs protocoles de génotypage afin de pouvoir appliquer à long terme une méthode rapide et peu coûteuse. Nos différentes expériences nous ont amenés à choisir le protocole exposé dans la partie ci-dessous.

Deux PCR complémentaires sont réalisées parallèlement afin de déterminer le génotype des souris (Figure 8). La première (amorces P1 et P2) permettant de déterminer la présence de la cassette néomycine, indique l'allèle muté, tandis que la seconde (amorces P1 et P3) amplifie le fragment de gène si la cassette néomycine est absente et révèle donc la présence de l'allèle sauvage.

Figure 62. Schéma du principe du génotypage.

A. structure des loci sauvage et recombiné ; positions des amorces ; B. Génotype déterminé par le profil PCR ; C. Exemple de résultats obtenus suite à l'analyse sur gel d'agarose 1.2% des ADN génomiques amplifiés par PCR. En haut, la PCR effectuée avec les amorces P1 et P2 amplifie des fragments de 250 paires de bases (pb). En bas, la PCR réalisée avec les amorces P1 et P3 génère des fragments de 500 paires de bases. (f = femelle ; m = mâle ; -/+ = hétérozygote)



1.2. Elevage de la colonie

La lignée a été redériver par transfert d'embryon, à Toronto avant de nous être transmise. Les deux couples fondateurs, après passage en quarantaine au CDTA d'Orléans, qui ont servi à amplifier la colonie, sont constitués chacun d'une femelle hétérozygote pour la mutation *pak3*- (-/X = -/+) et d'un mâle muté (-/Y). Ceci nous a permis d'obtenir en première génération, des femelles -/- et -/+, ainsi que des mâles -/Y et +/Y. Nous amplifions la colonie par des croisements entre des femelles hétérozygotes -/+ et des mâles sauvages +/Y. Nous avons amplifié cette colonie car nous étions le seul laboratoire à disposer de cette lignée en Europe et Zhengping Jia nous a demandé de distribuer cette lignée à d'autres laboratoires pour les études développementales. Par ailleurs, nous avons généré des femelles homozygotes sauvages +/+ et mutées -/-, afin d'obtenir des portées d'embryons sauvages ou mutés suite à des croisements avec des mâles +, ou -, respectivement, nécessaires aux analyses rapportées en parties Résultats I.1. et II.2. Nous avons de ce fait observé que les femelles -/- sont fertiles et capables d'élever leurs petits normalement.

Enfin, nous avons transféré la mutation sur le fond génétique C57BK/6N par back-cross successifs sur 10 générations, par croisement de mâles mutés -/Y avec des femelles homozygotes sauvages +/+.

L'élevage est réalisé en zone EOPS (Exempte d'Organismes Pathogènes Spécifiques) afin d'écartier toute contamination et de faciliter le transfert à d'autres animaleries. J'ai pris en charge en Janvier 2010 l'organisation et le suivi de la colonie, ainsi que les PCR de génotypage et ceci pendant environ 3 ans

1.3. Génotypage des souris *pak3*-

Deux réactions de polymérisation en chaîne (PCR) sont effectuées avec deux couples d'amorces différents, dont les séquences sont présentées ici : P1 5'-GAGTCAATTGCTTCACCAGCTG-3' ; P2 5'-GGGGGAAGTTCCTGACTAGG-3' ; P3 5'-GAAGTATGTGCGCACCAATGAC-3'. P1 est située dans l'exon 6, P2 dans la cassette néomycine et P3 dans la partie intronique (Figure 62).

Dans un premier temps, nous avons réalisé un protocole classique. Un petit morceau de queue de la souris à génotyper est lysé toute la nuit à 55°C dans le tampon Tris-HCl pH 7.8, 50 mM, EDTA 5 mM, NaCl 200 mM, contenant du SDS (1% w/v) et de la protéinase K (25 µl/0.5 ml d'une solution à 20 mg/ml (avec une activité spécifique supérieure à 32 U/Anson/mg) (Eurobio, France)). Le lysat est ensuite centrifugé 10 minutes à 10000 g à température ambiante. Le surnageant est transféré et l'ADN est précipité en ajoutant 100 µL de NaCl 5M et 800 µl d'éthanol 95%. Le flocon d'ADN génomique qui se forme immédiatement est prélevé puis transféré dans 100 µl d'eau stérile. Nous réalisons une PCR à partir de 2 µl de chaque échantillon d'ADN. Le mélange PCR est le suivant : Green Gotaq Flexi Buffer (Promega), 2mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP, 0.6 µM d'amorce P1, 0.6 µM d'amorce P2 ou P3, 0.02u/µl Gotaq DNA Polymerase (Promega) dans un volume de 20 µl. La PCR est réalisée grâce au thermocycleur Eppendorf qui initie l'amplification pendant 3 min à 94°C. La PCR s'effectue ensuite en 32 cycles, décomposés en dénaturation (30 sec à 94°C)-hybridation (1 min à 60°C)-élongation (1 min à 72°C). La procédure se finit par une terminaison de l'élongation à 72°C pendant 10 min. Les échantillons sont alors conservés à 4°C.

Dans le but d'accélérer cette étape et de diminuer le temps d'expérimentation, nous avons testé un nouveau kit de génotypage (Phire Animal Tissue Direct PCR kit, Finnzymes). Pour cela, nous avons prélevé le plus petit morceau (0.5 mm de diamètre) de queue possible grâce au perforateur « Harris Uni-core, Sigma ». Cet échantillon est traité (digestion et précipitation de l'ADN) grâce au kit Phire Animal Tissue Direct PCR de Finnzymes, puis incubé pendant 2 min à 98°C. La PCR est directement réalisée à partir de 2 µl de cet échantillon d'ADN et le mélange réactionnel de 50 µl est le suivant : Phire Animal Tissue PCR Buffer, 0.5 µM d'amorce P1, 0.5 µM d'amorce P2 ou P3, 1µl de Phire Hot Start II DNA Polymerase (de concentration initiale inconnue), H₂O qsq 50µl. La PCR est réalisée grâce au thermocycleur qui initie l'amplification pendant 5 min à 98°C. La PCR s'effectue ensuite en 40 cycles, décomposés en dénaturation (5 sec à 98°C)-hybridation (5 sec à 53°C)-élongation (20 sec à 72°C). La procédure se finit par une terminaison de l'élongation à 72°C pendant 1 min. Les échantillons sont alors conservés à 4°C.

Enfin, nous avons essayé un troisième protocole de génotypage, qui est moins coûteux et plus rapide. Toutefois son utilisation demande une certaine habileté. Nous prélevons le plus petit morceau (0.5mm de diamètre) de queue possible grâce au perforateur « Harris Uni-core ». Cet échantillon est ensuite digéré dans 200 µl de soude 50 mM 20 minutes à 95°C. La solution est neutralisée par ajout de 30 µl de Tris-HCl 1M pH 7.6. La PCR est réalisée à partir de 5 µl de d'ADN. Le mélange réactionnel de PCR et les conditions appliquées par le thermocycleur sont les mêmes que ceux établis pour le premier protocole de génotypage.

L'analyse de l'amplification de l'ADN obtenue suite à la PCR est réalisée par électrophorèse sur gel d'agarose (1.2%). Les échantillons sont déposés et la migration s'effectue à 50V pendant 5 minutes puis 100V. Une procédure de traçabilité de ce génotypage a été mise en place, par archivage de nos acquisitions, afin de pouvoir retrouver le génotype de chacune de nos souris.

1.4. Vérification de l'absence de protéine PAK3 chez les souris *pak3*-

La protéine putative codée par le gène remanié dans la lignée transgénique aurait une masse moléculaire de 24 kDa. Elle n'a pas été détectée dans la première étude publiée (Meng et al., 2005). Il est possible que la mutation non-sens induise un mécanisme d'élimination du messenger *pak3* par le système du Nonsense-mediated mRNA decay (Mühlemann et al., 2008), conduisant ainsi à une absence totale de la traduction de la protéine PAK3.

D'autre part, comme cela a été présenté dans l'introduction, il y a une difficulté à faire concorder les résultats obtenus avec les souris invalidées pour le gène *pak3* avec ceux obtenus avec les modèles expérimentaux en tranche ou en neurones cultivés. Une possibilité serait que l'invalidation du gène *pak3* par le groupe de Jia donne naissance à une protéine tronquée qui pourrait soit exécuter les fonctions propres à la partie N-terminale de la protéine, soit avoir un effet dominant négatif sur les protéines PAK endogènes codées par les gènes *pak1* et *pak2*. Ceci justifie le fait que nous ayons entrepris de rechercher la présence de protéine PAK3 dans les souris invalidées pour le gène *pak3*.

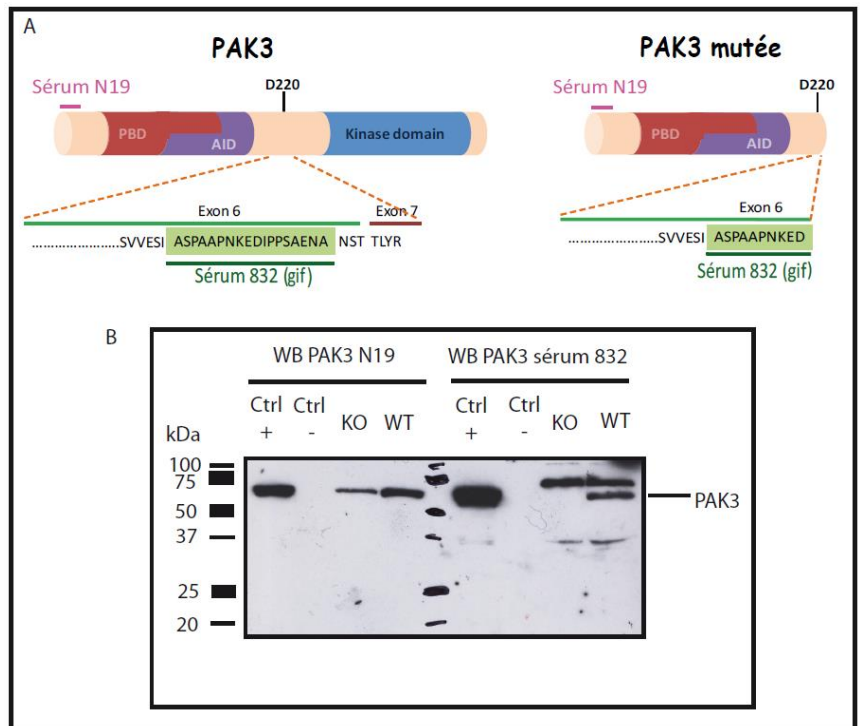
Pour cela, nous avons réalisé des western blots avec l'anticorps PAK3-N19 dirigé contre la partie N-terminale de la protéine, et le sérum PAK3-832 dirigé contre un épitope central de la

protéine. Les cerveaux de souris mâles sauvage (+/Y) et muté (-/Y) ont été lysés en conditions dénaturantes. Les lysats sont dosés avant d'être analysés par électrophorèse SDS-PAGE.

Nous observons bien la présence de la protéine de 65 kDa dans le lysat du cerveau de la souris sauvage et son absence dans le lysat de cerveau de la souris invalidée. Ce résultat est obtenu avec les deux anticorps dont nous disposons. Cependant, l'analyse réalisée avec l'anticorps N19 révèle la présence d'une bande de faible intensité de poids moléculaire légèrement plus élevé qui correspond certainement à PAK1. Ce résultat nous indique que l'anticorps N19 croise avec PAK1 et n'est donc pas complètement spécifique, nous obligeant à l'avenir, à être prudent dans l'analyse des résultats obtenus lors de l'utilisation de celui-ci. Par ailleurs, nous n'observons pas de bandes de 24 kDa dans le lysat de cerveau de la souris invalidée, confirmant ainsi les résultats publiés par Meng, quel que soit l'anticorps utilisé (Figure 63).

Figure 63. Les souris invalidées pour le gène pak3 ne présentent pas la protéine PAK3 tronquée.

A. Localisation des épitopes des anticorps N19 et 832 et schéma des protéines PAK3 WT et putative.
 B. Résultats des western blots réalisés avec l'anticorps N19 (à gauche) et 832 (à droite) sur les cerveaux de souris sauvage (WT) ou invalidée pour le gène pak3 (KO). Le contrôle positif (ctrl+) correspond à des cellules HeLa transfectées avec un plasmide PAK3-flag. Le contrôle négatif (ctrl-) est constitué par des cellules non transfectées. 40 µg de protéines ont été déposés dans chaque puits.



1.5. Recherche d'une éventuelle compensation par la kinase PAK1 de l'invalidation du gène pak3

Les travaux de Lei (2000) et de Parrini (2002) ont révélé l'existence d'homodimères PAK1 *in vitro* et *in vivo*. Les kinases PAK1 et PAK3 présentent de très fortes identités de séquences. De façon intéressante, Gaëlle Combeau, qui a effectué sa thèse dans mon équipe, a démontré l'existence d'hétérodimères PAK1/PAK3 dans le cerveau.

Nous avons cherché à déterminer si l'absence de PAK3 est compensée par une augmentation de l'expression de PAK1 ou bien, au contraire, si cette absence déstabilise la kinase PAK1. Pour cela,

les cerveaux de souris mâles âgées de 20 et 90 jours +/Y et -/Y ont été lysés en conditions dénaturantes. Les protéines sont dosées puis les lysats sont analysés par SDS-PAGE.

L'analyse montre que l'expression de PAK1 est identique chez la souris sauvage et celle mutée âgées de 20 jours. Cependant, chez les souris âgées de 90 jours, nous détectons moins la protéine PAK1 dans les KO que dans les WT (Figure 64). De ce premier résultat préliminaire, nous avançons l'hypothèse que l'absence de PAK3 entraîne une déstabilisation de PAK1, qui pourrait vraisemblablement être dégradée.

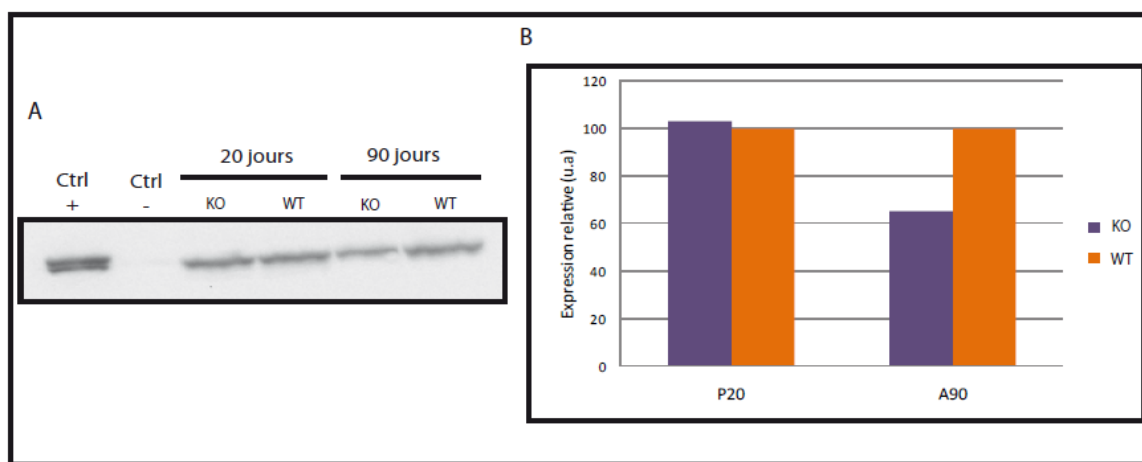


Figure 64. Les souris invalidées pour le gène *pak3* présentent une diminution de l'expression de PAK1 à 90 jours.

A. Résultat des western blots réalisés avec l'anticorps PAK1-N20 sur les cerveaux de souris sauvage (WT) ou invalidée pour le gène *pak3* (KO) âgées de 20 jours (P20) et 90 jours (A90). Le contrôle positif (ctrl +) correspond à des cellules HeLa transfectées avec un plasmide PAK1-flag. Le contrôle négatif (ctrl -) est constitué par des cellules COS7 transfectées avec un plasmide eGFP. 50 µg de protéines ont été déposés dans chaque puits. B. Expression relative de PAK1, exprimée en unité arbitraire (u.a.). L'intensité du signal de l'individu muté est rapportée à celle de l'individu sauvage au même âge. (expérience réalisée une fois). 50 µg de protéines ont été déposés dans chaque puits.

2. Description de la lignée *pak3* Knock in R67C

Un vecteur de recombinaison a été construit en clonant un fragment d'ADN génomique de 9 kbp englobant l'exon codant 2 de *pak3* provenant de la bibliothèque de cosmides issue de la souris C57BL/6N. Ce fragment inclut un bras d'homologie en 5' de 4.5 kbp, un bras d'homologie en 3' de 3.5 kbp et un fragment modifié de 0.6 kbp qui a été sous-cloné pour muter le codon CGC, codant pour un résidu Lysine en position 67, par le codon TGC, codant pour une Cystéine, par mutagenèse dirigée. Une cassette néomycine entre deux sites loxP a été insérée dans les séquences introniques en aval l'exon 2. Le vecteur linéarisé a été électroporé dans une ligne ES (MCI-C57BL/6N). 361 clones résistant à la néomycine ont été sélectionnés pour la recombinaison homologue par PCR et 5 clones positifs ont été confirmés par Southern blot après digestion de l'ADN génomique par les enzymes de restriction *Asel* et *NdeI* pour valider l'insertion du bras d'homologie en 5', et par les enzymes *SexAI* et *XcmI* pour valider l'insertion du bras d'homologie en 3'. La génération F1, qui possède la couleur du

pelage caractéristique du fond génétique des cellules ES, est contrôlée par PCR pour la transmission de la mutation à la lignée germinale et confirmée par Southern Blot. Afin d'éliminer le marqueur de sélection positive, les souris F1 âgées de 8 semaines ont été croisées avec des souris C57BL/6 exprimant la recombinaison Cre. La ségrégation du gène cible et des allèles de la recombinaison Cre a également été contrôlée par Southern blot. Un produit de PCR englobant les séquences génomiques comprenant l'exon codant 2 de *pak3* a été cloné dans le vecteur Topo-pCRII (Invitrogen) et l'insert a été séquencé pour vérifier la présence de la mutation T>C dans la séquence codante de l'exon 2, introduisant ainsi la mutation R67C. Nous avons également vérifié sur l'amplification de l'exon que cette mutation supprime le site de restriction HhaI, comme initialement décrit par Bienvenu et al., en 2000. Les souris des différents génotypes de la colonie *pak3*-R67C sont viables et fertiles. Les souris sont génotypées par PCR en utilisant deux amorces englobant la séquence lox (amorce sens-GTGGGTTTTTGTATGCAGTCACCGG et amorce anti-sens CAAATTTTGCAGAGACTTTGGCACTG).

Les soins apportés aux animaux, ainsi que l'ensemble des expérimentations animales, ont été pratiqués selon les recommandations du Comité d'éthique en matière d'expérimentation animale, Paris-Centre et Sud, N° 59, en conformation avec les directives institutionnelles, et sous la surveillance d'un vétérinaire. Brièvement, les animaux sont élevés dans des conditions approuvées, dans des cages individuellement aérées avec trois à cinq animaux à chaque cage, et suivant un cycle jour/nuit de 12 heures. La nourriture et l'eau sont dispensées *ad libitum*. Pour l'analyse biochimique et la purification des cellules souches, tous les animaux ont été sacrifiés par dislocation cervicale, par un opérateur formé. Pour l'analyse de la neurogenèse adulte *in vivo* dans la SVZ et le DG, voir ci-dessous.

3. Culture des neurones d'hippocampes

Deux femelles homozygotes, l'une sauvage et l'autre mutée, sont sacrifiées au 17^{ème} jour de gestation. L'utérus est prélevé puis le cerveau de chaque embryon est prélevé puis rincé dans du PBS froid. Les hippocampes sont ensuite disséqués.

Les neurones sont mis en culture sur lamelles selon le protocole suivant. Une dissociation mécanique à la pipette Pasteur rodée est réalisée en présence de trypsine (GIBCO Trypsine-EDTA 0.05%, #25300-054). Des lamelles sontensemencées de manière à obtenir 0.6×10^6 cellules/boîte. Des lamelles de verre préparées la veille, contenues dans des boîtes de culture Greiner de 60 mm, sont préalablement recouvertes avec de la polyornithine (PORN Sigma, #P3655-50MG-PORN) concentrée à 0.5 mg/mL. La culture s'effectue dans une étuve à 37°C avec 5% de CO₂. Dans un premier temps, les neurones sont cultivés en milieu MC+ (Neurobasal medium Gibco 21103, B27 Gibco 17504-44, 10% sérum de veau fœtal, Glutamax Gibco 2009-06, 25µM Acide glutamique, 1% Antibiotiques), puis à J4, un antimétabolite, le 1-β-Arabinofuranosylcytosine (AraC) à une concentration de 5 µM est ajouté afin de limiter les proliférations gliales ; le milieu est remplacé par du milieu MC (Neurobasal medium Gibco, B27 Gibco, Glutamax Gibco, 1% Antibiotiques). Le milieu est ensuite renouvelé par moitié tous les quatre jours. Les neurones, préalablement rincés au PBS, sont fixés dans une solution de paraformaldéhyde (PFA) 4% dilué en tampon phosphate 0.12 M pH 7.4 pendant 10 minutes, à température ambiante et à l'obscurité. L'excès de PFA est ensuite éliminé par de multiples rinçages au PBS puis les lamelles sont stockées à 4°C dans du PBS.

Certaines lamelles sont transfectées avec le plasmide pEGFP-PSD95 à une concentration de 1 µg/µl, grâce à la Lipofectamine 2000 (1 mg/ml, Invitrogen, #11668-027). Cette transfection est réalisée à J4 ou à J11 puis les neurones sont fixés (suivant les mêmes conditions que celles décrites précédemment) 3 jours après, afin que le plasmide puisse s'exprimer. Le plasmide a été produit dans des conditions minimisant la présence d'endotoxines grâce à des colonnes échangeuses d'ions Macherey-Nagel (Midi-prep Endotoxines-free).

4. Culture cellulaire et neurosphere assay.

Les *neurosphères* sont préparées à partir de la zone sous-ventriculaire et du gyrus denté isolés d'individus nouveau-nés (P0-P4). Des tranches de cerveau de 500µm d'épaisseur sont obtenues en utilisant un Tissue Chopper (McIlwain) et collectées dans du milieu de dissection froid (HBSS, 25 mM glucose, 15mM HEPES, 100U/ml pénicilline, 100µg/ml streptomycine). Les deux zones neurogéniques sont isolées grâce à des loupes binoculaires de dissection et collectées séparément. Les tissus ainsi micro-disséqués sont ensuite dissociés en suspension uni-cellulaire après 60 minutes d'incubation dans une solution enzymatique (0.1mg/ml papain, 1mg/ml dispase II, 0.1mg/ml DNaseI) à 37°C, sous agitation mécanique (Imbeault et al., 2010). Les progéniteurs sont ensemencés en plaques 24 puits non traitées pour la culture cellulaire (1600 cellules/cm² pour la SVZ and 1000 cellules/cm² pour le DG). Les neurosphères primaires sont obtenues après 5 à 7 jours de culture et analysées (nombre et diamètre) ou dissociées en utilisant le kit "NeuroCult Chemical Dissociation Kit", suivant les recommandations du fournisseur (StemCell Technologies), afin de générer des neurosphères secondaires.

Les *monocouches* de précurseurs neuraux, isolés à partir de zone sous-ventriculaire et de gyrus denté, sont préparées à partir d'un pool de quatre cerveaux de souris adultes mâles ou de 4 à 6 cerveaux de nouveau-nés (P0-P4). Les cerveaux adultes sont sectionnés en utilisant une matrice de sections coronales (tranches de 500µm d'épaisseur), tandis que les cerveaux de nouveau-nés sont sectionnés comme expliqué ci-dessus. Les tranches sont collectées dans du milieu de dissection froid (supplémenté en HBSS). Les deux zones neurogéniques sont isolées grâce à des loupes binoculaires de dissection et collectées séparément. Les tissus ainsi micro-disséqués sont ensuite dissociés en suspension uni-cellulaire après 20 minutes d'incubation dans une solution enzymatique (2.5U/ml papain, 1U/ml dispase, 250U/ml DNase) à 37°C, sous agitation mécanique (Babu et al., 2007). Ensuite, les précurseurs neuraux sont séparés des cellules différenciées, de la myéline et de la matrice extracellulaire, en appliquant un gradient de séparation de Percoll 22% obtenu après centrifugation, après (Babu et al, 2011). Le culot de cellules est séparé du surnageant, lavé puis remis en suspension dans du milieu de culture (DMEM/F12 supplémenté avec du Glutamax, 2% B27 and 20ng/ml EGF et FGF2) et les cellules sont ensemencées dans des boîtes de cultures traitées (20µg/ml poly-D-Lysine suivi de 10µg/ml laminine). 4 jours après l'extraction des cellules, 75% du milieu de culture est changé tous les deux jours. Les cultures sont maintenues jusqu'à 80% de confluence maximum puis passées.

5. PCR quantitative

5.1. Analyse de l'expression des gènes Pak3, Bdnf, VGlut et Viaat

(Extrait du manuscrit de Farley et al., en préparation)

Les hippocampes sont disséqués à partir de cerveaux de souris mâles wt et *pak3-KO* adultes âgés de 3 mois, puis congelés en azote liquide et stockés à -80°C. Les hippocampes congelés sont broyés et transférés dans du Trizol (Invitrogen, France), étapes suivies des procédures standard utilisant le chloroforme et l'isopropanol, afin d'extraire les ARN. Les concentrations d'ARN sont déterminées par spectrophotométrie (SmartSpec 3000, Bio-rad). Pour la PCR quantitative, 1 µg d'ARN totaux extraits est rétro-transcrit à 42°C pendant 1 heure en présence de 50 µg/ml random primers, 2mM de chacun des dNTPs, de RNasin et de M-MLV reverse-transcriptase (Promega). Les réactions de PCR quantitative ont été réalisées avec un CFX96 Real-Time System C1000 Thermal Cycler (Bio-rad), en utilisant le kit réactionnel Fast SYBR Green Master Mix kit (Applied Biosystems), selon des recommandations du fournisseur. Les expressions de chaque échantillon sont analysées en triplicat et normalisées par rapport aux expressions des gènes de référence *Hprt1* and *Pgm1*. Ces deux gènes, *Hprt1* and *Pgm1*, ont été choisis en raison de leurs niveaux d'expression comparables à ceux des gènes d'intérêt. Le kit d'amorces Pak3 provient de Qiagen (QuantiTect Primer Assay: Mm_Pak3-1-SG; QT00119560) et a été utilisé suivant les instructions du fournisseur. Le mix réactionnel est soumis au schéma de PCR suivant : une première étape de dénaturation est suivie de 40 cycles comprenant une étape de dénaturation à 95°C pendant 3 secondes et une étape de fixation des amorces et d'élongation du fragment à amplifier à 60°C pendant 30 secondes. Une dernière étape de dissociation des amorces permet de déterminer l'uniformité du produit de PCR quantitative. Les données ont été analysées avec le logiciel CFX Manager Software, 2.1 (Bio-rad), qui tient compte de la variabilité de l'expression de chaque gène de référence et d'intérêt afin de déterminer une significativité statistique. Tous les échantillons sont testés en triplicat pour chaque gène (de référence et d'intérêt), et pour chaque triplicat, une moyenne de la valeur du Cycle Threshold (Cq) est donnée. Les variations de l'expression relative des gènes d'intérêt (ΔCq) sont calculées après normalisation avec l'expression des gènes contrôles *Hprt1* and *Pgm1* puis le $\Delta\Delta Cq$ est calculé.

5.2. Analyse de l'expression des gènes Pak3, Dcx, Nestin

Les ARN purifiés avec le kit Macherey-Nagel à partir des sphères ou des monocouches sont quantifiés avec le Nanodrop et leur qualité vérifiée par électrophorèse capillaire avec l'Experion (BioRad). Les ARN sont rétrotranscrits avec la iScript (Biorad) et les PCR sont réalisées avec le mix de SyberGreen (SSoAdvance de Biorad). Les deux gènes de références sont *Pgk1* et *B2*. Les PCR sont réalisées avec le CFX de BioRad et analysées avec le logiciel CFX Manager, suivant les recommandations du fournisseur.

Primer	Séquence
Dcx-F	CCCCAGTCCTTGGCTAGCAGC
Dcx-R	GCCTTCCGTGGCTTACCCC
Sox2-F	CGCGGCGGAAAACCA
Sox2-R	CCTCCGGGAAGCGTGTACT
Bmi-F	CGAACAACCAGAATCAAGATC
Bmi-R	CTGGTCTCCAAGTAACGTAC
B2m-F	CCGCCTCACATTGAAATCCA
B2m-R	TCGATCCCAGTAGACGGTCTTG
Pgk1-F	CTGACTTTGGACAAGCTGGACG
Pgk1-R	GCAGCCTTGATCCTTTGGTTG
Nestin-F	CTTTCTGACCCCAAGCTGA
Nestin-R	TGAGGACAGGGAGCACAGATC

6. Western blotting et immunoprécipitation

Pour les immunoprécipitations de lysats totaux de cerveaux, deux cerveaux de souris mâles adultes âgés de 2 mois sont disséqués, coupés en petits morceaux avec un scalpel puis homogénéisés à l'aide d'un homogénéiseur de Dounce (10 aller-retours) dans du tampon de lyse (10 volumes/poids soit i.e. 10 ml/1 gr ; Tris 10 mM, pH 8.0, 0.5 mM DTT, supplémenté avec un cocktail d'inhibiteurs de protéases et de phosphatases) comme décrit dans l'article de Combeau et al., 2012. Le lysat est centrifugé à 100000g pendant 30 min à 4°C et la quantité de protéines dans le surnageant, correspondant au cytosol, est dosée par la méthode de Folin ou la méthode de Bradford. Le culot de membrane est remis en suspension dans du tampon de lyse supplémenté avec 2% SDS, soniqué et centrifugé (100000g, 30 min, 4°C). La quantité de protéines dans la fraction S2 solubilisée avec le SDS est déterminée par la méthode de Lowry. Aucune différence de purification de PAK1 et PAK3 dans les fractions cytosolique ou membranaire n'a été observée dans les cerveaux de souris knock-in, par rapport aux cerveaux de souris WT (données non présentées).

Pour les immunoprécipitations des lysats de culture cellulaire, les cellules cultivées en boîte de 35mm de diamètre sont rincées deux fois avec du PBS froid (phosphate-buffered saline) puis lysées avec 50µl de tampon de lyse froid (50 mM Tris-HCl, 1% Triton X-100, 100 mM NaCl, 50 mM NaF, 10 mM Na₄P₂O₇, 5 mM EDTA, 1% aprotinin, 1 mM 4-(2-aminoethyl)-benzenesulfonylfluoride (Pefabloc SC, Interchim), pH 7.5). Le lysat est clarifié par centrifugation à 13 000 g, pendant 10 min, à 4°C. L'expression de DCX est directement analysée par western blot et la quantité de protéines chargée est vérifiée par un western blot anti-actine. Pour l'expression de PAK3, la protéine PAK3 est immunoprécipitée avec un anticorps dirigé contre PAK3 et produit chez la chèvre (Santa-Cruz, SC N19) puis révélée avec un anticorps spécifique de PAK3 produit chez le lapin (Abcam).

7. Méthodes d'étude de la neurogenèse adulte

Les animaux sont traités en accord avec la législation européenne et avec la demande d'accord au comité d'éthique dont dépend notre institut déposée en 2014.

7.1. Administration du BrdU

Afin d'étudier la neurogenèse adulte dans le DG, à J0, les souris mâles mutées et les contrôles de même fratrie ont reçu des injections intrapéritonéales espacées de deux ou quatre heures (comme précisé dans les résultats) d'une solution de 50 ou 100 mg/kg de 5-Bromo-2'-déoxyUridine (BrdU, Sigma France) diluée dans une solution de NaCl (10 mg/ml). Les animaux sont anesthésiés après 2 heures, 7 jours ou 28 jours post-injections avec une injection intrapéritonéale de pentobarbital pur puis perfusés en intracardiaque avec une solution de paraformaldéhyde (4%). Les cerveaux sont ensuite post-fixés puis transférés dans des solutions de sucrose (20%) puis congelés et conservés à -20°C. Ils sont ensuite coupés au cryostat à -20°C en section coronale de 14 µm d'épaisseur et conservés à -20°C.

7.2. Immunohistochimie

La révélation de l'incorporation de BrdU est réalisée sur coupes de 14µm. Après séchage et plusieurs rinçages de PBS, les coupes sont incubées 30 minutes à 98°C dans une solution de démasquage (Dako). Après refroidissement, les coupes sont rincées au PBS, puis perméabilisées pendant 30 minutes avec une solution de Triton-X100 0,5% (en PBS). Après rinçage au PBS, les coupes sont incubées avec de la pepsine 0,125% (diluée avec une solution d'HCl 0,1N) pendant 3 minutes, rincées puis incubées en solution de blocage (BSA 1%, Triton X100 0,1 %, sérum de chèvre 5 %) pendant 1h30 avant l'étape d'incubation avec l'anticorps primaire anti-BrdU (1/100 ; Abcys Eurobio), sur toute la nuit. Les coupes sont ensuite incubées 2 heures dans l'anticorps secondaire anti-rat biotinylé (1/200, Vector Laboratories) puis avec le complexe avidine-biotine-peroxidase (ABC Elite Kit ; Vector Laboratories) pendant 30 min. Enfin, la révélation du BrdU se fait par une réaction avec la 3,30-diaminobenzidine-tetrahydrochloride (Sigma) à 0.06% dans une solution 0,03% NiCl₂ et 0,03% H₂O₂ en tampon Tris (0,05 M, pH7,6). Les sections sont ensuite déshydratées par bains graduels d'éthanol puis montées en DEPEX.

Afin d'analyser l'état de maturation neuronale des cellules BrdU positives, deux types de doubles marquages en immunofluorescence ont été réalisés. Nous avons utilisé la *Doublecortine* (DCX) pour marquer les neurones immatures et *NeuN*, pour les neurones matures.

La survie des cellules nouveau-nées est analysée par quantification des cellules marquées (BrdU+) à l'aide d'un microscope optique (Olympus BX60) et l'utilisation d'un logiciel d'acquisition et d'analyse d'images Mercator Pro (Exploranova, La Rochelle). Notre quantification se fait sur un échantillon de 4 sections espacées de 4 sections pour la SVZ (de à 1.70 mm à 0.26 mm par rapport au Bregma), de 4 sections espacées de 4 sections pour le bulbe olfactif (de 4.6 mm à 3.56 mm par rapport au Bregma) et de 7 sections espacées de 3 sections pour le DG (de -1.34 mm à -2.92 mm par rapport au Bregma). Le logiciel nous permet de tracer le contour du gyrus denté et de sa couche granulaire, ainsi que la SVZ, le bulbe olfactif, à l'objectif X20 et d'en former une maquette. Le logiciel calcule alors la surface de ces différentes zones puis leur volume, selon une équation stéréologique conventionnelle. La densité (nombre de cellules/µm²) et le nombre de cellules total sont calculés. Nous donnons les moyennes pour chaque groupe expérimental. Les différences statistiques sont obtenues après test de Student.

L'analyse de la maturation neuronale a été réalisée à l'aide d'un microscope confocal (Zeiss LSM 700) et d'un logiciel d'analyse d'image (Zen2000). Tout comme la quantification des cellules BrdU+, les colocalisations entre les deux marqueurs ont été analysées à l'objectif X40 en z-stack sur 30 cellules BrdU+ par animal pour le point 7 jours et 20 cellules pour le point 28 jours, et les données ont été exprimées en pourcentage de cellules doublement positives par rapport aux cellules BrdU+.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références Bibliographiques

- Abo, A., Qu, J., Cammarano, M. S., Dan, C., Fritsch, A., Baud, V., Belisle, B., and Minden, A. (1998) PAK4, a novel effector for Cdc42Hs, is implicated in the reorganization of the actin cytoskeleton and in the formation of filopodia. *Embo J* 17, 6527–6540
- Afroze, B., and Chaudhry, B. (2013) Genetics of non-syndromic autosomal recessive mental retardation. *J. Pak. Med. Assoc.* 63, 106–110
- Aguirre, A., Rubio, M. E., and Gallo, V. (2010) Notch and EGFR pathway interaction regulates neural stem cell number and self-renewal. *Nature* 467, 323–327
- Aimone, J. B., Deng, W., and Gage, F. H. (2011) Resolving new memories: a critical look at the dentate gyrus, adult neurogenesis, and pattern separation. *Neuron* 70, 589–596
- Alexson, T. O., Hitoshi, S., Coles, B. L., Bernstein, A., and van der Kooy, D. (2006) Notch signaling is required to maintain all neural stem cell populations—irrespective of spatial or temporal niche. *Dev Neurosci* 28, 34–48
- 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) PAK3 mutation in nonsyndromic X-linked mental retardation. *Nat Genet* 20, 25–30
- Altman, J. (1962) Are new neurons formed in the brains of adult mammals? *Science* (80-). 135, 1127–8
- Altman, J., and Das, G. D. (1965) Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol* 124, 319–35
- Altman, J., and Das, G. D. (1967) Postnatal neurogenesis in the guinea-pig. *Nature* 214, 1098–101
- Ambrogini, P., Orsini, L., Mancini, C., Ferri, P., Ciaroni, S., and Cuppini, R. (2004) Learning may reduce neurogenesis in adult rat dentate gyrus. *Neurosci. Lett.* 359, 13–6
- Ammar, M.-R., Humeau, Y., Hanauer, A., Nieswandt, B., Bader, M.-F., and Vitale, N. (2013) The Coffin-Lowry syndrome-associated protein RSK2 regulates neurite outgrowth through phosphorylation of phospholipase D1 (PLD1) and synthesis of phosphatidic acid. *J Neurosci* 33, 19470–9
- Anderson, M. L., Sisti, H. M., Curlik, D. M., and Shors, T. J. (2011) Associative learning increases adult neurogenesis during a critical period. *Eur. J. Neurosci.* 33, 175–81
- Arber, S., Barbayannis, F. A., Hanser, H., Schneider, C., Stanyon, C. A., Bernard, O., and Caroni, P. (1998) Regulation of actin dynamics through phosphorylation of cofilin by LIM-kinase. *Nature* 393, 805–9
- Arias-Romero, L. E., and Chernoff, J. (2008) A tale of two Paks. *Biol Cell* 100, 97–108
- Asrar, S., Meng, Y., Zhou, Z., Todorovski, Z., Huang, W. W., and Jia, Z. (2009) Regulation of hippocampal long-term potentiation by p21-activated protein kinase 1 (PAK1). *Neuropharmacology* 56, 73–80
- Azari, H., Osborne, G. W., Yasuda, T., Golmohammadi, M. G., Rahman, M., Deleyrolle, L. P., Esfandiari, E., Adams, D. J., Scheffler, B., Steindler, D. A., and Reynolds, B. A. (2011) Purification of immature neuronal cells from neural stem cell progeny. *PLoS One* 6, e20941
- Azim, K., Fischer, B., Hurtado-Chong, A., Draganova, K., Cantù, C., Zemke, M., Sommer, L., Butt, A., and Raineteau, O. (2014) Persistent Wnt/ β -catenin signaling determines dorsalization of the postnatal subventricular zone and neural stem cell specification into oligodendrocytes and glutamatergic neurons. *Stem Cells* 32, 1301–12
- Ba, W., van der Raadt, J., and Nadif Kasri, N. (2013) Rho GTPase signaling at the synapse: implications for intellectual disability. *Exp Cell Res* 319, 2368–74

Références Bibliographiques

- Babu, H., Claasen, J.-H., Kannan, S., Rünker, A. E., Palmer, T., and Kempermann, G. (2011) A protocol for isolation and enriched monolayer cultivation of neural precursor cells from mouse dentate gyrus. *Front Neurosci.* 5, 89
- Bagrodia, S., Taylor, S. J., Creasy, C. L., Chernoff, J., and Cerione, R. A. (1995) Identification of a mouse p21Cdc42/Rac activated kinase. *J Biol Chem* 270, 22731–7.
- Bagrodia, S., Taylor, S. J., Jordon, K. A., Van Aelst, L., and Cerione, R. A. (1998) A novel regulator of p21-activated kinases. *J Biol Chem* 273, 23633–23636
- Baird, D., Feng, Q., and Cerione, R. A. (2005) The Cool-2/alpha-Pix protein mediates a Cdc42-Rac signaling cascade. *Curr Biol* 15, 1–10
- Bannerman, D. M., Rawlins, J. N. P., McHugh, S. B., Deacon, R. M. J., Yee, B. K., Bast, T., Zhang, W.-N., Pothuizen, H. H. J., and Feldon, J. (2004) Regional dissociations within the hippocampus--memory and anxiety. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 28, 273–83
- Bassani, S., Folci, A., Zapata, J., and Passafaro, M. (2013) AMPAR trafficking in synapse maturation and plasticity. *Cell. Mol. Life Sci.* 70, 4411–30
- Bayin, N. S., Modrek, A. S., and Placantonakis, D. G. (2014) Glioblastoma stem cells: Molecular characteristics and therapeutic implications. *World J. Stem Cells* 6, 230–238
- Bear, M. F., Huber, K. M., and Warren, S. T. (2004) The mGluR theory of fragile X mental retardation. *Trends Neurosci.* 27, 370–7
- Bechara, E. G., Didiot, M. C., Melko, M., Davidovic, L., Bensaid, M., Martin, P., Castets, M., Pogoniec, P., Khandjian, E. W., Moine, H., and Bardoni, B. (2009) A novel function for fragile X mental retardation protein in translational activation. *PLoS Biol* 7, e16
- Ben Abdallah, N. M.-B., Slomianka, L., Vyssotski, A. L., and Lipp, H.-P. (2010) Early age-related changes in adult hippocampal neurogenesis in C57 mice. *Neurobiol. Aging* 31, 151–61
- Ben-Ari, Y. (2007) GABA, a key transmitter for fetal brain maturation. *Med. Sci.*
- Bergmann, O., Liebl, J., Bernard, S., Alkass, K., Yeung, M. S. Y., Steier, P., Kutschera, W., Johnson, L., Landén, M., Druid, H., Spalding, K. L., and Frisén, J. (2012) The age of olfactory bulb neurons in humans. *Neuron* 74, 634–9
- Berry-Kravis, E., Hessel, D., Coffey, S., Hervey, C., Schneider, A., Yuhas, J., Hutchison, J., Snape, M., Tranfaglia, M., Nguyen, D. V., and Hagerman, R. (2009) A pilot open label, single dose trial of fenobam in adults with fragile X syndrome. *J Med Genet* 46, 266–71
- Berry-Kravis, E. M., Hessel, D., Rathmell, B., Zarevics, P., Cherubini, M., Walton-Bowen, K., Mu, Y., Nguyen, D. V., Gonzalez-Heydrich, J., Wang, P. P., Carpenter, R. L., Bear, M. F., and Hagerman, R. J. (2012) Effects of STX209 (arbaclofen) on neurobehavioral function in children and adults with fragile X syndrome: a randomized, controlled, phase 2 trial. *Sci. Transl. Med.* 4, 152ra127
- Bienvendu, T., des Portes, V., McDonnell, N., Carrié, A., Zemni, R., Couvert, P., Ropers, H. H., Moraine, C., van Bokhoven, H., Fryns, J. P., Allen, K., Walsh, C. a, Boué, J., Kahn, A., Chelly, J., and Beldjord, C. (2000) Missense mutation in PAK3, R67C, causes X-linked nonspecific mental retardation. *Am J Hum Genet* 93, 294–8
- Blenis, J. (1993) Signal transduction via the MAP kinases: proceed at your own RSK. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 5889–92

Références Bibliographiques

- Bliss, T. V, and Gardner-Medwin, A. R. (1973) Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the unanaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J. Physiol.* 232, 357–74
- Bliss, T. V, and 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., Mas, C., and Muller, D. (2002) Activity-dependent regulation of genes implicated in X-linked non-specific mental retardation. *Neuroscience* 114, 13–7
- Boda, B., Alberi, S., Nikonenko, I., Node-Langlois, R., Jourdain, P., Moosmayer, M., Parisi-Jourdain, L., and Muller, D. (2004) The mental retardation protein PAK3 contributes to synapse formation and plasticity in hippocampus. *J Neurosci* 24, 10816–25
- Boda, B., Jourdain, L., and Muller, D. (2008) Distinct, but compensatory roles of PAK1 and PAK3 in spine morphogenesis. *Hippocampus* 18, 857–61
- Bokoch, G. M., Reilly, A. M., Daniels, R. H., King, C. C., Olivera, A., Spiegel, S., and Knaus, U. G. (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, G. M., Wang, Y., Bohl, B. P., Sells, M. A., Quilliam, L. A., and Knaus, U. G. (1996) Interaction of the Nck adapter protein with p21-activated kinase (PAK1). *J Biol Chem* 271, 25746–25749
- Bokoch, G. M. (2003) Biology of the p21-activated kinases. *Annu Rev Biochem* 72, 743–81
- Bonaguidi, M. A., Wheeler, M. A., Shapiro, J. S., Stadel, R. P., Sun, G. J., Ming, G. L., and Song, H. (2011) In vivo clonal analysis reveals self-renewing and multipotent adult neural stem cell characteristics. *Cell* 145, 1142–1155
- Bonaguidi, M. a, Song, J., Ming, G., and Song, H. (2012) A unifying hypothesis on mammalian neural stem cell properties in the adult hippocampus. *Curr Opin Neurobiol* 22, 754–61
- Bragado Alonso, S., Schulze-Steikow, M., and Calegari, F. (2014) Cell cycle activity of neural precursors in the diseased mammalian brain. *Front Neurosci.* 8, 39
- Braun, S. M. G., and Jessberger, S. (2014) Adult neurogenesis and its role in neuropsychiatric disease, brain repair and normal brain function. *Neuropathol Appl Neurobiol* 40, 3–12
- Brown, J. P., Couillard-Després, S., Cooper-Kuhn, C. M., Winkler, J., Aigner, L., and Kuhn, H. G. (2003) Transient expression of doublecortin during adult neurogenesis. *J Comp Neurol* 467, 1–10
- Bruel-Jungerman, E., Laroche, S., and Rampon, C. (2005) New neurons in the dentate gyrus are involved in the expression of enhanced long-term memory following environmental enrichment. *Eur. J. Neurosci.* 21, 513–21
- Bull, N. D., and Bartlett, P. F. (2005) The adult mouse hippocampal progenitor is neurogenic but not a stem cell. *J Neurosci* 25, 10815–21
- Burbelo, P. D., Drechsel, D., and Hall, A. (1995) A conserved binding motif defines numerous candidate target proteins for both Cdc42 and Rac GTPases. *J Biol Chem* 270, 29071–4.
- Buss, F., Kendrick-Jones, J., Lionne, C., Knight, A. E., Cote, G. P., and Paul Luzio, J. (1998) The localization of myosin VI at the golgi complex and leading edge of fibroblasts and its phosphorylation and recruitment into membrane ruffles of A431 cells after growth factor stimulation. *J Cell Biol* 143, 1535–1545
- Cahoy, J. D., Emery, B., Kaushal, A., Foo, L. C., Zamanian, J. L., Christopherson, K. S., Xing, Y., Lubischer, J. L., Krieg, P. a, Krupenko, S. a, Thompson, W. J., and Barres, B. a (2008) A transcriptome database

Références Bibliographiques

for astrocytes, neurons, and oligodendrocytes: a new resource for understanding brain development and function. *J Neurosci* 28, 264–78

Castrén, E., Elgersma, Y., Maffei, L., and Hagerman, R. (2012) Treatment of neurodevelopmental disorders in adulthood. *J Neurosci* 32, 14074–9

Castro, D. S., Martynoga, B., Parras, C., Ramesh, V., Pacary, E., Johnston, C., Drechsel, D., Lebel-Potter, M., Garcia, L. G., Hunt, C., Dolle, D., Bithell, A., Ettwiller, L., Buckley, N., and Guillemot, F. (2011) A novel function of the proneural factor *Ascl1* in progenitor proliferation identified by genome-wide characterization of its targets. *Genes Dev.* 25, 930–45

Causeret, F., Terao, M., Jacobs, T., Nishimura, Y. V., Yanagawa, Y., Obata, K., Hoshino, M., and Nikolic, M. (2009) The p21-activated kinase is required for neuronal migration in the cerebral cortex. *Cereb. Cortex* 19, 861–75

Chang, Q., Khare, G., Dani, V., Nelson, S., and Jaenisch, R. (2006) The disease progression of *Mecp2* mutant mice is affected by the level of BDNF expression. *Neuron* 49, 341–8

Chelly, J., and Mandel, J. L. (2001) Monogenic causes of X-linked mental retardation. *Nat Rev Genet* 2, 669–80.

Chiasson, B. J., Tropepe, V., Morshead, C. M., and van der Kooy, D. (1999) Adult mammalian forebrain ependymal and subependymal cells demonstrate proliferative potential, but only subependymal cells have neural stem cell characteristics. *J Neurosci* 19, 4462–71

Clarke, L., and van der Kooy, D. (2011) The adult mouse dentate gyrus contains populations of committed progenitor cells that are distinct from subependymal zone neural stem cells. *Stem Cells* 29, 1448–1458

Clelland, C. D., Choi, M., Romberg, C., Clemenson, G. D., Fagniere, A., Tyers, P., Jessberger, S., Saksida, L. M., Barker, R. A., Gage, F. H., and Bussey, T. J. (2009) A functional role for adult hippocampal neurogenesis in spatial pattern separation. *Science* 325, 210–3

Cobos, I., Borello, U., and Rubenstein, J. L. R. (2007) *Dlx* transcription factors promote migration through repression of axon and dendrite growth. *Neuron* 54, 873–88

Combeau, G., Kreis, P., Domenichini, F., Amar, M., Fossier, P., Rousseau, V., and Barnier, J.-V. (2012) The p21-activated kinase PAK3 forms heterodimers with PAK1 in brain implementing trans-regulation of PAK3 activity. *J. Biol. Chem.* 287, 30084–96

Costa, M. R., Ortega, F., Brill, M. S., Beckervordersandforth, R., Petrone, C., Schroeder, T., Gotz, M., and Berninger, B. (2011) Continuous live imaging of adult neural stem cell division and lineage progression in vitro. *Development* 138, 1057–1068

Cotteret, S., and Chernoff, J. (2006) Nucleocytoplasmic shuttling of Pak5 regulates its antiapoptotic properties. *Mol Cell Biol* 26, 3215–3230

Cotteret, S., Jaffer, Z. M., Beeser, A., and Chernoff, J. (2003) p21-Activated kinase 5 (Pak5) localizes to mitochondria and inhibits apoptosis by phosphorylating BAD. *Mol Cell Biol* 23, 5526–5539

Curtis, M. a., Kam, M., Nannmark, U., Faull, R. L. M., and Eriksson, P. S. (2007) Response to Comment on “Human Neuroblasts Migrate to the Olfactory Bulb via a Lateral Ventricular Extension.” *Science* (80-). 318, 393c–393c

Curtis, M. A., Kam, M., Nannmark, U., Anderson, M. F., Axell, M. Z., Wikkelsø, C., Holtås, S., van Roon-Mom, W. M. C., Björk-Eriksson, T., Nordborg, C., Frisén, J., Dragunow, M., Faull, R. L. M., and

Références Bibliographiques

Eriksson, P. S. (2007) Human neuroblasts migrate to the olfactory bulb via a lateral ventricular extension. *Science* 315, 1243–9

Dai, X., Iwasaki, H., Watanabe, M., and Okabe, S. (2014) Dlx1 transcription factor regulates dendritic growth and postsynaptic differentiation through inhibition of neuropilin-2 and PAK3 expression. *Eur. J. Neurosci.* 39, 531–47

Dan, I., Watanabe, N. M., and Kusumi, A. (2001) The Ste20 group kinases as regulators of MAP kinase cascades. *Trends Cell Biol* 11, 220–30.

David, D. J., Wang, J., Samuels, B. A., Rainer, Q., David, I., Gardier, A. M., and Hen, R. (2010) Implications of the functional integration of adult-born hippocampal neurons in anxiety-depression disorders. *Neuroscientist* 16, 578–91

De Ligt, J., Willemsen, M. H., van Bon, B. W. M., Kleefstra, T., Yntema, H. G., Kroes, T., Vulto-van Silfhout, A. T., Koolen, D. a, de Vries, P., Gilissen, C., del Rosario, M., Hoischen, A., Scheffer, H., de Vries, B. B. a, Brunner, H. G., Veltman, J. a, and Vissers, L. E. L. M. (2012) Diagnostic exome sequencing in persons with severe intellectual disability. *N. Engl. J. Med.* 367, 1921–9

Deacon, S. W., Beeser, A., Fukui, J. a, Rennefahrt, U. E. E., Myers, C., Chernoff, J., and Peterson, J. R. (2008) An isoform-selective, small-molecule inhibitor targets the autoregulatory mechanism of p21-activated kinase. *Chem. Biol.* 15, 322–31

Demars, M., Hu, Y.-S., Gadadhar, A., and Lazarov, O. (2010) Impaired neurogenesis is an early event in the etiology of familial Alzheimer's disease in transgenic mice. *J. Neurosci. Res.* 88, 2103–17

Dicthenberg, J. B., Swanger, S. a, Antar, L. N., Singer, R. H., and Bassell, G. J. (2008) A direct role for FMRP in activity-dependent dendritic mRNA transport links filopodial-spine morphogenesis to fragile X syndrome. *Dev. Cell* 14, 926–39

Döbrössy, M. D., Drapeau, E., Arousseau, C., Le Moal, M., Piazza, P. V., and Abrous, D. N. (2003) Differential effects of learning on neurogenesis: learning increases or decreases the number of newly born cells depending on their birth date. *Mol. Psychiatry* 8, 974–82

Dolan, B. M., Duron, S. G., Campbell, D. a, Vollrath, B., Shankaranarayana Rao, B. S., Ko, H.-Y., Lin, G. G., Govindarajan, A., Choi, S.-Y., and Tonegawa, S. (2013) Rescue of fragile X syndrome phenotypes in *Fmr1* KO mice by the small-molecule PAK inhibitor FRAX486. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 5671–6

Doll, C. a, and Broadie, K. (2014) Impaired activity-dependent neural circuit assembly and refinement in autism spectrum disorder genetic models. *Front. Cell. Neurosci.* 8, 30

Donega, V., van Velthoven, C. T. J., Nijboer, C. H., van Bel, F., Kas, M. J. H., Kavelaars, A., and Heijnen, C. J. (2013) Intranasal mesenchymal stem cell treatment for neonatal brain damage: long-term cognitive and sensorimotor improvement. *PLoS One* 8, e51253

Drapeau, E., Mayo, W., Arousseau, C., Le Moal, M., Piazza, P.-V., and Abrous, D. N. (2003) Spatial memory performances of aged rats in the water maze predict levels of hippocampal neurogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 14385–90

Dubos, A., Combeau, G., Bernardinelli, Y., Barnier, J.-V., Hartley, O., Gaertner, H., Boda, B., and Muller, D. (2012) Alteration of synaptic network dynamics by the intellectual disability protein PAK3. *J. Neurosci* 32, 519–27

Duffney, L. J., Wei, J., Cheng, J., Liu, W., Smith, K. R., Kittler, J. T., and Yan, Z. (2013) Shank3 deficiency induces NMDA receptor hypofunction via an actin-dependent mechanism. *J. Neurosci* 33, 15767–78

Références Bibliographiques

- Dugani, C. B., Paquin, A., Kaplan, D. R., and Miller, F. D. (2010) Coffin-Lowry syndrome: a role for RSK2 in mammalian neurogenesis. *Dev. Biol.* 347, 348–59
- Dummler, B., Ohshiro, K., Kumar, R., and Field, J. (2009) Pak protein kinases and their role in cancer. *Cancer Metastasis Rev* 28, 51–63
- Dupret, D., Montaron, M.-F., Drapeau, E., Arousseau, C., Le Moal, M., Piazza, P.-V., and Abrous, D. N. (2005) Methylazoxymethanol acetate does not fully block cell genesis in the young and aged dentate gyrus. *Eur. J. Neurosci.* 22, 778–83
- Dupret, D., Fabre, A., Döbrössy, M. D., Panatier, A., Rodríguez, J. J., Lamarque, S., Lemaire, V., Olié, S. H. R., Piazza, P.-V., and Abrous, D. N. (2007) Spatial learning depends on both the addition and removal of new hippocampal neurons. *PLoS Biol.* 5, e214
- Dupret, D., Revest, J. M., Koehl, M., Ichas, F., De Giorgi, F., Costet, P., Abrous, D. N., and Piazza, P. V. (2008) Spatial relational memory requires hippocampal adult neurogenesis. *PLoS One* 3, e1959
- Eberle, A. B., and Visa, N. (2014) Quality control of mRNP biogenesis: Networking at the transcription site. *Semin. Cell Dev. Biol.*
- Edwards, D. C., Sanders, L. C., Bokoch, G. M., and Gill, G. N. (1999) Activation of LIM-kinase by Pak1 couples Rac/Cdc42 GTPase signalling to actin cytoskeletal dynamics. *Nat Cell Biol* 1, 253–9.
- Eriksson, P. S., Perfilieva, E., Björk-Eriksson, T., Alborn, A. M., Nordborg, C., Peterson, D. A., and Gage, F. H. (1998) Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat. Med.* 4, 1313–7
- Ernst, A., Alkass, K., Bernard, S., Salehpour, M., Perl, S., Tisdale, J., Possnert, G., Druid, H., and Frisén, J. (2014) Neurogenesis in the striatum of the adult human brain. *Cell* 156, 1072–83
- Espósito, M. S., Piatti, V. C., Laplagne, D. A., Morgenstern, N. A., Ferrari, C. C., Pitossi, F. J., and Schinder, A. F. (2005) Neuronal differentiation in the adult hippocampus recapitulates embryonic development. *J Neurosci* 25, 10074–86
- Essmann, C. L., Martinez, E., Geiger, J. C., Zimmer, M., Traut, M. H., Stein, V., Klein, R., and Acker-Palmer, A. (2008) Serine phosphorylation of ephrinB2 regulates trafficking of synaptic AMPA receptors. *Nat. Neurosci.* 11, 1035–43
- Eswaran, J., Soundararajan, M., and Knapp, S. (2009) Targeting group II PAKs in cancer and metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 28, 209–217
- Eswaran, J., Soundararajan, M., Kumar, R., and Knapp, S. (2008) UnPAKING the class differences among p21-activated kinases. *Trends Biochem. Sci.* 33, 394–403
- Falco, M., Romano, C., Alberti, A., Greco, D., Scuderi, C., Avola, E., Failla, P., Belli, S., Tolmie, J. L., Amata, S., and Fichera, M. (2005) Identification of novel mutations in patients with Coffin-Lowry syndrome by a denaturing HPLC-based assay. *Clin. Chem.* 51, 2356–8
- Farioli-Vecchioli, S., Saraulli, D., Costanzi, M., Leonardi, L., Cinà, I., Micheli, L., Nutini, M., Longone, P., Oh, S. P., Cestari, V., and Tirone, F. (2009) Impaired terminal differentiation of hippocampal granule neurons and defective contextual memory in PC3/Tis21 knockout mice. *PLoS One* 4, e8339
- Farioli-Vecchioli, S., Saraulli, D., Costanzi, M., Pacioni, S., Cinà, I., Aceti, M., Micheli, L., Bacci, A., Cestari, V., and Tirone, F. (2008) The timing of differentiation of adult hippocampal neurons is crucial for spatial memory. *PLoS Biol.* 6, e246

Références Bibliographiques

- Farley, S., Domenichini, F., Laroche, S., Barnier, J.V. and Vaillend, C. (2014) Pak3 loss of function induces cognitive disturbances and brain alterations in mice. Prep.
- Faulkner, R. L., Jang, M.-H., Liu, X.-B., Duan, X., Sailor, K. A., Kim, J. Y., Ge, S., Jones, E. G., Ming, G., Song, H., and Cheng, H.-J. (2008) Development of hippocampal mossy fiber synaptic outputs by new neurons in the adult brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 14157–62
- Feliciano, D. M., and Bordey, A. (2013) Newborn cortical neurons: only for neonates? *Trends Neurosci.* 36, 51–61
- Feng, Q., Albeck, J. G., Cerione, R. A., and 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, 5644–50.
- Ferron, S. R., Pozo, N., Laguna, A., Aranda, S., Porlan, E., Moreno, M., Fillat, C., de la Luna, S., Sánchez, P., Arbonés, M. L., and Fariñas, I. (2010) Regulated segregation of kinase Dyrk1A during asymmetric neural stem cell division is critical for EGFR-mediated biased signaling. *Cell Stem Cell* 7, 367–79
- Frank, S. R., and Hansen, S. H. (2008) The PIX-GIT complex: a G protein signaling cassette in control of cell shape. *Semin. Cell Dev. Biol.* 19, 234–44
- Fromer, M., Pocklington, A. J., Kavanagh, D. H., Williams, H. J., Dwyer, S., Gormley, P., Georgieva, L., Rees, E., Palta, P., Ruderfer, D. M., Carrera, N., Humphreys, I., Johnson, J. S., Roussos, P., Barker, D. D., Banks, E., Milanova, V., Grant, S. G., Hannon, E., Rose, S. a, Chambert, K., Mahajan, M., Scolnick, E. M., Moran, J. L., Kirov, G., Palotie, A., McCarroll, S. a, Holmans, P., Sklar, P., Owen, M. J., Purcell, S. M., and O'Donovan, M. C. (2014) De novo mutations in schizophrenia implicate synaptic networks. *Nature* 506, 179–84
- Gabay, L., Lowell, S., Rubin, L. L., and Anderson, D. J. (2003) Deregulation of dorsoventral patterning by FGF confers trilineage differentiation capacity on CNS stem cells in vitro. *Neuron* 40, 485–99
- Gage, F. H. (2000) Mammalian neural stem cells. *Science* 287, 1433–8
- Galisteo, M. L., Chernoff, J., Su, Y. C., Skolnik, E. Y., and Schlessinger, J. (1996) The adaptor protein Nck links receptor tyrosine kinases with the serine-threonine kinase Pak1. *J Biol Chem* 271, 20997–1000.
- Garcia, A. D. R., Doan, N. B., Imura, T., Bush, T. G., and Sofroniew, M. V (2004) GFAP-expressing progenitors are the principal source of constitutive neurogenesis in adult mouse forebrain. *Nat. Neurosci.* 7, 1233–41
- Garthe, A., Behr, J., and Kempermann, G. (2009) Adult-generated hippocampal neurons allow the flexible use of spatially precise learning strategies. *PLoS One* 4, e5464
- Ge, S., Goh, E. L. K., Sailor, K. A., Kitabatake, Y., Ming, G. L., and Song, H. (2006) GABA regulates synaptic integration of newly generated neurons in the adult brain. *Nature* 439, 589–93
- Ge, S., Sailor, K. A., Ming, G., and Song, H. (2008) Synaptic integration and plasticity of new neurons in the adult hippocampus. *J. Physiol.* 586, 3759–65
- Ge, S., Yang, C.-H., Hsu, K.-S., Ming, G.-L., and Song, H. (2007) A critical period for enhanced synaptic plasticity in newly generated neurons of the adult brain. *Neuron* 54, 559–66
- Gedeon, A. K., Nelson, J., Gécz, J., and Mulley, J. C. (2003) X-linked mild non-syndromic mental retardation with neuropsychiatric problems and the missense mutation A365E in PAK3. *Am. J. Med. Genet. A* 120A, 509–17

Références Bibliographiques

Germain, J., Bruel-Jungerman, E., Grannec, G., Denis, C., Lepousez, G., Giros, B., Francis, F., and Nosten-Bertrand, M. (2013) Doublecortin knockout mice show normal hippocampal-dependent memory despite CA3 lamination defects. *PLoS One* 8, e74992

Giachino, C., and Taylor, V. (2014) Notching up neural stem cell homogeneity in homeostasis and disease. *Front. Neurosci.* 8, 32

Gilissen, C., Hehir-Kwa, J. Y., Thung, D. T., van de Vorst, M., van Bon, B. W. M., Willemsen, M. H., Kwint, M., Janssen, I. M., Hoischen, A., Schenck, A., Leach, R., Klein, R., Tearle, R., Bo, T., Pfundt, R., Yntema, H. G., de Vries, B. B. A., Kleefstra, T., Brunner, H. G., Vissers, L. E. L. M., and Veltman, J. A. (2014) Genome sequencing identifies major causes of severe intellectual disability. *Nature* 511, 344–7

Govek, E.-E., Newey, S. E., Akerman, C. J., Cross, J. R., Van der Veken, L., and Van Aelst, L. (2004) The X-linked mental retardation protein oligophrenin-1 is required for dendritic spine morphogenesis. *Nat. Neurosci.* 7, 364–72

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) Patterns of somatic mutation in human cancer genomes. *Nature* 446, 153–8

Gritti, A., Parati, E. A., Cova, L., Frolichsthal, P., Galli, R., Wanke, E., Faravelli, L., Morassutti, D. J., Roisen, F., Nickel, D. D., and Vescovi, A. L. (1996) Multipotential stem cells from the adult mouse brain proliferate and self-renew in response to basic fibroblast growth factor. *J Neurosci* 16, 1091–100

Guo, W., Zhang, L., Christopher, D. M., Teng, Z.-Q., Fausett, S. R., Liu, C., George, O. L., Klingensmith, J., Jin, P., and Zhao, X. (2011) RNA-binding protein FXR2 regulates adult hippocampal neurogenesis by reducing Noggin expression. *Neuron* 70, 924–38

Gu, J., and Zheng, J. Q. (2009) Microtubules in Dendritic Spine Development and Plasticity. *Open Neurosci. J.* 3, 128–133

Gustavsson, A., Svensson, M., Jacobi, F., Allgulander, C., Alonso, J., Beghi, E., Dodel, R., Ekman, M., Faravelli, C., Fratiglioni, L., Gannon, B., Jones, D. H., Jenum, P., Jordanova, A., Jonsson, L., Karampampa, K., Knapp, M., Kobelt, G., Kurth, T., Lieb, R., Linde, M., Ljungcrantz, C., Maercker, A., Melin, B., Moscarelli, M., Musayev, A., Norwood, F., Preisig, M., Pugliatti, M., Rehm, J., Salvador-Carulla, L., Schlehofer, B., Simon, R., Steinhausen, H. C., Stovner, L. J., Vallat, J. M., den Bergh, P. V., van Os, J., Vos, P., Xu, W., Wittchen, H. U., Jonsson, B., and Olesen, J. (2011) Cost of disorders of the brain in Europe 2010. *Eur Neuropsychopharmacol* 21, 718–779

Hamdan, F. F., Gauthier, J., Araki, Y., Lin, D.-T., Yoshizawa, Y., Higashi, K., Park, A.-R., Spiegelman, D., Dobrzyńska, S., Piton, A., Tomitori, H., Daoud, H., Massicotte, C., Henrion, E., Diallo, O., Shekarabi, M., Marineau, C., Shevell, M., Maranda, B., Mitchell, G., Nadeau, A., D'Anjou, G., Vanasse, M., Srour, M., Lafrenière, R. G., Drapeau, P., Lacaille, J. C., Kim, E., Lee, J.-R., Igarashi, K., Haganir, R. L., Rouleau, G. a, and Michaud, J. L. (2011) Excess of de novo deleterious mutations in genes associated with glutamatergic systems in nonsyndromic intellectual disability. *Am. J. Hum. Genet.* 88, 306–16

Hamdan, F. F., Gauthier, J., Spiegelman, D., Noreau, A., Yang, Y., Pellerin, S., Dobrzyńska, S., Côté, M., Perreault-Linck, E., Perreault-Linck, E., Carmant, L., D'Anjou, G., Fombonne, E., Addington, A. M., Rapoport, J. L., Delisi, L. E., Krebs, M.-O., Mouaffak, F., Joobar, R., Mottron, L., Drapeau, P., Marineau, C.,

Références Bibliographiques

- Lafrenière, R. G., Lacaille, J. C., Rouleau, G. A., and Michaud, J. L. (2009) Mutations in SYNGAP1 in autosomal nonsyndromic mental retardation. *N. Engl. J. Med.* 360, 599–605
- Hamdan, F. F., Piton, A., Gauthier, J., Lortie, A., Dubeau, F., Dobrzyńska, S., Spiegelman, D., Noreau, A., Pellerin, S., Côté, M., Henrion, E., Fombonne, E., Mottron, L., Marineau, C., Drapeau, P., Lafrenière, R. G., Lacaille, J. C., Rouleau, G. A., and Michaud, J. L. (2009) De novo STXBP1 mutations in mental retardation and nonsyndromic epilepsy. *Ann. Neurol.* 65, 748–53
- Han, Y.-G., Spassky, N., Romaguera-Ros, M., Garcia-Verdugo, J.-M., Aguilar, A., Schneider-Maunoury, S., and Alvarez-Buylla, A. (2008) Hedgehog signaling and primary cilia are required for the formation of adult neural stem cells. *Nat. Neurosci.* 11, 277–84
- Hanauer, A., and Young, I. D. (2002) Coffin-Lowry syndrome: clinical and molecular features. *J. Med. Genet.* 39, 705–13
- Hayashi, M. L., Choi, S.-Y., Rao, B. S. S., Jung, H.-Y., Lee, H.-K., Zhang, D., Chattarji, S., Kirkwood, A., and Tonegawa, S. (2004) Altered cortical synaptic morphology and impaired memory consolidation in forebrain-specific dominant-negative PAK transgenic mice. *Neuron* 42, 773–87
- Hayashi, M. L., Rao, B. S. S., Seo, J.-S., Choi, H.-S., Dolan, B. M., Choi, S.-Y., Chattarji, S., and Tonegawa, S. (2007) Inhibition of p21-activated kinase rescues symptoms of fragile X syndrome in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 11489–94
- Heasman, S. J., and Ridley, A. J. (2008) Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 690–701
- Hodge, R. D., Nelson, B. R., Kahoud, R. J., Yang, R., Mussar, K. E., Reiner, S. L., and Hevner, R. F. (2012) Tbr2 is essential for hippocampal lineage progression from neural stem cells to intermediate progenitors and neurons. *J Neurosci* 32, 6275–87
- Höglinger, G. U., Rizk, P., Muriel, M. P., Duyckaerts, C., Oertel, W. H., Caille, I., and Hirsch, E. C. (2004) Dopamine depletion impairs precursor cell proliferation in Parkinson disease. *Nat. Neurosci.* 7, 726–35
- Houge, G., Rasmussen, I. H., and Hovland, R. (2012) Loss-of-Function CNKSR2 Mutation Is a Likely Cause of Non-Syndromic X-Linked Intellectual Disability. *Mol. Syndromol.* 2, 60–63
- Hu, X., Viesselmann, C., Nam, S., Merriam, E., and Dent, E. W. (2008) Activity-dependent dynamic microtubule invasion of dendritic spines. *J. Neurosci.* 28, 13094–105
- Huang, W., Zhou, Z., Asrar, S., Henkelman, M., Xie, W., and Jia, Z. (2011) p21-Activated kinases 1 and 3 control brain size through coordinating neuronal complexity and synaptic properties. *Mol. Cell. Biol.* 31, 388–403
- Humeau, Y., Gambino, F., Chelly, J., and Vitale, N. (2009) X-linked mental retardation: focus on synaptic function and plasticity. *J Neurochem* 109, 1–14
- Imayoshi, I., and Kageyama, R. (2011) The role of Notch signaling in adult neurogenesis. *Mol Neurobiol* 44, 7–12
- Imayoshi, I., Sakamoto, M., Ohtsuka, T., Takao, K., Miyakawa, T., Yamaguchi, M., Mori, K., Ikeda, T., Itohara, S., and Kageyama, R. (2008) Roles of continuous neurogenesis in the structural and functional integrity of the adult forebrain. *Nat. Neurosci.* 11, 1153–61
- Inokuchi, K. (2011) Adult neurogenesis and modulation of neural circuit function. *Curr. Opin. Neurobiol.* 21, 360–4

Références Bibliographiques

- Iossifov, I., Ronemus, M., Levy, D., Wang, Z., Hakker, I., Rosenbaum, J., Yamrom, B., Lee, Y.-H., Narzisi, G., Leotta, A., Kendall, J., Grabowska, E., Ma, B., Marks, S., Rodgers, L., Stepansky, A., Troge, J., Andrews, P., Bekritsky, M., Pradhan, K., Ghiban, E., Kramer, M., Parla, J., Demeter, R., Fulton, L. L., Fulton, R. S., Magrini, V. J., Ye, K., Darnell, J. C., Darnell, R. B., Mardis, E. R., Wilson, R. K., Schatz, M. C., McCombie, W. R., and Wigler, M. (2012) De novo gene disruptions in children on the autistic spectrum. *Neuron* 74, 285–99
- Jacobs, B. L., van Praag, H., and Gage, F. H. (2000) Adult brain neurogenesis and psychiatry: a novel theory of depression. *Mol. Psychiatry* 5, 262–9
- Jacobs, T., Causeret, F., Nishimura, Y. V., Terao, M., Norman, A., Hoshino, M., and Nikolić, M. (2007) Localized activation of p21-activated kinase controls neuronal polarity and morphology. *J Neurosci* 27, 8604–15
- Jessberger, S., Clark, R. E., Broadbent, N. J., Clemenson, G. D., Consiglio, A., Lie, D. C., Squire, L. R., and Gage, F. H. (2009) Dentate gyrus-specific knockdown of adult neurogenesis impairs spatial and object recognition memory in adult rats. *Learn. Mem.* 16, 147–54
- Johnson, K., and D’Mello, S. R. (2005) p21-Activated kinase-1 is necessary for depolarization-mediated neuronal survival. *J Neurosci Res* 79, 809–815
- Jurkiewicz, D., Jezela-Stanek, A., Ciara, E., Piekutowska-Abramczuk, D., Kugaud, M., Gajdulewicz, M., Chrzanowska, K., Popowska, E., and Krajewska-Walasek, M. Four novel RSK2 mutations in females with Coffin-Lowry syndrome. *Eur. J. Med. Genet.* 53, 268–73
- Kahoud, R. J., Elsen, G. E., Hevner, R. F., and Hodge, R. D. (2014) Conditional ablation of *Tbr2* results in abnormal development of the olfactory bulbs and subventricular zone-rostral migratory stream. *Dev. Dyn.* 243, 440–50
- Kempermann, G., and Gage, F. H. (2002) Genetic influence on phenotypic differentiation in adult hippocampal neurogenesis. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 134, 1–12
- Kempermann, G., Gast, D., Kronenberg, G., Yamaguchi, M., and Gage, F. H. (2003) Early determination and long-term persistence of adult-generated new neurons in the hippocampus of mice. *Development* 130, 391–399
- Kheirbek, M. a, and Hen, R. (2013) (Radio)active neurogenesis in the human hippocampus. *Cell* 153, 1183–4
- Kim, K.-Y., Hysolli, E., and Park, I.-H. (2011) Neuronal maturation defect in induced pluripotent stem cells from patients with Rett syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 14169–74
- Kiosses, W. B., Hood, J., Yang, S., Gerritsen, M. E., Cheresch, D. A., Alderson, N., and Schwartz, M. A. (2002) A dominant-negative p65 PAK peptide inhibits angiogenesis. *Circ Res* 90, 697–702.
- Kitamura, T., Saitoh, Y., Takashima, N., Murayama, A., Niibori, Y., Ageta, H., Sekiguchi, M., Sugiyama, H., and Inokuchi, K. (2009) Adult neurogenesis modulates the hippocampus-dependent period of associative fear memory. *Cell* 139, 814–27
- Knaus, U. G., Wang, Y., Reilly, A. M., Warnock, D., and Jackson, J. H. (1998) Structural requirements for PAK activation by Rac GTPases. *J Biol Chem* 273, 21512–21518
- Knöth, R., Singec, I., Ditter, M., Pantazis, G., Capetian, P., Meyer, R. P., Horvat, V., Volk, B., and Kempermann, G. (2010) Murine features of neurogenesis in the human hippocampus across the lifespan from 0 to 100 years. *PLoS One* 5, e8809
- Koehl, M., and Abrous, D. N. (2011) A new chapter in the field of memory: adult hippocampal neurogenesis. *Eur. J. Neurosci.* 33, 1101–14

Références Bibliographiques

- Kondo, T., and Raff, M. (2000) Oligodendrocyte precursor cells reprogrammed to become multipotential CNS stem cells. *Science* 289, 1754–7
- Kreis, P., and Barnier, J.-V. (2009) PAK signalling in neuronal physiology. *Cell. Signal.* 21, 384–93
- Kreis, P., Rousseau, V., Thévenot, E., Combeau, G., and Barnier, J.-V. (2008) The four mammalian splice variants encoded by the p21-activated kinase 3 gene have different biological properties. *J. Neurochem.* 106, 1184–97
- Kreis, P., Thévenot, E., Rousseau, V., Boda, B., Muller, D., and Barnier, J.-V. (2007) The p21-activated kinase 3 implicated in mental retardation regulates spine morphogenesis through a Cdc42-dependent pathway. *J. Biol. Chem.* 282, 21497–506
- Krezymon, A., Richetin, K., Halley, H., Roybon, L., Lassalle, J.-M., Francès, B., Verret, L., and Rampon, C. (2013) Modifications of hippocampal circuits and early disruption of adult neurogenesis in the tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *PLoS One* 8, e76497
- Kuhn, H. G., Dickinson-Anson, H., and Gage, F. H. (1996) Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J Neurosci* 16, 2027–33
- Kukekov, V. G., Laywell, E. D., Suslov, O., Davies, K., Scheffler, B., Thomas, L. B., O'Brien, T. F., Kusakabe, M., and Steindler, D. A. (1999) Multipotent stem/progenitor cells with similar properties arise from two neurogenic regions of adult human brain. *Exp. Neurol.* 156, 333–44
- Kumar, R., Gururaj, A. E., and Barnes, C. J. (2006) p21-activated kinases in cancer. *Nat Rev Cancer* 6, 459–471
- Kutsche, K., Yntema, H., Brandt, A., Jantke, I., Nothwang, H. G., Orth, U., Boavida, M. G., David, D., Chelly, J., Fryns, J. P., Moraine, C., Ropers, H. H., Hamel, B. C., van Bokhoven, H., and 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, 247–50.
- Lancaster, M. a, Renner, M., Martin, C.-A., Wenzel, D., Bicknell, L. S., Hurler, M. E., Homfray, T., Penninger, J. M., Jackson, A. P., and Knoblich, J. a (2013) Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. *Nature* 501, 373–9
- Laplagne, D. a, Espósito, M. S., Piatti, V. C., Morgenstern, N. a, Zhao, C., van Praag, H., Gage, F. H., and Schinder, A. F. (2006) Functional convergence of neurons generated in the developing and adult hippocampus. *PLoS Biol.* 4, e409
- Lazarov, O., and Marr, R. a (2013) Of mice and men: neurogenesis, cognition and Alzheimer's disease. *Front. Aging Neurosci.* 5, 43
- Lazarov, O., Mattson, M. P., Peterson, D. a, Pimplikar, S. W., and van Praag, H. (2010) When neurogenesis encounters aging and disease. *Trends Neurosci.* 33, 569–79
- Lei, M., Lu, W., Meng, W., Parrini, M. C., Eck, M. J., Mayer, B. J., and Harrison, S. C. (2000) Structure of PAK1 in an autoinhibited conformation reveals a multistage activation switch. *Cell* 102, 387–97.
- Leigh, M. J. S., Nguyen, D. V, Mu, Y., Winarni, T. I., Schneider, A., Chechi, T., Polussa, J., Doucet, P., Tassone, F., Rivera, S. M., Hessel, D., and Hagerman, R. J. (2013) A randomized double-blind, placebo-controlled trial of minocycline in children and adolescents with fragile x syndrome. *J. Dev. Behav. Pediatr.* 34, 147–55
- Lemaire, V., Arousseau, C., Le Moal, M., and Abrous, D. N. (1999) Behavioural trait of reactivity to novelty is related to hippocampal neurogenesis. *Eur. J. Neurosci.* 11, 4006–14

Références Bibliographiques

- Lemasson, M., Saghatelian, A., Olivo-Marin, J.-C., and Lledo, P.-M. (2005) Neonatal and adult neurogenesis provide two distinct populations of newborn neurons to the mouse olfactory bulb. *J Neurosci* 25, 6816–25
- Leonard, H., and Wen, X. (2002) The epidemiology of mental retardation: challenges and opportunities in the new millennium. *Ment. Retard. Dev. Disabil. Res. Rev.* 8, 117–34
- Leuner, B., Mendolia-Loffredo, S., Kozorovitskiy, Y., Samburg, D., Gould, E., and Shors, T. J. (2004) Learning enhances the survival of new neurons beyond the time when the hippocampus is required for memory. *J. Neurosci.* 24, 7477–81
- Li, F., Adam, L., Vadlamudi, R. K., Zhou, H., Sen, S., Chernoff, J., Mandal, M., and Kumar, R. (2002) p21-activated kinase 1 interacts with and phosphorylates histone H3 in breast cancer cells. *EMBO Rep* 3, 767–773
- Li, Z., Okamoto, K.-I., Hayashi, Y., and Sheng, M. (2004) The importance of dendritic mitochondria in the morphogenesis and plasticity of spines and synapses. *Cell* 119, 873–87
- Lim, J., Ritt, D. A., Zhou, M., and Morrison, D. K. (2014) The CNK2 scaffold interacts with vils and modulates Rac cycling during spine morphogenesis in hippocampal neurons. *Curr. Biol.* 24, 786–92
- Liu, D., Ander, B. P., Tian, Y., Stamova, B., Jickling, G. C., Davis, R. R., and Sharp, F. R. (2012) Integrated analysis of mRNA and microRNA expression in mature neurons, neural progenitor cells and neuroblastoma cells. *Gene* 495, 120–7
- Liu, R., Wang, W., Ye, L., Bi, Y., Fang, H., Cui, B., Zhou, W., Dai, M., Zhang, J., Li, X., and Ning, G. (2010) p21-activated kinase 3 is overexpressed in thymic neuroendocrine tumors (carcinoids) with ectopic ACTH syndrome and participates in cell migration. *Endocrine* 38, 38–47
- Lu, W., Katz, S., Gupta, R., and Mayer, B. J. (1997) Activation of Pak by membrane localization mediated by an SH3 domain from the adaptor protein Nck. *Curr Biol* 7, 85–94
- Lubs, H. a, Stevenson, R. E., and Schwartz, C. E. (2012) Fragile X and X-linked intellectual disability: four decades of discovery. *Am. J. Hum. Genet.* 90, 579–90
- Luo, Y., Shan, G., Guo, W., Smrt, R. D., Johnson, E. B., Li, X., Pfeiffer, R. L., Szulwach, K. E., Duan, R., Barkho, B. Z., Li, W., Liu, C., Jin, P., and Zhao, X. (2010) Fragile x mental retardation protein regulates proliferation and differentiation of adult neural stem/progenitor cells. *PLoS Genet.* 6, e1000898
- Madsen, T. M., Kristjansen, P. E. G., Bolwig, T. G., and Wörtwein, G. (2003) Arrested neuronal proliferation and impaired hippocampal function following fractionated brain irradiation in the adult rat. *Neuroscience* 119, 635–42
- Magavi, S. S. P., Mitchell, B. D., Szentirmai, O., Carter, B. S., and Macklis, J. D. (2005) Adult-born and preexisting olfactory granule neurons undergo distinct experience-dependent modifications of their olfactory responses in vivo. *J Neurosci* 25, 10729–39
- Magini, P., Pippucci, T., Tsai, I.-C., Coppola, S., Stellacci, E., Bartoletti-Stella, A., Turchetti, D., Graziano, C., Cenacchi, G., Neri, I., Cordelli, D. M., Marchiani, V., Bergamaschi, R., Gasparre, G., Neri, G., Mazzanti, L., Patrizi, A., Franzoni, E., Romeo, G., Bordo, D., Tartaglia, M., Katsanis, N., and Seri, M. (2014) A mutation in PAK3 with a dual molecular effect deregulates the RAS/MAPK pathway and drives an X-linked syndromic phenotype. *Hum. Mol. Genet.* 23, 3607–17
- Mak, G. K., Enwere, E. K., Gregg, C., Pakarainen, T., Poutanen, M., Huhtaniemi, I., and Weiss, S. (2007) Male pheromone-stimulated neurogenesis in the adult female brain: possible role in mating behavior. *Nat. Neurosci.* 10, 1003–11

Références Bibliographiques

- Malberg, J. E., Eisch, A. J., Nestler, E. J., and Duman, R. S. (2000) Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. *J Neurosci* 20, 9104–10
- Malecka, K. a, Szentpetery, Z., and Peterson, J. R. (2013) Synergistic activation of p21-activated kinase 1 by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and Rho GTPases. *J. Biol. Chem.* 288, 8887–97
- Mandyam, C. D., Harburg, G. C., and Eisch, A. J. (2007) Determination of key aspects of precursor cell proliferation, cell cycle length and kinetics in the adult mouse subgranular zone. *Neuroscience* 146, 108–22
- Manser, E., Chong, C., Zhao, Z. S., Leung, T., Michael, G., Hall, C., and Lim, L. (1995) Molecular cloning of a new member of the p21-Cdc42/Rac-activated kinase (PAK) family. *J. Biol. Chem.* 270, 25070–8
- Manser, E., Leung, T., Salihuddin, H., Zhao, Z. S., and Lim, L. (1994) A brain serine/threonine protein kinase activated by Cdc42 and Rac1. *Nature* 367, 40–46
- Manser, E., Loo, T. H., Koh, C. G., Zhao, Z. S., Chen, X. Q., Tan, L., Tan, I., Leung, T., and Lim, L. (1998) PAK kinases are directly coupled to the PIX family of nucleotide exchange factors. *Mol. Cell* 1, 183–92
- Marín-Burgin, A., Mongiat, L. a, Pardi, M. B., and Schinder, A. F. (2012) Unique processing during a period of high excitation/inhibition balance in adult-born neurons. *Science* 335, 1238–42
- Matsuzaki, M., Honkura, N., Ellis-Davies, G. C., and Kasai, H. (2004) Structural basis of long-term potentiation in single dendritic spines. *Nature* 429, 761–766
- 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) 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, J., Meng, Y., Hanna, A., Janus, C., and Jia, Z. (2005) Abnormal long-lasting synaptic plasticity and cognition in mice lacking the mental retardation gene Pak3. *J Neurosci* 25, 6641–50
- Menon, P., Deane, R., Sagare, A., Lane, S. M., Zarcone, T. J., O'Dell, M. R., Yan, C., Zlokovic, B. V, and Berk, B. C. (2010) Impaired spine formation and learning in GPCR kinase 2 interacting protein-1 (GIT1) knockout mice. *Brain Res.* 1317, 218–26
- Merienne, K., Jacquot, S., Pannetier, S., Zeniou, M., Bankier, A., Gecz, J., Mandel, J. L., Mulley, J., Sassone-Corsi, P., and Hanauer, A. (1999) A missense mutation in RPS6KA3 (RSK2) responsible for non-specific mental retardation. *Nat. Genet.* 22, 13–4
- Merwick, A., O'Brien, M., and Delanty, N. (2012) Complex single gene disorders and epilepsy. *Epilepsia* 53 Suppl 4, 81–91
- Meshi, D., Drew, M. R., Saxe, M., Ansorge, M. S., David, D., Santarelli, L., Malapani, C., Moore, H., and Hen, R. (2006) Hippocampal neurogenesis is not required for behavioral effects of environmental enrichment. *Nat. Neurosci.* 9, 729–31
- Ming, G.-L., and Song, H. (2011) Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions. *Neuron* 70, 687–702
- Molinari, F., Rio, M., Meskenaite, V., Encha-Razavi, F., Auge, J., Bacq, D., Briault, S., Vekemans, M., Munnich, A., Attie-Bitach, T., Sonderegger, P., and Colleaux, L. (2002) Truncating neurotrophin mutation in autosomal recessive nonsyndromic mental retardation. *Science* (80-.). 298, 1779–81.
- Mongiat, L. A., Espósito, M. S., Lombardi, G., and Schinder, A. F. (2009) Reliable activation of immature neurons in the adult hippocampus. *PLoS One* 4, e5320

Références Bibliographiques

- Morice, E., Farley, S., Poirier, R., Dallerac, G., Chagneau, C., Pannetier, S., Hanauer, A., Davis, S., Vaillend, C., and Laroche, S. (2013) Defective synaptic transmission and structure in the dentate gyrus and selective fear memory impairment in the Rsk2 mutant mouse model of Coffin-Lowry syndrome. *Neurobiol. Dis.* 58, 156–68
- Morshead, C. M., Reynolds, B. A., Craig, C. G., McBurney, M. W., Staines, W. A., Morassutti, D., Weiss, S., and van der Kooy, D. (1994) Neural stem cells in the adult mammalian forebrain: a relatively quiescent subpopulation of subependymal cells. *Neuron* 13, 1071–1082
- Mouret, A., Gheusi, G., Gabellec, M.-M., de Chaumont, F., Olivo-Marin, J.-C., and Lledo, P.-M. (2008) Learning and survival of newly generated neurons: when time matters. *J Neurosci* 28, 11511–6
- Mu, Y., Zhao, C., and Gage, F. H. (2011) Dopaminergic modulation of cortical inputs during maturation of adult-born dentate granule cells. *J Neurosci* 31, 4113–23
- Mühlemann, O., Eberle, A. B., Stalder, L., and Zamudio Orozco, R. (2008) Recognition and elimination of nonsense mRNA. *Biochim. Biophys. Acta* 1779, 538–49
- Murakoshi, H., Wang, H., and Yasuda, R. (2011) Local, persistent activation of Rho GTPases during plasticity of single dendritic spines. *Nature* 472, 100–4
- Murata, Y., and Constantine-paton, M. (2013) Postsynaptic density scaffold SAP102 regulates cortical synapse development through EphB and PAK signaling pathway. *J Neurosci* 33, 5040–52
- Mustafa, S., Walker, A., Bennett, G., and Wigmore, P. M. (2008) 5-Fluorouracil chemotherapy affects spatial working memory and newborn neurons in the adult rat hippocampus. *Eur. J. Neurosci.* 28, 323–30
- Nadif Kasri, N., Nakano-Kobayashi, A., Malinow, R., Li, B., and Van Aelst, L. (2009) The Rho-linked mental retardation protein oligophrenin-1 controls synapse maturation and plasticity by stabilizing AMPA receptors. *Genes Dev.* 23, 1289–302
- Najmabadi, H., Hu, H., Garshasbi, M., Zemojtel, T., Abedini, S. S., Chen, W., Hosseini, M., Behjati, F., Haas, S., Jamali, P., Zecha, A., Mohseni, M., Püttmann, L., Vahid, L. N., Jensen, C., Moheb, L. A., Bienek, M., Larti, F., Mueller, I., Weissmann, R., Darvish, H., Wrogemann, K., Hadavi, V., Lipkowitz, B., Esmaeeli-nieh, S., Wiczorek, D., Kariminejad, R., Firouzabadi, S. G., Cohen, M., Fattahi, Z., Rost, I., Mojahedi, F., Hertzberg, C., Dehghan, A., Rajab, A., Banavandi, M. J. S., Hoffer, J., Falah, M., Musante, L., Kalscheuer, V., Ullmann, R., Kuss, A. W., Tzschach, A., Kahrizi, K., Ropers, H. H., Pu, L., Javad, M., and Banavandi, S. (2011) Deep sequencing reveals 50 novel genes for recessive cognitive disorders. *Nature* 478, 57–63
- Namba, T., Mochizuki, H., Suzuki, R., Onodera, M., Yamaguchi, M., Namiki, H., Shioda, S., and Seki, T. (2011) Time-lapse imaging reveals symmetric neurogenic cell division of GFAP-expressing progenitors for expansion of postnatal dentate granule neurons. *PLoS One* 6, e25303
- Newey, S. E., Velamoor, V., Govek, E.-E., and Van Aelst, L. (2005) Rho GTPases, dendritic structure, and mental retardation. *J. Neurobiol.* 64, 58–74
- Ninkovic, J., Mori, T., and Götz, M. (2007) Distinct modes of neuron addition in adult mouse neurogenesis. *J Neurosci* 27, 10906–11
- Nissant, A., Bardy, C., Katagiri, H., Murray, K., and Lledo, P.-M. (2009) Adult neurogenesis promotes synaptic plasticity in the olfactory bulb. *Nat. Neurosci.* 12, 728–30
- Nobes, C. D., and Hall, A. (1995) Rho, Rac, and Cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell* 81, 53–62

Références Bibliographiques

- Nodé-Langlois, R., Muller, D., and Boda, B. (2006) Sequential implication of the mental retardation proteins ARHGEF6 and PAK3 in spine morphogenesis. *J. Cell Sci.* 119, 4986–93
- Ohkawa, N., Saitoh, Y., Tokunaga, E., Nihonmatsu, I., Ozawa, F., Murayama, A., Shibata, F., Kitamura, T., and Inokuchi, K. (2012) Spine formation pattern of adult-born neurons is differentially modulated by the induction timing and location of hippocampal plasticity. *PLoS One* 7, e45270
- Ohtakara, K., Nishizawa, M., Izawa, I., Hata, Y., Matsushima, S., Taki, W., Inada, H., Takai, Y., and Inagaki, M. (2002) Densin-180, a synaptic protein, links to PSD-95 through its direct interaction with MAGUI-1. *Genes Cells* 7, 1149–60
- Ong, C. C., Jubb, A. M., Haverty, P. M., Zhou, W., Tran, V., Truong, T., Turley, H., O'Brien, T., Vucic, D., Harris, A. L., Belvin, M., Friedman, L. S., Blackwood, E. M., Koeppen, H., and Hoeflich, K. P. (2011) Targeting p21-activated kinase 1 (PAK1) to induce apoptosis of tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 7177–82
- Ostroff, L. E., Fiala, J. C., Allwardt, B., and Harris, K. M. (2002) Polyribosomes redistribute from dendritic shafts into spines with enlarged synapses during LTP in developing rat hippocampal slices. *Neuron* 35, 535–545
- Palmer, T. D., Markakis, E. a, Willhoite, a R., Safar, F., and Gage, F. H. (1999) Fibroblast growth factor-2 activates a latent neurogenic program in neural stem cells from diverse regions of the adult CNS. *J Neurosci* 19, 8487–97
- Palmer, T. D., Ray, J., and Gage, F. H. (1995) FGF-2-responsive neuronal progenitors reside in proliferative and quiescent regions of the adult rodent brain. *Mol. Cell. Neurosci.* 6, 474–86
- Park, B., Hong, C., Weaver, J. R., Rosocha, E. M., and Saint-Jeannet, J. (2012) Xaml1/Runx1 is required for the specification of Rohon-Beard sensory neurons in *Xenopus*. *Dev. Biol.* 362, 65–75
- Park, E., Na, M., Choi, J., Kim, S., Lee, J.-R., Yoon, J., Park, D., Sheng, M., and 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, 19220–9
- Parrini, M. C., Camonis, J., Matsuda, M., Gunzburg, J. De, and de Gunzburg, J. (2009) Dissecting activation of the PAK1 kinase at protrusions in living cells. *J. Biol. Chem.* 284, 24133–43
- Parrini, M. C., Lei, M., Harrison, S. C., and Mayer, B. J. (2002) Pak1 kinase homodimers are autoinhibited in trans and dissociated upon activation by Cdc42 and Rac1. *Mol. Cell* 9, 73–83
- Pastrana, E., Silva-Vargas, V., and Doetsch, F. (2011) Eyes wide open: a critical review of sphere-formation as an assay for stem cells. *Cell Stem Cell* 8, 486–98
- Paton, J. A., and Nottebohm, F. N. (1984) Neurons generated in the adult brain are recruited into functional circuits. *Science* 225, 1046–8
- Peippo, M., Koivisto, A. M., Särkämö, T., Sipponen, M., Koskull, H. Von, and Ylisaukko-oja, T. (2007) PAK3 related mental disability : Further characterization of the phenotype Case Report.
- Penzes, P., Buonanno, A., Passafaro, M., Sala, C., and Sweet, R. a (2013) Developmental vulnerability of synapses and circuits associated with neuropsychiatric disorders. *J. Neurochem.* 126, 165–82
- Philips, A. K., Sirén, A., Avela, K., Somer, M., Peippo, M., Ahvenainen, M., Doagu, F., Arvio, M., Kääriäinen, H., Van Esch, H., Froyen, G., Haas, S. a, Hu, H., Kalscheuer, V. M., and Järvelä, I. (2014) X-exome sequencing in Finnish families with intellectual disability--four novel mutations and two novel syndromic phenotypes. *Orphanet J. Rare Dis.* 9, 49

Références Bibliographiques

- Piatti, V. C., Davies-Sala, M. G., Espósito, M. S., Mongiat, L. a, Trincherio, M. F., and Schinder, A. F. (2011) The timing for neuronal maturation in the adult hippocampus is modulated by local network activity. *J Neurosci* 31, 7715–28
- Piccand, J., Meunier, A., Merle, C., Jia, Z., Barnier, J. V., and Gradwohl, G. (2013) Pak3 prevents proliferation and promotes differentiation of endocrine cells in the embryonic pancreas and is necessary to maintain glucose homeostasis in adult mice.
- Picker, J. D., and Walsh, C. A. (2013) New innovations: therapeutic opportunities for intellectual disabilities. *Ann. Neurol.* 74, 382–90
- Pierfelice, T., Alberi, L., and Gaiano, N. (2011) Notch in the vertebrate nervous system: an old dog with new tricks. *Neuron* 69, 840–855
- Pini, G., Scusa, M. F., Congiu, L., Benincasa, A., Morescalchi, P., Bottiglioni, I., Di Marco, P., Borelli, P., Bonuccelli, U., Della-Chiesa, A., Prina-Mello, A., and Tropea, D. (2012) IGF1 as a Potential Treatment for Rett Syndrome: Safety Assessment in Six Rett Patients. *Autism Res. Treat.* 2012, 679801
- Platel, J.-C., Dave, K. A., Gordon, V., Lacar, B., Rubio, M. E., and Bordey, A. (2010) NMDA receptors activated by subventricular zone astrocytic glutamate are critical for neuroblast survival prior to entering a synaptic network. *Neuron* 65, 859–72
- Poirier, R., Cheval, H., Mailhes, C., Charnay, P., Davis, S., and Laroche, S. (2007) Paradoxical role of an Egr transcription factor family member, Egr2/Krox20, in learning and memory. *Front. Behav. Neurosci.* 1, 6
- Pons-Espinal, M., de Lagran, M. M., and Dierssen, M. (2013) Functional implications of hippocampal adult neurogenesis in intellectual disabilities. *Amino Acids* 45, 113–31
- Powell, A. D., Gill, K. K., Saintot, P.-P., Jiruska, P., Chelly, J., Billuart, P., and Jefferys, J. G. R. (2012) Rapid reversal of impaired inhibitory and excitatory transmission but not spine dysgenesis in a mouse model of mental retardation. *J. Physiol.* 590, 763–76
- Purcell, S. M., Moran, J. L., Fromer, M., Ruderfer, D., Solovieff, N., Roussos, P., O'Dushlaine, C., Chambert, K., Bergen, S. E., Kähler, A., Duncan, L., Stahl, E., Genovese, G., Fernández, E., Collins, M. O., Komiyama, N. H., Choudhary, J. S., Magnusson, P. K. E., Banks, E., Shakir, K., Garimella, K., Fennell, T., DePristo, M., Grant, S. G. N., Haggarty, S. J., Gabriel, S., Scolnick, E. M., Lander, E. S., Hultman, C. M., Sullivan, P. F., McCarroll, S. a, and Sklar, P. (2014) A polygenic burden of rare disruptive mutations in schizophrenia. *Nature* 506, 185–90
- Purpura, D. P. (1974) Dendritic spine “dysgenesis” and mental retardation. *Science* (80-.). 186, 1126–1128
- Puto, L. a, Pestonjamas, K., King, C. C., and Bokoch, G. M. (2003) p21-activated kinase 1 (PAK1) interacts with the Grb2 adapter protein to couple to growth factor signaling. *J. Biol. Chem.* 278, 9388–93
- Raber, J., Rola, R., LeFevour, A., Morhardt, D., Curley, J., Mizumatsu, S., VandenBerg, S. R., and Fike, J. R. (2004) Radiation-induced cognitive impairments are associated with changes in indicators of hippocampal neurogenesis. *Radiat. Res.* 162, 39–47
- Radu, M., Semenova, G., Kosoff, R., and Chernoff, J. (2014) PAK signalling during the development and progression of cancer. *Nat. Rev. Cancer* 14, 13–25
- Ramakers, G. J. a (2002) Rho proteins, mental retardation and the cellular basis of cognition. *Trends Neurosci.* 25, 191–9

Références Bibliographiques

- Ramirez-Amaya, V., Marrone, D. F., Gage, F. H., Worley, P. F., and Barnes, C. A. (2006) Integration of new neurons into functional neural networks. *J Neurosci* 26, 12237–41
- Ray, J., Peterson, D. A., Schinstine, M., and Gage, F. H. (1993) Proliferation, differentiation, and long-term culture of primary hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 3602–6
- Reddy, S. D., Ohshiro, K., Rayala, S. K., and Kumar, R. (2008) MicroRNA-7, a homeobox D10 target, inhibits p21-activated kinase 1 and regulates its functions. *Cancer Res* 68, 8195–8200
- Rejeb, I., Saillour, Y., Castelnau, L., Julien, C., Bienvenu, T., Taga, P., Chaabouni, H., Chelly, J., Ben Jemaa, L., and Bahi-Buisson, N. (2008) A novel splice mutation in PAK3 gene underlying mental retardation with neuropsychiatric features. *Eur. J. Hum. Genet.* 16, 1358–63
- Rex, C. S., Lin, C. Y., Kramar, E. A., Chen, L. Y., Gall, C. M., and Lynch, G. (2007) Brain-derived neurotrophic factor promotes long-term potentiation-related cytoskeletal changes in adult hippocampus. *J Neurosci* 27, 3017–3029
- Reynolds, B. A., and Weiss, S. (1992) Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* (80-.). 255, 1707–1710
- Richards, L. J., Kilpatrick, T. J., and Bartlett, P. F. (1992) De novo generation of neuronal cells from the adult mouse brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 8591–5
- Robel, S., Berninger, B., and Götz, M. (2011) The stem cell potential of glia: lessons from reactive gliosis. *Nat. Rev. Neurosci.* 12, 88–104
- Robles, E., Woo, S., and Gomez, T. M. (2005) Src-dependent tyrosine phosphorylation at the tips of growth cone filopodia promotes extension. *J Neurosci* 25, 7669–7681
- Rola, R., Raber, J., Rizk, A., Otsuka, S., VandenBerg, S. R., Morhardt, D. R., and Fike, J. R. (2004) Radiation-induced impairment of hippocampal neurogenesis is associated with cognitive deficits in young mice. *Exp. Neurol.* 188, 316–30
- Romeo, Y., Zhang, X., and Roux, P. P. (2012) Regulation and function of the RSK family of protein kinases. *Biochem. J.* 441, 553–69
- Ropers, H. H. (2008) Genetics of intellectual disability. *Curr Opin Genet Dev* 18, 241–250
- Ropers, H. H. (2010) Genetics of early onset cognitive impairment. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 11, 161–87
- Ropers, H.-H. (2007) New perspectives for the elucidation of genetic disorders. *Am. J. Hum. Genet.* 81, 199–207
- Rousseau, V., Goupille, O., Morin, N., and Barnier, J.-V. (2003) A new constitutively active brain PAK3 isoform displays modified specificities toward Rac and Cdc42 GTPases. *J. Biol. Chem.* 278, 3912–20
- Roy, F., Laberge, G., Douziech, M., Ferland-McCollough, D., and Therrien, M. (2002) KSR is a scaffold required for activation of the ERK/MAPK module. *Genes Dev.* 16, 427–38
- Roy, N. S., Wang, S., Jiang, L., Kang, J., Benraiss, a, Harrison-Restelli, C., Fraser, R. a, Couldwell, W. T., Kawaguchi, a, Okano, H., Nedergaard, M., and Goldman, S. a (2000) In vitro neurogenesis by progenitor cells isolated from the adult human hippocampus. *Nat. Med.* 6, 271–7
- Salvador-Carulla, L., and Bertelli, M. (2008) “Mental retardation” or “intellectual disability”: time for a conceptual change. *Psychopathology* 41, 10–6

Références Bibliographiques

- Sanai, N., Nguyen, T., Ibric, R. A., Mirzadeh, Z., Tsai, H. H., Wong, M., Gupta, N., Berger, M. S., Huang, E., Garcia-Verdugo, J. M., Rowitch, D. H., and Alvarez-Buylla, A. (2011) Corridors of migrating neurons in the human brain and their decline during infancy. *Nature* 478, 382–386
- Sanai, N., Tramontin, A. D., Quinones-Hinojosa, A., Barbaro, N. M., Gupta, N., Kunwar, S., Lawton, M. T., McDermott, M. W., Parsa, A. T., Manuel-Garcia Verdugo, J., Berger, M. S., and Alvarez-Buylla, A. (2004) Unique astrocyte ribbon in adult human brain contains neural stem cells but lacks chain migration. *Nature* 427, 740–744
- Sanai, N., Berger, M. S., Garcia-Verdugo, J. M., and Alvarez-Buylla, A. (2007) Comment on “Human neuroblasts migrate to the olfactory bulb via a lateral ventricular extension”. *Science* 318, 393; author reply 393
- Santarelli, L., Saxe, M., Gross, C., Surget, A., Battaglia, F., Dulawa, S., Weisstaub, N., Lee, J., Duman, R., Arancio, O., Belzung, C., and Hen, R. (2003) Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science* 301, 805–9
- Saxe, M. D., Battaglia, F., Wang, J.-W., Malleret, G., David, D. J., Monckton, J. E., Garcia, A. D. R., Sofroniew, M. V., Kandel, E. R., Santarelli, L., Hen, R., and Drew, M. R. (2006) Ablation of hippocampal neurogenesis impairs contextual fear conditioning and synaptic plasticity in the dentate gyrus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 17501–6
- Schmidt-Hieber, C., Jonas, P., and Bischofberger, J. (2004) Enhanced synaptic plasticity in newly generated granule cells of the adult hippocampus. *Nature* 429, 184–187
- Schneider, A., Mehmood, T., Pannetier, S., and Hanauer, A. (2011) Altered ERK/MAPK signaling in the hippocampus of the *mrsk2* KO mouse model of Coffin-Lowry syndrome. *J. Neurochem.* 119, 447–59
- Scott, E. K., Reuter, J. E., and Luo, L. (2003) Small GTPase Cdc42 is required for multiple aspects of dendritic morphogenesis. *J Neurosci* 23, 3118–23
- Scotto-Lomassese, S., Nissant, A., Mota, T., Néant-Féry, M., Oostra, B. a, Greer, C. a, Lledo, P.-M., Trembleau, A., and Caillé, I. (2011) Fragile X mental retardation protein regulates new neuron differentiation in the adult olfactory bulb. *J Neurosci* 31, 2205–15
- Seaberg, R. M., and van der Kooy, D. (2002) Adult rodent neurogenic regions: the ventricular subependyma contains neural stem cells, but the dentate gyrus contains restricted progenitors. *J Neurosci* 22, 1784–1793
- Seaberg, R. M., Smukler, S. R., van der Kooy, D., and Kooy, D. Van Der (2005) Intrinsic differences distinguish transiently neurogenic progenitors from neural stem cells in the early postnatal brain. *Dev. Biol.* 278, 71–85
- Segura, I., Essmann, C. L., Weinges, S., and Acker-Palmer, A. (2007) Grb4 and GIT1 transduce ephrinB reverse signals modulating spine morphogenesis and synapse formation. *Nat. Neurosci.* 10, 301–10
- Sells, M. A., and Chernoff, J. (1997) Emerging from the Pak: the p21-activated protein kinase family. *Trends Cell Biol.* 7, 162–7
- Sells, M. a, Knaus, U. G., Bagrodia, S., Ambrose, D. M., Bokoch, G. M., and Chernoff, J. (1997) Human p21-activated kinase (Pak1) regulates actin organization in mammalian cells. *Curr Biol* 7, 202–210
- Shors, T. J., Miesegaes, G., Beylin, a, Zhao, M., Rydel, T., and Gould, E. (2001) Neurogenesis in the adult is involved in the formation of trace memories. *Nature* 410, 372–6
- Shors, T. J., Townsend, D. A., Zhao, M., Kozorovitskiy, Y., and Gould, E. (2002) Neurogenesis may relate to some but not all types of hippocampal-dependent learning. *Hippocampus* 12, 578–84

Références Bibliographiques

- Sierra, A., Encinas, J. M., Deudero, J. J. P., Chancey, J. H., Enikolopov, G., Overstreet-Wadiche, L. S., Tsirka, S. E., and Maletic-Savatic, M. (2010) Microglia shape adult hippocampal neurogenesis through apoptosis-coupled phagocytosis. *Cell Stem Cell* 7, 483–95
- Siller, S. S., and Broadie, K. (2012) Matrix metalloproteinases and minocycline: therapeutic avenues for fragile X syndrome. *Neural Plast.* 2012, 124548
- Singh, R. R., Song, C., Yang, Z., and Kumar, R. (2005) Nuclear localization and chromatin targets of p21-activated kinase 1. *J Biol Chem* 280, 18130–18137
- Smrt, R. D., Eaves-Egenes, J., Barkho, B. Z., Santistevan, N. J., Zhao, C., Aimone, J. B., Gage, F. H., and Zhao, X. (2007) Mecp2 deficiency leads to delayed maturation and altered gene expression in hippocampal neurons. *Neurobiol Dis* 27, 77–89
- Snyder, J. S., Hong, N. S., McDonald, R. J., and Wojtowicz, J. M. (2005) A role for adult neurogenesis in spatial long-term memory. *Neuroscience* 130, 843–52
- Sokol, D. K., Maloney, B., Long, J. M., Ray, B., and Lahiri, D. K. (2011) Autism, Alzheimer disease, and fragile X: APP, FMRP, and mGluR5 are molecular links. *Neurology* 76, 1344–52
- Souopgui, J., Sölter, M., and Pieler, T. (2002) XPA3 promotes cell cycle withdrawal during primary neurogenesis in *Xenopus laevis*. *EMBO J.* 21, 6429–39
- Spalding, K. L., Bergmann, O., Alkass, K., Bernard, S., Salehpour, M., Huttner, H. B., Boström, E., Westerlund, I., Vial, C., Buchholz, B. a, Possnert, G., Mash, D. C., Druid, H., and Frisén, J. (2013) Dynamics of hippocampal neurogenesis in adult humans. *Cell* 153, 1219–27
- Stone, K. (2012) Experts urge caution over unregulated stem cell therapies. *Ann. Neurol.* 71, A9
- Szczepanowska, J. (2009) Involvement of Rac/Cdc42/PAK pathway in cytoskeletal rearrangements. *Acta Biochim. Pol.* 56, 225–34
- Tarpey, P. S., Smith, R., Pleasance, E., Whibley, A., Edkins, S., Hardy, C., O'Meara, S., Latimer, C., Dicks, E., Menzies, A., Stephens, P., Blow, M., Greenman, C., Xue, Y., Tyler-Smith, C., Thompson, D., Gray, K., Andrews, J., Barthorpe, S., Buck, G., Cole, J., Dunmore, R., Jones, D., Maddison, M., Mironenko, T., Turner, R., Turrell, K., Varian, J., West, S., Widaa, S., Wray, P., Teague, J., Butler, A., Jenkinson, A., Jia, M., Richardson, D., Shepherd, R., Wooster, R., Tejada, M. I., Martinez, F., Carvill, G., Goliath, R., de Brouwer, A. P. M., van Bokhoven, H., Van Esch, H., Chelly, J., Raynaud, M., Ropers, H.-H., Abidi, F. E., Srivastava, A. K., Cox, J., Luo, Y., Mallya, U., Moon, J., Parnau, J., Mohammed, S., Tolmie, J. L., Shoubbridge, C., Corbett, M., Gardner, A., Haan, E., Rujirabanjerd, S., Shaw, M., Vandeleur, L., Fullston, T., Easton, D. F., Boyle, J., Partington, M., Hackett, A., Field, M., Skinner, C., Stevenson, R. E., Bobrow, M., Turner, G., Schwartz, C. E., Gecz, J., Raymond, F. L., Futreal, P. A., and Stratton, M. R. (2009) A systematic, large-scale resequencing screen of X-chromosome coding exons in mental retardation. *Nat. Genet.* 41, 535–43
- Tashiro, A., Sandler, V. M., Toni, N., Zhao, C., and Gage, F. H. (2006) NMDA-receptor-mediated, cell-specific integration of new neurons in adult dentate gyrus. *Nature* 442, 929–33
- Tashiro, A., Zhao, C., and Gage, F. H. (2006) Retrovirus-mediated single-cell gene knockout technique in adult newborn neurons in vivo. *Nat. Protoc.* 1, 3049–55
- Thakker-Varia, S., Behnke, J., Doobin, D., Dalal, V., Thakkar, K., Khadim, F., Wilson, E., Palmieri, A., Antila, H., Rantamaki, T., and Alder, J. (2014) VGF (TLQP-62)-induced neurogenesis targets early phase neural progenitor cells in the adult hippocampus and requires glutamate and BDNF signaling. *Stem Cell Res.* 12, 762–77

Références Bibliographiques

- Thévenot, E., Moreau, A. W., Rousseau, V., Combeau, G., Domenichini, F., Jacquet, C., Goupille, O., Amar, M., Kreis, P., Fossier, P., and Barnier, J.-V. (2011) p21-Activated kinase 3 (PAK3) protein regulates synaptic transmission through its interaction with the Nck2/Grb4 protein adaptor. *J. Biol. Chem.* 286, 40044–59
- Toni, N., Laplagne, D. a, Zhao, C., Lombardi, G., Ribak, C. E., Gage, F. H., and Schinder, A. F. (2008) Neurons born in the adult dentate gyrus form functional synapses with target cells. *Nat. Neurosci.* 11, 901–7
- Toni, N., Teng, E. M., Bushong, E. A., Aimone, J. B., Zhao, C., Consiglio, A., van Praag, H., Martone, M. E., Ellisman, M. H., and Gage, F. H. (2007) Synapse formation on neurons born in the adult hippocampus. *Nat. Neurosci.* 10, 727–34
- Trivier, E., De Cesare, D., Jacquot, S., Pannetier, S., Zackai, E., Young, I., Mandel, J. L., Sassone-Corsi, P., and Hanauer, A. (1996) Mutations in the kinase Rsk-2 associated with Coffin-Lowry syndrome. *Nature* 384, 567–70.
- Tronel, S., Fabre, A., Charrier, V., Oliet, S. H. R., Gage, F. H., and Abrous, D. N. (2010) Spatial learning sculpts the dendritic arbor of adult-born hippocampal neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 7963–8
- Vadlamudi, R. K., Li, F., Adam, L., Nguyen, D., Ohta, Y., Stossel, T. P., and Kumar, R. (2002) Filamin is essential in actin cytoskeletal assembly mediated by p21-activated kinase 1. *Nat. Cell Biol.* 4, 681–90
- Vadodaria, K. C., Brakebusch, C., Suter, U., and Jessberger, S. (2013) Stage-specific functions of the small Rho GTPases Cdc42 and Rac1 for adult hippocampal neurogenesis. *J. Neurosci.* 33, 1179–89
- Vaillend, C., Poirier, R., and Laroche, S. (2008) Genes, plasticity and mental retardation. *Behav Brain Res* 192, 88–105
- Van Bokhoven, H. (2011) Genetic and epigenetic networks in intellectual disabilities. *Annu. Rev. Genet.* 45, 81–104
- Van Galen, E. J. M., and Ramakers, G. J. (2005) Rho proteins, mental retardation and the neurobiological basis of intelligence. *Prog. Brain Res.* 147, 295–317
- Van Praag, H., Schinder, A. F., Christie, B. R., Toni, N., Palmer, T. D., and Gage, F. H. (2002) Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature* 415, 1030–4
- Verpelli, C., and Sala, C. (2012) Molecular and synaptic defects in intellectual disability syndromes. *Curr. Opin. Neurobiol.* 22, 530–6
- Viaud, J., and Peterson, J. R. (2009) An allosteric kinase inhibitor binds the p21-activated kinase autoregulatory domain covalently. *Mol. Cancer Ther.* 8, 2559–65
- Viou, L., Launay, P.S., Rousseau, V., Devignot, V., Murakami, F., Barnier, J.V., Métin, C. (2013) Role of the PAK3 kinase in migration of cortical interneurons. in preparation. Prep.
- Vissers, L. E. L. M., de Ligt, J., Gilissen, C., Janssen, I., Steehouwer, M., de Vries, P., van Lier, B., Arts, P., Wieskamp, N., del Rosario, M., van Bon, B. W. M., Hoischen, A., de Vries, B. B. a, Brunner, H. G., and Veltman, J. a (2010) A de novo paradigm for mental retardation. *Nat. Genet.* 42, 1109–12
- Walker, T. L., White, A., Black, D. M., Wallace, R. H., Sah, P., and Bartlett, P. F. (2008) Latent stem and progenitor cells in the hippocampus are activated by neural excitation. *J Neurosci* 28, 5240–7
- Wang, C., Liu, F., Liu, Y.-Y., Zhao, C.-H., You, Y., Wang, L., Zhang, J., Wei, B., Ma, T., Zhang, Q., Zhang, Y., Chen, R., Song, H., and Yang, Z. (2011) Identification and characterization of neuroblasts in the subventricular zone and rostral migratory stream of the adult human brain. *Cell Res.* 21, 1534–50

Références Bibliographiques

- Wang, T., Bray, S. M., and Warren, S. T. (2012) New perspectives on the biology of fragile X syndrome. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 22, 256–63
- Westmark, C. J., and Malter, J. S. (2007) FMRP mediates mGluR5-dependent translation of amyloid precursor protein. *PLoS Biol.* 5, e52
- Wiegert, J. S., and Bading, H. (2011) Activity-dependent calcium signaling and ERK-MAP kinases in neurons: a link to structural plasticity of the nucleus and gene transcription regulation. *Cell Calcium* 49, 296–305
- Winner, B., Kohl, Z., and Gage, F. H. (2011) Neurodegenerative disease and adult neurogenesis. *Eur J Neurosci* 33, 1139–1151
- Wiskott, L., Rasch, M. J., and Kempermann, G. (2006) A functional hypothesis for adult hippocampal neurogenesis: avoidance of catastrophic interference in the dentate gyrus. *Hippocampus* 16, 329–43
- Wong, L. L.-Y., Lam, I. P.-Y., Wong, T. Y.-N., Lai, W.-L., Liu, H.-F., Yeung, L.-L., and Ching, Y.-P. (2013) IPA-3 inhibits the growth of liver cancer cells by suppressing PAK1 and NF- κ B activation. *PLoS One* 8, e68843
- Xu, N.-J., and Henkemeyer, M. (2009) Ephrin-B3 reverse signaling through Grb4 and cytoskeletal regulators mediates axon pruning. *Nat. Neurosci.* 12, 268–76
- Yamaguchi, M., and Mori, K. (2005) Critical period for sensory experience-dependent survival of newly generated granule cells in the adult mouse olfactory bulb. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 9697–702
- Yamanaka, S. (2012) Induced pluripotent stem cells: past, present, and future. *Cell Stem Cell* 10, 678–84
- Yang, N., Higuchi, O., Ohashi, K., Nagata, K., Wada, A., Kangawa, K., Nishida, E., and Mizuno, K. (1998) Cofilin phosphorylation by LIM-kinase 1 and its role in Rac-mediated actin reorganization. *Nature* 393, 809–812
- Yao, I., Ohtsuka, T., Kawabe, H., Matsuura, Y., Takai, Y., and Hata, Y. (2000) Association of membrane-associated guanylate kinase-interacting protein-1 with Raf-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 270, 538–42
- Ye, D. Z., and Field, J. (2012) PAK signaling in cancer. , 105–116
- Yokoyama, T. K., Mochimaru, D., Murata, K., Manabe, H., Kobayakawa, K., Kobayakawa, R., Sakano, H., Mori, K., and Yamaguchi, M. (2011) Elimination of adult-born neurons in the olfactory bulb is promoted during the postprandial period. *Neuron* 71, 883–97
- Yu, H., and Chen, Z. (2011) The role of BDNF in depression on the basis of its location in the neural circuitry. *Acta Pharmacol. Sin.* 32, 3–11
- Zeniou, M., Gattoni, R., Hanauer, A., and Stévenin, J. (2004) Delineation of the mechanisms of aberrant splicing caused by two unusual intronic mutations in the RSK2 gene involved in Coffin-Lowry syndrome. *Nucleic Acids Res.* 32, 1214–23
- Zhang, C.-L., Zou, Y., He, W., Gage, F. H., and Evans, R. M. (2008) A role for adult TLX-positive neural stem cells in learning and behaviour. *Nature* 451, 1004–7
- Zhang, H., Webb, D. J., Asmussen, H., and Horwitz, A. F. (2003) Synapse formation is regulated by the signaling adaptor GIT1. *J. Cell Biol.* 161, 131–42
- Zhang, H., Webb, D. J., Asmussen, H., Niu, S., and Horwitz, A. F. (2005) A GIT1/PIX/Rac/PAK signaling module regulates spine morphogenesis and synapse formation through MLC. *J Neurosci* 25, 3379–88

Références Bibliographiques

Zhang, L., Yang, X., Yang, S., and Zhang, J. (2011) The Wnt /beta-catenin signaling pathway in the adult neurogenesis. *Eur J Neurosci* 33, 1–8

Zhao, C., Teng, E. M., Summers, R. G., Ming, G.-L., and Gage, F. H. (2006) Distinct morphological stages of dentate granule neuron maturation in the adult mouse hippocampus. *J Neurosci* 26, 3–11

Zhao, Z. S., and Manser, E. (2005) PAK and other Rho-associated kinases--effectors with surprisingly diverse mechanisms of regulation. *Biochem J* 386, 201–214

ANNEXES

ANNEXE I

p21-Activated Kinase 3 (PAK3) Protein Regulates Synaptic Transmission through Its Interaction with the Nck2/Grb4 Protein Adaptor

Thévenot Emmanuel, Moreau Alexandre William, Rousseau Véronique, Combeau Gaëlle, **Domenichini Florence**, Jacquet Claire, Goupille Olivier, Amar Muriel, Kreis Patricia, Fossier Philippe, Barnier Jean-Vianney -2011- J Biol Chem ;286(46):40044-59. doi: 10.1074/jbc.M111.262246.

p21-activated Kinase 3 (PAK3) Protein Regulates Synaptic Transmission through Its Interaction with the Nck2/Grb4 Protein Adaptor^{*[S]}

Received for publication, May 19, 2011, and in revised form, September 23, 2011. Published, JBC Papers in Press, September 23, 2011, DOI 10.1074/jbc.M111.262246

Emmanuel Thévenot[‡], Alexandre William Moreau[‡], Véronique Rousseau[§], Gaëlle Combeau[§],
Florence Domenichini[§], Claire Jacquet[§], Olivier Goupille[‡], Muriel Amar[§], Patricia Kreis[‡], Philippe Fossier[§],
and Jean-Vianney Barnier[§]

From the [‡]CNRS, Institut de Neurobiologie Alfred Fessard, Laboratoire de Neurobiologie Cellulaire et Moléculaire, 91190 Gif sur Yvette and the [§]Centre de Neurosciences Paris-Sud, UMR 8195, Université Paris-Sud, and [¶]CNRS, UMR 8195, Orsay, France

Background: The mental retardation p21-activated kinase (PAK3) protein regulates synaptic plasticity through the regulation of cytoskeleton dynamics of dendritic spines.

Results: PAK3 binds the Grb4/Nck2 adaptor in brain, and inhibition of this complex alters synaptic currents but not spine morphology.

Conclusion: The PAK3-Nck2 complex regulates post-synaptic transmission independently of spine dynamics.

Significance: This opens perspectives in understanding the PAK3 implication in synaptic plasticity and mental retardation.

Mutations in the p21-activated kinase 3 gene (*pak3*) are responsible for nonsyndromic forms of mental retardation. Expression of mutated PAK3 proteins in hippocampal neurons induces abnormal dendritic spine morphology and long term potentiation anomalies, whereas *pak3* gene invalidation leads to cognitive impairments. How PAK3 regulates synaptic plasticity is still largely unknown. To better understand how PAK3 affects neuronal synaptic plasticity, we focused on its interaction with the Nck adaptors that play a crucial role in PAK signaling. We report here that PAK3 interacts preferentially with Nck2/Grb4 in brain extracts and in transfected cells. This interaction is independent of PAK3 kinase activity. Selective uncoupling of the Nck2 interactions in acute cortical slices using an interfering peptide leads to a rapid increase in evoked transmission to pyramidal neurons. The P12A mutation in the PAK3 protein strongly decreases the interaction with Nck2 but only slightly with Nck1. In transfected hippocampal cultures, expression of the P12A-mutated protein has no effect on spine morphogenesis or synaptic density. The PAK3-P12A mutant does not affect synaptic transmission, whereas the expression of the wild-type PAK3 protein decreases the amplitude of spontaneous miniature excitatory currents. Altogether, these data show that PAK3 down-regulates synaptic transmission through its interaction with Nck2.

Mental retardation, also named intellectual disability, is the most frequent human cognitive disorder and has now been associated with defects in several different genes (1, 2). Among these genes, *pak3* is located on the X chromosome and encodes a p21-activated kinase (PAK)⁴ of group I with five mutations responsible for this disease that have been identified to date (3, 4). PAK group I also includes PAK1 and PAK2, and PAKs are known to be effectors of Rac1 and Cdc42 GTPases and to play an important role in the regulation of cytoskeleton dynamics (5). Recent data demonstrate their role in synaptic plasticity, in spinogenesis (4), and also in post-natal brain development (6). The lack of functional complementation between PAK3 and the two other PAKs in patients with mental retardation as well as in *pak3* KO mice strongly suggests that PAK3 possesses specific functions in neuronal signaling (4). Indeed, *pak3* knock-out leads to anomalies in plasticity (e.g. long term potentiation) and deficiencies in learning and memory (7). Expression of PAK3 genes with kinase-dead or mental retardation mutations in hippocampal neurons also alters spinogenesis (8–10). Nevertheless, how PAK3 regulates synaptic transmission and plasticity is still largely unknown (4, 11).

PAK protein activation is achieved through their recruitment to the membrane and their interaction with Rac1 and Cdc42 GTPases. One pathway for membrane recruitment is reached through the two Nck adaptors (Nck1/Nck α and Nck2/Nck β /Grb4), each of which contains one SH2 domain and three SH3 domains (12–14). These adaptors link membrane-localized phosphotyrosine residues to proline-rich domain-containing proteins implicated in cytoskeleton regulation (15). Indeed, a mutation that abrogates Nck interaction with the *Drosophila* D-PAK protein generates defects of photoreceptor axon path-finding (16). Moreover the phosphorylation-dependent regula-

* This work was supported in part by Agence Nationale de la Recherche Grant ANR-MNP-2009, the Fondation Jérôme Lejeune, and by a fellowship from Association pour la Recherche sur le Cancer (to E. T.).

[S] The on-line version of this article (available at <http://www.jbc.org>) contains supplemental Figs. 1–4.

¹ Present address: Sunnybrook Research Institute, Brain Science Research Program, Toronto, Ontario M4N 3M5, Canada.

² Present address: Commissariat à l'Énergie Atomique, Direction des Sciences du Vivant, Institut des Maladies Emergentes et des Nouvelles, 922960, Fontenay aux Roses, France.

³ To whom correspondence should be addressed: Centre de Neurosciences Paris-Sud, Bat 444, Centre Universitaire; 91405, Orsay, France. Tel.: 33-1-69158160; E-mail: jean-vianney.barnier@u-psud.fr.

⁴ The abbreviations used are: PAK, p21-activated kinase; TCL, total cell lysate; DIV, days *in vitro*; aCSF, artificial cerebrospinal fluid; eEPSC, evoked excitatory postsynaptic current; mEPSC, miniature excitatory postsynaptic current; SH, Src homology.

tion of the PAK1/Nck1 interaction was shown to control cell spreading, polarization, and migration (17–19). Recent data show that Nck1 and Nck2 play different roles in cell signaling, spinogenesis, and synaptic plasticity (20–23). Interestingly, Nck2 is implicated in dendritic spine morphogenesis downstream from the ephrinB reverse signaling pathway (22). The notion that interaction between PAK3 and Nck adaptors may play a role in synaptic signaling is thus particularly attractive.

To address this hypothesis, we investigated the interaction between PAK3 and the two Nck adaptors, using several approaches in brain lysates and in transfected cells. We identified PAK3-Nck2 as the main complex in brain and characterized the unique properties of the PAK3-Nck2 complex compared with the other PAK-Nck complexes described to date. We demonstrated that Nck2 plays an important role in evoked synaptic response. Finally, we showed that the PAK3-Nck2 complex does not influence dendritic spine and synapse formation, but does down-regulate spontaneous synaptic transmission. These results uncover new aspects of PAK3 function in neuronal signaling by linking Nck2 signaling to PAK3.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Plasmid Constructs—In this report, PAK3 refers to the PAK3a splice variant (24, 25). The following plasmids were described previously (10, 24): the pcDNA3-HA-PAK3-WT, -kd, -ca, -R419X, -A365E, and -R67C plasmids encode mouse HA-tagged PAK3 wild-type, K297L kinase-defective, T421E constitutively active, mental retardation truncated mutant, missense kinase defective mutant, and the missense R67C mutated proteins, respectively. New mutants and constructs were prepared from the pcDNA3-HA-PAK3-WT plasmid with *Pfu* polymerase (Promega) using procedures based upon the QuikChange protocol (Stratagene) and confirmed by sequencing. The mutant of the PAK3 first proline-rich domain (P12A) was created using the oligonucleotide set (5'-GCTTGGATAACGAAGAAAACCCGCGGCTCCCCACTGAGGATGAAAC-3' and 5'-GTTTCATCCTCAGTGGGGGAGCCGCGGGT-TTTTCTTCGTTATCCAAGC-3') by PCR from pcDNA3-HA-PAK3-WT, giving the pcDNA3-HA-PAK3-P12A plasmid. The p3×-FLAG-PAK3-WT, p3×-FLAG-PAK3-P12A and p3×-FLAG-PAK3-kd constructs were obtained by KpnI/XbaI digestion of the corresponding pcDNA3-HA-PAK3 plasmids, and the inserts were ligated into the p3×-FLAG-CMV-24 vector (Sigma). The N-terminal deleted mutant of PAK3 (Δ Nter) was obtained using the oligonucleotide set (5'-CGGGATCC-TGGTAACAACCGAGACTCTTCAGCACTCAACC-3' and 5'-GGCTCTAGACTAACGGCTACTGTTCTTAATTGC-3'). After KpnI/XbaI digestion, the truncated sequence of PAK3 was introduced and ligated into the KpnI/XbaI linear p3×-FLAG-CMV-24 vector, to obtain the p3×-FLAG-PAK3- Δ Nter plasmid. The pGFP-PAK3-WT plasmid was described previously (10). The BamHI/XbaI fragment of the pcDNA3-HA-PAK3-P12A plasmid was subcloned into the BamHI/XbaI linear pEGFP-C1 vector (Clontech) to obtain the pGFP-PAK3-P12A plasmid. The sequence coding for peptide covering PAK3 amino acids 2–49 fused to the glutathione S-transferase (GST) moiety were amplified with the oligonucleotide set (5'-CAGGATCCTCTGACAGCTTGGATAACG-3' and 5'-GCCTCGA-

GTCAGCGAAGCCTGGCTTTCTTATTCTTCTC-3'), and the PCR products were BamHI/XhoI-subcloned into pGEX-6P1 (GE Healthcare), leading to the pGST-PAK3-(2–49) constructs (WT and S20E). pGST-PAK3-S4G and pGST-PAK3-S4G/S20E constructs were prepared from pGST-PAK3-(2–49)-WT and pGST-PAK3-(2–49)-S20E plasmids, respectively, with *Pfu* polymerase (Promega) using procedures based upon the QuikChange protocol (Stratagene), using the oligonucleotide set (5'-CAGGGGCCCTGGGATCCTCTGACGGCTTGGATAACGAAGAAAACCCCCAG-3' and 5'-CTGGGGGTTTCTTCGTTATCCAAGCCGTCAGAGGATCCCAAGGGGCCCTG-3') and confirmed by sequencing. The FLAG-Pak1-KD was obtained by subcloning an amplified fragment of the pDA-PAK1-K299R kindly provided by M. Lattamahieu (Sanofi-Aventis, France) into the p3×-FLAG-CMV-24 vector. The N-terminal portions of mouse PAK1-(2–56) and PAK2-(2–63) were amplified with the oligonucleotide sets 5'-CCGGATCCAGGATTCAAATAACGGCGTAGACATC-3', 5'-GCTCTAGACTATCGATAAAAACCGGTCTTC-3' and 5'-CGCGAATTCTCTGATAACGGGGAGCTAGAG-3', 5'-CTCGAGCTATTTGTTCCCTCGGTTTTTTT-TCC-3', respectively. The PCR products were, respectively, BamHI/XbaI subcloned into pGEX-2T* (GE Healthcare), leading to pGST-PAK1-(2–56)-WT plasmid, and EcoRI/XhoI subcloned into pGEX-6P3 (GE Healthcare), leading to pGST-PAK2-(2–63)-WT plasmid.

The pRK5-HA-Nck1 and the pRK5-HA-Nck2 plasmids were a gift from W. Li (University of Southern California, Los Angeles). The pGST-Nck1-(SH3)₂ was kindly provided by B. Mayer (University of Connecticut Health Center, Farmington). The pGST-Nck2-(SH3)₂ plasmid was obtained by amplification of the second SH3 domain of human Nck2 from pRK5-HA-Nck2 with the oligonucleotide set 5'-CGCGGATCCGCCGACCGCATCTACGACC-3' and 5'-CCGGAATTCAGTCCACCTCC-TCCAAGACG-3', and BamHI/EcoRI cloning into the pGEX-6P3 vector.

Plasmids expressing GFP-fused GTPases (GFP-Cdc42-V12 and GFP-Cdc42-N17) and the GST-Cdc42-V12 plasmid were a gift from P. Fort (CNRS, CRBM, Montpellier, France). The huntingtin plasmid was a gift from S. Humbert and F. Saudou. The GST-B-Raf plasmid was described previously (26).

Cell Culture and Transfection—COS-7 cells and HeLa 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 μ g/ml streptomycin (Invitrogen). Plasmid DNA was transfected either using the electroporation method with an electroporator (Bio-Rad) for COS-7 cells, as described previously (24), or with Lipofectamine LTX Plus reagent (Invitrogen) for HeLa cells, as recommended by the manufacturer.

RT-Quantitative Real Time PCR—cDNAs were synthesized using the Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase according to the manufacturer's instructions (Promega) from 2 μ g of total RNA of mouse E18 and adult brains. Quantitative PCR was performed with a Lightcycler (Roche Diagnostics) using the FastStart DNA Master^{PLUS} SYBR Green I detection protocol. The reaction mixture was subjected to real time PCR cycling by hot start followed by multiple cycles of denaturing at

PAK3 Regulates Synaptic Transmission through Nck2

95 °C for 5 s, annealing at 60 °C for 5 s, and extension at 72 °C for 8 s. Mouse β -actin, Nck1, and Nck2 primers sets utilized for real time quantification were obtained from Qiagen (QuantiTect Primer Assay) and used following the manufacturer's instructions. The analysis of fluorescence was carried out using LC software version 3.01 (Roche Diagnostics).

Antibodies and Immunoblotting—Immunoblot analyses were performed using anti-HA (monoclonal 12CA5 from Roche Diagnostics, agarose-linked-HA antibodies from Sigma A2095, and the polyclonal sc-805 from Santa Cruz Biotechnology), anti-FLAG (F7425 from Sigma), anti-GFP (catalog no. 2555 from Cell Signaling Technology), anti-PAK3 (N19, Sc-1871 from Santa Cruz Biotechnology), anti pan-Nck directed against the SH2 domain of the Nck adaptor (catalog no. 61099 from BD Transduction Laboratories), and anti- β -actin (AC-15, sc-69879 from Santa Cruz Biotechnology). Because commercial Nck antibodies do not allow the immunoprecipitation of each Nck isoform, we generated two new antibodies against unique sequences for each Nck adaptor. The PADDSEVDPGE peptide corresponding to an internal (92–102) amino acid sequence of the human/mouse Nck1 protein was synthesized and fused to an aminohexanoic acid arm and a cysteine for linking to keyhole limpet hemocyanin (GeneCust). The DGPALHPAH peptide inside the human/mouse Nck2 protein (residues 257–265) was similarly processed. Two rabbits for each conjugated peptide were immunized with a classical procedure. For the Western blot in Fig. 1E, the Nck polyclonal antibodies were affinity-purified by Ultralink column chromatography (Perbio Science) after covalent attachment of the corresponding peptide, following the manufacturer's instructions. Immunocytochemistry experiments were performed using mouse monoclonal PSD95 (K28/43 from NeuroMab) antibodies, rabbit vGLUT1 antibody (27), and Alexa-568 and Alexa-633-conjugated secondary antibodies (Invitrogen), as described previously (10). For Western blot analysis, protein samples were separated by 10% SDS-PAGE and transferred to PVDF membranes (Millipore). Immunodetection was performed using the SuperSignal chemiluminescent reagent (Thermo Scientific Pierce). Quantification was performed after acquisition with a CCD camera (GeneSnap, SynGene) and quantification software (GeneTools, SynGene). Statistical analyses were performed using the Student's *t* test in GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc.). All data shown are representative of a typical experiment from three independent experiments or more.

Pulldown Assay and Co-immunoprecipitation—The GST-fused proteins were expressed in *Escherichia coli* BL21 and purified on glutathione-agarose beads as described by the manufacturer (GE Healthcare). Pulldown assays were performed as described previously (24). Briefly, COS-7 cells were transfected with constructs expressing HA-PAK3-WT. Forty hours later, cells were washed in cold phosphate-buffered saline (PBS) containing 0.1 mM orthovanadate and lysed in 50 mM HEPES, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 15 mM NaF, 2 mM EDTA, and protease inhibitor mixture. After 15 min on ice, lysates were cleared by centrifugation at 20,000 \times *g* for 15 min. Cleared cell extracts were incubated with 10 μ g of GST-Nck1-(SH3)₂ or GST-Nck2-(SH3)₂ recombinant proteins and immobilized on

glutathione beads, for 2 h at 4 °C. The beads were washed with the lysis buffer, and affinity-precipitated proteins were analyzed by Western blotting using the appropriate antibodies. For co-immunoprecipitation from COS-7 and HeLa cells expressing FLAG-PAK3 constructs and/or the HA-Nck plasmids, cells lysed in modified Robert's lysis buffer (0.1% Triton X-100, 10% glycerol, 20 mM Tris, pH 8.0, 137 mM NaCl, 50 mM NaF supplemented with protease and phosphatase inhibitors mixture) were immunoprecipitated overnight at 4 °C, with anti-HA agarose-conjugate (Sigma). For immunoprecipitation in the presence of synthetic peptides, the wild-type inhibitory peptide named P₁₂ (EEKPPAPPLRMNSNN) or the mutant peptide named A₁₂ (EEKPAAPPLRMNSNN), purchased from GeneCust at >90% purity, was added at 1 mM after cell lysis. Immune complexes were separated by electrophoresis and transferred to PVDF membranes, before Western blotting analysis, with appropriate antibodies. Expression of transfected proteins was checked in each experiment by Western blotting of total cell lysate (TCL) sample. The competing P₁₂ or the control A₁₂ peptides were added at 250 μ M in cell lysate before PAK proteins were pulled down by GST-Nck2(SH3)₂ beads, as described above. For brain co-immunoprecipitation, adult brain or 18-day embryonic mouse brains were dissected and washed in ice-cold PBS, homogenized with a Potter-Elvehjem homogenizer in modified Robert's lysis buffer as described above, and incubated for 20 min on ice. Lysates were cleared by centrifugation at 20,000 \times *g* for 15 min, and 10 mg of total protein was used for each assay. A clarification step with protein G-agarose (Sigma) for 2 h at 4 °C was performed. 10 μ l of anti-Nck1 or anti-Nck2 serum or the corresponding preimmune sera, in the presence of 50 μ l of protein G-agarose, were added for overnight incubation at 4 °C. After extensive washing, precipitated complexes were analyzed by Western blotting, with appropriate antibodies.

Kinase Assay—For GST-PAK3-(2–49)-WT or GST-PAK3-(2–49)-S20E phosphorylation by CaMKII, 10 μ g of GST recombinant PAK3 proteins were incubated with 50 units of recombinant α CaMKII-(1–325) (New England Biolabs) for 45 min at 30 °C in the presence of 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 2 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 1.2 mM calmodulin, 2 mM CaCl₂, 5 μ Ci/tube of [γ -³²P]ATP (4500 Ci/mmol, PerkinElmer Life Sciences), 10 μ M ATP. For Cdc42-dependent activation, COS-7 cells were transfected with 10 μ g of HA-PAK3-WT plasmid. To activate the kinase, cleared cell extracts were incubated with 5 μ g of recombinant GST-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) overnight at 4 °C. For kinase reactions, immunoprecipitates were washed in the kinase buffer (25 mM HEPES, pH 7.4, 25 mM MgCl₂, 25 mM β -glycerophosphate, 2 mM dithiothreitol, 0.1 mM orthovanadate) and then incubated in the presence of 20 μ M ATP and 5 μ Ci of [γ -³²P]ATP for 20 min at 30 °C. Akt and PKA kinases were purchased from Cell Signaling and Sigma, respectively, and kinase assays were performed as recommended by the providers.

Tryptic Digestion and Phosphopeptide Mapping—After autophosphorylation or CaMKII kinase assays, full-length or the

amino acid residues 2–49 of PAK3 protein was separated on 10 and 15% acrylamide gels, respectively. Gels were dried between two cellophane sheets, and radioactive bands corresponding to PAK3 were detected by autoradiography. Each band was excised and washed three times in 45% methanol, 10% acetic acid and three times in 50% methanol. Bands were then resuspended in 25 mM ammonium bicarbonate, pH 7.5, containing 25 units of trypsin (Promega) for 14 h at 37 °C. Two-dimensional migrations of tryptic phosphopeptides were performed as described previously (26). Briefly, the lyophilized samples were resuspended in 10% acetic acid (5000–10,000 cpm/ μ l), spotted onto 100- μ m cellulose-coated plates (Kodak chromatogram sheet) in 1- μ l aliquots, and electrophoresed for 3 h at 400 V in a horizontal electrophoresis unit in pH 3.5 buffer (acetic acid 10% and pyridine 1%). Plates were air-dried and then chromatographed in buffer containing 30% pyridine, 20% butanol, and 6% glacial acetic acid until the mobile phase reached the top of the plate. 32 P-Labeled tryptic peptides were detected by autoradiography on Kodak Biomax film for up to 3 days.

Dissociated Hippocampal Neuron Culture, Immunocytochemistry, Imaging, and Synaptogenesis Analysis—Primary cultures of dissociated hippocampal neurons were prepared from embryonic day 17 (E17) mice. Briefly, 300–400 cells/ mm^2 were plated on 18-mm coverslips previously coated with 0.5 mg/ml poly-L-ornithine and grown in B27-supplemented Neurobasal medium (Invitrogen). Neurons were transfected with GFP-tagged constructs using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) at 18 days *in vitro* (DIV) for synapse analysis, before paraformaldehyde fixation at DIV21. After fixation, neurons were imaged with a Zeiss LSM 510 confocal microscope using the 488-nm band of an argon laser, the 561-nm band of a diode-pumped solid-state laser, and the 633-nm band of a He:Ne laser. Healthy and differentiated transfected neurons were selected, and cells with a high expression of the transgene were excluded. Images were acquired using a $\times 63$ objective (1.4 numerical aperture), using a frame size of 1024 \times 1024 pixels, with an optic zoom to generate 50 \times 50 μm cropped images. Because protrusion density could be variable depending on the distance from the soma, dendritic segments were acquired at a distance restricted between 50 and 150 μm from the soma. Furthermore, z series stacks of 1.8–3 μm (typically five to eight frames) were taken from the bottom to the top of dendrites and used ImageJ software (National Institutes of Health) to generate image projections. All images were acquired and analyzed while blinded to the experimental condition. Each experiment was repeated two to four times from different cultures. For the morphometric study, the parameters analyzed were protrusion density and length, measured from the limit of the dendrite to the tip of the protrusion using SimplePCI image analysis software (Hamamatsu Inc.). The classification of dendritic protrusions, *i.e.* filopodia *versus* spines, was verified at the same time using the three-dimensional image stack. All data are expressed as means \pm S.E. For synapse analysis, after paraformaldehyde fixation at DIV21, GFP-transfected neurons were double immunolabeled for native proteins using anti-PSD-95 (1:200) and anti-vGLUT1 (1:2000) followed by Alexa-568-conjugated anti-mouse IgG and Alexa-633-conjugated anti-rabbit IgG. PSD-95-positive protrusions were counted from GFP and PSD-95

images. Synapses were identified as PSD95-positive spines with adjacent staining of vGLUT1 from the three-color images. Immunofluorescent puncta were counted for 100 μm lengths of dendrites. All images were acquired and analyzed as described above while blinded to experimental conditions using identical acquisition parameters. Statistical comparisons of PSD-95 clusters and densities were done using the Student's *t* test in GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc). All data are expressed as means \pm S.E.

Peptide Perfusion and Patch Clamp Recording in Cortical Slices and mEPSCs Recording—In accordance with the guidelines of the American Physiological Society, 2 weak-old Wistar rats were decapitated and their brains quickly removed. A hemisection of the left hemisphere was removed, attached to the stage of a Vibratome tissue slicer (Campden Instrument), and immersed in ice-cold artificial cerebrospinal fluid (aCSF) containing (in mM) the following: 126 NaCl, 26 NaHCO₃, 10 glucose, 2 CaCl₂, 1.5 KCl, 1.5 MgSO₄, and 1.25 KH₂PO₄ (pH 7.5, 310–330 mosM). 250- μm parasagittal slices containing primary visual cortex were cut and transferred, after at least 1 h of recovery, to the recording chamber mounted on the X-Y translation stage of an upright microscope (Zeiss Axioscop 2 FS+). Slices were perfused with aCSF, continuously bubbled with 95% O₂, 5% CO₂, and maintained at 32 °C using an in-line solution heater (Warner Instruments). Cells were visualized using video-enhanced differential interference contrast optics and $\times 40$ long-working distance water immersion lens. Stable whole-cell voltage clamp recordings of evoked excitatory postsynaptic currents (eEPSCs) were performed in layer 5 pyramidal neurons using a Multiclamp 700A amplifier (Axon Instruments). As described previously (28), eEPSCs were recorded, 10 min after patch stabilization, following electrical stimulations (1–10 μA , 0.2 ms, every minute) of the layer 2/3 with 1 megohm impedance bipolar tungsten electrodes (TST33A10KT, WPI, Hertfordshire, UK). Stimulation intensity was set to obtain subliminal eEPSCs, and cells were held at -80 mV. This value is the reversal potential for inhibition in our experimental conditions so that we record only excitatory responses (29, 30). To monitor the stability of patch seals, access resistance was also measured over the whole time of the experiment using a 50-ms hyperpolarizing step injected 100 ms before the onset of stimulation (as is illustrated in Fig. 3H). In addition, to monitor eEPSCs stability during the experiments, a control recording was systematically performed at the same time in a surrounding layer 5 pyramidal neuron using a patch pipette that did not contain the peptide. Data were filtered at 2 kHz by a low pass Bessel filter and sampled at 4 kHz using a Digidata 1322A acquisition board (Axon Instruments). Peptide perfusion was achieved through patch clamp pipettes (3–5 megohms) that contained 100 μM of either the WT uncoupling peptide P₁₂ (EEKPPAPPLRMN-SNN) or the A₁₂ mutant (*i.e.* noninteracting) peptide (EEK-PAAPPLRMNSNN) and diluted in the following internal solution (in mM): 140 potassium gluconate, 10 HEPES, 4 ATP, 2 MgCl₂, 0.4 GTP, and 0.5 EGTA (pH 7.3 adjusted with KOH, 270–290 milliosmolar). The synthetic peptides used in this study were purchased from GeneCust at >90% purity and dialyzed against a patch pipette solution. Statistical analyses were performed blind to experimental conditions using the Mann-

PAK3 Regulates Synaptic Transmission through Nck2

Whitney test in GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc). As described in Seeburg *et al.* (31), electrophysiological recordings of mEPSCs were performed in dissociated mouse hippocampal cultures placed in a recording chamber mounted on the X-Y translation stage of an upright microscope (Zeiss Axioscop 2 FS+) and perfused (~2 ml/min) at room temperature (~25 °C) with the following extracellular solution (in mM): 119 NaCl, 2.5 KCl, 2.8 CaCl₂, 2 MgCl₂, 26 NaHCO₃, 1 NaH₂PO₄, 11 glucose, 0.01 bicuculline, gassed with 5% CO₂, 95% O₂ at pH 7.4. Tetrodotoxin (1 μM) was added to block action potentials. Whole-cell voltage clamp recordings were performed as described above, and mEPSCs were recorded after 5 min of patch stabilization and during roughly 5 min to obtain at least 100 events per cell. Patch pipettes were filled with an internal solution containing (in mM) the following: 115 cesium methanesulfonate, 20 CsCl, 10 HEPES, 2.5 MgCl₂, 4 ATP disodium salt, 0.4 GTP trisodium salt, 10 sodium phosphocreatine, and 0.6 EGTA, at pH 7.25. Analysis and quantifications were performed off-line with the specialized ElphyTM software (Gérard Sadoc, Biologic UNIC-CNRS, France), blinded to experimental conditions. Statistical analyses were performed using the Mann-Whitney test in GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc.).

RESULTS

Nck1 and Nck2 Are Both Expressed in Brain—Members of the group I p21-activated kinases (PAK1–3) interact with the Nck adaptor in both invertebrates and vertebrates through the first highly conserved proline-rich domain of PAK and the second SH3 domain of Nck (Fig. 1, A and B) (12, 13, 16, 32). However, the amino acid sequence of the first SH3-binding domain of PAK3 expected to interact with Nck differs from the conserved sequence in the other PAKs. Moreover, the residues that are unique to PAK3 such as the leucine 16, the methionine 18, and the asparagine 19 are conserved among all PAK3 orthologs (Fig. 1, B and C). In mammals, the interaction between PAK1 and Nck1 has been extensively studied (12, 13, 17–20, 32). Despite much recent data describing specific cellular functions for Nck2/Grb4 (22, 23, 33), the interaction of PAK proteins with Nck2 is poorly documented. Given the salient expression of PAK3 in neurons, we first determined the relative amount of each Nck mRNA in mouse embryonic and adult brain by quantitative RT-PCR (Fig. 1D). After RNA normalization based on β-actin quantitative-PCR, amplification of Nck1 and Nck2 with specific primer sets showed equivalent efficiency. We found that Nck2 transcripts are more abundant than those of Nck1 in embryonic E18 and adult brain. In embryos, Nck2 mRNAs were found to be over eight times more abundant than those of Nck1 (Nck1, 0.20 ± 0.02; Nck2, 1.63 ± 0.27), and in adult brain the ratio is slightly higher than 2.5 (Nck1, 0.75 ± 0.06; Nck2, 1.99 ± 0.33). These results are in accordance with independent analyses such as the Allen Brain Atlas and the neural transcriptome (34, 35). To estimate Nck1 and Nck2 protein levels in brain, we generated two polyclonal sera directed against each adaptor by choosing short unique sequences from these proteins as antigens. To characterize these new antibodies, HA-tagged Nck proteins were HA-immunoprecipitated from transfected COS-7 cells and then probed with the different antibodies by Western blotting (Fig. 1E, 1st to 4th panel). Equal amounts of

immunoprecipitated Nck proteins were verified by HA antibody immunoblot (Fig. 1E, 1st panel), and the pan-Nck monoclonal antibody directed against the SH2 domain of Nck adaptors recognized both Nck1 and Nck2 proteins with the same efficiency (Fig. 1E, 2nd panel). Lack of cross-reactivity of the isoform-specific Nck antibodies in Western blotting assay was confirmed (Fig. 1E, 3rd and 4th panels). We also checked the ability of each antibody to immunoprecipitate its respective target protein (Fig. 1E, 5th and 6th panels). It is to be noted that we report here the first characterization of Nck isoform-specific antibodies with immunoprecipitation ability. Furthermore, we observed that the anti-Nck2 is less effective than the anti-Nck1 antibody in recognizing its appropriate target by direct Western blot or immunoprecipitation (Fig. 1E). Using these strictly specific Nck1 and Nck2 antibodies, we analyzed the protein expression of each adaptor in brain extracts from E18 and adult mice along with PAK3 (Fig. 1F). Nck1 protein is equally abundant in embryonic and in adult brain extracts. In contrast, we observed a slightly higher expression of Nck2 and PAK3 proteins in embryo compared with adult brains.

PAK3 Interacts Preferentially with Nck2 Adaptor in Vitro and in Mouse Brain—To compare the capacities of the two adaptors to interact with PAK3, COS-7 cells were co-transfected with either HA-Nck1- or HA-Nck2-expressing vectors in the presence of the FLAG-PAK3-WT plasmid. Nck proteins were immunoprecipitated with HA antibodies, and isolated complexes were analyzed for the presence of the associated FLAG-PAK3 proteins (Fig. 2A). Western blot analysis showed that specific co-immunoprecipitation of PAK3 with Nck adaptors was four times greater with Nck2 compared with PAK3 with Nck1 (27.6 ± 2.8% for the Nck1/Nck2 ratio) (Fig. 2B). The anti-Nck1 and anti-Nck2 sera were then used to co-immunoprecipitate PAK3 in mouse E18 and adult brain extracts (Fig. 2C). Preimmune sera were also used as controls. Immunoprecipitated Nck proteins were revealed using the pan-Nck antibody, indicating a similar amount of Nck proteins. Surprisingly, PAK3 protein immunoprecipitates only with Nck2 complexes, both in embryonic brain as well as in adult brain extracts, although less complex is found in adult brain. PAK3 was below the detection threshold in the Nck1 complexes, despite the fact that the anti-Nck1 serum is more efficient than the anti-Nck2 serum at immunoprecipitating its target protein. Hence, these results show that PAK3 preferentially forms complexes with the Nck2 adaptor in mouse brains and that this interaction may be particularly important during brain development. Note also that these results are the first report of co-immunoprecipitation of a PAK-Nck complex from brain tissue. We also tested the capacity of the mental retardation mutated A365E and R419X PAK3 proteins to interact with Nck2 in co-immunoprecipitation assays, and no difference was observed between these mutated proteins compared with the wild type (Fig. 2D). This result could be explained by the localization of the mutations outside of the interacting region between PAK3 and Nck adaptors (10). However, we observed that the R67C mutated PAK3 also associated with mental retardation (36) binds less Nck2, in agreement with the localization of the mutation proximal to the first proline-rich domain.

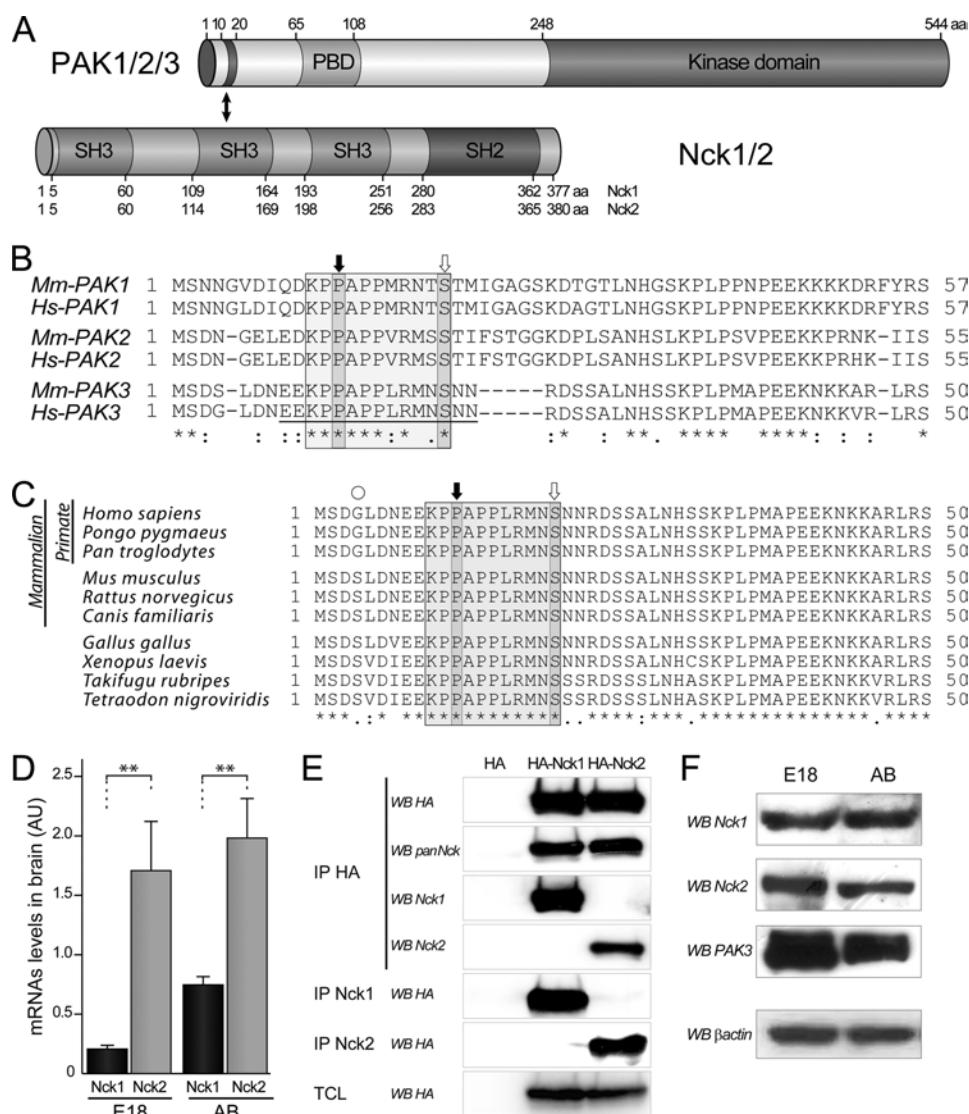


FIGURE 1. Nck adaptor expression in mouse brain. *A*, domain structure of PAK and Nck proteins involved in the interaction. The N-terminal part of PAK proteins contains an SH3-binding domain located between amino acids 10 and 20. This region interacts with the second SH3 domain of Nck adaptors. The amino acid (aa) numbering of PAK corresponds to those of the human PAK3 sequence. *B*, amino acid alignment of the N-terminal domain of PAK proteins of group I encoded by mouse and human genes. The amino acid sequence of the SH3-binding domain contains a conserved proline-rich motif PPXPP and two critical residues Pro-12 and Ser-20 (numbers refer to PAK3) for Nck interaction are indicated with black and white arrows, respectively. The sequence of the P₁₂ peptide used in the following sections, which inhibits Nck2 interaction, is underlined. *C*, sequence alignment of the N-terminal domains of primate, mouse, *Xenopus*, and fish illustrates the phylogenetic conservation of the amino extremity of the PAK proteins. *D*, mRNA quantification by quantitative-PCR shows more Nck2 than Nck1 expression in brain. Total RNAs (2 μ g) from mouse embryonic E18 brain (E18) and adult brain (AB) were subjected to quantitative RT-PCR. Comparison with Student's *t* test: **, $p < 0.01$, $n = 4$. Error bars indicate the S.E. *E*, characterization of the Nck sera. The two Nck isoform-specific sera were tested for their ability to specifically recognize their targets. Lysates of COS-7 cells transfected either with HA-Nck1 or HA-Nck2 plasmids were controlled for Nck expression by HA-Western blotting (WB) on total cell lysate (last panel), and HA-precipitated (IP HA) before being analyzed by Western blotting, using a polyclonal HA or the pan-Nck monoclonal antibodies (1st and 2nd panels), or immune Nck1 or Nck2 sera (3rd and 4th panels). Ability for immunoprecipitation of the two new sera was tested from similarly transfected cells, and precipitated complexes were analyzed by HA Western blotting (5th and 6th panels). *F*, the two Nck and PAK3 proteins were detected in mouse brain by Western blot analysis. E18 and adult brain lysates (25 μ g of proteins) were probed with either the Nck1 and the Nck2 antibodies or the PAK3 antibodies and β -actin antibodies for loading control. Data shown in the *D-F* are representative of a typical experiment.

PAK3 Binds Nck2 Independently of Its Kinase Activity—The main functions of PAK1 are dependent on its cycling activity that is mostly linked to its subcellular location (17–19). Following its activation at the membrane, PAK1 autophosphorylates and dissociates from the Nck1 complex and then returns to the cytoplasm where it may be dephosphorylated and deactivated (18, 19). To analyze whether the interactions of PAK3 with Nck adaptors are dependent on the kinase activity as described for PAK1, we compared the affinity precipitation of wild-type,

kinase dead (K297L), or constitutively active (T421E) variants with the GST-immobilized second SH3 domain of Nck1 or Nck2 (Fig. 3A). We found that the three PAK3 proteins (wild-type, kinase dead, or constitutively active) were equally affinity-precipitated by the second SH3 domain of Nck1 (relative binding compared with wild-type, kinase dead, 89.0 ± 18.0 ; constitutively active, 91.1 ± 23.6) and of Nck2 (relative binding compared with wild-type, kinase dead, 92.9 ± 22.1 , constitutively active, 115.1 ± 19.5) (Fig. 3B).

PAK3 Regulates Synaptic Transmission through Nck2

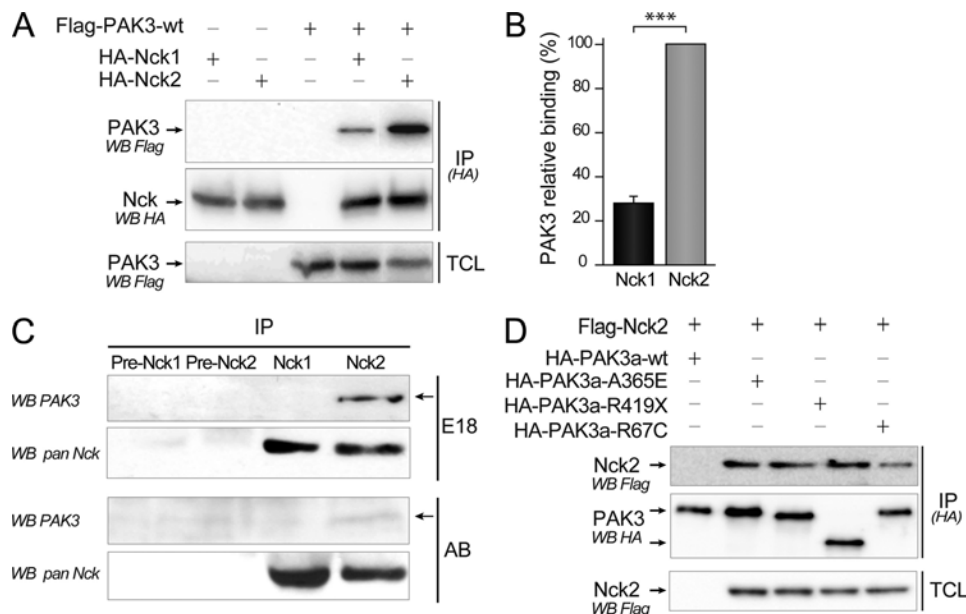


FIGURE 2. Preferential binding of PAK3 with Nck2 *in vitro* and *in vivo*. *A*, stronger interaction between PAK3 and Nck2 compared with Nck1. COS-7 cells were co-transfected with plasmids coding for HA-tagged Nck1 or Nck2 with FLAG-PAK3-WT. Nck proteins were HA-immunoprecipitated (IP(HA)). The co-immunoprecipitated PAK3 protein was revealed by anti-FLAG blotting (upper panel). Equal PAK3 expression levels in transfected cells and equal amount of immunoprecipitated Nck proteins were controlled by Western blotting on TCL (lower panel) and immunoprecipitated proteins (IP-HA, WB HA, middle panel), respectively. *B*, quantification of the amount of PAK3 precipitated with Nck adaptors from the experiments illustrated in *A*. Comparison with Student's *t* test: ***, $p < 0.001$, $n = 4$. Error bars indicate the S.E. *C*, PAK3 co-immunoprecipitates with Nck2 but not with Nck1 from mouse brain. E18 or adult brain lysates (10 mg), analyzed by Western blot in Fig. 1*F*, were immunoprecipitated with preimmune or immune Nck1 or Nck2 sera. Immunoprecipitated Nck proteins were revealed with the pan-Nck antibodies (WB pan Nck). Associated PAK3 proteins were revealed by Western blotting using PAK3 antibodies (WB PAK3). *D*, three PAK3 proteins bearing the mental retardation mutation A365E, R419Stop, and R67C co-immunoprecipitate with Nck2 with an apparent normal efficiency. COS-7 cells were co-transfected with plasmids coding for HA-tagged PAK3 mutants with FLAG-Nck2. The co-immunoprecipitated HA Nck2 protein was revealed by anti-FLAG blotting (upper panel). Equal Nck2 expression levels in transfected cells and amount of HA-immunoprecipitated PAK3 proteins were controlled by Western blotting on TCL (lower panel) and immunoprecipitated proteins (IP-HA, WB HA, middle panel). Data shown in the *A*, *C*, and *D* are representative of a typical experiment.

To analyze whether the *in vivo* interactions of PAK3 with Nck adaptors are regulated by active GTPases, COS-7 cells were co-transfected either with the FLAG-tagged PAK3 wild-type protein or with the kinase-dead mutant (PAK3-K297L), together with HA-Nck1 (Fig. 3*C*) or HA-Nck2 (Fig. 3*D*), and PAK3 proteins were activated by co-transfecting the constitutively active GFP-Cdc42-V12 GTPase or the inactive GFP-Cdc42-N17 mutant as a negative control. Surprisingly, we found that the Cdc42-activated PAK3 protein co-immunoprecipitated with Nck2 and even with Nck1 (Fig. 3, *C* and *D*). The presence of a kinase-dead mutation in PAK3 did not modify this interaction. Furthermore, the co-expression of the dominant negative N17 form of Cdc42 did not further increase co-immunoprecipitation of PAK3 with Nck adaptors. Thus, in sharp contrast with PAK1, PAK3 binds the Nck adaptors independently of its activation state and kinase activity.

Serine 20 Residue of PAK3 Is Not a Phosphorylated Site—The activation-dependent autophosphorylation of PAK1 serine 21 (white arrow, Fig. 1*B*) has been shown previously to be responsible for suppression of the PAK1/Nck1 interaction upon PAK1 activation (18). This serine residue lies at the extremity of the highly conserved PPXPPXRXS consensus sequence for binding to the Nck SH3 domain (18) and is conserved among all PAK proteins of group I, in invertebrates and vertebrates (Fig. 1*B*). Interestingly, the sequence of the surrounding proline-rich domain is PAK isoform-specific, and the PAK3 amino acid sequence of this domain is totally conserved among all verte-

brates (Fig. 1*C*). We further investigated whether the homologous PAK3 serine 20 residue is indeed an autophosphorylation site. As the serine 20 residue is located in a strong RXXS consensus sequence and is likely to be phosphorylated *in vitro* by several kinases, such as CaMKII, we used recombinant CaMKII to identify the phosphorylated peptide containing the serine 20. We generated a GST-fused recombinant peptide corresponding to the N-terminal extremity (amino acids 2–49) of PAK3 and tested it in an *in vitro* kinase assay (supplemental data 1). We observed that the N-terminal part of PAK3 is phosphorylated *in vitro* by recombinant CaMKII. We then generated a nonphosphorylatable mutated form by the substitution of the serine 20 residue. The tryptic maps of the wild-type (Fig. 4*A*) and S20E (Fig. 4*B*) recombinant N-terminal peptides phosphorylated *in vitro* confirm that the serine 20 residue in the tryptic MNS²⁰NNR peptide is phosphorylated by CaMKII *in vitro*. Two-dimensional mapping of the autophosphorylated full-length PAK3 protein (Fig. 4*C*), expressed in COS-7 cells and activated by recombinant Cdc42-V12 protein, indicated multiple autophosphorylated sites in the PAK3 protein, whereas in the absence of active Cdc42, PAK3 does not present any autophosphorylation, as observed previously (24, 25). However, no spot corresponding to the Ser-20-containing peptide (black arrow) is observed in this map (Fig. 4*C*). The two-dimensional map obtained with the full-length PAK3-S20E mutant gave a similar pattern than the wild-type protein confirming that the Ser-20-containing peptide was not phosphorylated.

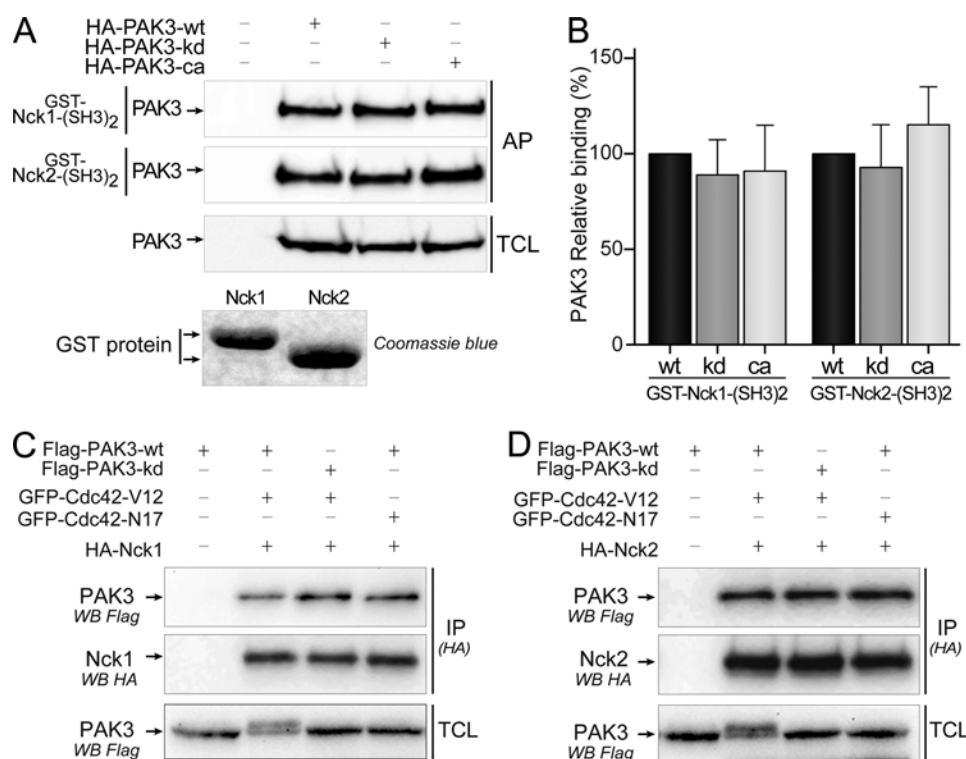


FIGURE 3. PAK3 binds Nck2 independently of its kinase activity. *A*, *in vitro* interaction of different PAK3 kinase mutants with the second SH3 domains of Nck1 and Nck2. WT, kinase-dead (*kd*), and constitutively active (*ca*) forms of HA-PAK3 were expressed in COS-7 cells, and lysates were incubated with recombinant GST proteins containing the second SH3 domain of Nck1 (1st panel) or Nck2 (2nd panel). Affinity-purified (AP) PAK3 proteins and COS-7 expressed PAK3 proteins (TCL) were revealed by Western blotting (WB) with HA antibodies. Data shown are representative of a typical experiment from three independent experiments. Amount of GST proteins was controlled by Coomassie Blue staining. Note that the lower electrophoretic migration of the GST-Nck1-(SH3)₂ protein is due to the presence of an HA tag. *B*, Quantification of the amount of different PAK3 proteins precipitated with the second SH3 domain of Nck adaptors from the experiments illustrated in *A*, *n* = 3. Error bars indicate the S.E. *C* and *D*, Cdc42 activation of PAK3 does not suppress its interaction with Nck1 (*C*) or Nck2 (*D*). COS-7 cells were co-transfected with plasmids coding for FLAG-PAK3-WT or FLAG-PAK3-kd (kinase-dead), with either active Val-12 or inactive Asn-17 mutants of GFP-Cdc42 vectors, together with HA-tagged Nck1 (*C*) or Nck2 (*D*) plasmids. Nck1 or Nck2 proteins were HA-immunoprecipitated (IP (HA)) and visualized after HA immunoblotting (middle panels). PAK3 proteins in immune complexes (upper panels) and in TCLs were revealed by anti-FLAG immunoblotting. GFPase expression was verified using anti-GFP antibody (data not shown). Note that activation of PAK3 by Cdc42-Val-12 induced an electrophoretic shift of PAK3-WT protein as previously reported (25).

This was also confirmed by co-migration of peptides from the GST-PAK3-(2–49)-WT sample mixed with those obtained from the autophosphorylated wild-type PAK3 (data not shown). These experiments indicate that the serine 20 residue is not autophosphorylated upon PAK3 activation.

However, the mutation of serine 20 of PAK3 is not sufficient to totally abrogate N-terminal phosphorylation suggesting the presence of other phosphorylation sites targeted by CaMKII (Fig. 4, *B* and *D*). To identify these other sites, we have mutated all the putative phosphorylated sites of the N-terminal portion of PAK3 (supplemental data 2) and tested their phosphorylation by CaMKII. The single mutation of the serine 4 residue is sufficient to dramatically decrease the phosphorylation level of PAK3 (Fig. 4*D*). However, this serine 4 residue present in rodents corresponds to a glycine residue in primates (Fig. 1*C*). PAK3 N-terminal peptide with a glycine 4 residue, thus corresponding to a human like peptide sequence, does not appear to be phosphorylated by CaMKII, suggesting that CaMKII does not regulate PAK3/Nck2 interaction in primates. We also observed using similar approaches that the serine 20 residue of PAK3 is not phosphorylated by Akt (Fig. 4*E*) or PKA (Fig. 4*F*), which were previously described as regulatory kinases for the PAK1 serine 21 residue (19, 37). Altogether, these data suggest that the Akt, CaMKII, and PKA kinases do not regulate the

PAK3/Nck2 interaction and that the PAK3-Nck2 complex displays unique properties compared with the complex of PAK1 with Nck1.

PAK-Nck2 Uncoupling Peptide P₁₂ Increases eEPSC Amplitude in Perfused Neurons of Acute Cortical Slices—The role of the PAK1/Nck1 interaction in cell migration, cell spreading, atherogenesis, and angiogenesis was proved in several experimental models using inhibitory peptides (17, 19, 38, 39). So we tested whether a PAK3 homologous peptide from the first proline-rich region would inhibit PAK3/Nck interaction. We designed and synthesized a P₁₂ inhibitory peptide, homologous to the previously used PAK1 peptide, and corresponding to the 15-amino acid peptide ⁸EKKPAPPLRMNSNN²² near the N-terminal extremity of the wild-type PAK3 protein (underlined in the sequence of the PAK3-N-terminal region, in Fig. 1*B*). We also produced a mutated version of the P₁₂ peptide that contained a substitution of the proline 12 by alanine (A₁₂ peptide, ⁸EKKPAAPPLRMNSNN²²) to be used as a negative control. The inhibitory effects of these two peptides were checked in co-immunoprecipitation assays of PAK3 performed with either Nck1 or Nck2, and in the presence of the P₁₂ or the A₁₂ peptide. As shown in Fig. 5*A*, the presence of the P₁₂ peptide during immunoprecipitation strongly decreased the recovery of PAK3 with Nck2 but not with Nck1. Quantification (Fig. 5*B*)

PAK3 Regulates Synaptic Transmission through Nck2

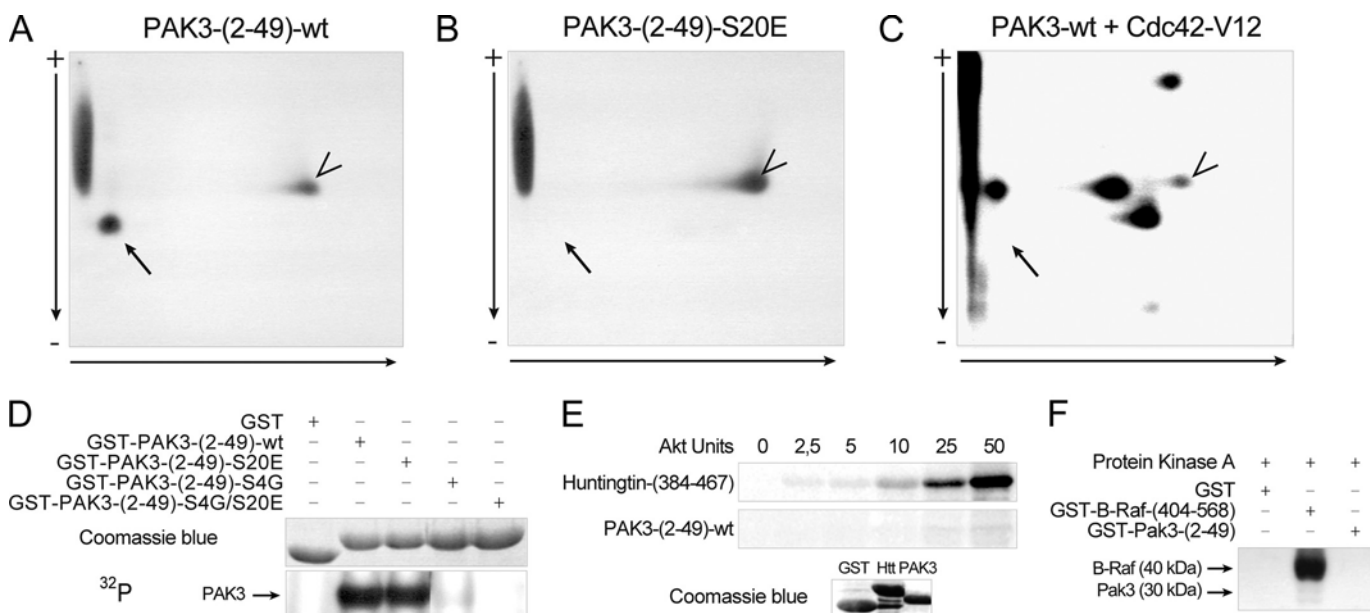


FIGURE 4. Serine 20 residue of PAK3 is not a regulatory site. *A–C*, two-dimensional chromatography of PAK3 peptides obtained from recombinant GST-PAK3-(2–49) protein (*A*) or GST-PAK3-(2–49)-S20E protein (*B*), which were phosphorylated *in vitro* by CaMKII, before analysis of the tryptic phosphopeptides by two-dimensional mapping. *C*, two-dimensional mapping of full-length activated wild-type PAK3 protein. HA-PAK3-transfected COS-7 cell lysate was incubated with recombinant GST-Cdc42-V12 before immunoprecipitation. The precipitate was then subjected to a kinase assay with radioactive ATP. *Vertical arrows* indicate the electrophoretic direction and *horizontal arrows* the chromatography migration. *Black arrow* indicates the serine 20-corresponding peptide, and the *arrowheads* show an uncharacterized phosphorylated peptide. *D*, phosphorylation of mutated PAK3-N-terminal proteins. The serine residues of the PAK3-N-terminal proteins were successively mutated and tested in a CaMKII kinase assay, as described above. *E*, Akt phosphorylation of PAK3-N-terminal and huntingtin as positive control. huntingtin and PAK3 recombinant peptides, visualized with Coomassie Blue staining (*lower panel*), were tested in an Akt kinase assay (*upper panel*). *F*, PKA phosphorylation of PAK3-N-terminal and B-Raf as positive control. B-Raf and PAK3 recombinant peptides were tested in a PKA kinase assay. All data shown are representative of a typical experiment from three independent experiments.

confirmed that the P₁₂ peptide inhibits PAK3 binding to Nck2 (43.4 ± 6.2%, *p* = 0.0004) but not significantly to Nck1 (83.0 ± 21.2%, *p* = 0.2988), whereas the A₁₂ peptide did not significantly change PAK3 binding with Nck2 or Nck1 (108.3 ± 2.1 and 112.4 ± 16.1%, respectively). However, because this P₁₂ peptide should interact with the second SH3 domain of Nck2, we checked whether this interaction affects the PAK1-Nck2 complex. By co-immunoprecipitation (data not shown) and pull-down assay (Fig. 5C), we observed that addition of the P₁₂ peptide to cell lysate strongly decreases the binding of both PAK1 and PAK3 to the SH3 domain of Nck2. The control peptide A₁₂ does not have any effect on PAK1 and PAK3 interactions with Nck2. Thus, the mimetic peptide P₁₂ prevents the interaction between Nck2 and the partners of its second SH3 domain, in particular PAK1 and PAK3. Once the mimetic peptide specificity was confirmed toward Nck2, we could use this peptide to clarify the role of the Nck2 complex in neuronal signaling. To do so, the uncoupling P₁₂ or the mutated A₁₂ peptide was applied through the patch clamp pipette into layer 5 pyramidal neurons while performing whole-cell recordings of evoked excitatory post-synaptic currents (eEPSCs) in visual cortical slices of juvenile rats (Fig. 5D). The time course of peptide diffusion in layer 5 pyramidal neurons was estimated prior to electrophysiological recordings by filling pyramidal cells through whole-cell patches with pipettes containing a 3000-Da dextran-FITC, a fluorescent polymer whose molecular mass is similar to that of the P₁₂ (1666 Da) peptide. The full-length of the apical dendrite of pyramidal cells (from the soma to the layer 1) showed a green fluorescence signal 15–20 min after membrane break-in (data not shown). Next, layer 5 pyramidal

neurons were held at –80 mV (*i.e.* the reversal potential for evoked inhibition under our experimental conditions), and eEPSCs were recorded every minute for more than 1 h. A typical control eEPSC, evoked by layer 2/3 stimulation, is shown in Fig. 5E (*aCSF panel*). The corresponding current wave did not change after bath application of AP5 and picrotoxin, the selective blockers of NMDA and GABA_A receptors, respectively. However, bath application of 2,3-dihydroxy-6-nitro-7-sulfamoylbenzo(*F*)quinoxaline, a potent AMPA receptor antagonist, suppressed the inward current of the evoked response (Fig. 5, *E* and *F*), showing that the eEPSCs evoked under our experimental conditions are strictly due to AMPA receptor activation, mainly on the apical dendrite of pyramidal neurons (30). We found that the perfusion of the uncoupling P₁₂ peptide in pyramidal neurons produced a robust and persistent increase in eEPSCs amplitude (Fig. 5, *G* and *H*). This increase in eEPSCs amplitude started 20–30 min after the beginning of the perfusion (*i.e.* after breaking-in cell membrane) and reached a plateau after 40 min (+41.8% ± 7.7% between 50 and 70 min, *p* < 0.001, *n* = 4) (Fig. 5, *G*, *black squares*, and *H*). This delay is consistent with the estimated peptide diffusion time course in the apical dendrite of the recorded neuron, as mentioned above. In contrast, the perfusion of the mutated A₁₂ peptide failed to produce any change in eEPSC amplitude (Fig. 5G, *open dots*), thus strongly suggesting that the wild-type proline-rich peptide P₁₂ specifically modifies evoked excitatory post-synaptic currents through the inhibition of Nck2 signaling.

Mutation of the PAK3 Proline 12 Residue Targets the Interaction with Nck2 but Not with Nck1—Mutations of the second proline residue (¹²PPAPPMRNTS²¹) in the first proline-rich

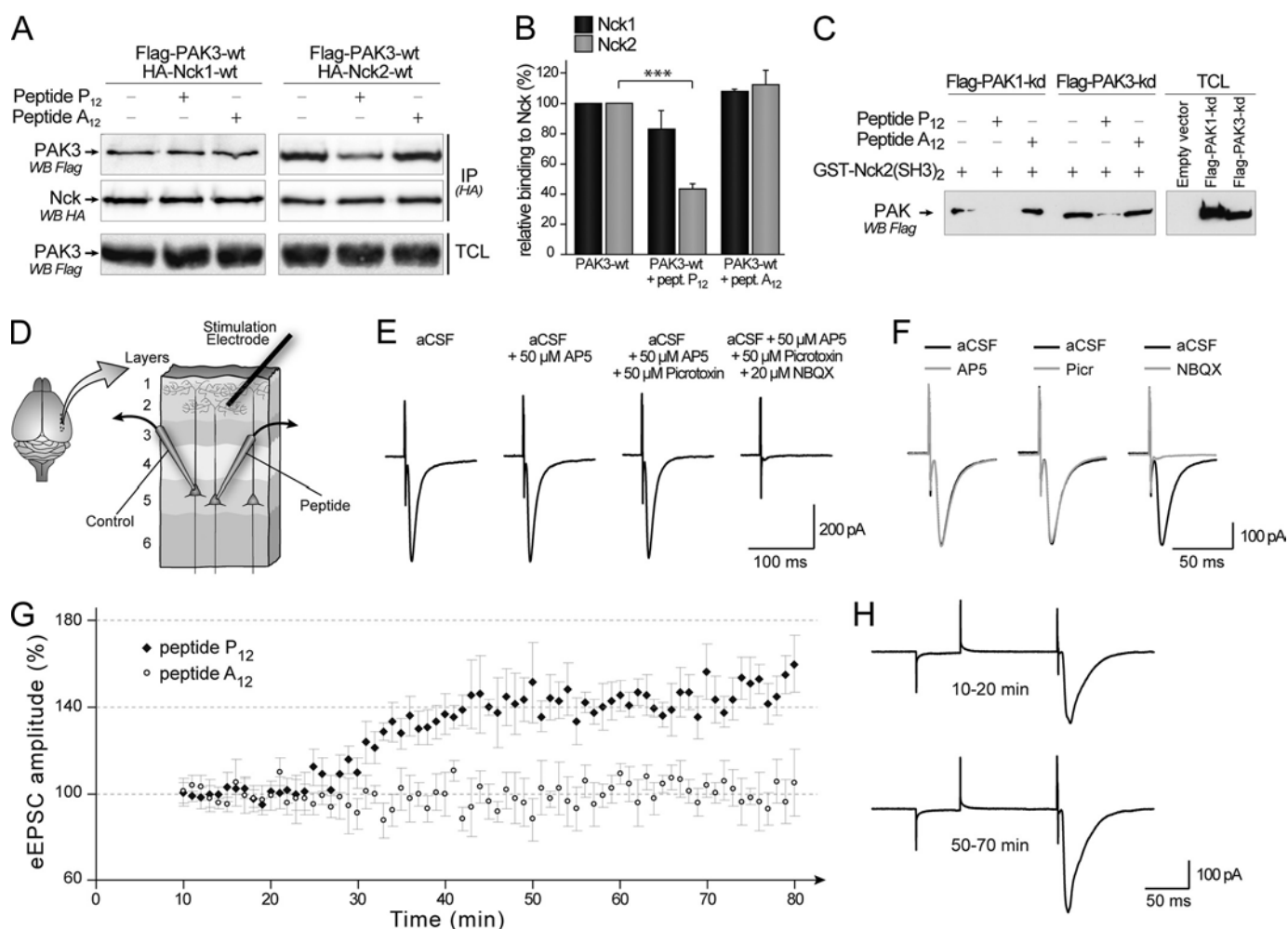


FIGURE 5. Post-synaptic inhibition of the PAKs/Nck2 interaction by perfusion of the inhibitory P₁₂ peptide induced an increase in evoked EPSC. *A*, P₁₂ peptide decreased the amount of co-immunoprecipitated PAK3 protein with Nck2 but not with Nck1. COS-7 cells were co-transfected with plasmids coding for FLAG-PAK3-WT and HA-tagged Nck1 (left lanes) or Nck2 (right lanes). Nck proteins were HA-immunoprecipitated (IP(HA)) in the absence or the presence of 1 mM of the P₁₂ or the A₁₂ peptide. Nck proteins are visualized after immunoblotting (middle panel). The co-immunoprecipitated PAK3 protein was revealed by anti-FLAG blotting (upper panel). PAK3 expression levels in TCLs were controlled as indicated (lower panel). *B*, quantification of amount of precipitated PAK3 protein with Nck adaptors illustrated in *A* ($n = 3$). *C*, pull-down assay of PAK1 or PAK3 proteins with the GST-(SH3)₂ domain of Nck2 in presence of the P₁₂ competing peptide or its A₁₂ control peptide. Lysates of COS-7 cells transfected with FLAG-PAK1 or PAK3-kinase-dead expression vector were incubated 5 min without or with 250 μ M of the P₁₂ peptide or the A₁₂ peptide before the PAK proteins were pulled down with the recombinant GST protein (20 μ g). Precipitated proteins (left lanes) and expressed proteins in TCL (right lanes) were revealed by FLAG Western blot (WB). *D*, schematic representation of simultaneous patch clamp recordings. Pyramidal neurons were targeted in layer 5 of parasagittal slices of juvenile rat primary visual cortex. Two simultaneous whole-cell patch clamp recordings were then performed using two pipettes, one of them containing the P₁₂ or A₁₂ peptide, whereas the second consists of control recording. Extracellular electrical stimulations were applied in layer 2/3, on a vertical axis set at 50–70 μ m from the recorded neuron apical dendrite. Evoked EPSCs (eEPSCs) were recorded under voltage clamp at a holding potential of -80 mV. Recordings and analysis involving P₁₂ or A₁₂ peptides were performed under blind conditions. *E*, characterization of the AMPA-mediated evoked excitatory responses in layer 5 neurons. The aCSF panel represents the typical current response obtained under control conditions after the brief extracellular stimulation (as indicated by the corresponding stimulation artifact). Bath application of NMDA (50 μ M AP5) or GABA_A (50 μ M picrotoxin) receptor blockers had no impact on the evoked EPSC, whereas AMPA receptor blockade 2,3-dihydroxy-6-nitro-7-sulfamoylbenzo(F)quinoxaline (NBQX, 20 μ M) suppressed the response. Current responses represented in this panel are means of three consecutive individual traces. This experiment was replicated three times in different slices. *F*, superposition of the control eEPSC (aCSF condition, black trace) with the eEPSCs recorded under the three different conditions shown in *E* (gray traces). *G*, perfusion of the P₁₂ peptide through the patch clamp pipette increases the amplitude of eEPSCs recorded in layer 5 pyramidal neurons by roughly 40% (black square). In contrast, recordings performed with the noninteracting peptide A₁₂ (open dots) showed unmodified amplitudes during more than 1 h ($n = 3$ cells per condition, $p < 0.001$; Mann-Whitney test). Note that the control recordings (performed without any peptide in the patch clamp pipette, see *E*) were stable for all cells included in the data set and are not illustrated in this figure. *H*, significant representation of eEPSC obtained with P₁₂ peptide-containing recording pipette at two different times, during an early step between 10 and 20 min (upper trace) and during a later phase between 50 and 70 min (lower trace).

domain of PAK1 (black arrow in Fig. 1B), and its homologous residue in *Drosophila* D-PAK protein, abolished PAK/Nck interaction and suppressed PAK functions (16, 32). To investigate the role of the interaction between PAK3 and Nck, we constructed PAK3 mutants in which the homologous proline 12 residue (bold black on gray square, in Fig. 6A) was mutated into alanine (PAK3-P12A) or the first 20 N-terminal amino

acids encompassing the proline-rich domain of PAK3 were deleted (PAK3- Δ Nter) (Fig. 6A). First, pull-down assays were performed with the second SH3 domains of Nck1 and Nck2 (Fig. 6B), with WT or P12A mutated proteins expressed in COS-7 cells. The P12A mutation totally abolishes the precipitation of the Nck adaptors. We also observed that the P12A mutation suppresses the interaction between PAK3 and Nck1

PAK3 Regulates Synaptic Transmission through Nck2

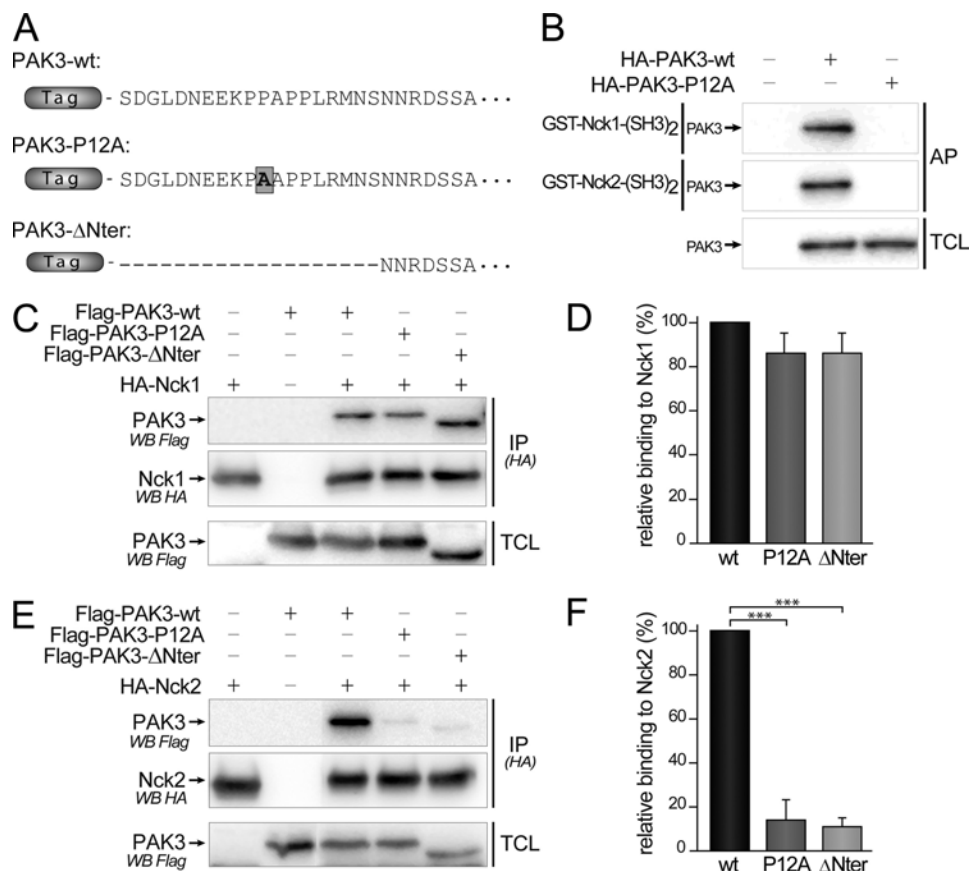


FIGURE 6. Mutation of the proline 12 residue and deletion of the N-terminal part of PAK3 suppress co-immunoprecipitation with Nck2 but not with Nck1. *A*, amino acid sequences of the N-terminal extremity of mouse PAK3 protein and the two mutated proteins used in this study. *B*, P12A mutation impairs the affinity precipitation of PAK3 protein with the second SH3 domains of Nck1 and Nck2 fused to GST. *C*, mutation of the proline 12 in PAK3 does not significantly change the interaction with Nck1. FLAG-PAK3 wild-type (wt), with the mutation P12A (P12A) or deleted for the first 20 amino acids (ΔNter) were co-expressed with HA-Nck1 in COS-7 cells. Nck1 protein was HA-immunoprecipitated and the presence of PAK3 in precipitated complexes (IP(HA)) and in TCLs was analyzed by Western blotting (WB) with FLAG antibodies. The amount of Nck1 precipitated proteins was controlled by anti-HA immunoblotting. *D*, relative binding of PAK3 proteins to Nck1, quantified from three independent experiments illustrated from *C* and averaged. *E*, mutation of the proline 12 in PAK3 abolished the interaction with Nck2. PAK3 proteins were co-expressed with HA-Nck2 in COS-7 cells. Nck2 protein was HA-immunoprecipitated and the presence of PAK3 in precipitated complexes (IP(HA)) and in TCL was analyzed by Western blotting with FLAG antibodies. The amount of Nck2 precipitated proteins was controlled by anti-HA immunoblotting. *F*, relative binding of PAK3 proteins to Nck2, quantified from four independent experiments illustrated from *E*. Comparison with Student's *t* test: ***, $p < 0.001$, $n = 3$. Errors bars indicate the S.E.

in a two-hybrid assay, a result in total agreement with the previously published results obtained with *Drosophila* homologs (16) as well as with human genes (supplemental data 3)(32). We then performed co-immunoprecipitation assays in transfected COS-7 cells expressing these different FLAG-PAK3 proteins and either HA-Nck1 (Fig. 6C) or HA-Nck2 (Fig. 6E) proteins. The HA-tagged Nck proteins were immunoprecipitated and the FLAG-tagged PAK3 proteins revealed by Western blotting. We observed that introducing the P12A mutation or the small N-terminal deletion had differential effects on Nck1 and Nck2 binding. Whereas both mutations induced only a nonsignificant decrease in binding with Nck1 (-13.7 ± 9.1 and $-14.5 \pm 9.4\%$ for P12A and ΔNter mutants, respectively) (Fig. 6D), both mutations induced a strong decrease of the interaction between PAK3 and Nck2 (-86.4 ± 9.3 and $-89.2 \pm 4.4\%$, for P12A and ΔNter proteins, respectively) (Fig. 6F). Among several studies analyzing these complexes (16–19), we report here the first experimental data showing that the mutation of the proline 12 residue suppresses co-immunoprecipitation between a PAK protein and a Nck adaptor. Because the Nck proteins are the only known partners of the PAK first proline-rich domain, the

P12A mutant of PAK3 is a highly selective tool to study the implication of PAK3/Nck2 in biological processes.

PAK3 Acts on Spinogenesis and Synaptogenesis Independently of Its Interaction with Nck2—Because PAK3 was described to regulate dendritic spine formation (8, 9), we studied the role of the PAK3/Nck2 interaction on dendritic spine maturation. PAK3-WT and -P12A expression vectors were transfected in mouse hippocampal neurons at DIV18 and neurons were fixed 3 days later. A morphological study of spine differentiation was carried out, and protrusions were classified into the following two categories as illustrated on Fig. 7A: filopodia defined as long protrusions without head or widening, and spines defined as protrusions with a mushroom-like head or an enlargement at the tip. No significant difference of the protrusion density was observed between the two constructs, compared with the GFP control (Fig. 7B). Moreover, the average length of protrusions was not significantly modified in P12A mutant-expressing neurons when compared with PAK3-WT or GFP-transfected neurons (Fig. 7C). We also analyzed protrusion density in hippocampal neurons at an early stage of differentiation, after 14 days of culture *in vitro* differentiation, and

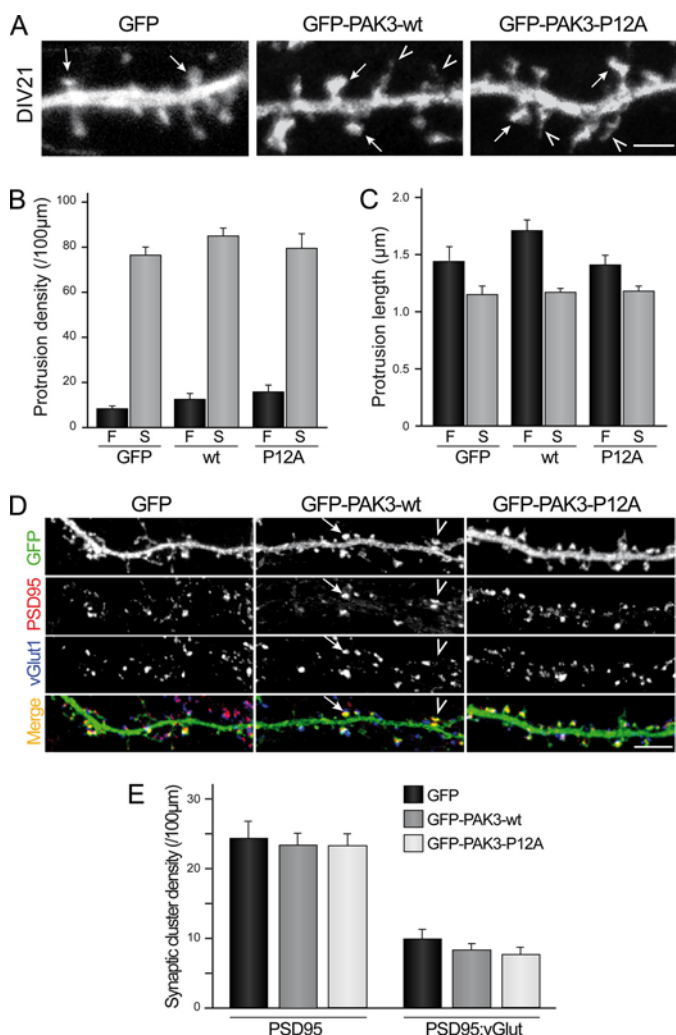


FIGURE 7. PAK3 acts on spinogenesis and synaptogenesis independently of its interaction with Nck2. *A*, P12A mutation did not affect spine maturation. Hippocampal neurons were transfected either with GFP as control or GFP-PAK3-WT or GFP-PAK3-P12A constructs at DIV18 and fixed at DIV21. Confocal images showed mature spines (arrows) and filopodia (arrowheads) at DIV21. Scale bar represents 2 μm . *B* and *C*, quantitative analysis of protrusion density or length. No significant difference for filopodia (F) or spines (S) between the three expressed constructs was observed. Data are means \pm S.E. of measurements obtained from 8 to 11 cells (length of dendrites analyzed: 50–250 $\mu\text{m}/\text{cell}$; 1030–1800 protrusions analyzed). *D*, P12A mutation did not affect synaptic density. Hippocampal neurons were transfected either with GFP (1st panels) as control, GFP-PAK3-WT (2nd panels) or GFP-PAK3-P12A (3rd panels) constructs at DIV18, fixed at DIV21, and immunolabeled for PSD95 as postsynaptic marker and vGLUT1 as presynaptic marker. Confocal images showed GFP proteins in green, PSD95 in red, and vGLUT1 in blue. PSD95-positive spines were identified from green and red images (arrowhead), and synapses were identified as PSD95-positive spines with adjacent staining of vGLUT1 (arrow). Scale bar, 5 μm . *E*, quantitative analysis of synaptic cluster density. No significant difference was observed in PSD95-positive spine (left histogram) or synapse (right histogram) density between the three conditions. Data are means \pm S.E. of measurements obtained from 15 to 17 neurons (length of dendrites analyzed: 50–250 $\mu\text{m}/\text{cell}$; 680–820 PSD-95 clusters and 230–330 synapses analyzed).

did not find any difference between control, WT, and P12A-expressing neurons (data not shown). To investigate the involvement of the PAK3-Nck2 complex in synaptogenesis, we analyzed the post-synaptic structure of DIV21-transfected neurons, by imaging the PSD-95 clusters, a key scaffold protein of the post-synaptic density of excitatory synapses (40) and the pre-synaptic contact using vGLUT1 as a marker (27). Interest-

ingly, we found that expression of PAK3-WT and PAK3-P12A proteins does not modify the density of PSD-95 clusters in dendritic spines (Fig. 7*E*, left histogram). In addition, the density of the synapses defined as PSD-95:vGLUT1 double-positive clusters were unaltered by expression of any PAK3 constructs (Fig. 7*E*, right histogram). Altogether, these results strongly suggest that the interaction between PAK3 and Nck2 does not control either the pathway involved in spine morphogenesis or synapse formation.

PAK3 Expression Decreases mEPSC Amplitude through Nck2 Interaction in Hippocampal Neurons—We next investigated the functional outcome of PAK3 or P12A expression on synaptic transmission. Thus, whole-cell recordings of spontaneous miniature excitatory post-synaptic currents (mEPSCs) were performed in DIV18 hippocampal neurons, transiently transfected with either GFP-PAK3-WT or GFP-PAK3-P12A plasmids. During each set of experiments, control recordings were performed on nonfluorescent untransfected neurons surrounding the targeted transfected cell on the same coverslip. Transfected and untransfected neurons showed similar resting potential and membrane input resistance (data not shown). Postsynaptic neurons were held at -60 mV to record only AMPA receptor-mediated mEPSCs. In both PAK3-WT and PAK3-P12A conditions, quantification of mEPSCs frequency showed no significant modification, thus ruling out any impact of PAK3 transfection on presynaptic release (Fig. 8, *A* and *B*, and data not shown). However, we did find that the expression of the wild-type PAK3 protein produced a decreased amplitude ($-17.0 \pm 0.2\%$, $p < 0.001$, $n = 15$) of the averaged mEPSCs compared with untransfected neurons (Fig. 8, *A–C*), although the expression of the PAK3-P12A protein, which does not interact with Nck2, did not change the average amplitude of mEPSCs (untransfected, 12.38 ± 0.24 pA, 1500 events on 15 neurons; WT, 10.28 ± 0.17 pA, 1300 events on 13 neurons; P12A, 11.90 ± 0.24 pA, 1000 events on 10 neurons) (Fig. 8, *D–F*). This suggests that PAK3 overexpression down-regulates excitatory post-synaptic currents, by a mechanism dependent upon its interaction with Nck2.

DISCUSSION

Mutations of the *pak3* gene are responsible for mental retardation, indicating that PAK3 has specific synaptic functions that, when lost or altered, cannot be compensated for by the two other PAK proteins of the group I. These unique functions of PAK3 in neuronal signaling have been largely unexplored (4). The amino acid sequence identity of PAK3 compared with the two other members of PAK group I is strong (41), but the level of identity drops drastically within the N-terminal region of these kinases. Indeed, many of the first 60 amino acids of human PAK3 are unique to PAK3 (53 and 49% identity with PAK1 and PAK2, respectively) and are highly conserved among PAK3s in the vertebrate phylum. Thus the NH₂ extremity of PAK3 may support its specific functions, in particular through interaction with Nck adaptors, the only known partners of the N-terminal part of PAKs (5), because the second proline-rich sequence PP⁴²NP localized in the N-terminal part of PAK1 that links with Grb2 is not conserved in PAK3 (42). The absence of PAK3 interaction with Grb2 was verified by a

PAK3 Regulates Synaptic Transmission through Nck2

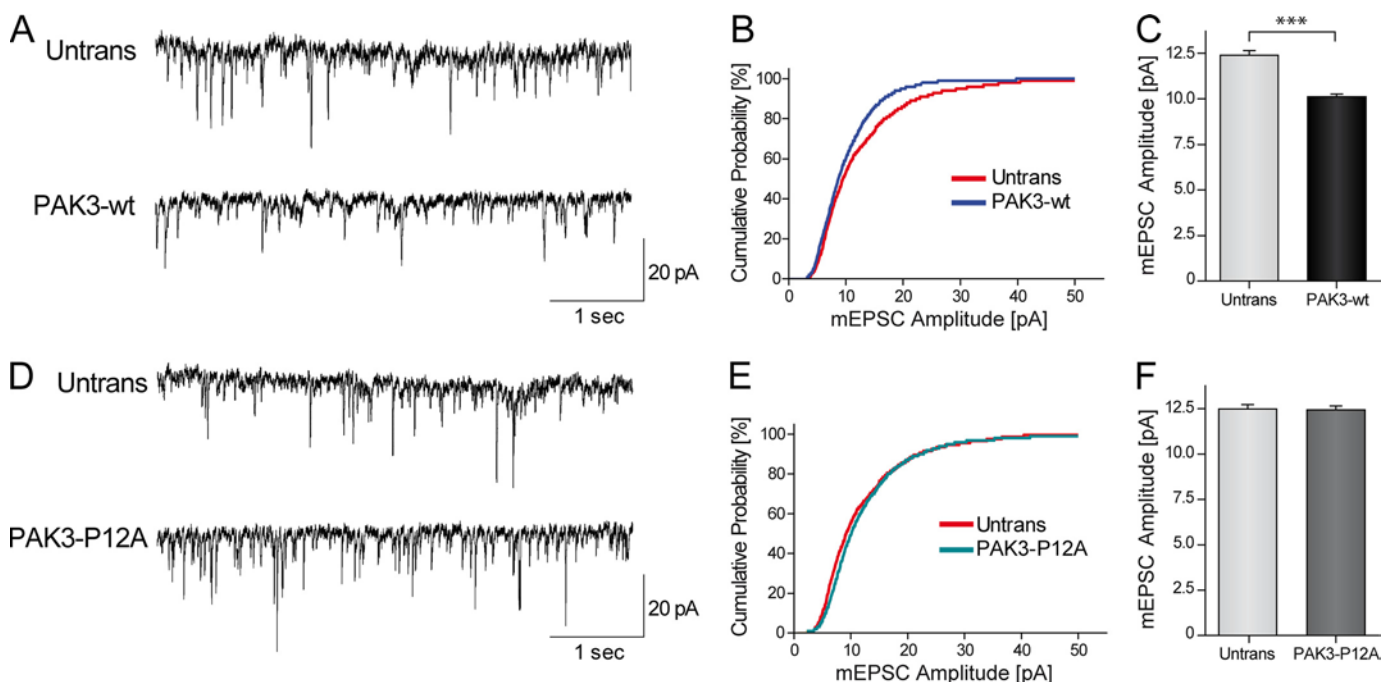


FIGURE 8. Expression of PAK3-WT down-regulates mEPSC amplitudes in hippocampal neurons through its interaction with Nck2. *A*, representative sample traces of 5 s recording of mEPSCs in untransfected or GFP-PAK3-WT transfected neurons. Scale bars, 20 pA and 1 s. *B*, cumulative distribution plots of the mEPSC amplitude, assembled from the first 100 events from each cell recorded. *C*, quantification of mean mEPSC amplitude (mean \pm S.E.). $n = 10$ – 15 cells per condition; ***, $p < 0.001$, Mann-Whitney test. *D–F*, sample traces, cumulative distribution and quantification of mEPSC amplitude (means \pm S.E.) recorded in untransfected neurons and in neurons transfected with GFP-PAK3-P12A construct showed no difference. $n = 15$ cells per condition.

two-hybrid assay (data not shown). We showed that PAK3 is more closely associated with Nck2 than with Nck1 in brain co-immunoprecipitates, and we demonstrated a higher affinity of PAK3 for Nck2 than for Nck1. This is a new specific feature of PAK3, because PAK1 has been shown to interact similarly with the two adaptors (43).

We then analyzed the molecular mechanisms of PAK3 interaction with Nck2, by comparing them with those described for the PAK-Nck1 complex (13, 14, 18, 19, 32). Our results indicate that PAK3 interacts directly with Nck1 and Nck2 because the full-length PAK3 protein precipitates with the second SH3 domain of Nck1 and Nck2 in pull-down assays, and reciprocally, the amino part of PAK3 (the first 49 amino acids) fused to GST precipitates with Nck1. So, the main interaction is a direct binding between the second SH3 domain of Nck1 and Nck2 and the amino extremity of PAK3. These results do not differentiate PAK3 from PAK1, and similar interactions are widely observed with all PAK and Nck orthologs from *Drosophila* to human. Analyzing the molecular bases of the PAK3-Nck complex, we unexpectedly found major differences between Nck1 and Nck2 (see recapitulative Table in supplemental data 4). We observed that the P12A mutation in PAK3 does not abolish the co-immunoprecipitation between PAK3 and Nck1, whereas it disrupts the PAK3-Nck2 complex. In contrast, in pull-down assays, the P12A mutation suppresses the interaction with both Nck1 and Nck2. We also confirmed that the P12A mutation suppresses the interaction between PAK3 and Nck1 in a two-hybrid assay, as described previously for *Drosophila* homologs (16) as well as for human genes (32). The co-immunoprecipitation of the P12A mutant with Nck1 was also confirmed using a PAK3 mutant deleted for the first 20 amino acids correspond-

ing to the Nck-binding domain because this deletion suppresses the interaction with Nck2 but not with Nck1. Moreover, the mimetic peptide displays a differential effect on Nck1 and Nck2, inhibiting only the interaction with the latter. Thus, the mutation of the second proline residue P12, the deletion of the first 20 amino acids, and the inhibitory mimetic peptide, all showed a minor effect on PAK3/Nck1 co-immunoprecipitation but a strong effect on recovery of the PAK3-Nck2 complex, indicating that interactions of PAK3 with the two adaptors are different. To explain these results, we hypothesize that the interaction between PAK3 and Nck1 may involve a third partner consolidating this interaction or may implicate other interacting domains of PAK3 and Nck1. As an example, it was shown that although the second SH3 domain of Nck1 plays an important role in the binding with PAK1, the presence of the third SH3 domain increases the interaction (5). However, another type of interaction may exist as recently described for the atypical association of the Nck adaptors with Robo, a binding that may involve multiple SH3 domains (44). The fact that the full-length PAK3-P12A mutant does not interact in the two-hybrid assay with the full-length Nck1 protein is an argument strengthening the hypothesis of a third partner. Another unique property of PAK3 is that PAK3 binds Nck independently of its kinase activity thus demonstrating that regulation of this complex is different from that characterized for PAK1. Indeed the PAK3 serine 20, which is a key residue for the regulation of the PAK1/Nck1 interaction (18), is neither autophosphorylated upon kinase activation nor is it a substrate for Akt and PKA. Whether the PAK3/Nck2 interaction is regulated is still unknown, and several mechanisms may be considered. For instance, the observed dissociation of the PAK3-Nck2 complex

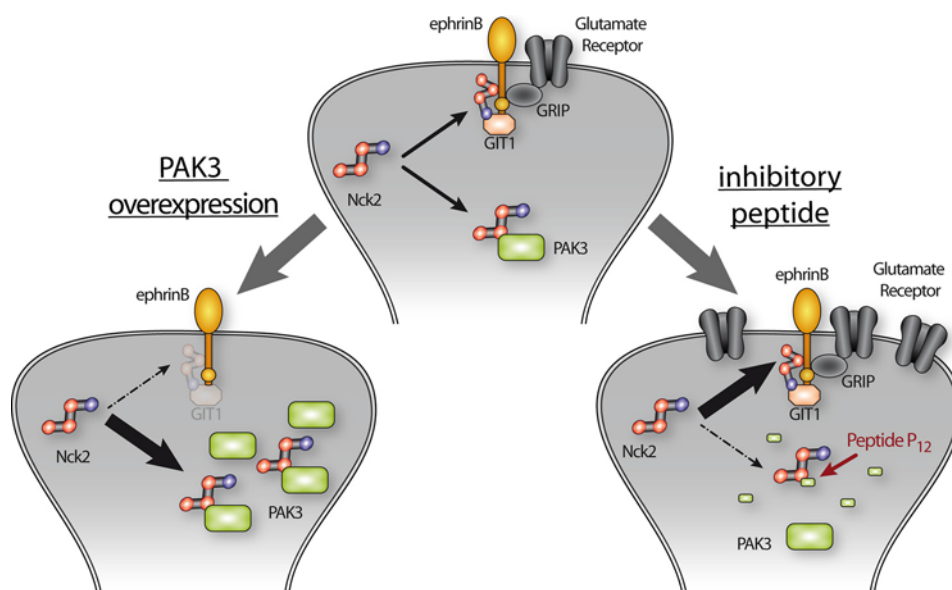


FIGURE 9. **Model of regulation of synaptic transmission by PAK3.** Nck2 regulates glutamate receptor stabilization (*center diagram*). Overexpression of PAK3 titrates Nck2 and induces a decrease of the Nck2-dependent stabilization of glutamate receptors (*left diagram*). Conversely, perfusion of an inhibitory peptide inhibits the Nck2-PAK3 complex, releasing Nck2 and allowing a Nck2-dependent stabilization of glutamate receptors (*right diagram*).

with the mimetic phosphorylated serine 20 residue suggests that a kinase may phosphorylate this crucial serine 20 residue. But the upstream asparagine 19 residue, which is conserved in all vertebrate PAK3 proteins, is a bad peptide consensus for almost all kinases. So we hypothesize that this interaction is not regulated by phosphorylation of this site. Another mechanism of regulation may target the amount of PAK3 at synapses. Indeed previous data effectively demonstrated the regulation of the *pak3* gene expression during long term potentiation (45). Another attractive option may be the involvement of the GIT-PIX complex that controls membrane localization of PAK (46) and that plays an important role in synapse formation (9). To date, there is no evidence of cross-talk between Nck and PIX signaling (for example see Ref 47). Finally, another hypothesis may be that this interaction is constitutive, as has been described for the Nck1-DCC complex (48).

Whereas inactivation of *Nck1* or *Nck2* genes has uncovered a large redundancy of both protein functions (49, 50), several recent data also demonstrate independent roles for each adaptor (33, 44), although the involvement of a specific PAK isoform has not been previously described. Nck2 plays specific roles in cellular signaling and also in neuronal differentiation and in dendritic spine formation (22, 23, 44, 51). When we analyzed the biological role of the PAK3-Nck2 complex during dendritic spine formation and maturation, we did not find any significant effect when the PAK3-P12A mutant or the wild-type protein were expressed in hippocampal neurons, at an early stage of dendritic spine formation (DIV7,) or later during spine maturation (DIV18). A first possibility could be that effects due to disruption of the PAK3-Nck2 complex may be undetectable in spine and synapse differentiation assays. Alternatively, the PAK3/Nck2 pathway may regulate synaptic plasticity independently of spine morphogenesis, an hypothesis in agreement with the normal dendritic spine structure in PAK3 knock-out mice (7). The two kinase-dead mutations associated with mental retardation have no effect on the interaction suggesting that

plasticity defect due to these mutations is not directly related to the absence of the PAK3-Nck2 complex. However, the slight decrease observed in the binding of the R67C mutant with Nck2 may be responsible for neuronal anomalies and be related to the severity of the mental retardation in this family (36).

We report here two independent observations that indicate that PAKs, and in particular PAK3, are involved in a down-regulation of post-synaptic excitatory currents. Perfusion of an inhibitory peptide in cortical pyramidal neurons increases the evoked post-synaptic response, and conversely overexpression of PAK3 in hippocampal neurons induces a decrease of spontaneous excitatory postsynaptic currents. Interestingly, transgenic expression of the auto-inhibitory domain of PAK and *pak1/pak3* double gene inactivation has been shown to induce an increase of excitatory synaptic transmission (6, 52) also indicating that PAKs down-regulate synaptic transmission. Together, these data strongly suggest that PAK3 down-regulates excitatory currents through its interaction with Nck2. These results raise the question as to how this complex acts on the dynamics of excitatory synaptic transmission. One possibility may be that PAK3 targets the ephrinB signaling through its interaction with Nck2 whose recruitment to the C-terminal phosphotyrosine of ephrinB after the Eph/ephrinB engagement initiates reverse signaling (53). In particular, the ephrinB/Nck2 association permits synaptic recruitment of the scaffold protein GIT1 to promote spine morphogenesis and synapse formation (22). An interesting hypothesis may be that the PAK3/Nck2 interaction regulates glutamate receptor dynamics at excitatory synapses, through regulation of signaling complexes involving EphrinB, GIT, and other synaptic proteins (54), either by titration of Nck2 or by interfering with Nck2 function at synapse. In this model (Fig. 9), overexpression of PAK3 is responsible for Nck2 titration and induces a decrease of the Nck2-dependent stabilization of glutamate receptors. Conversely, perfusion of the P₁₂ inhibitory peptide decreases the cytoplasmic binding of Nck2 to PAK3, releasing Nck2 and allowing an Nck2-depen-

dent stabilization of glutamate receptors at the postsynaptic level, and leading to an increase in synaptic transmission. Interestingly, a similar model in which Nck sequesters PAK1 to the cytoplasm was recently proposed in prolactin signaling (55). In conclusion, we have shown that PAK3 forms a signaling complex with the Nck2/Grb4 adaptor, which is involved in the down-regulation of post-synaptic excitatory currents.

Acknowledgments—We thank Wei Li and Bruce Mayer for Nck plasmids, Frédéric Saudou and Sandrine Humbert for Huntingtin plasmids, Martine Latta-Mahieu for the DA-PAK1-kd plasmid, and Salah El Mestikawy for the vGLUT1 rabbit antibody. We also thank Annie Lamouroux for the help with quantitative-PCR; Jacques Camonis for the help with two-hybrid assay; Julie Perroy for advice in mouse neuronal cultures; Sandrine Poëa-Guyon for help in confocal imaging, and Gérard Sadoc for the electrophysiological recording software. We thank Seana O'Regan for helpful comments on the manuscript.

REFERENCES

1. Ropers, H. H. (2008) *Curr. Opin. Genet. Dev.* **18**, 241–250
2. Chelly, J., Khelifaoui, M., Francis, F., Chérif, B., and Bienvenu, T. (2006) *Eur. J. Hum. Genet.* **14**, 701–713
3. 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
4. Kreis, P., and Barnier, J. V. (2009) *Cell. Signal.* **21**, 384–393
5. Bokoch, G. M. (2003) *Annu. Rev. Biochem.* **72**, 743–781
6. Huang, W., Zhou, Z., Asrar, S., Henkelman, M., Xie, W., and Jia, Z. (2011) *Mol. Cell. Biol.* **31**, 388–403
7. Meng, J., Meng, Y., Hanna, A., Janus, C., and Jia, Z. (2005) *J. Neurosci.* **25**, 6641–6650
8. 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
9. Zhang, H., Webb, D. J., Asmussen, H., Niu, S., and Horwitz, A. F. (2005) *J. Neurosci.* **25**, 3379–3388
10. Kreis, P., Thévenot, E., Rousseau, V., Boda, B., Muller, D., and Barnier, J. V. (2007) *J. Biol. Chem.* **282**, 21497–21506
11. Boda, B., Nikonenko, I., Alberi, S., and Muller, D. (2006) *Mol. Neurobiol.* **34**, 67–80
12. Bagrodia, S., Taylor, S. J., Creasy, C. L., Chernoff, J., and Cerione, R. A. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 22731–22737
13. Bokoch, G. M., Wang, Y., Bohl, B. P., Sells, M. A., Quilliam, L. A., and Knaus, U. G. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 25746–25749
14. Lu, W., Katz, S., Gupta, R., and Mayer, B. J. (1997) *Curr. Biol.* **7**, 85–94
15. Buday, L., Wunderlich, L., and Tamás, P. (2002) *Cell. Signal.* **14**, 723–731
16. Hing, H., Xiao, J., Harden, N., Lim, L., and Zipursky, S. L. (1999) *Cell* **97**, 853–863
17. Fryer, B. H., Wang, C., Vedantam, S., Zhou, G. L., Jin, S., Fletcher, L., Simon, M. C., and Field, J. (2006) *J. Biol. Chem.* **281**, 11487–11495
18. Zhao, Z. S., Manser, E., and Lim, L. (2000) *Mol. Cell. Biol.* **20**, 3906–3917
19. Zhou, G. L., Zhuo, Y., King, C. C., Fryer, B. H., Bokoch, G. M., and Field, J. (2003) *Mol. Cell. Biol.* **23**, 8058–8069
20. Guan, S., Chen, M., Woodley, D., and Li, W. (2007) *Mol. Cell. Biol.* **27**, 6001–6011
21. Pilpel, Y., and Segal, M. (2005) *J. Neurochem.* **95**, 1401–1410
22. Segura, I., Essmann, C. L., Weinges, S., and Acker-Palmer, A. (2007) *Nat. Neurosci.* **10**, 301–310
23. Xu, N. J., and Henkemeyer, M. (2009) *Nat. Neurosci.* **12**, 268–276
24. Rousseau, V., Goupille, O., Morin, N., and Barnier, J. V. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 3912–3920

25. Kreis, P., Rousseau, V., Thévenot, E., Combeau, G., and Barnier, J. V. (2008) *J. Neurochem.* **106**, 1184–1197
26. König, S., Guibert, B., Morice, C., Vernier, P., and Barnier, J. V. (2001) *C. R. Acad. Sci. III* **324**, 673–681
27. Herzog, E., Belenchi, G. C., Gras, C., Bernard, V., Ravassard, P., Bedet, C., Gasnier, B., Giros, B., and El Mestikawy, S. (2001) *J. Neurosci.* **21**, RC181
28. Moreau, A. W., Amar, M., Le Roux, N., Morel, N., and Fossier, P. (2010) *Cereb. Cortex* **20**, 456–467
29. Le Roux, N., Amar, M., Baux, G., and Fossier, P. (2006) *Eur. J. Neurosci.* **24**, 3507–3518
30. Le Roux, N., Amar, M., Moreau, A., Baux, G., and Fossier, P. (2008) *Eur. J. Neurosci.* **27**, 3244–3256
31. Seeburg, D. P., Feliu-Mojer, M., Gaiottino, J., Pak, D. T., and Sheng, M. (2008) *Neuron* **58**, 571–583
32. Galisteo, M. L., Chernoff, J., Su, Y. C., Skolnik, E. Y., and Schlessinger, J. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 20997–21000
33. Guan, S., Fan, J., Han, A., Chen, M., Woodley, D. T., and Li, W. (2009) *J. Invest. Dermatol.* **129**, 1909–1920
34. Cahoy, J. D., Emery, B., Kaushal, A., Foo, L. C., Zamanian, J. L., Christopherson, K. S., Xing, Y., Lubischer, J. L., Krieg, P. A., Krupenko, S. A., Thompson, W. J., and Barres, B. A. (2008) *J. Neurosci.* **28**, 264–278
35. Lein, E. S., Hawrylycz, M. J., Ao, N., Ayres, M., Bensinger, A., Bernard, A., Boe, A. F., Boguski, M. S., Brockway, K. S., Byrnes, E. J., Chen, L., Chen, L., Chen, T. M., Chin, M. C., Chong, J., Crook, B. E., Czaplinska, A., Dang, C. N., Datta, S., Dee, N. R., Desaki, A. L., Desta, T., Diep, E., Dolbeare, T. A., Donelan, M. J., Dong, H. W., Dougherty, J. G., Duncan, B. J., Ebbert, A. J., Eichele, G., Estlin, L. K., Faber, C., Facer, B. A., Fields, R., Fischer, S. R., Fliss, T. P., Frensley, C., Gates, S. N., Glattfelder, K. J., Halverson, K. R., Hart, M. R., Hohmann, J. G., Howell, M. P., Jeung, D. P., Johnson, R. A., Karr, P. T., Kawal, R., Kidney, J. M., Knapik, R. H., Kuan, C. L., Lake, J. H., Laramee, A. R., Larsen, K. D., Lau, C., Lemon, T. A., Liang, A. J., Liu, Y., Luong, L. T., Michaels, J., Morgan, J. J., Morgan, R. J., Mortrud, M. T., Mosqueda, N. F., Ng, L. L., Ng, R., Orta, G. J., Overly, C. C., Pak, T. H., Parry, S. E., Pathak, S. D., Pearson, O. C., Puchalski, R. B., Riley, Z. L., Rockett, H. R., Rowland, S. A., Royall, J. J., Ruiz, M. J., Sarno, N. R., Schaffnit, K., Shapovalova, N. V., Svisay, T., Slaughterbeck, C. R., Smith, S. C., Smith, K. A., Smith, B. I., Sodt, A. J., Stewart, N. N., Stumpf, K. R., Sunkin, S. M., Sutram, M., Tam, A., Teemer, C. D., Thaller, C., Thompson, C. L., Varnam, L. R., Visel, A., Whitlock, R. M., Wohnoutka, P. E., Wolkey, C. K., Wong, V. Y., Wood, M., Yaylaoglu, M. B., Young, R. C., Youngstrom, B. L., Yuan, X. F., Zhang, B., Zwingman, T. A., and Jones, A. R. (2007) *Nature* **445**, 168–176
36. Bienvenu, T., des Portes, V., McDonnell, N., Carrié, A., Zemni, R., Couvert, P., Ropers, H. H., Moraine, C., van Bokhoven, H., Fryns, J. P., Allen, K., Walsh, C. A., Boué, J., Kahn, A., Chelly, J., and Beldjord, C. (2000) *Am. J. Med. Genet* **93**, 294–298
37. Howe, A. K., and Juliano, R. L. (2000) *Nat. Cell Biol.* **2**, 593–600
38. Kiouss, W. B., Hood, J., Yang, S., Gerritsen, M. E., Cheresh, D. A., Alderson, N., and Schwartz, M. A. (2002) *Circ. Res.* **90**, 697–702
39. Orr, A. W., Stockton, R., Simmers, M. B., Sanders, J. M., Sarembock, I. J., Blackman, B. R., and Schwartz, M. A. (2007) *J. Cell Biol.* **176**, 719–727
40. Lee, H. W., Kim, Y., Han, K., Kim, H., and Kim, E. (2010) *J. Neurosci.* **30**, 5508–5518
41. Arias-Romero, L. E., and Chernoff, J. (2008) *Biol. Cell* **100**, 97–108
42. Puto, L. A., Pestonjamas, K., King, C. C., and Bokoch, G. M. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 9388–9393
43. Braverman, L. E., and Quilliam, L. A. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 5542–5549
44. Round, J. E., and Sun, H. (2011) *Mol. Cell. Neurosci.* **47**, 265–273
45. Boda, B., Mas, C., and Muller, D. (2002) *Neuroscience* **114**, 13–17
46. Brown, M. C., West, K. A., and Turner, C. E. (2002) *Mol. Biol. Cell* **13**, 1550–1565
47. Ku, G. M., Yablonski, D., Manser, E., Lim, L., and Weiss, A. (2001) *EMBO J.* **20**, 457–465
48. Bladt, F., Aippersbach, E., Gelkop, S., Strasser, G. A., Nash, P., Tafuri, A., Gertler, F. B., and Pawson, T. (2003) *Mol. Cell. Biol.* **23**, 4586–4597
49. Fawcett, J. P., Georgiou, J., Ruston, J., Bladt, F., Sherman, A., Warner, N., Saab, B. J., Scott, R., Roder, J. C., and Pawson, T. (2007) *Proc. Natl. Acad.*

Sci. U.S.A. **104**, 20973–20978

50. Li, X., Meriane, M., Triki, I., Shekarabi, M., Kennedy, T. E., Larose, L., and Lamarche-Vane, N. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 37788–37797
51. Tu, Y., Li, F., and Wu, C. (1998) *Mol. Biol. Cell* **9**, 3367–3382
52. 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
53. Cowan, C. A., and Henkemeyer, M. (2001) *Nature* **413**, 174–179
54. Essmann, C. L., Martinez, E., Geiger, J. C., Zimmer, M., Traut, M. H., Stein, V., Klein, R., and Acker-Palmer, A. (2008) *Nat. Neurosci.* **11**, 1035–1043
55. Tao, J., Oladimeji, P., Rider, L., and Diakonova, M. (2011) *Mol. Endocrinol.* **25**, 1565–1578

ANNEXE II

The p21-activated Kinase PAK3 Forms Heterodimers with PAK1 in Brain Implementing Trans-regulation of PAK3 Activity.

Combeau Gaëlle, Kreis Patricia, **Domenichini Florence**, Amar Muriel, Fossier Philippe, Rousseau Véronique, Barnier Jean-Vianney -2012- J Biol Chem ; 287(36):30084-96. doi: 10.1074/jbc.M112.355073

The p21-activated Kinase PAK3 Forms Heterodimers with PAK1 in Brain Implementing Trans-regulation of PAK3 Activity^{*[S]}

Received for publication, February 21, 2012, and in revised form, July 11, 2012. Published, JBC Papers in Press, July 19, 2012, DOI 10.1074/jbc.M112.355073

Gaëlle Combeau¹, Patricia Kreis², Florence Domenichini, Muriel Amar, Philippe Fossier, Véronique Rousseau, and Jean-Vianney Barnier³

From the Centre de Neurosciences Paris-Sud, Université Paris-Sud, UMR 8195 and CNRS, UMR 8195, Orsay F-91405, France

Background: Regulation of group I p21-activated kinases is based on dimeric conformation.

Results: PAK3a forms regulatory heterodimers with PAK1 *in vitro* and *in vivo*.

Conclusion: Heterodimerization of PAK3a and PAK1 links PAK pathways in brain.

Significance: Analyzing the molecular mechanisms of PAKs regulation could help to understand the pathophysiology of some cancers and mental disabilities.

p21-activated kinase 1 (PAK1) and PAK3 belong to group I of the PAK family and control cell movement and division. They also regulate dendritic spine formation and maturation in the brain, and play a role in synaptic transmission and synaptic plasticity. PAK3, in particular, is known for its implication in X-linked intellectual disability. The *pak3* gene is expressed in neurons as a GTPase-regulated PAK3a protein and also as three splice variants which display constitutive kinase activity. PAK1 regulation is based on its homodimerization, forming an inactive complex. Here, we analyze the PAK3 capacity to dimerize and show that although PAK3a is able to homodimerize, it is more likely to form heterodimeric complexes with PAK1. We further show that two intellectual disability mutations impair dimerization with PAK1. The b and c inserts present in the regulatory domain of PAK3 splice variants decrease the dimerization but retain the capacity to form heterodimers with PAK1. PAK1 and PAK3 are co-expressed in neurons, are colocalized within dendritic spines, co-purify with post-synaptic densities, and co-immunoprecipitate in brain lysates. Using kinase assays, we demonstrate that PAK1 inhibits the activity of PAK3a but not of the splice variant PAK3b in a trans-regulatory manner. Altogether, these results show that PAK3 and PAK1 signaling may be coordinated by heterodimerization.

The p21-activated kinases (PAK)⁴ are effectors of Rac and Cdc42 GTPases and control cell proliferation and movement

* This work was supported in part by a grant from the Agence Nationale de la Recherche (ANR-MNP-2009) and the Fondation Jérôme Lejeune.

[S] This article contains three supplemental figures and one supplemental table.

¹ Present address: Ludwig Institute for Cancer Research, Department of Cell and Molecular Biology, Karolinska Institute, SE-171 77 Stockholm, Sweden.

² Present address: MRC center for Developmental Neurobiology, King's College London, London SE1 1UL, United Kingdom.

³ To whom correspondence should be addressed: Centre de Neurosciences Paris-Sud, bât 444, 91405 Orsay, France. Tel.: 33-1-69158160; E-mail: jean-vianney.barnier@u-psud.fr.

⁴ The abbreviations used are: PAK, p21-activated kinase; PBD, p21-binding domain; AID, auto-inhibitory domain; PSD, post-synaptic density; DIV, days *in vitro*; TCL, total cell lysate; TBL, total brain lysate; KD, kinase-dead; PAK3sv, PAK3 splice variant; KD, kinase dead.

(1). The mammalian group I of PAK includes PAK1, PAK2, and PAK3 which all display a very high degree of sequence identity and share structural and functional similarities. Their N-terminal domain interacts with regulators such as GTPases through the p21-binding domain (PBD), with Nck adaptors through the first proline-rich sequence and with PIX guanine exchange factors through an atypical proline-rich sequence (2–5). The PBD partially overlaps with the auto-inhibitory domain (AID). This latter domain can be subdivided into three domains: the dimerization domain, the inhibitory switch domain and the kinase inhibitory segment, which directly interacts with the kinase domain to inhibit its activity (6, 7). Mechanisms of PAK regulation have been mainly studied for PAK1 and were shown to be driven through the formation of dimers. Interaction between the regulatory domain and the catalytic domain is determinant for kinase regulation (6–11). Dimeric assembly positions the AID of one monomer inside the catalytic cleft of the kinase domain of the other monomer, forcing the T-loop to adopt an inactive conformation (6, 11). Membrane recruitment and GTPase-binding to the PBD induce conformational changes of the inhibitory switch domain, leading to the dissociation of the dimer and cis- and trans-phosphorylations allowing the activation of each partner (7, 8, 11–13). The dynamics of the different steps appears to be very complex and may proceed through different reaction pathways (11). This model of regulation is thought to be more generally applicable to the whole group I PAK proteins on the basis of their strong sequence identity.

PAK3 has specific functions in neuronal physiology and *pak3* mutations lead to intellectual disability (ID) (14–16). PAK3 is the only group I member whose expression is relatively restricted to neurons whereas PAK1 is highly expressed in the nervous system but also in other tissues (17, 18). The mammalian *pak3* gene contains two alternatively spliced exons called b and c (17, 19) and encodes PAK3a (without any spliced exon) and three splice variants referred to as PAK3b, PAK3c, and PAK3cb. The inserts are present in the AID, and their sequences are highly conserved during evolution, suggesting that these splice variants support unique functions for PAK3

(17). Unlike PAK3a, these splice variants are constitutively active and their interaction with active GTPases of the Rac/Cdc42 family are profoundly diminished compared with PAK3a. Moreover, their AID cannot inhibit the kinase activity of a PAK3a kinase domain (19). The molecular basis of the specific functions of PAK3 and its splice variants are largely unknown (20), and their mechanisms of regulation deserve to be extensively studied. Mechanisms of regulation of PAK1 were largely studied in regard to its role in cancer (21, 22) and the basis of PAK1 regulation is dependent upon its capacity to form dimeric complexes. In an attempt to characterize the mechanisms of regulation of PAK3a and of the three PAK3 splice variants, we analyzed, *in vitro*, the ability of PAK3 proteins to form dimers and to interact with the other neuronal PAK protein, PAK1. In transfected cells, we have demonstrated the existence of PAK3 homodimers and also heterodimeric complexes between PAK1 and the four PAK3 proteins. However, we observed a preference for heterodimeric complexes with PAK1 rather than PAK3 homodimers. *In vivo*, we showed that the different *pak3* mRNAs are expressed together with *pak1* in single pyramidal neurons and that PAK1 and PAK3 proteins colocalized in dendritic spines and are both present in the postsynaptic density (PSD) fraction. Moreover, we report that PAK1 and PAK3 co-immunoprecipitate with each other in mouse brain lysates. Finally, we demonstrated that PAK1/PAK3 heterodimers allow a trans-inhibition of the catalytic activity of PAK3a but not of the PAK3b splice variant. Altogether, our data show that PAK3 proteins form heterodimers with PAK1 and suggest that PAKs heterodimerization can coordinate PAK signaling and help to synchronize actin polymerization and spine stabilization.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Antibodies—Immunoblot and immunochemistry analyses were performed using anti-HA (rabbit: Santa Cruz Biotechnologies and rat: Roche), anti-FLAG (rabbit and mouse: Sigma-Aldrich), anti-PSD95 K28/43 (NeuroMab), anti-paxillin (Upstate-Millipore), HRP-conjugated secondary antibodies (Bio-Rad), Rabbit TrueBlot antibody (eBioscience), and anti-rabbit-FITC-, anti-rat-TRITC-, anti-mouse-Alexa-568-, and anti-mouse-Alexa-633-conjugated secondary antibodies (Jackson ImmunoResearch, Sigma, and Invitrogen). The anti-synaptophysin rabbit serum was previously described (23). For PAK analysis, several commercial or homemade sera were used and their characteristics were described in supplemental Fig. S1. N19-PAK3 directed against the 19-N-terminal amino acids of PAK3 and the N20-PAK1 directed against the 20 N-terminal amino acids of PAK1 were from Santa Cruz Biotechnologies, and the monoclonal antibody, named 3A12-PAK3 was from Sigma-Aldrich. A new polyclonal antiserum directed against the PAK3 protein was generated in rabbit (Sigma Genosys). The ASPAAPNKEDIPPSAENA (residues 211–228) synthetic peptide, common to all the mouse PAK3 proteins, was conjugated to keyhole limpet hemocyanin before immunization. The serum obtained was named rb-211-PAK3. The rabbit polyclonal antibody raised against the PAK3 exon c-encoded peptide, named Ec, was previously described (17). A rabbit polyclonal serum, directed against the GEFTPDLY (residues

94–101) peptide, only present in the mouse PAK3b protein, was similarly processed (Neosystem) and named rb-svs-PAK3b. Two new polyclonal antisera were obtained after immunization with synthetic peptides, unique to the mouse PAK1 protein (GenScript): a serum named ch-209-PAK1 was prepared from chicken, using the LTVTPTRDVAT (residues 209–219) peptide, and another one from rabbit, named rb-211-PAK1, using the VTPTRDVATSPISPTEN (residues 211–227) peptide. PAK antibodies were affinity-purified by Ultralink column chromatography (Perbio Science).

Plasmid Constructs—The following pcDNA3-HA-based plasmids were previously described: pcDNA3-HA-PAK3a-WT, -PAK3a-K297L (kinase-dead), -PAK3b-WT, -PAK3b-K297L (19), -PAK3a-A365E, -PAK3a-R419X, -PAK3a-R67C (24), -PAK3c-WT, -PAK3cb-WT (17). The following FLAG-based constructs were previously described (5): pFLAG-PAK3a-WT, pFLAG-PAK3a-K297L, pFLAG-PAK1-K299R (kinase-dead and named pFLAG-PAK1-KD). The plasmid encoding HA-PAK2 protein was provided by Herma Renkema (Tampere, Finland) and the HA-tagged wild-type PAK1 plasmid was provided by M. C. Parrini (7). Mutagenesis was performed using procedures based upon the QuickChange protocol (Stratagene) with the oligonucleotides listed in supplemental Table S2. PCR on pcDNA3-HA-PAK3a-K297L with the oligonucleotides set 1 gave rise to the pcDNA3-HA-PAK3a-L102F-K297L plasmid. The KpnI/XbaI digested fragment from the pcDNA3-HA-PAK3a-L102F-K297L plasmid was introduced in the pFLAG3S2X vector (Sigma), to obtain the pFLAG-PAK3a-L102F-K297L plasmid. Mutagenesis on the pFLAG-PAK3a-WT and the pFLAG-PAK3a-K297L plasmids using the oligonucleotides set 2 led to the pFLAG-PAK3a-R436E-K437D and the pFLAG-PAK3a-R436E-K437D-K297L plasmids, respectively. A fragment obtained after PfuII digestion of the pFLAG-PAK3a-R436E-K437D-K297L construct, was introduced in the PfuII digested pFLAG-PAK3a-L102F-K297L plasmid, giving rise to the pFLAG-PAK3a-L102F-R436E-K437D-K297L plasmid. The pFLAG-PAK3a-R436E-K437D-K297L was digested by KpnI/XbaI and the fragment obtained was cloned in the pcDNA3-HA vector, leading to the pcDNA3-HA-PAK3a-R436E-K437D-K297L plasmid. PCR amplifications were performed from the pFLAG-PAK3a-K297L and the pFLAG-PAK3a-R436E-K437D using the oligonucleotides set 3. pLex and pGAD plasmids previously were previously described (5). PCR products were digested by BamHI/SalI and the fragments obtained were inserted in the pLex vector to obtain the pLex-PAK3-(232–544) plasmid (named pLex-PAK3-Cter) and the pLex-PAK3-R436E-K437D-(232–544) plasmid (named pLex-PAK3-Cter-R436E-K437D), respectively. PCR amplification was also performed on pcDNA3-HA-PAK1-K299R with the oligonucleotide set 4. PCR products were digested by BamHI/XbaI then inserted into pLex or pGAD vectors to obtain pLex-PAK1-(235–545) named pLex-PAK1-Cter and pGAD-PAK1-(235–545) named pGAD-PAK1-Cter, respectively. The BamHI/SalI fragment PAK3a-(2–270) from the pcDNA3-HA-PAK3a-WT was cloned in the pLex vector, giving rise to the pLex-PAK3a-(2–270) plasmid, named pLex-PAK3-Nter. To obtain the pGAD-PAK3-(232–544) plasmid, named pGAD-PAK3-Cter, a PCR was performed on pcDNA3-HA-PAK3a-K297L with the oligonucleotide set 5. PCR products were digested by BamHI/XbaI and the insert obtained was cloned

PAK Heterodimers in Brain

into the GAD vector. PCR amplifications were performed from the plasmids pcDNA3-HA-PAK3a-L102F-K297L, pcDNA3-HA-PAK3b, pcDNA3-HA-PAK3c, and pcDNA3-HA-PAK3cb with the oligonucleotide set 7. PCR products digested by BamHI/XbaI were cloned into the pGAD vector to obtain pGAD-PAK3a-(2–270)-L102F, pGAD-PAK3b-(2–270), pGAD-PAK3c-(2–270), and pGAD-PAK3cb-(2–270) constructs (all named Nter in place of 2–270). The BamHI/XbaI insert obtained after digestion of the pFLAG-PAK1-K299R plasmid (5) was inserted in the pcDNA3-HA vector (Invitrogen) in order to obtain the pcDNA3-HA-PAK1-K299R plasmid. The pGAD-PAK1-(2–270) plasmid, named pGAD-PAK1-Nter was obtained by amplifying pcDNA3-HA-PAK1 with set 6. The insert was then cloned in the GAD vector. The GST-Cdc42-V12 prokaryotic expression plasmid was previously described (19). All plasmid coding sequences obtained were confirmed by sequencing.

Cell Line and Neuron Culture, Immunocytochemistry, and Imaging—HeLa cell cultures, primary cultures of dissociated hippocampal neurons and transfections were previously described (5). For HeLa cells, PAK-transfected cells were fixed after 24 h and triple immunolabeled using FLAG, HA, and paxillin antibodies, followed by anti-rabbit-FITC-, anti-rat-TRITC- and anti-mouse-Alexa-633-conjugated secondary antibodies, respectively. At 21 days *in vitro* (DIV), neurons were fixed and labeled for native PAK proteins, using specific PAK1 and PAK3 antibodies, followed by anti-rabbit-FITC- and anti-mouse-Alexa-568-conjugated secondary antibodies, respectively, in the presence of Alexa-633-phalloidin to label actin cytoskeleton. Images were acquired in a sequential mode, as previously described (5), using a Zeiss LSM 700 confocal microscope, equipped with 488, 555, and 639 nm lasers. Bleed-through was checked by imaging cells labeled with a single fluorophore and by acquiring dual channel images with the same setup used for the triple-labeled cells, indicating the total absence of overlap between the different fluorophores used. Analysis of the PAK1/PAK3 co-localized pixels was performed from the same focal plane acquired sequentially in the two channels, using the RG2B co-localization plug-in of NIH ImageJ software.

Immunoprecipitation and Western Blot—24–30 h after transfection, HeLa cells were lysed in KLB buffer as described by Ref. 7. Cell lysates were immunoprecipitated overnight with HA-agarose conjugate or with protein G-agarose (Sigma-Aldrich) in the presence of the FLAG antibody. For brain immunoprecipitation, tissues were cut in KLB buffer (10% weight/volume) then homogenized in a Potter-Elvehjem homogenizer. After a centrifugation step, tissue supernatants were then incubated a few hours in the presence of protein G-agarose as a clearing step. Immunoprecipitation was then performed overnight at 4 °C by adding protein G-agarose and appropriate PAK antibodies. Samples were resolved by electrophoresis and Western blotting as previously described (5). Expression of transfected proteins was checked in each experiment by Western blotting of Total Cell Lysate (TCL) samples.

Kinase Assay—The immunoprecipitates obtained from transfected cells were resuspended in the kinase buffer (25 mM HEPES, pH 7.4, 25 mM MgCl₂, 25 mM-glycerophosphate, 2 mM dithiothreitol, 0.1 mM orthovanadate) and incubated in the

absence or the presence of the active GTPase GST-Cdc42V12, to activate the kinase activity, as previously described in Thévenot *et al.*, (5). Samples were then incubated in the presence of 5 μCi of [γ -³²P]ATP (Amersham Biosciences) for 20 min at 30 °C under agitation, in the presence of 3 μg of Myelin Basic Protein (Invitrogen) as a substrate. Reaction was stopped by adding SDS-Laemmli sample buffer. Boiled samples were resolved by SDS-PAGE and incorporation of ³²P was quantified using a PhosphorImager (Amersham Biosciences).

Yeast Two-hybrid Assay, Histidine Test, and β -Galactosidase Activity—The two-hybrid assay was applied according to standard procedures. L40 yeasts strain (L40 Mata, Trp-1, Leu-2, His-3, lys::(*lexAop*)4-HIS3, ura3::(*LexAop*)8-LacZ), were co-transfected with pLex and pGAD constructs by the lithium acetate method and transformants were grown on appropriate selective medium. Following overnight growth on YPDA medium, patches were replicated on plates lacking His, Trp, and Leu for selection of diploids. Liquid β -galactosidase assay was performed following the method of Crouin *et al.* (25). In each experiment, the quantification of the interaction between the PAK3a-Nterminal domain and the PAK3-Cterminal domain constitutes the 100% reference for all other tested interactions.

Single Cell RT-PCR on Cortical Neurons—Experiments were performed as previously described (26). Briefly, layer V visual cortex neurons of 3-week-old rats were patched and following whole cell recording to identify neurons, as much cytoplasm as possible was aspirated into the patch pipette. The cytoplasm was added to a reverse-transcription mix and processed for first strand elongation for three hours at 48 °C. The RT products were then amplified by two successive rounds of PCR. First, a multiplex PCR was performed directly in the same tubes by adding 90 μl of the PCR mix. This mix contained pairs of primers that hybridize with similar Tm. A second specific amplification was then performed in several parallel PCRs, using 1 μl of the PCR1 products (in 25 μl final PCR volume) and one primer set. PCR products were analyzed after electrophoresis in ethidium bromide containing agarose gels. Primer sequences are described in supplemental Table S2 and in Ref. 17.

Synaptosome Extraction and PSD Purification—Mice brains were cut in small pieces and resuspended in 5% (weight/volume) of resuspension solution A (5 mM Hepes, 320 mM sucrose, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, pH 7.4, and protease and phosphatase inhibitors), as described in Ref. 27 (see supplemental Fig. S3). Homogenization of tissues was performed by a Precellys tissue homogenizer. The TBL was centrifuged to give the P2 fraction, according to the protocol of Ref. 28. P2 was then resuspended in a small volume of solution B (320 mM sucrose, 1 mM NaHCO₃ with protease and phosphatase inhibitors), which was then mixed with 15 ml of 14% Ficoll (GE Healthcare). This preparation was loaded below a 7.5% Ficoll solution. Both Ficoll solutions were diluted in solution A. Gradients were centrifuged during 1 h at 80,000 × *g*. Synaptosomes migrated at the interface between both the two Ficoll solutions, so this cream-colored band was collected. Synaptosomes were diluted in B solution, and the obtained volume was half diluted with solution C (12 mM Tris pH 8.0, 1% Triton X-100 with protease and phosphatase inhibitors). The preparation was incubated 15 min

in ice then centrifuged 20 min at $32,800 \times g$. The pellet containing the PSD fraction was resuspended in a small volume of Krebs' buffer (20 mM Hepes, 10 mM glucose, 1.2 mM NaH_2PO_4 , 1.3 mM MgCl_2 , 1.2 mM CaCl_2 , 5 mM KCl, 145 mM NaCl, 2 mM EDTA, with protease, and phosphatase inhibitors). All the collected fractions were then analyzed by Western blotting using appropriate antibodies.

Animal Experimentation—All experiments were conducted under appropriate biological containment in accordance with European Communities Council Directive (CEE 86/609) for animal care and experimentation, and were conducted following the guidelines of the animal facility in Orsay (France) approved by the national direction of veterinary services (Direction des Services Vétérinaires, France, agreement no. B91-471-104).

RESULTS

PAK3a Forms Homodimers—Crystallographic analysis and co-immunoprecipitation assays showed that PAK1 forms homodimers (6, 7). Since PAK1 and PAK3 possess a high sequence identity and share an overall similar structure (Fig. 1A), we first asked whether PAK3 may form homodimers like PAK1 does. The ability of PAK3a to form dimers was tested by a co-immunoprecipitation assay. HeLa cells were co-transfected with HA- and FLAG-tagged PAK3a constructs. As a control, cells were transfected by HA- or FLAG- PAK3 plasmids alone or with empty vectors. To bypass the problem of dissociation of the dimers following PAK activation, we chose to work with kinase-dead (KD) constructs (PAK3-K297L and PAK1-K299R) as previously performed for PAK1 (7). The mutation of the PAK3 lysine 297 residue that is homolog to the lysine 299 in the PAK1 protein, totally inactivates the kinase activity of PAK3 (19). Co-immunoprecipitated proteins were revealed by Western blot analysis with anti-FLAG antibodies on HA-precipitates. As shown in Fig. 1B, the FLAG-PAK3 protein is present in the HA-immunoprecipitated complex, demonstrating that PAK3a is able to form homodimers in co-transfected cells. Specificity of the signal was verified with the absence of co-immunoprecipitated protein in experiments from single-transfected cells, and from cells co-transfected with an HA or FLAG empty vector and a corresponding tagged PAK3 plasmid (Fig. 1B, *fourth* and *fifth lanes*). It was previously shown that in PAK1 the Leu-107 residue in the Inhibitory Switch domain and the Arg-Lys-438–439 residues in the large lobe of the kinase domain are involved in the molecular interaction between the N-terminal regulatory domain and the catalytic C-terminal domain and their mutation disrupts the dimeric complex (6, 7). We introduced the homolog mutations L102F and R436E-K437D, alone or together, in the *pak3* coding sequence (see Fig. 1A) and tested the capacity of the mutated proteins to dimerize (Fig. 1C). The Western blot analysis indicates that mutation L102F present on only one monomer was sufficient to strongly reduce the interaction ($4.84 \pm 2.00\%$ of PAK3a homodimer) (Fig. 1D). Present in both partners, L102F totally suppressed the interaction ($0.68 \pm 0.39\%$ of PAK3a homodimer). The double mutation R436E-K437D in the catalytic domain of one partner also decreased the co-immunoprecipitation ($51.08 \pm 2.34\%$ of PAK3a homodimer) but to a lesser extent than the L102F muta-

tion. The presence of the mutation R436E-K437D in both partners strengthened the effect of a single mutation ($25.36 \pm 5.88\%$ of PAK3a homodimer). Moreover, the presence of the mutations L102F and R436E-K437D in one PAK3 protein totally abrogates dimer formation ($1.39 \pm 0.8\%$ of PAK3a homodimer). These results show that L102 and R436-K437 residues are strongly involved in PAK3 dimer formation. To define the precise domains involved in the complex formation, a two-hybrid assay was performed with the N-terminal moiety and the C-terminal moiety of PAK3 fused to the Lex binding domain or the GAD transactivation domain. Protein interactions were observed on selective medium devoid of histidine (histidine test) and quantified by measure of β -galactosidase activity. Double transfected yeasts that co-expressed N-terminal and C-terminal moieties displayed a significant growth on selective media and a high β -galactosidase activity, indicating a strong interaction between the N-terminal and the C-terminal domains of PAK3a (Fig. 1E). In contrast, interactions between two N-terminal moieties of PAK3a and between two C-terminal moieties of PAK3 were very weak referred to the interaction between the N-terminal and C-terminal parts of the protein: $4.19 \pm 1.39\%$ for PAK3a-Nter/PAK3a-Nter interaction and $3.45 \pm 1.15\%$ for PAK3-Cter/PAK3-Cter interaction. The L102F or the R436E-K437D mutations both strongly decrease the N-terminal/C-terminal interaction (L102F: $17.06 \pm 5.68\%$; R436E-K437D: $1.22 \pm 0.40\%$). Taken together, these data show that PAK3a forms homodimers via a strong N-terminal/C-terminal interaction, leucine 102, arginine 436, and lysine 437 being critical residues for this complex.

PAK3a Forms Heterodimers with PAK1—Given that PAK1 and PAK3 share a very high level of sequence identity, we wondered whether PAK3a can form heterodimers with PAK1. Because PAK1 and PAK3 proteins can form heterodimers only if they localize in the same subcellular regions, we analyzed their co-localization, in particular in focal adhesions whose structure and reorganization are highly regulated by PAKs (4). HeLa cells were co-transfected with FLAG-tagged PAK3a-KD and HA-tagged PAK1-KD expressing plasmids (Fig. 2A). Immunolabeling was performed using FLAG and HA antibodies to detect PAK3 and PAK1 proteins, respectively, and paxillin antibody to detect focal adhesions. We observed that the PAK3a and PAK1 proteins colocalize (Fig. 2A, *right panel*), and colocalize also with paxillin in the focal adhesions at the edge of the cell.

Thus, since these proteins were localized in the same cellular structures, we examined whether they could form heterodimers by a co-immunoprecipitation assay. As mentioned above, since PAK activation may interfere with the capacity to form dimers (7), we tested interaction with kinase-dead proteins. HeLa cells were co-transfected with plasmids encoding differentially tagged PAK3a-KD or PAK1-KD (Fig. 2B) and a co-immunoprecipitation assay revealed that PAK3a could form homodimers. Interestingly, significantly higher levels of heterodimers were formed with PAK1 (Fig. 2B). Comparison of the ratio co-immunoprecipitate/precipitate intensity reveals that PAK3a interacts about 7-fold more with PAK1 than with itself (674.71% of

PAK3 Heterodimers in Brain

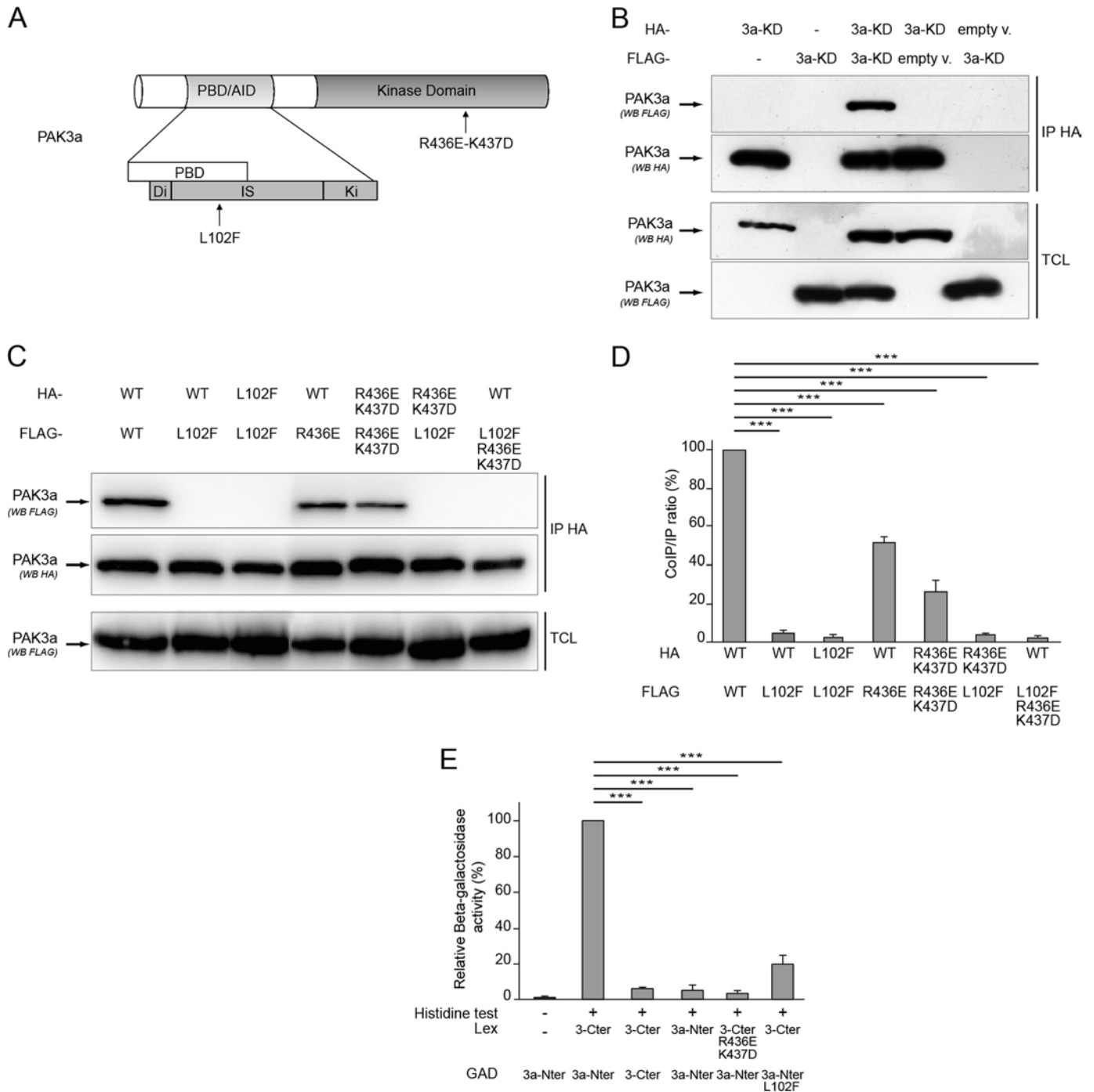


FIGURE 1. PAK3a forms homodimers. *A*, structure of the PAK3 protein indicating location of interaction mutations. *B*, PAK3a co-immunoprecipitates with itself. Lysates of HeLa cells transfected with empty HA- or FLAG vectors (empty v.) or with plasmids encoding HA-PAK3a-KD, FLAG-PAK3a-KD, or both, were HA-precipitated (*IP HA*). Total cell lysates (*TCL*) were controlled using the corresponding antibodies as indicated (*third and fourth panels*). HA-precipitated proteins were revealed by anti-HA Western blotting (*second panel*) and the co-immunoprecipitated PAK3a proteins were revealed by anti-FLAG Western blotting (*first panel*). Images shown are representative of three independent experiments. *C*, characterization of PAK3a mutations that disrupt the dimer. All PAK3a constructs carry the K297L (*KD*) mutation that inactivates the kinase domain. HA or FLAG-tagged PAK3a-WT, -L102F or -R436E-K437D plasmids were co-transfected in HeLa cells before HA-precipitation (*IP HA*) and Western blotting using FLAG antibody (co-immunoprecipitates, *first panel*) or HA antibody (immunoprecipitates, *second panel*) as indicated. Levels of FLAG-PAK3a proteins in *TCL* were controlled by anti-FLAG immunoblotting (*third panel*). Images shown are representative of three independent experiments. *D*, amount of FLAG-PAK3a proteins co-immunoprecipitated compared with the amount of HA-immunoprecipitated PAK3a proteins in three experiments. Results are expressed relative to the PAK3a/PAK3a interaction. Comparison with Student's *t* test: ***, $p < 0.001$, $n = 3$. *E*, PAK3a interaction involves a strong Nter/Cter interaction as demonstrated with the two-hybrid assay. Yeast growth on histidine minus media (histidine test) indicates a protein-protein interaction (+). β -Galactosidase activity was expressed relative to the PAK3a-Nter/PAK3a-Cter interaction. Comparison with Student's *t* test: ***, $p < 0.001$, $n = 3$.

PAK3a homodimer ± 224.90 (Fig. 2C). In contrast, PAK1 forms similar amounts of homodimers (431.22% of PAK3a homodimer ± 143.74) than heterodimers.

We then compared co-immunoprecipitation between wild-type and kinase-dead proteins (Fig. 2D). Controls with empty vectors verified the specificity of the assay (first two lanes). We

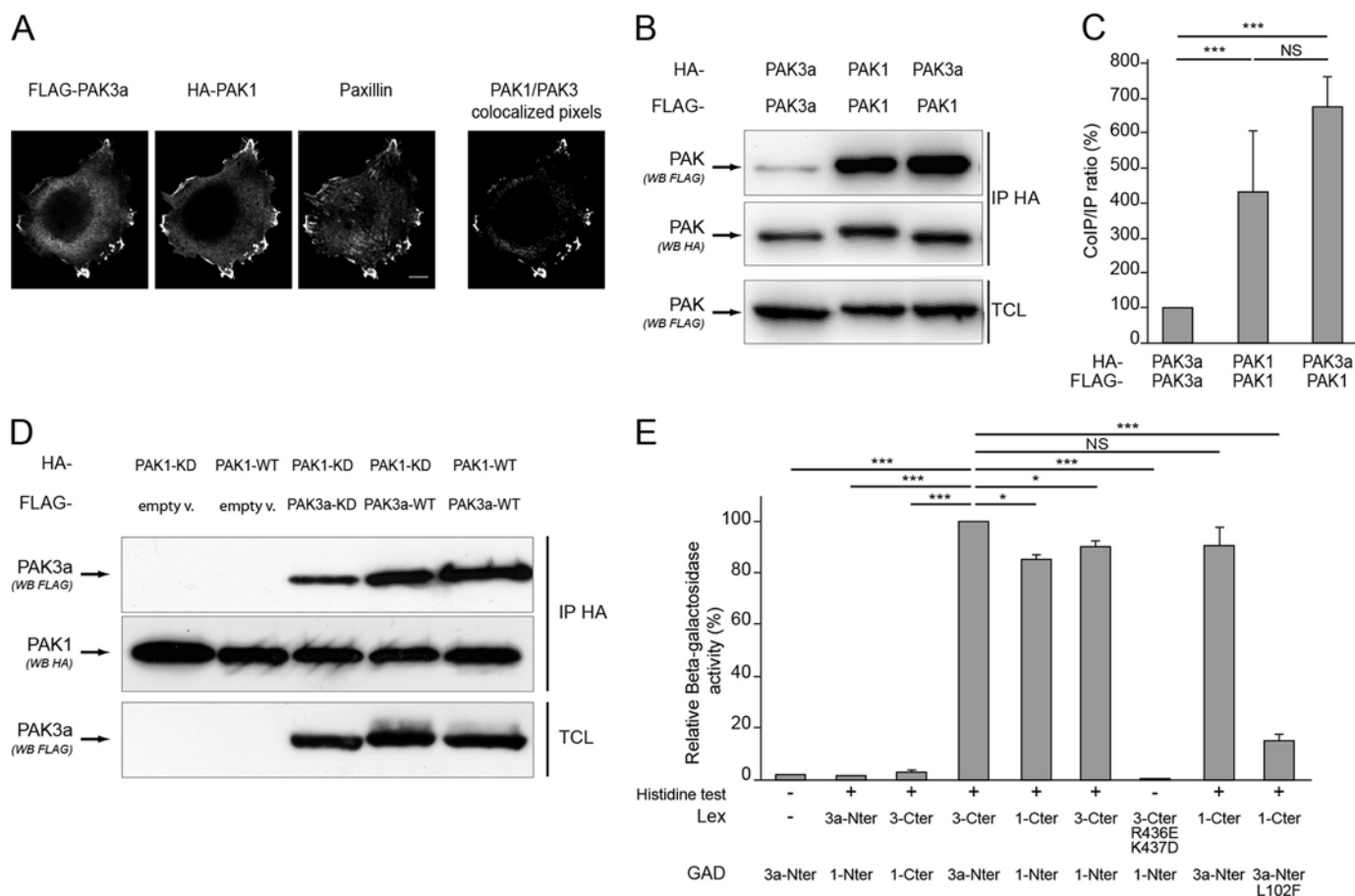


FIGURE 2. PAK3a forms heterodimers with PAK1. *A*, PAK1 and PAK3 colocalize at focal adhesions of HeLa cells. FLAG-PAK3a-KD and HA-PAK1-KD plasmids were transfected in HeLa cells. Immunolabeling was performed using FLAG and HA antibodies to detect PAK proteins and paxillin antibodies to identify focal adhesions. The PAK1/PAK3 colocalized pixels are shown (*right*). *B*, PAK3a co-immunoprecipitates with PAK1. HA- and FLAG-tagged PAK3a-KD and PAK1-KD plasmids were co-transfected in HeLa cells then cell lysates were HA-precipitated (IP HA). The co-immunoprecipitated PAK proteins were revealed by anti-FLAG Western blotting (*first panel*). HA-precipitated proteins and TCL were controlled using the corresponding antibodies as indicated (*second and third panels*, respectively). Images shown are representative of three independent experiments. *C*, amount of FLAG-PAK proteins co-immunoprecipitated compared with the amount of HA-precipitated PAK proteins. Results are expressed relative to the PAK3a/PAK3a interaction. Comparison with Student's *t* test: NS, $p > 0.05$; ***, $p < 0.001$, $n = 3$. *D*, wild-type PAK isoforms interact together. Cells were co-transfected with HA-PAK1-K_D and FLAG-PAK3a-KD (*third lane*), HA-PAK1-KD, and FLAG-PAK3a-WT (*fourth lane*), and HA-PAK1-WT and FLAG-PAK3a-WT (*fifth lane*). HA-proteins were immunoprecipitated (*second panel*) and co-immunoprecipitated FLAG proteins were visualized by anti-FLAG Western blotting (*first panel*). Co-transfection of PAK1 with empty vector (*empty v.*) was done as control (*first two lanes*). Images shown are representative of three independent experiments. *E*, analysis of the PAK1/PAK3a interaction using the two-hybrid assay. Yeasts growth on histidine minus media indicated a protein-protein interaction (+). β -Galactosidase activity was expressed relative to the PAK3a-Nter/PAK3a-Cter interaction. Comparison with Student's *t* test: NS, $p > 0.05$; *, $p < 0.05$; ***, $p < 0.001$; $n = 3$.

observed that the interaction between PAK1 and PAK3a is maintained for wild-type partners, demonstrating that this interaction is not abrogated by phosphorylation. On the contrary, we observed that PAK3a-WT co-immunoprecipitates more with PAK1-KD than the PAK3a-KD does. This suggests that, in contrast to that what previously reported for PAK1 (7), the wild-type PAK3a protein more easily forms heterodimers than the inactive protein, and that the regulation of dimer stability by autophosphorylation may differ for the different PAK isoforms.

Using a two-hybrid assay, we observed that the PAK3 C-terminal domain strongly interacts with the PAK1 N-terminal domain of its partner, and reciprocally, contributing to heterodimer formation (Fig. 2*E*). The L102F and R436E-K437D mutations also disrupted heteromeric interaction between PAK3a and PAK1, as analyzed by the two-hybrid assay. Note that the quantitative difference observed between PAK3a/PAK3a homodimers and PAK3a/PAK1 heterodimers in the co-

immunoprecipitation assay was not observed in the two-hybrid assay, suggesting that preferential heteromeric conformation is supported by properties dependent on full length structure. Altogether, our results indicate that, in transfected cells, the two proteins PAK1 and PAK3 localized and that PAK3a preferentially forms heterodimers with PAK1.

Intellectual Disability Mutations Differentially Affect PAK3 Dimerization—To date, five mutations in the *pak3* gene coding sequence have been identified in patients with a non syndromic form of ID (reviewed in Ref. 20). Because we demonstrated that PAK3 preferentially forms heterodimers with PAK1, we wondered if these ID mutations could affect dimerization. We tested the R67C mutation previously described to decrease both the Cdc42 binding and the induced PAK3 activity, and two other mutations located in the C-terminal moiety, one missense mutation (A365E) and one nonsense mutation (R419X), that were both shown to abrogate PAK3 kinase activity (Fig. 3*A*) (24). HeLa cells were co-transfected with FLAG-PAK1-KD in

PAK Heterodimers in Brain

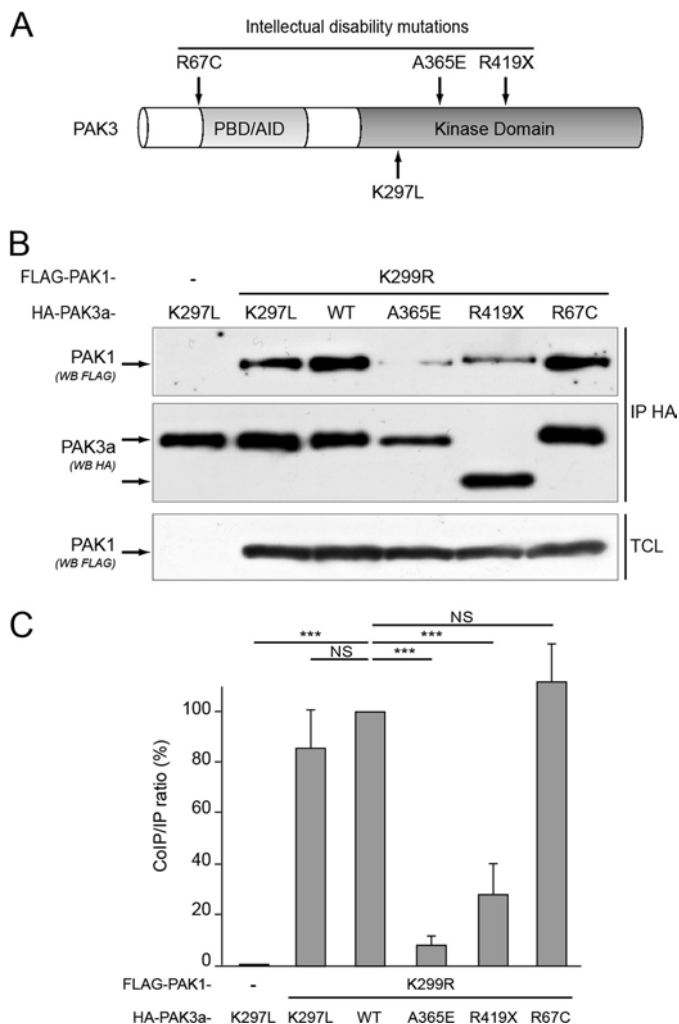


FIGURE 3. Two intellectual disability mutations of PAK3 affect their dimerization properties. *A*, location of three mutations responsible for intellectual disability. *B*, the A365E and R419X mutations affect the capacity to form heterodimers. HeLa cells were co-transfected with FLAG-PAK1-KD and HA-tagged PAK3a-KD, -WT, -A365E, -R419X, or -R67C. Co-immunoprecipitated proteins were revealed using FLAG antibodies (*first panel*) and HA-immunoprecipitated proteins (*IP HA*) were controlled by anti-HA labeling (*second panel*). Expression of FLAG PAK1 protein was controlled on TCL by an anti-FLAG Western blotting (*third panel*). Image shown is representative of three independent experiments. *C*, amount of FLAG-PAK1 proteins co-immunoprecipitated compared with the amount of HA-precipitated PAK proteins, in the experiment illustrated in *B*. Results are expressed relative to the PAK1/PAK3-WT interaction. Comparison with Student's *t* test: NS, $p > 0.05$; ***, $p < 0.001$, $n = 3$.

the presence of either HA-tagged PAK3 plasmids PAK3a-WT, -KD, -A365E, -R419X, and -R67C. Cell lysates were HA-immunoprecipitated and the co-immunoprecipitated PAK1 proteins were revealed using FLAG antibodies (Fig. 3*B*). Concerning ID mutations, the R67C mutation did not affect the PAK1/PAK3 interaction. In contrast, the A365E and R419X PAK3 mutations dramatically decreased PAK1/PAK3 complex formation. Thus, PAK3 ID mutations of the Ala-365 residue and C-terminal deletion from Arg-419 residue are directly responsible for the loss of dimerization with PAK1.

PAK3 Splice Variants Still Form Heterodimers with PAK1—The b and c inserts are located between amino acids 92 and 93 at the N-terminal part of the inhibitory switch domain (Fig. 4*A*), which is proximal to the dimerization segment and the Leu-102

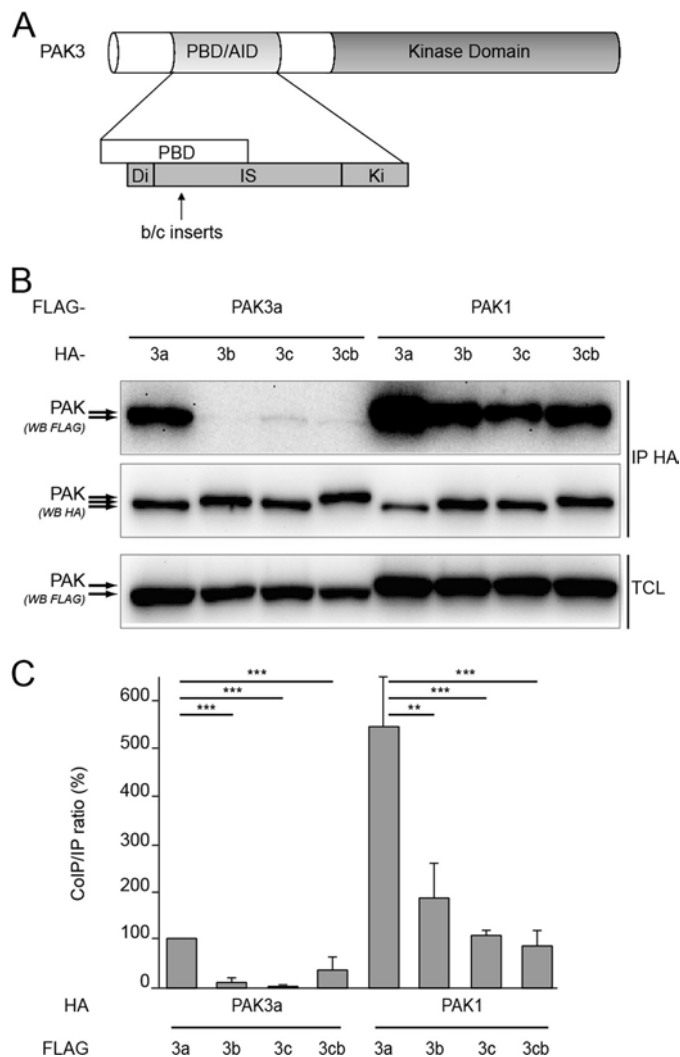


FIGURE 4. PAK3 splice variants form heterodimers with PAK1. *A*, schematic representation of the PAK3 protein indicating the location of the b and c inserts. *B*, presence of inserts decreases dimer formation. All the PAK1 and PAK3 expressed proteins carry the kinase dead mutation (KD). FLAG-tagged PAK3a-KD or PAK1-KD plasmids were transfected in HeLa cells in the presence of HA-tagged PAK3-KD-encoding variants. Cell lysates were HA-precipitated (*IP HA*). The co-immunoprecipitated PAK proteins were revealed by anti-FLAG Western blotting (*first panel*). HA-precipitated proteins and TCL were controlled using the corresponding antibodies as indicated (*second and third panels*, respectively). Images shown are representative of three independent experiments. *C*, quantification of the amount of FLAG-PAK3a-KD or FLAG-PAK1-KD proteins co-immunoprecipitated in the experiment illustrated in *B*, relative to the amount of HA-immunoprecipitated PAK3 proteins. Comparison with Student's *t* test: **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$, $n = 3$.

residue involved in dimer stability (6, 7, 17). We thus wondered whether PAK3 splice variants could also form dimers and tested this using a co-immunoprecipitation assay (Fig. 4*B*). Cells were transfected with plasmids expressing FLAG-tagged PAK3a-KD or PAK1-KD in the presence of HA-tagged PAK3 splice variants in their kinase-dead forms. Interestingly, we observed that the presence of the b and c inserts dramatically decreased their co-immunoprecipitation with PAK3a compared with that of PAK3a with itself (Fig. 4, *B* and *C*). We further observed that the three splice variants were able to co-immunoprecipitate with PAK1 about 5-fold less than PAK3a does with PAK1. However, the level of splice variant dimerization with PAK1 is equivalent to that of PAK3a dimerization

with itself (Fig. 4, *B* and *C*). Two-hybrid analysis confirmed that the presence of the insert in the N-terminal part of PAK3 protein fused to GAD bait decreases the interaction with the C-terminal moieties of PAK1 and PAK3 fused to Lex, suggesting that the inserts strongly modify structures involved in dimer formation (supplemental Fig. S4). In transfected mammalian cells, PAK3 splice variants (PAK3sv) were relatively impaired in their capacity to form dimers with PAK3a, but they retained their capacity to form heterodimers with PAK1. Interestingly, in both cases, relative to PAK3a-PAK3a, the decrease of dimer formation was more pronounced for PAK3sv-PAK3a (more than 10-fold) than for PAK3sv-PAK1 (3–5-fold), suggesting that *in vivo*, PAK3 splice variants heterodimerize with PAK1.

PAK3 and PAK1 Form Complexes in Brain—One required condition for heterodimer formation is the expression of transcripts coding for the two partners in the same cell. To test this, we investigated whether *pak1* mRNA and the different *pak3* transcripts are co-expressed in a neuron by single cell RT-PCR. Pyramidal neurons of the visual cortex layer V of juvenile rat were patched and the cytoplasm was aspirated to be processed for RT-PCR with specific primers that amplified *pak1* transcripts, all the *pak3* transcripts (indicated as PAK3s) or each *pak3* splice variant, *i.e.* a, b, c, cb variants as previously described (17, 26) (Fig. 5A). *Actin* was used as control, to attest the ability of the cDNA amplification from each sample. Among the actin-positive neurons ($n = 37$), 26 were positive for *pak1* and 11 for *pak3*. Importantly, all of the *pak3* positive cells were also positive for *pak1* transcripts. Among *pak3* positive neurons, 5 expressed *pak3a*, 4 expressed *pak3b* and 2 expressed *pak3a* and *pak3cb*. As an illustration, we show here (Fig. 5B) three neurons, positive for at least one *pak3* transcript, indicating that a single neuron could express different *pak3* transcripts. These results show that in a single neuron, both *pak1* and *pak3* genes are expressed and also that several *pak3* splice variants can be co-expressed.

To go further, we analyzed PAK1 and PAK3 localization by immunofluorescence and biochemical fractionation. PAKs immunofluorescence was performed on hippocampal neurons after 21 days of *in vitro* differentiation using specific antibodies as described in supplemental Fig. S1. PAK3 labeling shows an enrichment of PAK3 proteins in dendritic spines which are enriched in actin, as observed by Phalloïdin labeling (Fig. 5C, *second* and *third panels*), a result previously described (29–33). PAK1 labeling displays a more widespread distribution in the dendritic shaft, but is also detectable in certain dendritic spines. However, we observed clear colocalization of PAK1 and PAK3 in some spines (Fig. 5C, *fourth panel, white arrows*), indicating that in some functional domains of neurons, PAK1 and PAK3 proteins colocalize.

We then asked whether PAK1 and PAK3 proteins were enriched in the same subcellular domain in particular in the post-synaptic densities where PAK1 and PAK3 were described to localize (32). Synaptosomes were isolated from mice brain lysates on Ficoll-sucrose gradient and the postsynaptic densities (PSD) fractions were purified by Triton-X100 treatment (supplemental Fig. S3) as described (27). The different fractions obtained were analyzed by Western blot using the PAK antibodies characterized in supplemental Fig. S1, and as controls,

the pre-synaptic marker synaptophysin and the post-synaptic marker PSD-95 (Fig. 5B, *two lower panels*). Results showed that synaptophysin was highly enriched in the synaptosomal fraction and completely absent from the PSD fraction. By contrast and as expected, PSD-95 is almost completely recovered in the PSD fraction. We observed that PAK1 was enriched in the synaptosomal fraction and was also present in the PSD fraction whereas PAK3 is present at a low level in the synaptosomal fraction and is highly enriched in the PSD fraction. These data are in agreement with the immunolabeling results indicating a more restricted localization of PAK3 in dendritic spines. The different PAK3 splice variants segregate differentially in post-synaptic fractions, the PAK3b splice variant being particularly enriched in PSD whereas the splice variants containing exon c-encoded insert are enriched in synaptosomes. Thus PAK1 and the different PAK3 proteins partially co-purified in the PSD fraction from adult mouse brain.

We next investigated whether dimers exist in the mouse brain between the two endogenous proteins by co-immunoprecipitation using specific immunoprecipitating antibodies (supplemental Fig. S1) and *pak3* knock-out mouse brains as control. PAK1 protein was equally detected in both models (Fig. 5E, *third panel*, and 5F, *fourth panel*) and equal amount of immunoprecipitated PAK1 proteins were detected in brain lysates from wild-type mice and *pak3* KO mice (Fig. 5F, *second panel*). On the other hand, PAK3 protein was only detectable in WT animals (Fig. 5E, *fourth panel*, and 5F, *third panel*), as expected (30). We detected PAK1 protein in the PAK3 immunoprecipitate from wild-type mice and not from *pak3* KO mice (Fig. 5E, *first panel*). In the reverse experiment, we detected PAK3 protein in the PAK1 immunoprecipitated from wild-type mice, while no signal was detected from *pak3* knock-out mice (Fig. 5F, *first panel*). Thus, using *pak3* knock-down mice as a negative control and specific immunoprecipitating antibodies, we demonstrated by co-immunoprecipitation assays that endogenous PAK1 and PAK3 proteins form heterodimers in mouse brain. To resume, PAK3 and PAK1 are co-expressed in single neurons, and to some extent, colocalize in dendritic spines, co-purify in post-synaptic densities and co-immunoprecipitate in mouse brain demonstrating that endogenous PAK1 and PAK3 proteins form heterodimers in neurons.

PAK3a Is Regulated by Heterodimerization—Since PAK3 can dimerize, and PAK1 is regulated by its homodimerization, we wondered whether PAK3 heterodimerization regulates its own kinase activity. We developed a multi-step assay in which we first immunoprecipitated a PAK1/PAK3 complex. The co-immunoprecipitated material was divided into two equal aliquots, the first one being directly tested for its kinase activity while the second being incubated with active recombinant Cdc42 GTPase, before testing for its kinase activity. In both cases only the activity of the co-immunoprecipitated protein was measured since the precipitated protein was a kinase-dead mutant. We verified for the presence of immunoprecipitated and co-immunoprecipitated proteins by Western blot (Fig. 6, *A* and *B*) and the dissociation of the dimers following activation by Cdc42 (data not shown), as previously described (7). Kinase activity was analyzed by measuring the incorporation of γ - 32 P in myelin basic protein (MBP) as a substrate. The comparison

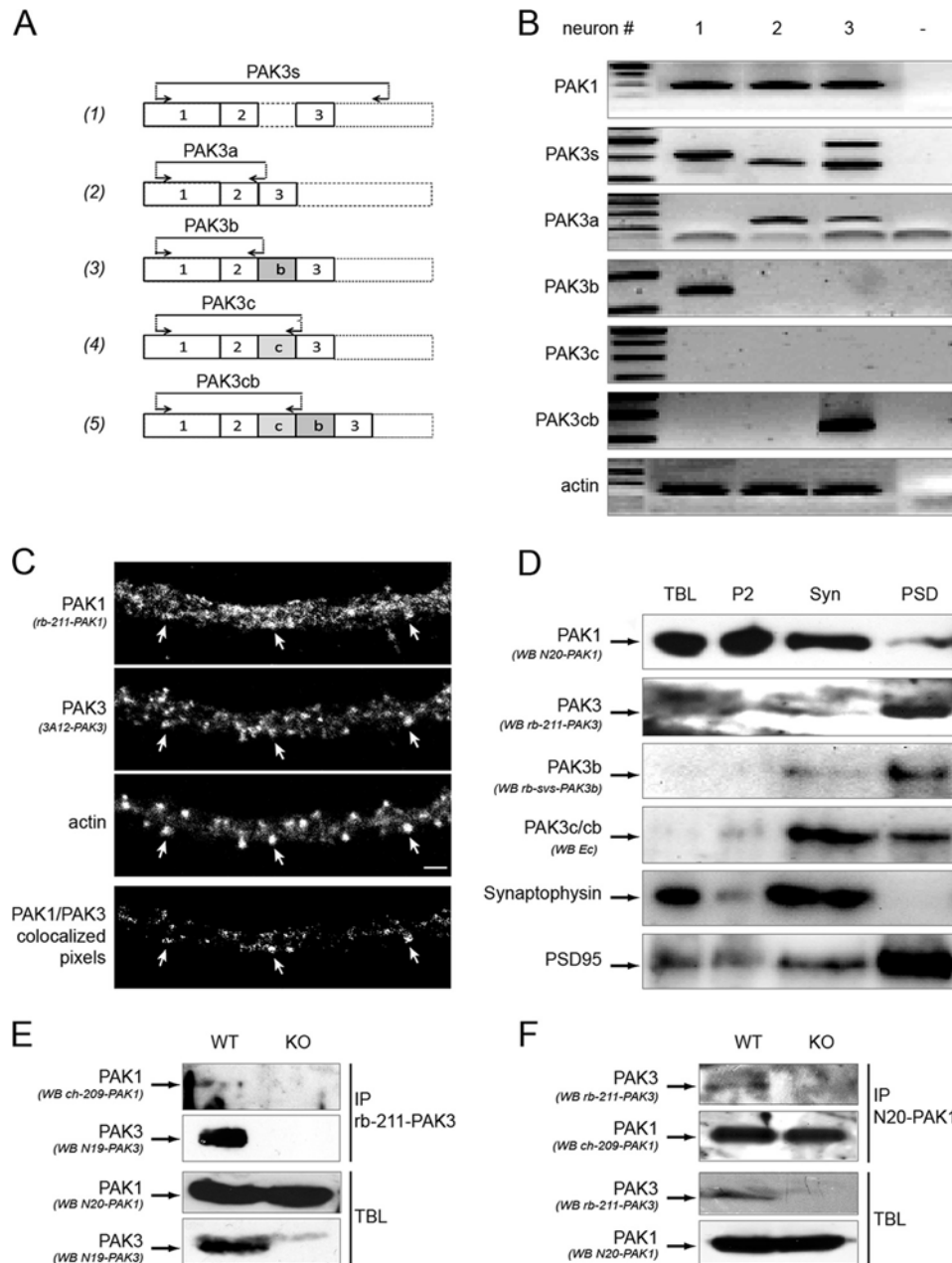


FIGURE 5. PAK3 and PAK1 are coexpressed in single neurons, colocalize in dendritic spines, co-purified with the postsynaptic density, and co-immunoprecipitate in brain extracts. *A*, schematic representation of the location of the different PAK3 oligonucleotides used for single-cell RT-PCR. Forward and reverse oligonucleotides are indicated by arrows. Primers were chosen near or within the exons 2–3 portion to detect all the PAK3 cDNAs (1), and at exon/exon junction to specifically detect PAK3a (2), PAK3b (3), PAK3c (4), and PAK3cb (5) cDNAs. *B*, PAK3 and PAK1 are co-expressed in single neuron. RNAs from single pyramidal neurons were extracted and RT-PCR was performed using the different primer sets. Actin amplification was used as control (*panel 7*). Specific primer sets were used for PAK1 (*first panel*), all PAK3s (*second panel*), PAK3a, b, c, cb (*third to sixth panel*). *C*, PAK3 and PAK1 partially colocalize in dendritic spines of differentiated hippocampal neurons. Endogenous PAK proteins were immunolabeled with rb-211-PAK1 antibodies (*first panel*) and monoclonal 3A12 PAK3 antibodies (*second panel*). Dendritic spines were visualized by Alexa-633-phalloidin labeling (*third panel*) on dissociated hippocampal neurons at DIV21. On the PAK1/PAK3 colocalization image (*fourth panel*), white arrows indicate some spines where PAK1 and PAK3 proteins are co-expressed. Scale bar, 2 μ m. *D*, PAK3 and PAK1 partially co-purify with some synaptosomal fractions as shown by Western blots of the different fractions purified from brain lysates. TBL from adult mice brain were fractionated to obtain the second pellet (P2) fraction, the synaptosomal fraction (Syn) and the postsynaptic densities (PSD) fraction. The same amount of protein was loaded for each fraction. The different fractions were probed with either the N20-PAK1 antibodies specific for PAK1 (*first panel*), the rb-211-PAK3 antibodies that recognized the PAK3s proteins (*second panel*), the rb-svs-PAK3b antibodies specific for PAK3b variant (*third panel*), the Ec antibodies that recognized the PAK3c and PAK3cb variants (*fourth panel*). Western blots with the synaptophysin antibodies as a presynaptic marker (*fifth panel*), and the PSD-95 antibodies as a postsynaptic density marker (*sixth panel*) confirm quality of tissue fractionation. Images shown are representative of three experiments. *E*, PAK1 co-immunoprecipitates with PAK3. TBL were prepared from adult wild-type mice (WT) and as a negative control, from *pak3*^{-/-} mice (KO). In TBL, PAK1, and PAK3 proteins were detected by immunoblotting using the N20-PAK1 antibodies (*third panel*) and the N19-PAK3 (*fourth panel*), respectively. PAK3 proteins were immunoprecipitated with the N19-PAK3 sera (*second panel*) and co-immunoprecipitated PAK1 proteins were detected with ch-209-PAK1 (*first panel*). *F*, PAK3 co-immunoprecipitates with PAK1. TBL were processed as for *E*, to analyze PAK3 (*third panel*) and PAK1 (*fourth panel*) expression. PAK1 proteins were immunoprecipitated using the N20-PAK1 antibodies (*second panel*) and co-immunoprecipitated PAK3 proteins were then detected with the rb-211-PAK3 sera (*first panel*). Images shown are representative of two experiments.

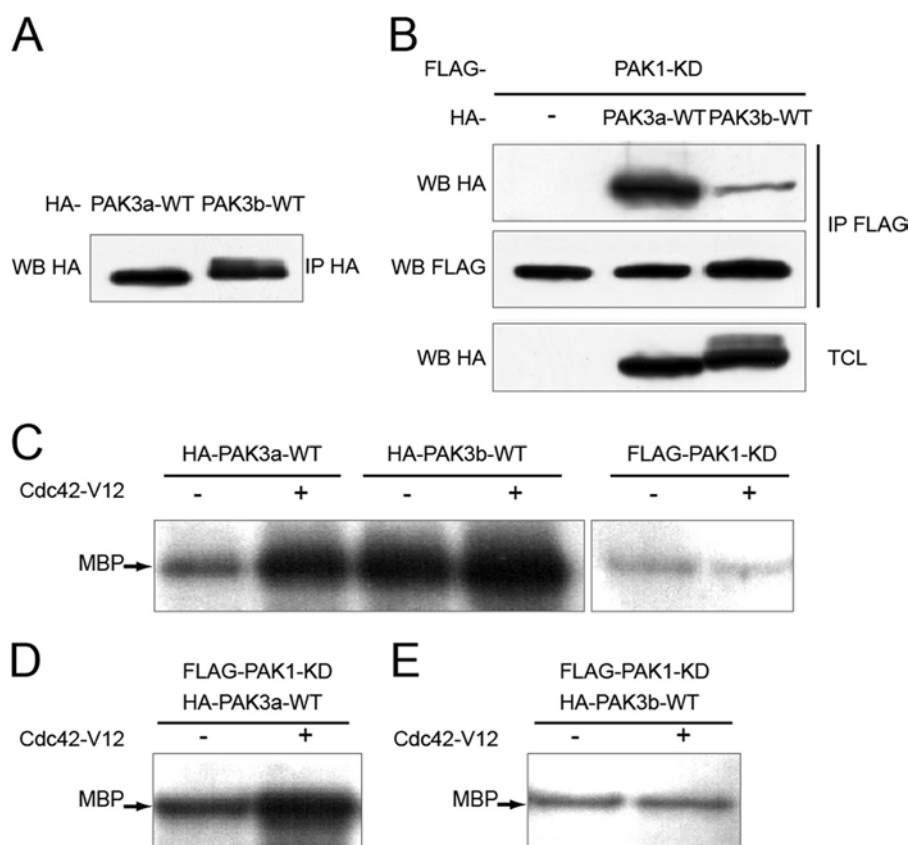


FIGURE 6. PAK1 regulates PAK3 activity through heterodimerization. *A*, control of PAK expression. HA-tagged PAK3a-WT and PAK3b-WT plasmids were transfected in HeLa cells, and cell lysates were HA-immunoprecipitated (*IP HA*), then the amount of PAK3 proteins was determined using HA antibodies. *B*, control of co-immunoprecipitation of PAK3s proteins with PAK1. FLAG-PAK1-KD plasmid was transfected in HeLa cells alone or in the presence of HA-PAK3a-WT or HA-PAK3b-WT. Cell lysates were FLAG-immunoprecipitated (*IP FLAG*) then the amount of PAK1 proteins was determined using FLAG antibodies (*second panel*). The co-immunoprecipitated PAK3a-WT and PAK3b-WT proteins were revealed by HA blotting (WB HA, *first panel*). TCLs were controlled using the HA antibody (*third panel*). *C*, PAK3a displays an inducible kinase activity whereas PAK3b possesses a constitutive activity. Catalytic activity of HA-PAK3a-WT; HA-PAK3b-WT and FLAG-PAK1-KD previously obtained by immunoprecipitation was tested in the presence or in the absence of recombinant Cdc42-V12. *D* and *E*, catalytic activity of complexed or dissociated PAK3 proteins. HA-PAK3a-WT (*D*) or HA-PAK3b-WT (*E*) obtained by co-immunoprecipitation (*B*, *first panel*) was analyzed after incubation with or without recombinant Cdc42-V12 protein. Images shown are representative of three experiments

between the kinase activities of the two fractions with or without the GTPase reflects the level of inhibition of the co-immunoprecipitated partner in the non-dissociated complex. To do this, HeLa cells were co-transfected with FLAG-PAK1 kinase-dead and HA-PAK3a or -PAK3b wild type plasmids. Immunoprecipitation and Western blot analysis were performed with appropriate tag antibodies as indicated in Fig. 6*B*. A control was performed to confirm that PAK3a-WT has a catalytic activity, only in presence of Cdc42-V12, whereas PAK3b is constitutively activated as previously published (17, 19) (Fig. 6*C*, *first panel*). Kinase assay with the inactive kinase-dead PAK1 protein indicated the background of the test likely due to other kinases co-immunoprecipitated with the PAK complex (Fig. 6*C*, *second panel*). When PAK3a is associated with PAK1, its activity is inhibited and this inhibition is relieved after activation by Cdc42 (Fig. 6*D*). On the contrary, we did not observed a Cdc42-dependent increase of MBP phosphorylation upon dissociation of PAK1-KD/PAK3b dimer suggesting that PAK3b is not inhibited in dimers (Fig. 6*E*). These results strongly suggest that heterodimerization with PAK1 regulates PAK3a activity but not activities of splice variants.

DISCUSSION

Molecular Mechanisms of Regulation of PAK3—Kinase dimerization is a key regulatory mechanism in the kinome. A large range of scenarios exist in life and the importance of kinase dimerization was recently highlighted in relation to pathophysiology (34). Dimerization is a canonical step in receptor tyrosine kinase activation (35) but plays more diverse roles in serine/threonine kinases, being responsible for inactivation, activation, subcellular compartment retention or localization and substrate specification (36–38). PAK dimerization was first described ten years ago (6) and since then the PAK1 regulation mechanisms have been extensively studied (6, 7, 11, 12). Data demonstrated that, under cellular resting conditions, PAK1 exists in an autoinhibited inactive dimeric conformation (6, 7). The activation process of PAK1 requires a succession of steps: membrane recruitment, modification of domain folding, and phosphorylation of key residues that modify the conformation of the catalytic cleft and other regulatory sites leading to changes in the intermolecular assembly (1, 13, 39). The PAK1 trans-inhibition regulatory mechanism is thought to be valid also for the other kinases of group I since they share high

PAK Heterodimers in Brain

sequence identities and functional similarities. We demonstrated here for the first time, that PAK3 is able to form homodimers, *in vitro*, as PAK1 does. However, another interesting question concerns the potentiality for PAK kinases to form heterodimers. It was previously mentioned (7) that PAK1 can form heterodimers with PAK2. Here we present the first evidence that PAK3 can also form heterodimers with PAK1, through interactions mainly between the N-ter domain and the C-ter domain. The L102F mutation or the R436E-K437D mutation introduced in the IS domain and the catalytic domain respectively, strongly or totally abrogate homomeric interaction of PAK3a and also the heteromeric interaction between PAK3a and PAK1. This suggests that PAK3a may form homodimers as PAK1 does, and also that heterodimeric complexes have similar structures compared with the homodimeric ones described for PAK1. Moreover, we demonstrated that PAK1 regulates PAK3a kinase activity within heterodimers, showing that PAK heterodimerization also allows trans-inhibition.

In vivo, we demonstrated that PAK1 and PAK3a are co-expressed in the same cells, they colocalize in the same subcellular area, and they also biochemically partially co-purify in the same structure, three properties necessary for their interaction. Interestingly, we observed a higher level of PAK3a/PAK1 heterodimers than PAK3a/PAK3a homodimers *in vitro* whereas PAK1 interacts with itself or with PAK3a with the same efficiency. Moreover, the relative amount of endogenous proteins in neurons is much more in favor of PAK3a/PAK1 heterodimer formation than PAK3a homodimer formation. Actually, all these results strongly reinforce the idea that PAK3 forms complexes with PAK1 *in vivo*, a hypothesis that we demonstrated by detecting PAK1/PAK3 complexes in brain immunoprecipitates.

Moreover, we report here that PAK3 splice variants can form heterodimers with PAK1. Insertions of 15, 21, and 36 amino acids encoded by the two alternatively spliced exons b and c, and present in the splice variants b, c, and cb, respectively, are localized in the β -sheet of the IS domain, and so are predicted to strongly modify the structure of the regulatory region. We previously demonstrated that the AID of PAK3b does not inhibit a PAK3a wild-type kinase domain (19). PAK3 splice variants show a relatively decreased capacity to form complexes with PAK3a and heterodimers with PAK1, but heterodimers are more efficiently formed than dimers with PAK3 suggesting that splice variants exist mainly as complexes with PAK1. In addition, we demonstrated that whereas PAK1 could regulate PAK3a kinase activity by dimerization, dimerization with PAK3 splice variants does not inhibit their kinase activity. This observation suggests that dimer formation is not sufficient to permit a trans-inhibition of one monomer by another one. It is also possible that the residual activity of PAK3b in dimers is sufficient to phosphorylate crucial residues such as Thr-421 or Ser-139 (144 for PAK1) which play important role in kinase regulation (12). Moreover this suggests that the kinase activity of splice variants is regulated by other unknown mechanisms, such as post-transcriptional modulation of splicing or protein degradation. Finally, recent data demonstrated an asymmetry in the PAK dimer complex, suggesting that the two monomers

have distinct roles in the molecular mechanisms of kinase inhibition (11). Since we report that PAK dimers contain one PAK1 and one PAK3 monomers, this questions whether the two isoforms have distinct roles in the asymmetric complex, or there is a random repartition of the two distinct roles.

Biological Consequence of Dimerization—Our data suggest that PAK3 and PAK1 signaling are linked together, at least until the moment of their activation. Interestingly, PAK1 protein is also involved in synaptic plasticity via regulation of cofilin phosphorylation and actin cytoskeleton modeling (40) whereas PAK3 probably acts through other pathways involving CREB and Nck2 (5, 30). A recent study that characterized the *pak1/pak3* double KO mice pointed out new neuronal defects due to an impaired post-natal brain growth (41). Altogether, these data suggest that in addition to unique functions and to shared functions, some PAK functions may depend on a crosstalk between PAK1 and PAK3 during the activation process. As a consequence, PAK1-dependent PAK3 regulation could coordinate their specific signaling pathway and help to synchronize actin polymerization and spine stabilization.

In addition, a consequence of the link between PAK1 and PAK3 signaling concerns the relationship between intelligence disability PAK3 linked ID mutations and the alteration of PAK1 signaling. The five ID mutations which have been shown to modify different properties of PAK3 such as the kinase activity, the binding to the Rac-Cdc42 GTPases (24), or the binding to Nck2/Grb4 (5), and which are associated with moderate to severe cognitive defects (reviewed in (20)), differently affect dimer formation. We observed that the R67C mutated protein does not alter dimerization with PAK1 in contrast with the two kinase-dead ID mutated proteins. Since the PAK3-R67C protein displays a defect in GTPase binding and a consequential defect in the activation of the kinase (24), the PAK3-R67C protein in complex with PAK1 will probably maintain PAK1 inactive. Thus, the more severe phenotype associated with the R67C mutation could be due to a defect of PAK1 activation, in addition to partial PAK3 impairment, supporting the idea that some mutated PAK3 proteins may act as dominant-negative proteins with respect to PAK1. In contrast, PAK3-A365E and PAK3-R419X mutations that alter the PAK3 ability to dimerize with PAK1 could favor PAK1 to form homodimers and thus these mutations would not impact PAK1 regulation. So, some phenotypic characteristics associated with *pak3* mutations may be due to anomalies in PAK1 regulation in addition to the PAK3 signaling defect.

To conclude, it appears that PAK regulation is a complex process that involves homodimer and heterodimer formation dependent upon intra and inter molecular interactions, in a face-to-face conformation, allowing a dynamic succession of trans- and cis- phosphorylation events associated with spatial rearrangements of several domains of the protein, also dependent on activators such as active GTPases, or to a lesser extent on the guanine exchange factor of the PIX/Cool family, on membrane interaction, and on lipid association. We report here a novel level of complexity in one of these parameters, demonstrating that a combinatory of dimer assembly exists, that a hierarchy in complex formation exists, and that these heteromeric interactions may have a functional role. We show that

PAK isoforms do not have the same propensity to form homodimers *versus* heterodimers. Thus, in addition to the concept that heterodimers support a signaling network of related kinases (6), we propose that heterodimers may link together PAK1 and PAK3 signaling pathways in physiological as well as in pathophysiological conditions.

Acknowledgments—We thank Zhengping Jia for providing us with the pak3 KO strain, Maria-Carla Parrini for the PAK1 WT plasmid, Herma Renkema for the PAK2 plasmid, and Nicolas Morel for the synaptophysin antibody. We also thank Seana O'Regan for helpful comments on the manuscript. We are grateful to Nathalie Samson and Pascale Veyrac (CNRS, France) for animal care, Sandrine Poëa-Guyon for help in confocal imaging, and Bernadette Wiszniowski for technical assistance.

REFERENCES

- Bokoch, G. M. (2003) Biology of the p21-activated kinases. *Annu. Rev. Biochem.* **72**, 743–781
- Burbelo, P. D., Drechsel, D., and Hall, A. (1995) A conserved binding motif defines numerous candidate target proteins for both Cdc42 and Rac GTPases. *J. Biol. Chem.* **270**, 29071–29074
- Bagrodia, S., Taylor, S. J., Jordon, K. A., Van Aelst, L., and Cerione, R. A. (1998) A novel regulator of p21-activated kinases. *J. Biol. Chem.* **273**, 23633–23636
- Manser, E., Huang, H. Y., Loo, T. H., Chen, X. Q., Dong, J. M., Leung, T., and Lim, L. (1997) Expression of constitutively active α -PAK reveals effects of the kinase on actin and focal complexes. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 1129–1143
- Thévenot, E., Moreau, A. W., Rousseau, V., Combeau, G., Domenichini, F., Jacquet, C., Goupille, O., Amar, M., Kreis, P., Fossier, P., and Barnier, J. V. (2011) p21-Activated kinase 3 (PAK3) protein regulates synaptic transmission through its interaction with the Nck2/Grb4 protein adaptor. *J. Biol. Chem.* **286**, 40044–40059
- Lei, M., Lu, W., Meng, W., Parrini, M. C., Eck, M. J., Mayer, B. J., and Harrison, S. C. (2000) Structure of PAK1 in an autoinhibited conformation reveals a multistage activation switch. *Cell* **102**, 387–397
- Parrini, M. C., Lei, M., Harrison, S. C., and Mayer, B. J. (2002) Pak1 kinase homodimers are autoinhibited in trans and dissociated upon activation by Cdc42 and Rac1. *Mol. Cell* **9**, 73–83
- Zenke, F. T., King, C. C., Bohl, B. P., and Bokoch, G. M. (1999) Identification of a central phosphorylation site in p21-activated kinase regulating autoinhibition and kinase activity. *J. Biol. Chem.* **274**, 32565–32573
- Buchwald, G., Hostinova, E., Rudolph, M. G., Kraemer, A., Sickmann, A., Meyer, H. E., Scheffzek, K., and Wittinghofer, A. (2001) Conformational switch and role of phosphorylation in pak activation. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 5179–5189
- Pirruccello, M., Sondermann, H., Pelton, J. G., Pellicena, P., Hoelz, A., Chernoff, J., Wemmer, D. E., and Kuriyan, J. (2006) A dimeric kinase assembly underlying autophosphorylation in the p21 activated kinases. *J. Mol. Biol.* **361**, 312–326
- Wang, J., Wu, J. W., and Wang, Z. X. (2011) Structural insights into the autoactivation mechanism of p21-activated protein kinase. *Structure* **19**, 1752–1761
- Chong, C., Tan, L., Lim, L., and Manser, E. (2001) The mechanism of PAK activation. Autophosphorylation events in both regulatory and kinase domains control activity. *J. Biol. Chem.* **276**, 17347–17353
- Parrini, M. C., Camonis, J., Matsuda, M., and de Gunzburg, J. (2009) Dissecting activation of the PAK1 kinase at protrusions in living cells. *J. Biol. Chem.* **284**, 24133–24143
- 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) PAK3 mutation in nonsyndromic X-linked mental retardation. *Nat. Genet.* **20**, 25–30
- Bienvenu, T., des Portes, V., McDonnell, N., Carrié, A., Zemni, R., Couvert, P., Ropers, H. H., Moraine, C., van Bokhoven, H., Fryns, J. P., Allen, K., Walsh, C. A., Boué, J., Kahn, A., Chelly, J., and Beldjord, C. (2000) Missense mutation in PAK3, R67C, causes X-linked nonspecific mental retardation. *Am. J. Med. Genet.* **93**, 294–298
- Gedeon, A. K., Nelson, J., Gecz, J., and Mulley, J. C. (2003) X-linked mild non-syndromic mental retardation with neuropsychiatric problems and the missense mutation A365E in PAK3. *Am. J. Med. Genet.* **120**, 509–517
- Kreis, P., Rousseau, V., Thévenot, E., Combeau, G., and Barnier, J. V. (2008) The four mammalian splice variants encoded by the p21-activated kinase 3 gene have different biological properties. *J. Neurochem.* **106**, 1184–1197
- Arias-Romero, L. E., and Chernoff, J. (2008) A tale of two Paks. *Biol. Cell* **100**, 97–108
- Rousseau, V., Goupille, O., Morin, N., and Barnier, J. V. (2003) A new constitutively active brain PAK3 isoform displays modified specificities toward Rac and Cdc42 GTPases. *J. Biol. Chem.* **278**, 3912–3920
- Kreis, P., and Barnier, J. V. (2009) PAK signaling in neuronal physiology. *Cell. Signal.* **21**, 384–393
- Molli, P. R., Li, D. Q., Murray, B. W., Rayala, S. K., and Kumar, R. (2009) PAK signaling in oncogenesis. *Oncogene* **28**, 2545–2555
- Dummler, B., Ohshiro, K., Kumar, R., and Field, J. (2009) Pak protein kinases and their role in cancer. *Cancer Metastasis Rev.* **28**, 51–63
- Morel, N., Dedieu, J. C., and Philippe, J. M. (2003) Specific sorting of the α 1 isoform of the V-H+ATPase a subunit to nerve terminals where it associates with both synaptic vesicles and the presynaptic plasma membrane. *J. Cell Sci.* **116**, 4751–4762
- Kreis, P., Thévenot, E., Rousseau, V., Boda, B., Muller, D., and Barnier, J. V. (2007) The p21-activated kinase 3 implicated in mental retardation regulates spine morphogenesis through a Cdc42-dependent pathway. *J. Biol. Chem.* **282**, 21497–21506
- Crouin, C., Arnaud, M., Gesbert, F., Camonis, J., and Bertoglio, J. (2001) A yeast two-hybrid study of human p97/Gab2 interactions with its SH2 domain-containing binding partners. *FEBS Lett.* **495**, 148–153
- Poëa-Guyon, S., Amar, M., Fossier, P., and Morel, N. (2006) Alternative splicing controls neuronal expression of v-ATPase subunit α 1 and sorting to nerve terminals. *J. Biol. Chem.* **281**, 17164–17172
- Sans, N., Racca, C., Petralia, R. S., Wang, Y. X., McCallum, J., and Wenthold, R. J. (2001) Synapse-associated protein 97 selectively associates with a subset of AMPA receptors early in their biosynthetic pathway. *J. Neurosci.* **21**, 7506–7516
- Standley, S., Roche, K. W., McCallum, J., Sans, N., and Wenthold, R. J. (2000) PDZ domain suppression of an ER retention signal in NMDA receptor NR1 splice variants. *Neuron* **28**, 887–898
- Boda, B., Alberi, S., Nikonenko, I., Node-Langlois, R., Jourdain, P., Moosmayer, M., Parisi-Jourdain, L., and Muller, D. (2004) The mental retardation protein PAK3 contributes to synapse formation and plasticity in hippocampus. *J. Neurosci.* **24**, 10816–10825
- Meng, J., Meng, Y., Hanna, A., Janus, C., and Jia, Z. (2005) Abnormal long-lasting synaptic plasticity and cognition in mice lacking the mental retardation gene Pak3. *J. Neurosci.* **25**, 6641–6650
- Rex, C. S., Lin, C. Y., Kramár, E. A., Chen, L. Y., Gall, C. M., and Lynch, G. (2007) Brain-derived neurotrophic factor promotes long-term potentiation-related cytoskeletal changes in adult hippocampus. *J. Neurosci.* **27**, 3017–3029
- 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) Altered cortical synaptic morphology and impaired memory consolidation in forebrain-specific dominant-negative PAK transgenic mice. *Neuron* **42**, 773–787
- Dubos, A., Combeau, G., Bernardinelli, Y., Barnier, J. V., Hartley, O., Gaertner, H., Boda, B., and Muller, D. (2012) Alteration of synaptic network dynamics by the intellectual disability protein PAK3. *J. Neurosci.* **32**, 519–527
- Wan, P. T., Garnett, M. J., Roe, S. M., Lee, S., Niculescu-Duvaz, D., Good, V. M., Jones, C. M., Marshall, C. J., Springer, C. J., Barford, D., and Marais, R. (2004) Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell* **116**, 855–867
- Lemmon, M. A., and Schlessinger, J. (2010) Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* **141**, 1117–1134
- Yatime, L., Hein, K. L., Nilsson, J., and Nissen, P. (2011) Structure of the

PAK Heterodimers in Brain

- RACK1 dimer from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Mol. Biol.* 411:486–498
37. Wimmer, R., and Baccharini, M. (2010) Partner exchange: protein-protein interactions in the Raf pathway. *Trends Biochem. Sci.* 35, 660–668
38. Hatzivassiliou, G., Song, K., Yen, L., Brandhuber, B. J., Anderson, D. J., Alvarado, R., Ludlam, M. J., Stokoe, D., Gloor, S. L., Vigers, G., Morales, T., Aliagas, I., Liu, B., Sideris, S., Hoeflich, K. P., Jaiswal, B. S., Seshagiri, S., Koeppen, H., Belvin, M., Friedman, L. S., and Malek, S. (2010) RAF inhibitors prime wild-type RAF to activate the MAPK pathway and enhance growth. *Nature* 464, 431–435
39. Eswaran, J., Soundararajan, M., Kumar, R., and Knapp, S. (2008) UnPAK-ing the class differences among p21-activated kinases. *Trends Biochem. Sci.* 33, 394–403
40. Asrar, S., Meng, Y., Zhou, Z., Todorovski, Z., Huang, W. W., and Jia, Z. (2009) Regulation of hippocampal long-term potentiation by p21-activated protein kinase 1 (PAK1). *Neuropharmacology* 56, 73–80
41. Huang, W., Zhou, Z., Asrar, S., Henkelman, M., Xie, W., and Jia, Z. (2011) p21-Activated kinases 1 and 3 control brain size through coordinating neuronal complexity and synaptic properties. *Mol. Cell. Biol.* 31, 388–403

**Adult neurogenesis and intellectual disabilities:
Analysis of the role of the p21-activated kinase 3 (PAK3) in two murine models
representative of the pathology**

Summary

The group I p21-activated kinases (PAK) are involved in many cellular processes such as proliferation, cell movement, adhesion and apoptosis. These kinases are effectors of Rho GTPases Rac1 and Cdc42, and participate in the regulation of the actin cytoskeleton. Both neuronal kinase PAK1 and PAK3, which exhibit high sequence identities, regulate the actin cytoskeleton, thereby controlling the dynamics of dendritic spines and synaptic plasticity. Mutations of the X-linked *pak3* are responsible for intellectual disability (ID) in humans, and the molecular and cellular mechanisms associated with cognitive defects are poorly described. It was shown that PAK3 participates in the proneural pathway during early *Xenopus* embryogenic development, by promoting cell cycle exit and neuronal differentiation of neural precursors. However, the role of PAK3 in the adult neurogenesis has not been studied in mammals. It is now generally accepted that neurogenesis persists during human adulthood and is involved in learning and memory. We are therefore interested in the involvement of PAK3 in the regulation of adult neurogenesis, on the assumption that defects in neurogenesis may be responsible, at least in part, for cognitive defects in ID patients.

We showed that PAK3 is not expressed in proliferative neural stem/progenitor cells but its expression increased significantly upon growth factor removal, suggesting a role in adult neurogenesis. We showed that the invalidation of *pak3* gene causes an increase in the frequency and in size of primary neurospheres. However *Pak3* invalidation does not affect the size of the stem cell reservoir nor the NCS cardinal properties (pluripotency, self-renewal and proliferation). However, the *pak3*- progenitor cells continue their proliferation in culture conditions normally inducing differentiation, suggesting a defect in cell cycle exit. We then asked whether *pak3* ID mutations affect adult neurogenesis. We created a knock-in model expressing the *pak3*-R67C mutation responsible in humans for a severe form of intellectual impairment. We observed in the knock-in mice, a significant decrease in the number of newborn cells in both neurogenic areas of the brain (the subventricular zone in forebrain, and the dentate gyrus of the hippocampus) and an increase in the proportion of immature newborn neurons. These data suggest that the R67C mutation does not induce a loss of function of the kinase but a change of a function dependent on preferential activation by the Rac1 GTPase.

In conclusion, we show that PAK3 play an important role in the regulation of adult neurogenesis in mammals by controlling the cell cycle exit of neural progenitors. The R67C ID mutation impacts both newborn cell proliferation and their maturation. Taken together, these data suggest that defects in adult neurogenesis caused by ID mutations in the *pak3* gene may be involved in some cognitive dysfunctions.

Neurogenèse adulte et déficience intellectuelle : analyse du rôle de la kinase PAK3 dans deux modèles murins représentatifs de la pathologie

Résumé

Les p21-activated kinases (PAK) du sous-groupe I sont impliquées dans de nombreux processus cellulaires tels la prolifération, les mouvements cellulaires, l'adhérence et l'apoptose. Ces kinases sont des effecteurs des Rho-GTPases Rac1 et Cdc42 et participent à la régulation du cytosquelette d'actine. Les deux kinases neuronales PAK1 et PAK3, qui présentent de fortes identités de séquence, régulent le cytosquelette d'actine, contrôlant ainsi la dynamique des épines dendritiques, et la plasticité synaptique.

Les mutations du gène *pak3*, localisé sur le chromosome X, sont responsables de déficience intellectuelle chez l'homme, et les mécanismes moléculaires et cellulaires associés aux défauts cognitifs sont mal connus. Il a été montré que PAK3 participe à la voie proneurale au cours de l'embryogénèse précoce du xénope en favorisant la sortie du cycle cellulaire et la différenciation neuronale. Cependant, le rôle de PAK3 dans la neurogenèse adulte n'a pas été étudié. Or depuis maintenant une quinzaine d'années, il est admis que la neurogenèse perdure à l'âge adulte et participe aux processus de mémorisation et d'apprentissage. Nous nous sommes donc intéressés à l'implication de PAK3 dans la régulation de la neurogenèse adulte, posant l'hypothèse qu'un défaut de neurogenèse serait responsable, au moins en partie, des défauts cognitifs chez les patients. Nous avons montré que PAK3 n'est pas exprimée dans les cellules souches neurales/progéniteurs prolifératifs mais son expression augmente fortement dès le retrait des facteurs de croissance, *ex vivo*, suggérant un rôle dans la neurogenèse adulte. Nous avons montré que l'inactivation de *pak3* provoque une augmentation de la fréquence de neurosphères primaires formées ainsi qu'un accroissement de leur taille, ceci sans affecter la taille du réservoir de cellules souches ni les propriétés cardinales de celles-ci (multipotence, auto-renouvellement et prolifération). Toutefois, les cellules progénitrices *pak3*- poursuivent leur prolifération dans des conditions de culture induisant normalement la différenciation, suggérant un défaut de sortie du cycle cellulaire.

Nous nous sommes ensuite demandé si les mutations de déficience intellectuelle du gène *pak3* altèrent la neurogenèse adulte. Nous avons créé pour cela un modèle murin portant la mutation R67C, responsable chez l'homme de la forme la plus sévère de déficience intellectuelle associée aux mutations de ce gène. Nous mettons en évidence, dans cette souris knock-in, une forte diminution du nombre de cellules nouveau-nées dans les deux zones neurogéniques du cerveau (la zone sous-ventriculaire et le gyrus denté de l'hippocampe) et une augmentation de la proportion de neurones nouveau-nés immatures. Ces données suggèrent que la mutation R67C n'induit pas une perte de fonction de la kinase mais un changement de fonction dépendante d'une activation préférentielle par la GTPase Rac1.

En conclusion, ce travail de thèse montre que PAK3 participe à la régulation de la neurogenèse adulte chez les mammifères, contrôle la sortie du cycle cellulaire des progéniteurs neurales et que la mutation R67C impacte la maturation des neurones nouveau-nés. L'ensemble de ces données suggère que les défauts de neurogenèse adulte dus aux mutations de déficience intellectuelle du gène *pak3* sont à l'origine de certains dysfonctionnements cognitifs.