

Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire
CNRS - INSERM - Université Louis Pasteur de Strasbourg - Collège de France
Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé

Thèse présentée pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université Louis Pasteur

Discipline: Sciences du Vivant/Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

par

Marie Castets

Bases moléculaires du syndrome de l'X Fragile :
de l'identification d'interacteurs de FMRP à l'établissement
d'une connexion avec la voie de signalisation Rac1

Soutenue publiquement le 19 juin 2006 devant la commission d'examen:

M. Le Professeur Jean-Louis Mandel	Directeur de thèse
M. Le Professeur Jamel Chelly	Rapporteur externe
M. Le Professeur Gérard Gacon	Rapporteur externe
Mme Le Professeur Brigitte Kieffer	Rapporteur interne
Mme Le Docteur Barbara Bardoni	Examineur

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les Professeurs Brigitte Kieffer, Jamel Chelly et Gérard Gacon d'avoir accepté d'évaluer le travail que j'ai effectué au cours de ma thèse.

J'adresse mes plus vifs remerciements au Pr. Jean-Louis Mandel. Je le remercie de m'avoir donné la chance d'intégrer son équipe et de m'avoir fait profiter d'un environnement scientifique exceptionnel. Je lui suis extrêmement reconnaissante du temps qu'il m'a accordé tout au long de ma thèse.

Un immense merci au Dr. Barbara Bardoni ! Merci de m'avoir suivi tout au long de ces années, merci pour ton enthousiasme, ta détermination, tes idées et ta passion si communicative ! Merci de ta confiance et de la liberté que tu m'as accordée ! J'associe Enzo et le reste de la « Lalli team » à ces remerciements !

Danke schöne Annette! Many thanks for the discussions we had and for the help you brought to me! I've missed your experience and your knowledge after you left!

Un grand merci aussi à tous les anciens et nouveaux membres de l'équipe X-Fra ! Je tiens notamment à remercier le Dr. Hervé Moine : merci pour le travail effectué ensemble et pour ton aide ces derniers mois ! Elias, merci d'avoir comblé le vide laissé par Annette de ta joie de vivre et bonne chance avec le projet stress ox ! Merci à Eric Flatter d'avoir accepté de s'irradier et de m'avoir aidé techniquement. Enfin, merci aux trois petits stagiaires, Nicolas Dondaine, Johan Bacart et Jean-Nicolas Schickel qui m'ont accompagné durant les étés : bon courage pour la suite de vos études !

Merci à toute l'équipe du Dr. Thierry Rabilloud, et notamment à Sylvie Luche, de m'avoir permis de mener à bien les travaux de protéomique. Merci pour votre savoir-faire et votre disponibilité de tous les instants !

Un merci tout particulier à Solange Pannetier pour m'avoir aidé avec les souris : ton expérience va me manquer à Lyon !

Un immense merci à tous les membres de l'équipe de Génétique Humaine pour l'aide et le soutien qu'ils m'ont apporté au cours de ces années. Merci donc, dans le désordre, à Anna, Yvon, Chantal, Claudine, Jocelyn, Christine, Maria Do Ceu, Hervé, Delphine et à tous les autres !

Merci à Dominique et Didier d'avoir supporté mes histoires de western blot ! Merci à Stan de m'avoir fait profiter de sa passion pour la recherche et d'avoir animé nos repas du midi ! Merci à Mim's pour toute l'aide qu'elle m'a apportée au cours de ma thèse !

Merci à l'ensemble des membres des services techniques de l'IGBMC et notamment à Betty Heller et toute l'équipe du service de culture cellulaire, à Didier Hentsch, Marcel Boeglin, Jean-Luc Vonesch et à Manuela Argentini !

Merci à Anne-Sophie, Lama, Gretta, Myriam, Vincent, Holger, Marie, Romain, Antoine, Delphine, Anne, Cécile, Caroline, Marie W, Richard, les petits nouveaux Stéphane et Aurélien, et tout ceux que j'oublie pour les bons moments passés ensemble ! Bon courage pour la suite et à très bientôt !

Un IMMENSE merci à la dream team de 3045 (ou assimilés) ! Merci à Krishna d'avoir égayé l'atmosphère avant de rejoindre Londres (malgré le mauvais œil...) ! Merci à Fabrice d'avoir supporté les infos du matin, de m'avoir écouté et de m'avoir fait connaître autre chose que JJG ! Merci pour tous les bons moments passés ensemble dans et hors du labo ! Merci à Schkoumi et à son inimitable « café ? » du matin ! Merci pour ta bonne humeur, ta joie de vivre et tes conseils ! Merci à Susana pour sa gentillesse, sa patience et son expérience !

Last but not least, MERCI à Thomas pour ce dos-à-dos de presque 4 ans ! Tom, merci pour tout, merci de m'avoir soutenue, merci pour nos discussions, merci d'avoir pris le relai du café du matin quand Schkoumi est parti et merci d'avoir accepté (parfois) d'arrêter d'écouter quinze fois le même disque à la suite ! RDV en septembre au CLB, tu ne croyais tout de même pas t'en sortir en t'exilant en Suisse !

Merci à tous les amis rencontrés au cours de cet exil alsacien : Gégé, Virginie, Christelle, Sofia, Iban, JC, Maud, Julie, Yannick, Emilie, Sophie, Romain, Anne-So, Cécile, Anne, Myriam, Pierrot, Hélène, Janush, Dorota, Fabrice, Sckoumi, Aymeric, Tom, Marie et tous les autres, merci pour tous les bons moments passés ensemble et à très bientôt !

Enfin, cette thèse est un peu une histoire de famille ! Merci donc à toute ma famille pour leur soutien tout au long de ces années ! Un GRAND merci à ma petite sœur Perrine, d'avoir lu, relu et re-relu ce manuscrit : à charge de revanche dans quelques temps pour ta thèse ! MERCI aussi à mes parents d'avoir cumulé les emplois d'assistantes maternelles et d'imprimeurs !

Enfin, merci à mes deux hommes pour leur patience en ces temps de rédaction ! Merci à toi Julien d'avoir supporté les week end (et même les nuits !) au labo, les NUCIFeries en tout genre, merci de m'avoir soutenue ces 4 années, merci pour le recul que tu as su me faire prendre quand il le fallait !

Table des Matières

Table des Matières.....	3
Liste des figures.....	10
Liste des tableaux.....	11
Abréviations.....	12
INTRODUCTION.....	17
I. Le syndrome de l’X Fragile : de la découverte à la caractérisation clinique	18
1) Approche historique.....	18
1.1) Emergence de la notion de retard mental lié à l’X.....	18
1.2) Identification d’un site fragile comme marqueur chromosomique d’un RMLX syndromique, le syndrome de l’X fragile	19
2) Les retards mentaux : définition, causes et classification.....	20
2.1) Critères de définition des retards mentaux.....	20
a) Approche historique.....	20
b) Critères actuels	20
2.2) Causes des retards mentaux.....	21
2.3) Prévalence des retards mentaux.....	22
2.4) Classification des retards mentaux liés à l’X.....	22
a) Définition	22
b) Retards mentaux liés à l’X non syndromiques (RMLX-NS)	22
c) Retards mentaux liés à l’X syndromiques (RMLX-S)	24
3) Caractéristiques phénotypiques du syndrome de l’X fragile	25
3.1) Tableau clinique.....	25
a) Les troubles cognitifs	25
b) Les troubles comportementaux.....	26
c) Autres troubles	27
3.2) Caractéristiques anatomopathologiques.....	28
a) Atteintes cérébrales	28
3.3) Variabilité phénotypique et prévalence du syndrome	30
a) Variabilité phénotypique.....	30
b) Conséquences de la variabilité phénotypique sur l’estimation de la prévalence	31
II. Le Syndrome de l’X Fragile : des causes génétiques aux causes moléculaires	31

1)	Le syndrome de l’X fragile : une maladie monogénique à expansion de triplets nucléotidiques.....	31
1.1)	Identification du gène <i>FMRI</i> au niveau du site fragile	31
1.2)	Structure du gène <i>FMRI</i>	32
1.3)	Conservation interspécifique du gène <i>FMRI</i>	32
1.4)	Expression spatio-temporelle du gène <i>FMRI</i>	33
a)	Structure du promoteur et régulation de la transcription du gène <i>FMRI</i>	33
b)	Expression du gène <i>FMRI</i> au cours du développement	34
c)	Expression du gène <i>FMRI</i> chez l’adulte	35
1.5)	Mutations du gène <i>FMRI</i>	36
a)	Le syndrome de l’X fragile : une maladie à expansion de triplets nucléotidiques	36
b)	Autres Mutations.....	41
2)	FMRP et le métabolisme des ARNm.....	42
2.1)	FMRP : une protéine aux différentes isoformes	42
2.2)	FMRP : une protéine navette entre le noyau et le cytoplasme	42
2.3)	FMRP : une protéine se liant aux ARN	43
a)	FMRP possède des domaines de liaison à l’ARN	43
b)	FMRP se lie à l’ARN <i>in vitro</i>	44
c)	FMRP reconnaît des ARNm <i>in vivo</i>	46
2.4)	Intégration de FMRP au sein d’un complexe ribonucléoprotéique.....	47
a)	FMRP fait partie de complexes ribonucléoprotéiques associés aux polysomes	47
b)	Principaux interacteurs de FMRP (Publication 1).....	48
c)	Mobilité des RNP.....	49
2.5)	Implication de FMRP dans la régulation de la traduction	50
a)	Mise en évidence <i>in vitro</i>	50
b)	Confirmation <i>in vivo</i>	51
2.6)	Modèle du rôle cellulaire de FMRP.....	54

III. Le syndrome de l’X fragile : de l’étude des modèles animaux aux modèles moléculaires de pathogenèse.....54

1)	Apport du modèle murin à la compréhension du rôle synaptique de FMRP	54
1.1)	Caractéristiques générales du modèle murin	54
a)	Elaboration du modèle murin	54
b)	Phénotype global des souris <i>Fmr1</i> knock-out.....	56
1.2)	Introduction générale : les bases de la mémoire, de l’échelle cérébrale à l’échelle moléculaire	57
a)	Définition	57
b)	Plasticité des réseaux neuronaux: les bases cellulaires de la mémoire	58
c)	Récepteurs au glutamate et calcium: les bases moléculaires de la mémoire.	59
1.3)	Implication de FMRP dans les phénomènes de plasticité synaptique : émergence du modèle des récepteurs au glutamate	63
a)	Implication de FMRP dans la régulation de la traduction induite par les récepteurs mGluR au niveau synaptique.....	63

b)	Mise en évidence d'altérations de la plasticité synaptique dans le cerveau des souris <i>Fmr1</i> knock-out	64
c)	Bilan : modèle de pathogenèse des récepteurs au glutamate.....	65
2)	Apport du modèle drosophile à l'établissement d'un lien entre FMRP et le cytosquelette.....	66
2.1)	Caractéristiques générales du modèle drosophile	66
a)	Complexe FMRP chez la drosophile	66
b)	Elaboration du modèle Drosophile	67
c)	Caractéristiques phénotypiques générales.....	68
2.2)	Etude du modèle drosophile et mise en évidence de l'importance des protéines dFMR1/FMRP dans la réorganisation du cytosquelette de microtubules.....	69
a)	Organisation et dynamique du réseau de microtubules.....	69
b)	Analyse de la neurogenèse chez les mutants <i>dFMR1</i> de drosophile : l'hypothèse Futsch/MAP1B	70
c)	Mise en évidence de l'implication des protéines dFMR1/FMRP dans l'organisation des microtubules : importance dans la spermatogenèse.....	71
2.3)	Etablissement d'une connexion entre <i>dFMR1</i> et la voie dRac1 des Rho GTPases : importance dans l'organisation dynamique du cytosquelette d'actine.....	71
a)	Organisation et dynamique du cytosquelette d'actine.....	71
b)	Rôle des Rho GTPases dans la réorganisation dynamique du cytosquelette d'actine et importance dans la neurogenèse.....	73
c)	Interactions génétiques entre dFMR1 et dRac1 : dCYFIP, le lien manquant ?.....	77
2.4)	L'hypothèse du cytosquelette.....	78
PUBLICATION 1		79
RESULTATS		93
I.	Identification et caractérisation d'un nouvel interacteur de FMRP, 82-FIP	94
1)	Stratégie d'identification de nouveaux interacteurs de FMRP par criblage double-hybride.....	94
1.1)	Origine du projet et objectif.....	94
1.2)	Principe du criblage double-hybride.....	94
1.3)	Identification de partenaires de FMRP.....	95
2)	Identification d'une nouvelle protéine, 82-FIP, associée au(x) complexe(s) RNP contenant FMRP (Publication 2).....	96
2.1)	82-FIP, un nouvel interacteur de FMRP	96
2.2)	Caractérisation du domaine d'interaction de FMRP.....	96
2.3)	82-FIP, une protéine associée à des complexes RNP.....	97
3)	82-FIP, une protéine ubiquitaire dont la localisation subcellulaire varie au cours du cycle cellulaire	97
3.1)	Profil d'expression de 82-FIP dans des tissus de souris adultes	97
3.2)	Variation de la localisation subcellulaire de 82-FIP au cours du cycle cellulaire	98

3.3) Observation de corps nucléaires contenant 82-FIP	99
PUBLICATION 2	100
II. Etablissement d'une connexion entre FMRP et la voie de signalisation Rac1 : implication de FMRP dans la réorganisation du cytosquelette d'actine (Publication 3).....	111
1) Objectif de l'étude et description du modèle utilisé.....	111
1.1) Objectif.....	111
1.2) Mise au point d'un modèle cellulaire	111
2) Perturbations de la voie de signalisation Rac1 en absence de protéine FMRP fonctionnelle	112
2.1) Potentialisation de l'effet du PDGF sur la réorganisation du cytosquelette d'actine dans les cellules FMR1 ⁻ , FMR1 ^{KH1} et FMR1 ^{KH2}	112
2.2) Diminution du taux de Phospho-Cofiline (P-Cofiline) dans les cellules FMR1 ⁻ , FMR1 ^{KH1} et FMR1 ^{KH2}	113
3) PP2A, une nouvelle cible de FMRP	114
3.1) Comparaison du protéome des cellules FMR1 ⁺ et FMR1 ⁻ par électrophorèse bidimensionnelle (EBD)	114
a) Objectif.....	114
b) Principe de l'EBD.....	114
c) Identification de cibles putatives de FMRP	114
3.2) PP2A, une cible probable de FMRP	115
a) Augmentation du taux de PP2A en absence de FMRP fonctionnelle	115
3.3) Interaction entre FMRP et l'ARNm de la PP2A	115
4) Réorganisation du cytosquelette et relocalisation de FMRP et de ses interacteurs.....	116
4.1) Traitement au PDGF et relocalisation de quatre interacteurs de FMRP au niveau des cercles d'actine	116
4.2) Relocalisation de FMRP, FXR1P et CYFIP1 autour des vésicules de macropinocytose.....	116
4.3) Localisation de FXR1P au niveau de faisceaux de microtubules impliqués dans la formation de lamellipodes.....	117
PUBLICATION 3	119
I. Etude du rôle de la PP2A dans la déphosphorylation de FMRP.....	130
1) Modifications post-traductionnelles et régulation de l'activité de FMRP	130
1.1) Modification de FMRP par méthylation.....	130
1.2) Modification de FMRP par phosphorylation	130
2) Hypothèse et objectif de l'étude (Manuscrit 4)	131
3) Inhibition de la PP2A par traitement à l'acide okadaïque et modifications post-traductionnelles de FMRP	132
4) Effet de l'acide okadaïque sur la localisation de FMRP et sur son association aux polysomes	132
4.1) Influence de l'inhibition de la PP2A sur la localisation subcellulaire de FMRP.....	132

4.2) Absence d'effet de l'acide okadaïque sur l'association de FMRP aux polysomes	133
MANUSCRIPT 4	134
DISCUSSION et PERSPECTIVES	148
I. Identification et caractérisation de 82-FIP	149
1) 82-FIP, un nouvel interacteur de FMRP impliqué dans le métabolisme de l'ARN ?.....	149
1.1) Rôle nucléaire de 82-FIP ?	149
1.2) Rôle cytoplasmique de 82-FIP ?	151
1.3) Changement de localisation subcellulaire et modulation du rôle de 82-FIP ?	152
2) 82-FIP et le cycle cellulaire : rôle actif ou relocalisation passive ?.....	152
2.1) Rôle de 82-FIP dans la régulation du cycle cellulaire	152
2.2) Implication de Rac1 dans la relocalisation de 82-FIP au cours du cycle cellulaire ?	153
3) Signification fonctionnelle de l'interaction entre 82-FIP et FMRP ?.....	154
II. Connexion FMRP-Rac1	154
1) Identification de cibles putatives de FMRP	154
1.1) PP2A, une phosphatase régulée par et régulant FMRP ?.....	154
a) PP2A, une cible directe de FMRP ?	154
b) Validité fonctionnelle du modèle proposé ?.....	155
c) Autres conséquences liées à l'augmentation du taux de PP2Ac en absence de FMRP ?	157
d) Existence d'une boucle de régulation entre la PP2A et FMRP ?.....	158
2) Implication de FMRP dans la régulation du stress oxydatif ?	159
3) Rac1, un modulateur de l'activité de FMRP (et de ses interacteurs) ?.....	161
3.1) Modulation de la composition des complexes RNP contenant FMRP	161
3.2) Signification fonctionnelle des relocalisations induites par Rac1	162
a) Au bord avant des cellules	162
b) Autour des vésicules de macropinocytose.....	163
4) Validité de la connexion FMRP/Rac1/cytosquelette d'actine dans la pathogenèse ?.....	163
4.1) Lien FMRP/PP2A/P-Cofiline : validité chez la souris ?.....	163
4.2) Modification de la dynamique de restructuration du cytosquelette d'actine en absence de FMRP : rôle causal dans l'apparition d'anomalies au niveau des épines dendritiques ?.....	164
4.3) Les protéines FXR et la régulation de la structure et de la dynamique du cytosquelette.....	165
MANUSCRIPT 5	166
APPENDICE.....	188
PUBLICATION 6	189

BIBLIOGRAPHIE	202
Listes des sites web	228

Liste des figures

Introduction

Figure 1 : Site fragile à l'extrémité du chromosome X	p19
Figure 2 : Répartition de la population selon les scores obtenus aux tests de QI	p21
Figure 3 : Répartition des gènes impliqués dans des retards mentaux le long de l'idéogramme du chromosome X	p22
Figure 4 : Principaux signes cliniques du syndrome de l'X fragile	p25
Figure 5 : Epines dendritiques : morphologie, ultrastructure et anomalies dans le syndrome de l'X fragile	p28
Figure 6 : Organisation du gène <i>FMR1</i> humain et de son promoteur	p32
Figure 7 : Analyse immunohistochimique de l'expression du gène <i>FMR1</i>	p35
Figure 8 : Classification des allèles de <i>FMR1</i> en fonction de la longueur de la série CGG	p37
Figure 9 : Maladies monogéniques à expansion de triplets nucléotidiques	p40
Figure 10 : Isoformes de FMRP	p42
Figure 11 : Domaines fonctionnels de FMRP et régions impliquées dans l'association à ses interacteurs	p43
Figure 12 : Motifs potentiels de liaison de FMRP à l'ARN	p45
Figure 13 : Schéma du réseau des interacteurs de FMRP	p48
Figure 14 : Modèle du rôle cellulaire de FMRP	p54
Figure 15 : Modèle murin du syndrome de l'X fragile	p55
Figure 16 : Réseaux neuronaux impliqués dans la mémoire	p58
Figure 17 : Mécanismes moléculaires de la LTP dépendant des récepteurs NMDA dans l'hippocampe	p61
Figure 18 : Pathogenèse du syndrome de l'X fragile : modèle des récepteurs au glutamate	p65
Figure 19 : Modèle drosophile du syndrome de l'X fragile	p66
Figure 20 : Organisation et rôles du cytosquelette de microtubules	p69
Figure 21 : dFMR1 et le cytosquelette de microtubules	p70
Figure 22 : Organisation des microfilaments d'actine	p71
Figure 23 : Cycle des Rho GTPases	p73
Figure 24 : Contrôle de la réorganisation du cytosquelette d'actine par RhoA, Rac1 et Cdc42	p74
Figure 25 : Voies de signalisation effectrices des Rho GTPases	p75
Figure 26 : Interactions génétiques entre dFMR1, dCYFIP et dRac1 dans l'œil de drosophile	p77

Résultats

Figure 27 : Analyse immunohistochimique de l'expression de 82-FIP	p97
Figure 28 : Influence de FMRP sur la localisation de 82-FIP pendant le cycle cellulaire	p99
Figure 29 : Localisation de 82-FIP dans des corps nucléaires jouxtant l'hétérochromatine	p100
Figure 30 : Etablissement d'un modèle cellulaire	p112
Figure 31 : Cartes protéomiques des fibroblastes FMR1+ et FMR1-	p114
Figure 32 : Spots surnuméraires de la vimentine sur la carte protéomique des fibroblastes FMR1+	p114
Figure 33 : Relocalisation de FMRP, CYFIP1 et FXR1P autour des vésicules de macropinocytose	p117
Figure 34 : Localisation de FXR1P au niveau de structures en faisceaux	p118
Figure 35 : Localisation de FXR1P au niveau de faisceaux de microtubules	p119

Liste des tableaux

Introduction

Tableau 1 : Principales formes syndromiques de retards mentaux liés à l'X	p23
Tableau 2 : Causes génétiques des formes non syndromiques de retards mentaux liés à l'X	p24
Tableau 3 : Conservation interspécifique du gène <i>FMR1</i>	p32
Tableau 4 : Principales cibles ARNm potentielles de FMRP	p52

Résultats

Tableau 5 : Résultats de l'identification des spots différentiels par spectrométrie de masse	p114
---	------

Abréviations

82-FIP	82kDa-FMRP Interacting Protein
Abi	Abelson interacting protein
ACSL4	Acyl-CoA Synthetase Long chain 4
Actine G	Actine Globulaire
Actine F	Filaments d'actine
ADF	Actin Depolymerizing Factor
AND	Acide Désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ADP	Adénosine Di-Phosphate
Ala	Alanine
AMPA	α -Amino-3-hydroxy -5-Méthyl-4-isoxazolePropionic Acid
AP-2 α	Activating Protein-2a
APRA	Antibody-Positioned RNA Amplification
Arc	Activity-regulated cytoskeleton associated protein
ARHGEF6	Alpha RHo Guanine Nucleotide Exchange Factor 6
ARN	Acide RiboNucléique
ARNm	ARN messenger
ARNpm	ARN prémessenger
ARNr	ARN ribosomique
Arp2/3	Actin-related protein 2/3
ARX	Aristaless-Related homeoboX
Asp	Acide Aspartique
ATP	Adénosine Tri-Phosphate
ATPase	Adénosine Tri-Phosphatase
ATP6AP2	ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal Accessory Protein 2
BC1	Brain Cytoplasmic RNA 1
BCOR	B-Cell Lymphoma 6 (BCL-6) CO-Repressor
β DAG1	β Dystroglycan-Associated Glycoprotein 1
BiFC	Bimolecular Fluorescence Complementation
Ca ²⁺	Calcium
CA1/2/3	Corne d'Ammon 1,2,3
CaMKII	Calcium-calModuline-dependant Kinase II
CAP G/Z	Capping Protein G/Z
Cdc42	Cell Division Cycle 42
CDK4	Cyclin Dependent Kinase 4
CDKL5	Cyclin Dependent Kinase-Like 5
CEA	Commissariat à l'Energie Atomique

CKII	Casein Kinase II
CREB	cAMP Response Element-Binding Protein
CYFIP1/2	CYtoplasmic FMRP Interacting Protein
DA	Domaine d'Activation
DAG	DiAcylGlycérol
dCKII	dCKII : <i>drosophila</i> Casein Kinase II
dCYFIP	<i>drosophila</i> CYtoplasmic FMRP Interacting Protein
dFMR1	<i>drosophila</i> Fragile X Mental Retardation 1
DHPG	DiHydroxyPropoxymethylGuanine
DL	Domaine de Liaison
dNUFIP	<i>drosophila</i> Nuclear Interacting Protein
EBD	Electrophorèse BiDimensionnelle
EDTA	acide EthylèneDiaminoTétraAcétique
EF-1A	Elongation Factor-1A
eIF2C	eukaryotic translation Initiation Factor 2C
EJC	Exons Junction Complex
E-LTP	Early-Long Term Potentiation
EOR	Espèces Oxygénées Réactives
eRF1	eukaryotic Release Factor 1
ERK	Elk-Related tyrosine Kinase
EST	Expressed Sequence Tag
FGD1	FacioGenital Dysplasia protein 1
FLNA	FiLamiNe Alpha
FMR1/2	Fragile X Mental Retardation 1/2, gènes humains
Fmr1	Fragile X Mental Retardation 1/2, gène murin
FMRP	Fragile X Mental Retardation Protein
FRAXA	FRAgile chromosome X site A
FRAXE	FRAgile chromosome X site E
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfer
FRT	Flipase Recognition Target
FTSJ1	Filamentation Temperature-Sensitive J 1
FXR1/2	Fragile X Related gene 1,2
FXR1/2P	Fragile X Related Protein 1,2
G6PD	Glucose 6-Phosphate Déshydrogénase
GAP	GTPases Activating Protein
GDI	Guanine nucleotide Dissociation Inhibitor
GDP	Guanosine Di-Phosphate
GEF	Guanine nucleotide Exchange Factor
GFP	Green Fluorescent Protein
GK	Glycerol Kinase

GluR1-4	Glutamate Receptor subunits 1-4
GRK2	G protein-coupled Receptor Kinase 2
GTP	Guanosine TriPhosphate
GTPase	Guanosine TriPhosphatase
H3/4	Histone 3/4
Hem-2	Hematopoietic Protein 2
HIS	Histidine
hnRNP (A1,A2,K,U)	heterogeneous nuclear RiboNucleoProtein (A1,K,U)
HPRT	Hypoxanthine PhosphoRibosyl Transférase
HSPC300	Heat Shock Protein C300
Hz	Hertz
IGC	Interchromatine Granule Clusters
IL1RAPL	Interleukin 1 Receptor Accessory Protein-Like gene
IMP1	Insulin-like Growth Factor II mRNA binding protein I
iso1	isoforme 1 de FMRP codée par l'ensemble des 12 exons
iso7	isoforme 7 de FMRP dépourvue de l'exon12
IP3	Inositol 3-Phosphate
JARID1C	Jumonji/ARID domain-containing protein 1C
K ⁺	Potassium
kb	kilobase
kDa	kiloDalton
KH	domaine K Homologue
LDP	Long Term Depression
LIMK-1	LIM (Lin-11, Isf-1 and Mec-3) Domain Kinase-1
L-LTP	Late-Long Term Potentiation
LTP	Long Term Potentiation
MAP1A/1B/2/3/4	Microtubules Associated Protein 1A/1B/2/3/4
MeCP2	Methyl-CpG-binding Protein 2
MEGAP	MENTal disorder-associated GAP protein
MER1	Meiotic Recombination 1 protein
mGluR1-8	metabotropic Glutamate Receptor 1-8
MPEP	2-Methyl-6-(PhenyEthynyl)-Pyridine
MPF	Mitosis Promoting Factor
MSP58	MicroSPhérule 58
Na ⁺	Sodium
NAP1	NCK-Associated Protein 1
NES	Nuclear Export Signal
NG-108	Neuroblastoma x Glioma hybrid cells
NGF	Nerve Growth Factor
NLS	Nuclear Localisation Signal

NMDA	N-Methyl-D-Aspartate
NMDA-R1 à 4	NMDA Receptors 1-4
NO	Monoxyde d'azote
NUFIP	NUclear FMRP Interacting Protein
NRF1	Nuclear Respiratory Factor 1
OA	Okadaïc Acid
OCRL1	OculoCerebroRenal Lowe syndrome
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
OPHN1	OligoPHreNin-1 gene
p70S6k	kinase p70 S6
PAK3	p21 Activated Kinase 3
P-Cofiline	Phospho-ADF/Cofiline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor
PHF6/8	Plant Homeodomain-like Finger 6/8 gene
pI	point Isoélectrique
aPix	alpha PAK-Interacting Exchange Factor
PKA/C	Protéine Kinase A/C
PLC	PhosphoLipase-C
PP1/2A/2B	Protéine Phosphatase 1/2A/2B
PPSE	Potentiel Post-Synaptique Excitateur
PQBP1	Polyglutamine-Binding Protein 1
PSD	Post Synaptic Density
PSD-95	Post-Synaptic Density 95 protein
Pur α	Purine-rich element-binding protein α
QI	Quotient Intellectuel
Rac1	Ras-related C3 botulinum toxin substrate
RER	Réticulum Endoplasmique Rugueux
RGG	boîte arginine-glycine
RGS5	Regulator of G protein Signalling 5
Rho GTPase	Ras homolog Guanosine TriPhosphatase
RhoBTB	Rho-Related BTB (BR-C, Ttk and Bab) domain-containing Protein
RISC	RNA-Induced Silencing Complex
RM	Retard Mental
RMLX	Retard Mental Lié à l'X
RMLX-NS	RMLX non syndromique ou aspécifique
RMLX-S	RMLX syndromique ou spécifique
RNase	RiboNuclease A
RNP	RiboNucléoParticle/complexe ribonucléoprotéique
RSK2	Ribosomal S6 Kinase 2

RT	Reverse Transcription
S	Svedberg
SCAR	Suppressor of c-AMP Repressor
SELEX	Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment
Ser	Sérine
SMN	Survival of Motor Neuron
snRNP	small nuclear RiboNucleoParticle
SOD1	Superoxyde dismutase 1
Sp1	Specificity Protein 1
SSB-1	Sjogren-Syndrome antigen B-1
SSH-1/2/3	Slingshot 1/2/3
TM4SF2	TransMembrane 4 SuperFamily member 2
UAS-GAL4	Upstream Activating Sequence-Galactosidase 4
USF1/2	Upstream Simulatory Factor 1/2
UTR	Untranslated Region
VP16	Viral Protein 16
WASP	Wiskott-Aldrich Syndrome Protein family
WAVE	WASP family VErpilin homologous protein
X-Gal	5-bromo -4-chloro -3-indolyl-beta-D-galactopyranoside
XNP	X-linked Nuclear Protein gene
Xp	Bras court du chromosome X
Xq	Bras long du chromosome X
YAC	Yeast Artificial Chromosome
YB1/P50	Y-box-binding protein 1
ZBP1	Z-DNA Binding Protein 1
ZNF41	ZiNc Finger protein 41

INTRODUCTION

I. Le syndrome de l’X Fragile : de la découverte à la caractérisation clinique

1) Approche historique

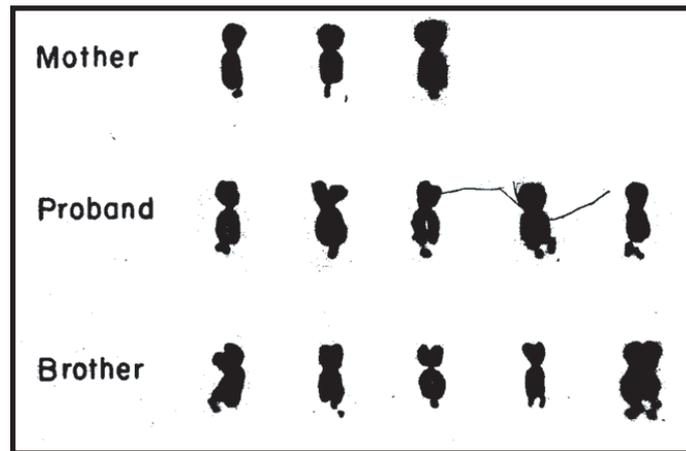
1.1) Emergence de la notion de retard mental lié à l’X

L’établissement d’un lien entre retard mental et hérédité liée au sexe débute au XX^{ème} siècle avec plusieurs rapports réalisés au sein d’institutions spécialisées faisant état de l’inégale répartition des cas de retards mentaux entre hommes et femmes. Une étude réalisée par Sir Lionel Penrose en 1938 présente ainsi l’analyse de la répartition selon le sexe de 1280 individus hospitalisés en raison d’un déficit intellectuel (voir (Neri and Opitz 2000) pour revue). Cette analyse révèle un sexe ratio déséquilibré de 1,22 hommes pour une femme. Différentes équipes confirment par la suite cette surreprésentation masculine de l’ordre de 20-30% parmi les patients souffrant de retards mentaux. Toutefois, la transmission de ces déficiences via le chromosome X n’est alors pas envisagée, puisque Penrose conclut lui-même ainsi : «*The conclusion may be drawn that there is no outstanding tendency for sex-linked genes to influence the genetics of mental deficiency*” (Neri and Opitz 2000). L’une des explications avancées était l’existence d’un biais social, provenant du fait que les femmes atteintes de déficience mentale seraient moins facilement placées en institutions spécialisées.

Cette hypothèse s’effrite en 1943 avec la publication par James Purdon Martin et Julia Bell du premier cas familial de retard mental à ségrégation liée au sexe (Martin and Bell 1943). Le pedigree de la famille décrite comporte en effet onze hommes atteints de retard mental en deux générations pour deux cas féminins mineurs seulement. Cet article ne fait état d’aucun autre symptôme chez ces patients.

Au cours des deux décennies suivantes, plusieurs publications décrivent des cas similaires de transmission différentielle de retards mentaux dans différentes familles. Une étape majeure est franchie en 1968 : à partir de l’analyse de cinq de ces familles et en reprenant l’ensemble des données acquises depuis les travaux de Penrose, Robert Gordon Lehrke propose dans sa thèse que l’existence de mutations dans des gènes portés par le chromosome X puisse expliquer l’inégalité entre hommes et femmes devant la survenue de telle déficience intellectuelle (Neri and Opitz 2000). Il pose ainsi les bases de la notion de retard mental lié à l’X (RMLX).

A.



B.

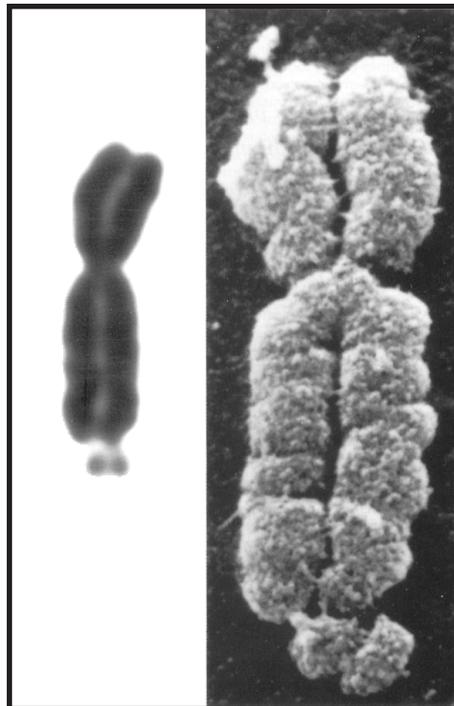


Figure 1. Site fragile à l'extrémité du chromosome X.

A. Observation par Lehrke du site fragile FRAXA à l'extrémité des chromosomes X de deux frères atteints de retards mentaux et de leur mère. Adapté de *Lehrke, 1972*.

B. Site fragile observé après marquage chromosomique au Giemsa (à gauche) et en microscopie électronique (à droite). Photo par *Griffith et al, 2000*.

1.2) Identification d'un site fragile comme marqueur chromosomique d'un RMLX syndromique, le syndrome de l'X fragile

En 1969, Lubs rapporte l'existence d'une anomalie à l'extrémité du chromosome X chez les quatre hommes atteints d'une même famille, ainsi que chez leur mère (cf. Figure 1) (voir (Hagerman 1987) pour revue). Cette anomalie sera par la suite caractérisée comme étant un site fragile, nommée FRAXA (FRAGile chromosome X site A). Un site fragile correspond à une zone de fragilité constitutionnelle de la chromatine, se manifestant par l'apparition d'un espace sur le chromosome lors de la réalisation d'un caryotype. Les travaux de Sutherland précisent en 1977 les conditions de culture à respecter pour reproduire cette observation : lorsque les cellules sont cultivées dans un milieu pauvre en folate, un site fragile à l'extrémité du bras long du chromosome X (Xq) apparaît chez des patients souffrant de retard mental (Hagerman 1987). A la même période, Turner décrit le cas de patients présentant une macroorchidie dans le cadre d'un RMLX (Turner, Daniel et al. 1980). L'application de la technique de Sutherland à ces patients permet d'établir un lien entre ce RMLX, la macroorchidie et l'existence du site fragile. En 1981, Richards reprend l'étude de la famille décrite près de 40 ans plus tôt par Martin et Bell (Neri and Opitz 2000). Il montre que les patients de cette famille possèdent tous un site fragile en Xq et remarque en outre qu'ils présentent une augmentation du volume testiculaire. L'existence d'un retard mental syndromique transmis via le chromosome X est alors établie. La forme de retard mental décrite par Martin et Bell devient alors plus connue sous le nom de syndrome de l'X fragile. D'autres formes de retards mentaux syndromiques liés à l'X sont découvertes dans les années suivantes. En 1985, le site caractéristique du syndrome de l'X fragile est localisé plus précisément en Xq27.3 par Krawczun (Krawczun, Jenkins et al. 1985).

2) Les retards mentaux : définition, causes et classification

2.1) Critères de définition des retards mentaux

a) Approche historique

La notion de déficience intellectuelle causée par une atteinte du fonctionnement cérébral est extrêmement ancienne, puisque des papyrus médicaux trouvés à Thèbes et datant de 1500 avant J.C. y font référence (voir (Biasini, Grupe et al. 1999) pour revue). Cependant, l'intérêt porté à la question du retard mental reste extrêmement ténu pendant les siècles suivants. Les travaux de John Locke en 1690, repris et appliqués en 1800 par le physicien Jean-Marc-Gaspard Itard à l'éducation de Victor, « l'enfant sauvage » de l'Aveyron, aboutissent finalement, au début du XX^{ème} siècle aux USA, à l'acceptation des différentes composantes de la définition du retard mental sous sa forme actuelle (Biasini, Grupe et al. 1999).

b) Critères actuels

Selon la définition de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), on considère actuellement que « *le retard mental est un arrêt du développement mental ou un développement mental incomplet, caractérisé par une insuffisance des facultés et du niveau global d'intelligence, notamment des fonctions cognitives, du langage, de la motricité et des performances sociales.[...]Des capacités intellectuelles réduites sont le trait dominant de ce trouble, mais on ne pose le diagnostic que si elles s'accompagnent d'une moindre capacité d'adaptation aux exigences quotidiennes de l'environnement social* » (source : site web de l'OMS). L'Association Américaine de Psychiatrie ajoute à cette définition que l'âge de survenue de la déficience doit être inférieur à 18 ans (Chelly 2000).

L'évaluation des facultés intellectuelles est réalisée à l'aide de tests standardisés permettant d'appréhender les capacités de l'individu à comprendre des idées complexes, à résoudre des problèmes ou encore à maîtriser un raisonnement abstrait (voir (Chelly 2000) pour revue). Le résultat est exprimé sous forme d'un score, le Quotient Intellectuel (QI). Le QI moyen dans la population générale est, par définition, de 100. On parle de retard mental

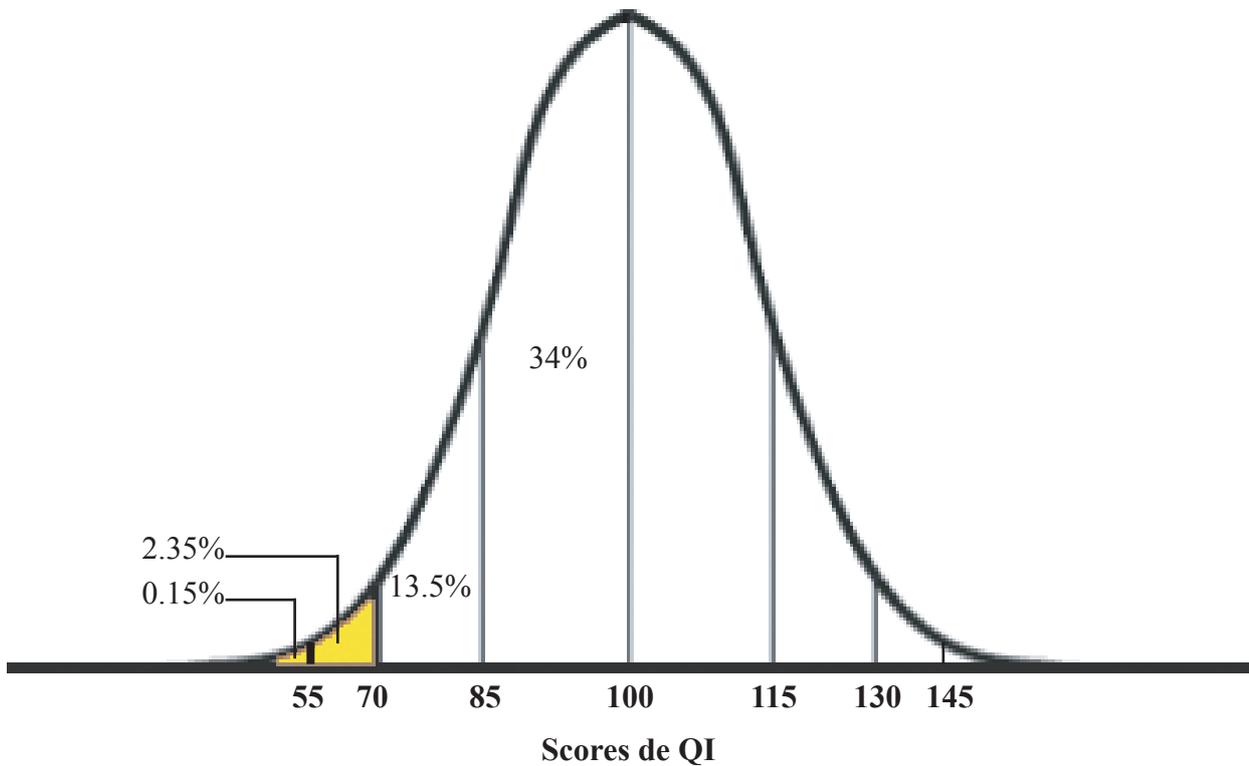


Figure 2. Répartition de la population selon le résultat obtenu aux tests de QI.

Les pourcentages indiquent la part de la population comprise dans chacun des intervalles de scores. La moyenne des scores réalisées est de 100.

On parle de retard mental lorsque le QI est inférieur à 70. Le retard mental est jugé grave lorsque le QI est inférieur à 50-55. Adapté de *Chelly, 2000*.

lorsque le QI est inférieur à 70. Le retard mental est considéré comme léger lorsqu'il est compris entre 70 et 50, comme modéré lorsqu'il est compris entre 49 et 35, comme grave lorsqu'il est compris entre 34 et 20 et comme profond lorsqu'il est inférieur à 20 (cf. Figure 2). Comme l'indique la définition de l'OMS, l'établissement d'un diagnostic de retard mental prend également en considération l'aptitude de l'individu à évoluer et à se débrouiller seul dans son environnement quotidien. Ce facteur est également évalué à l'aide de tests des capacités conceptuelles (lecture, écriture, échanges de langage, notion d'argent...), sociales (sens des responsabilités, estime de soi, naïveté, respect des règles, des lois...) et pratiques (autonomie pour manger, s'habiller, se laver, utilisation du téléphone, des transports en commun...) de l'individu (source : site web «American Association on Mental Retardation»).

2.2) Causes des retards mentaux

Les causes identifiées de retards mentaux sont multiples et non exhaustives, puisqu'une étude menée en Suède révèle que 20% des cas de retards mentaux graves et 55% des cas de retards mentaux légers sont d'origine inconnue (Chelly 2000).

On peut subdiviser les causes identifiées de retards mentaux en trois grands groupes (Chelly 2000):

- les causes biologiques inhérentes à l'individu, qu'elles soient malformatives, chromosomiques (syndrome de Down, syndrome de Prader-Willi et d'Angelman), ou monogéniques (syndrome de l'X fragile). En France, un tiers des cas de retards mentaux sévères ont une origine biologique.
- les causes infectieuses. L'infection peut avoir lieu pendant la période anténatale (listériose, toxoplasmose, rubéole...) ou postnatale (méningite).
- les causes environnementales. Elles peuvent être traumatiques (anoxie à la naissance, syndrome du «bébé secoué»...), dues à la consommation d'agents pathogènes et notamment d'alcool pendant la grossesse, ou encore alimentaire. La carence en iode est ainsi une cause majeure de retard mental dans certains pays et constitue même la première cause de retard mental évitable selon l'OMS.

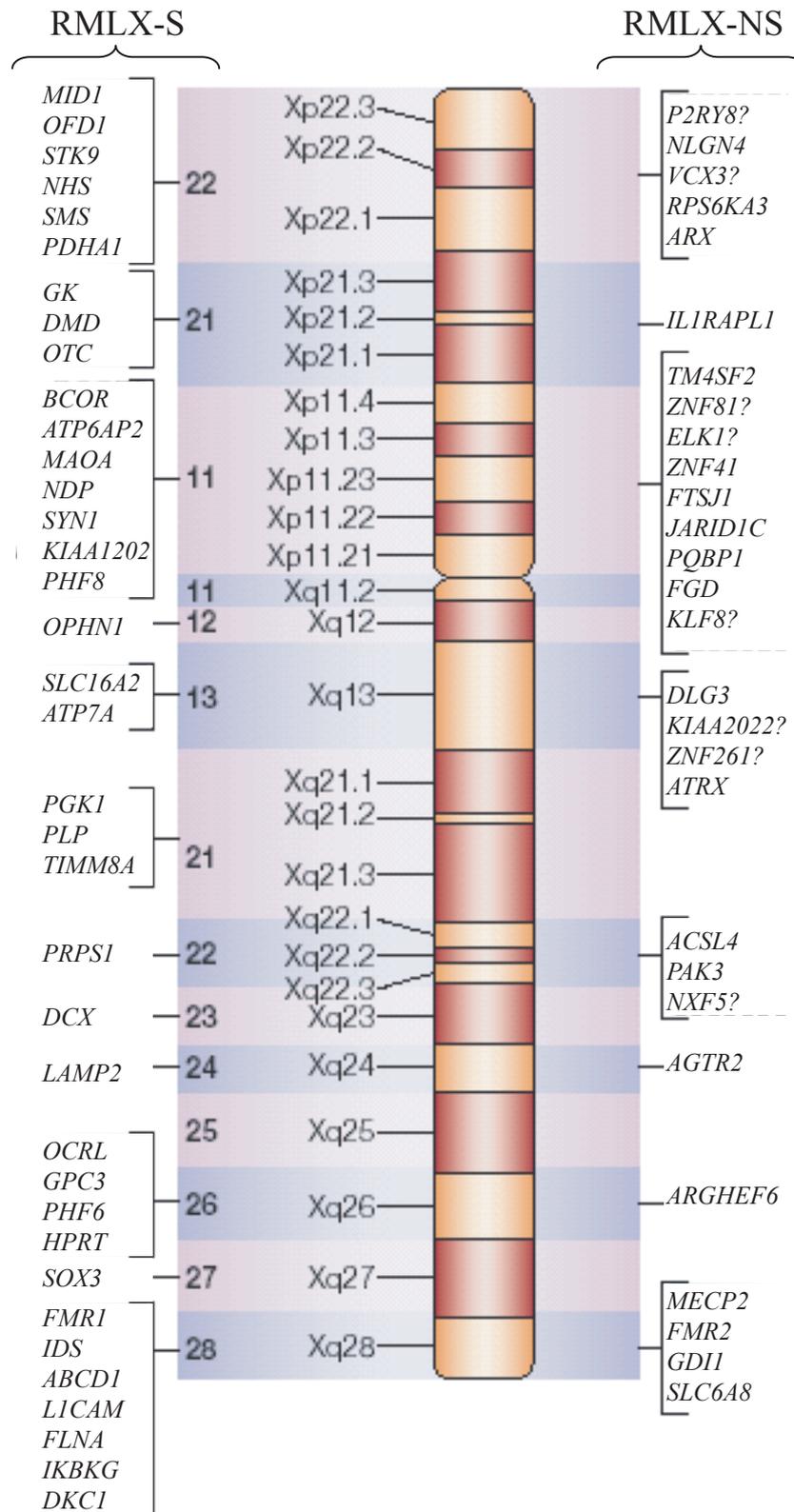


Figure 3. Répartition des gènes impliqués dans des retards mentaux liés à l'X (RMLX) le long de l'idéogramme du chromosome X.

Les gènes impliqués dans des RMLX syndromiques (RMLX-S) sont indiqués à gauche, ceux impliqués dans des formes non syndromiques (RMLX-NS) sont reportés à droite. Les points d'interrogation indiquent les gènes candidats potentiels mais dont le rôle dans la survenue de RMLX reste à confirmer. Adapté de *Ropers, 2005*.

2.3) Prévalence des retards mentaux

A partir des critères décrits précédemment, on estime que 1 à 3% de la population mondiale souffre de déficience intellectuelle, légère dans les deux tiers des cas (source : site web de l’OMS). La prévalence est plus forte dans les pays en voie de développement, en raison du plus fort taux d’accidents traumatiques périnataux et du risque infectieux plus élevé pendant la petite enfance (source : site web de l’OMS).

2.4) Classification des retards mentaux liés à l’X

a) Définition

Les retards mentaux liés à l’X (RMLX) sont des retards mentaux d’origine génétique, pour lesquels le gène incriminé est localisé sur le chromosome X (cf. Figure 3) (voir (Chelly and Mandel 2001) et (Ropers and Hamel 2005) pour revue). Ces RMLX sont supposés expliquer le déséquilibre du sexe ratio des patients atteints de déficience intellectuelle, qui varie de 1,3 à 1,9 hommes pour une femme selon les données épidémiologiques.

On distingue deux types de RMLX, en fonction de l’association d’autres troubles au retard mental :

- Les RMLX sont dits non syndromiques (RMLX-NS) ou aspécifiques, lorsque le seul symptôme cliniquement observable est un retard mental non évolutif. Le consortium européen «European XLMR Consortium» estime que la fréquence cumulée de RMLX-NS correspond à environ une naissance masculine sur 600. Ce groupe représenterait deux tiers des RMLX, même si son importance relative diminue au fur et à mesure de la découverte de critères diagnostiques de plus en plus pointus (Ropers and Hamel 2005).
- Les RMLX sont dits syndromiques (RMLX-S) ou spécifiques, lorsque des anomalies morphologiques, anatomiques et/ou biochimiques sont associées au retard mental.

b) Retards mentaux liés à l’X non syndromiques (RMLX-NS)

Identification des gènes responsables de RMLX-NS

La détermination des causes génétiques des RMLX-NS est compliquée par la difficulté à regrouper les familles atteintes d’un même type de retard mental, en l’absence d’autres symptômes de référence (Ropers and Hamel 2005). Ainsi, les analyses de liaison

GENE	FONCTION DE LA PROTEINE
<i>ARX*</i>	Facteur de transcription
<i>FMR2</i>	Régulation de la transcription, rôle possible dans la mémoire à long terme et la plasticité synaptique
<i>JARIDIC*</i>	Remodelage de la chromatine
<i>ZNF41</i>	Régulation de la transcription par remodelage de la chromatine
<i>MECP2*</i>	Répression de la transcription de gènes neuronaux
<i>RSK2*</i>	Sérine-thréonine kinase, responsable de la phosphorylation du facteur de transcription CREB
<i>XNP/ATRX*</i>	ADN hélicase : remodelage de la chromatine
<i>ARGHEF6</i>	Médiateur de la voie des intégrines, responsable de l'activation de Rac1 et Cdc42
<i>FGDI*</i>	Rho GEF (Guanine Exchange Factor) : réorganisation du cytosquelette d'actine
<i>PAK3</i>	Contrôle de la dynamique du cytosquelette d'actine
<i>TM4SF2</i>	Modulation de la voie des intégrines
<i>ACSL4</i>	Synthèse des acides gras à longues chaînes : rôle possible dans la fabrication et le recyclage des membranes
<i>GDI1</i>	Régulation des stocks de Rab3 et Rab4, rôle probable dans la maturation des vésicules synaptiques
<i>ILIRAPL</i>	Régulation de l'exocytose de granules à cœur dense
<i>AGTR2</i>	Récepteur à l'angiotensine de type 2
<i>DLG3</i>	Protéine post-synaptique de la voie des récepteurs NMDA au glutamate
<i>FTSJ1</i>	Régulation de la traduction par modulation du positionnement du complexe aminoacyl-ARNt
<i>NLGN4</i>	Protéine d'adhésion cellulaire des membranes post-synaptiques : induction de la formation de terminaison présynaptique
<i>PQBPI*</i>	Epissage de l'ARN
<i>SLC6A8*</i>	Transport de la créatine

Tableau 1. Causes génétiques des formes non syndromiques de retard mentaux liés à l’X connues à ce jour.

Les trois grands groupes fonctionnels, correspondant aux gènes jouant un rôle dans la transcription, dans l'organisation du cytosquelette d'actine et dans les flux membranaires sont indiqués respectivement en bleu, en vert et en jaune. Les gènes ne faisant pas partie de ces trois groupes sont indiqués en orangé. Les astérisques indiquent les gènes également impliqués dans des formes syndromiques de retards mentaux.

réalisées sur plus de 70 familles ont conduit à l'identification de plus de 10 régions non chevauchantes, souvent larges et contenant chacune de nombreux gènes candidats. Le recoupement des analyses de liaison issues de familles différentes est donc extrêmement complexe, y compris lorsque la région identifiée est identique, car les mutations à l'origine de la pathologie peuvent se trouver dans des gènes différents.

Néanmoins, le regroupement des données cliniques et moléculaires provenant de larges pool de familles dans le cadre de consortium a permis l'identification de 20 gènes à ce jour (cf. Figure 3) (Ropers and Hamel 2005). Dans la plupart des cas, ces gènes ont été identifiés grâce à l'analyse des points de cassure chez des patients présentant des translocations équilibrées impliquant le chromosome X ou via la caractérisation de microdélétions du chromosome X. La recherche de mutations dans ces gènes candidats au sein de larges cohortes de patients a confirmé leur implication dans la survenue de RMLX-NS (Ropers and Hamel 2005). Le criblage systématique à grande échelle de régions chromosomiques candidates, identifiées par analyse de liaison, a également été récemment entrepris. L'application de cette stratégie aux 50 gènes de la région candidate Xp11 exprimés dans le cerveau a ainsi permis l'identification de cinq nouveaux gènes de RMLX-NS.

Classification fonctionnelle des gènes responsables de RMLX-NS

Le Tableau 1 présente la liste des gènes de RMLX-NS identifiés à ce jour, ainsi que leur fonction (Ropers and Hamel 2005).

Si quelques uns des gènes identifiés jouent des rôles marginaux dans le contrôle de l'épissage (*PQBPI*) ou de la traduction (*FTSJI*), la plupart peuvent être répartis en trois groupes fonctionnels :

- le premier groupe code des protéines impliquées dans la régulation de l'expression génique. C'est le cas des facteurs transcriptionnels *FMR2* et *ARX*, mais aussi des protéines *RSK2*, *MeCP2*, *XNP*, *ZNF41* et *JARID1C* qui contrôlent le remodelage de la chromatine.
- le second groupe comprend des gènes impliqués dans la dynamique des membranes synaptiques, tels que *GDI1*, *ILIRAPL* ou *ACSL4* qui contrôlent respectivement la formation des vésicules synaptiques, l'exocytose de vésicules denses, la formation et le renouvellement des membranes lipidiques.
- enfin, le troisième groupe comporte des gènes impliqués dans la mise en place et la réorganisation du cytosquelette, et notamment du cytosquelette d'actine. C'est le cas de

GENE	SYNDROME ASSOCIE	FONCTION DE LA PROTEINE
<i>ARX</i>	Syndrome de West/Partington/Proud Lissencéphalie liée à l’X	Facteur de transcription
<i>ATP6AP2</i>	Epilepsie	Récepteur à la rénine activant les protéines ERK1/2
<i>BCOR</i>	Microphthalmie de Lenz	Répression de la transcription par remodelage de la chromatine
<i>CDKL5</i>	Spasmes infantiles	Sérine-thréonine kinase : remodelage de la chromatine
<i>GK</i>	Déficiences en Glycérol kinase	Translocation nucléaire du complexe récepteur-gluocorticoïdes
<i>JARIDIC</i>	Microcéphalie/Spasticité/Epilepsie	Facteur de transcription : remodelage de la chromatine
<i>MECP2</i>	Syndrome de Rett	Remodelage de la chromatine et répression de la transcription de gènes neuronaux
<i>PHF6</i>	Syndrome de Borjeson-Forssman-Lehman	Protéine à doigt de zinc : régulation de la transcription
<i>PHF8</i>	Syndrome de Siderius-Hamel	Protéine à doigt de zinc : régulation de la transcription
<i>RSK2</i>	Syndrome de Coffin-Lowry	Sérine-thréonine kinase du facteur de transcription CREB
<i>XNP/ATRX</i>	Syndrome de Carpenter-Waziri/Chudley-Lowry-Hoar/Holmes-Gang/Juberg-Marsidi/Smith-Fineman-Myers et thalassémie alpha liée à l’X	ADN hélicase : remodelage de la chromatine
<i>FGD1</i>	Syndrome d’Aarskog-Scott	Rho GEF (Guanine Exchange Factor) : réorganisation du cytosquelette d’actine
<i>FLNA</i>	Syndrome oto-palato-digital	Liaison à l’actine : mise en place dans la formation des neurites et des épines dendritiques
<i>KIAA1202</i>	Syndrome de Stocco dos Santos	Rôle putatif dans le remodelage du cytosquelette d’actine
<i>OPHN1</i>	Syndrome d’hypoplasie/dysplasie cérébelleuse	Rho GAP (GTPases Activating Protein)
<i>FMRI</i>	Syndrome de l’X fragile	Régulation du transport et/ou de la traduction d’ARNm
<i>MAOA</i>	Retard mental dû à une déficience en monoamines oxydase A	Métabolisme de la sérotonine
<i>PQBPI</i>	Syndrome de Renpenning/Golabi-Ito-Hall/Sutherland-Haan/cerebro-palatocardiaque d’Hamel	Epissage de l’ARN
<i>SLC16A</i>	Anomalies thyroïdiennes et neurologiques	Transporteur T3
<i>SLC6A8</i>	Syndrome de déficience en créatine	Transport de la créatine
<i>SMS</i>	Snyder-Robinson Syndrome	Synthèse de la spermine
<i>SYN1</i>	Macrocéphalie/Epilepsie	Protéine associée aux vésicules synaptiques

Tableau 2. Principales formes syndromiques répertoriées de retard mentaux liés à l’X.

Les deux grands groupes fonctionnels, correspondant aux gènes jouant un rôle dans la transcription et à ceux contrôlant l’organisation du cytosquelette d’actine sont indiqués respectivement en bleu et en vert. Les gènes ne faisant pas partie de ces deux groupes sont indiqués en orange.

l'effecteur de Rho GTPases PAK3, des protéines ARHGEF6 et FGD1, ou de TM4SF2, qui module la signalisation dépendante des intégrines.

c) Retards mentaux liés à l'X syndromiques (RMLX-S)

Principaux types de retards mentaux syndromiques

Si les méthodes d'isolement de gènes causatifs de RMLX syndromiques et non syndromiques sont similaires, leur identification est moins difficile dans le premier cas, en raison de la possibilité de regrouper les familles atteintes d'un même syndrome. Cent quarante formes différentes de RMLX-S sont répertoriées à ce jour (Ropers and Hamel 2005). Pour 66 d'entre elles, le gène déficient est identifié et une région chromosomique précise est assignée à 50 autres.

Le Tableau 2 résume les principaux gènes associés à des RMLX-S, ainsi que leur fonction cellulaire. Comme dans le cas des RMLX-NS, un grand nombre de ces gènes sont impliqués dans la régulation de l'expression génique (*GK*, *RSK2*, *MeCP2*, *XNP*, *ARX*, *CDKL5*, *PHF6* et *8*, *BCOR*, *ATP6AP2*, *JARIDIC1*) ou dans la mise en place et la réorganisation du cytosquelette (*FGD1*, *FLNA*, *OPHN1*, *KIAA1202*). L'existence d'autres symptômes en dehors du RM suggère cependant que la fonction de ces gènes ne se limite pas à la régulation de la neurogenèse ou du fonctionnement cérébral.

Importance du syndrome de l'X fragile

Le syndrome de l'X fragile est le premier RMLX-S à avoir été identifié et expliqué génétiquement. Il constitue la cause la plus importante de RMLX-S. A lui seul, il explique 2 à 3% des retards mentaux chez les hommes et 1% chez les femmes.

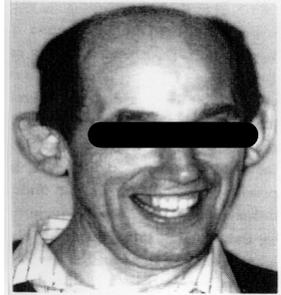
	<p>Retard Mental</p>
	<p>Troubles du comportement</p>
	<ul style="list-style-type: none"> - <u>Hyperactivité</u> - Tics, stéréotypies - Anxiété - Troubles du langage - Autisme - Troubles de concentration - <i>Timidité</i> - <i>Tendance dépressive</i>
	<p>Dysmorphie faciale</p>
	<ul style="list-style-type: none"> - Front large - Visage allongé - Oreilles proéminentes - Strabisme
	<p>Hypotonie</p>
	<p>Atteinte du tissu conjonctif</p>
	<ul style="list-style-type: none"> - Souplesse articulaire - Prolapsus de la valve mitrale
	<p>Problèmes orthopédiques :</p>
	<ul style="list-style-type: none"> - Pieds plats - Scoliose
	<p>Otite</p>
	<p><u>Macroorchidie</u></p>

Figure 4. Principaux signes cliniques du syndrome de l’X fragile.

Les symptômes plus caractéristiques des filles et des garçons sont respectivement indiqués en *italique* et souligné.

3) Caractéristiques phénotypiques du syndrome de l’X fragile

3.1) Tableau clinique

L’ensemble des symptômes associés au syndrome de l’X fragile est résumé sur la Figure 4.

a) Les troubles cognitifs

La sévérité du retard mental associé au syndrome de l’X fragile varie d’un individu à l’autre mais également selon le sexe. La plupart des patients masculins souffrent d’un retard mental modéré et possèdent un QI situé autour de 50. Cependant, certains patients présentent un retard mental profond, alors que pour 10 à 15%, le retard mental est au contraire qualifié de léger (Hagerman and Cronister 1996). La sévérité du retard mental est globalement moindre chez les femmes : 30 à 50% des patientes souffrent d’un retard mental léger, et les 50 à 70% restant présentent un QI considéré comme limite, puisque compris entre 70 et 85 (Hagerman and Cronister 1996). Dans la majorité des cas, la déficience intellectuelle apparaît précocement, et peut être détectée dès l’âge de 3 ans à l’aide de tests appropriés.

Les principales difficultés résident dans la mise en jeu de raisonnements abstraits, qu’il s’agisse de traiter des données de manière séquentielle, d’établir des relations de cause à effet ou encore de résoudre des problèmes arithmétiques (Hagerman 1987). L’augmentation de la part des exercices utilisant ces aptitudes au fur et à mesure des années explique la baisse progressive des performances des patients lors de la réalisation de tests de QI. La coordination oculomotrice est également affectée, ce qui rend difficile l’apprentissage de l’écriture et même la réalisation de dessins. En revanche, les tests réalisés à partir de données ayant une signification concrète, tels que la reconstruction d’une photographie à partir d’un puzzle, et utilisant les capacités visuelles de perception et d’appariement sont mieux réussis. De même, la richesse du vocabulaire et les capacités de mémorisation, s’agissant notamment des domaines d’intérêt du patient, sont en général meilleures que ne le laisserait prévoir le résultat du QI (source : site web «The National Fragile X Foundation»).

Dans la vie quotidienne, l'acquisition d'une certaine autonomie est également retardée et implique, de la part des parents, la répétition séquentielle des mêmes gestes quotidiennement (Source : site web «The National Fragile X Foundation»).

b) Les troubles comportementaux

Les troubles comportementaux sont généralement marqués chez les patients atteints du syndrome de l'X fragile et constituent de ce fait un critère diagnostique majeur.

80 à 90% des jeunes garçons atteints sont hyperactifs, impulsifs et présentent des bouffées d'agressivité en cas de stress. La plupart développent également des tics et des stéréotypies motrices, consistant par exemple à agiter et à mordre leurs mains ou à mâchonner leurs vêtements. Ces manifestations pourraient être une réponse au sentiment d'anxiété qui les habite. Cette angoisse se traduit également par une faible capacité d'adaptation et par une inquiétude face au changement (Hagerman and Hagerman 2002).

Certaines des caractéristiques comportementales du syndrome de l'X fragile sont communes à celles observées en cas d'autisme : les patients ont un contact visuel fuyant, évitent les regards et refusent les contacts physiques (Hagerman and Hagerman 2002). Un diagnostic d'autisme est d'ailleurs réellement posé pour 15 à 33% des patients. Réciproquement, on estime que 5 à 7% des individus autistes seraient atteints du syndrome de l'X fragile (source : site web «Association Nationale du syndrome de l'X fragile »).

Des troubles de l'attention et une faible capacité de concentration renforcent les problèmes d'apprentissage. Les patients présentent également un retard d'acquisition du langage associé à différents troubles, tels que des dysrythmies, des difficultés d'articulation, ou des tendances à l'écholalie (Hagerman and Hagerman 2002).

La tendance à l'hyperactivité est moins marquée chez les filles, mais celles-ci souffrent fréquemment des troubles de l'attention et du langage décrits précédemment. Elles présentent souvent des difficultés relationnelles, qui se manifestent par des angoisses, une timidité et même une tendance dépressive (Hagerman and Hagerman 2002).

c) Autres troubles

A la naissance, les nouveaux-nés atteints du syndrome de l'X fragile ne présentent pas de symptômes décelables permettant l'établissement d'un diagnostic. Le diagnostic est d'ailleurs rarement posé avant l'âge d'un an (Committee on Genetics of American Academy of Pediatrics 1996). Les signes cliniques deviennent plus caractéristiques dès la deuxième année, et se manifestent notamment par une hypotonie, une hyperlaxité ligamentaire, un affaissement de la voûte plantaire et éventuellement l'apparition d'un strabisme.

Le tableau clinique se précise ensuite progressivement au cours des années et comporte (Hagerman and Cronister 1996):

- une dysmorphie faciale, visible dans environ 64% des cas (cf. Figure 3). Les patients peuvent présenter un visage allongé, un front haut, de grandes oreilles proéminentes, des lèvres minces, et/ou une mâchoire prognathe avec un palais étroit. Enfin, le périmètre crânien est souvent supérieur à la moyenne, notamment à la naissance.
- une atteinte des tissus conjonctifs, qui se manifeste par une hyperlaxité ligamentaire chez 67 % des patients. Cette grande souplesse articulaire est notamment repérable au niveau des articulations métacarpophalangiennes chez les enfants de moins de onze ans. Cette atteinte pourrait par ailleurs expliquer le prolapsus de la valve mitrale observé chez 35% des patients.
- une macrorchidie chez 70% des garçons après la puberté. Ce symptôme, défini par un volume testiculaire supérieur à 30 ml, est, historiquement, le premier à avoir été associé au syndrome de l'X fragile et a permis son rattachement au groupe des RMLX-S. Il serait provoqué par des œdèmes ou par une augmentation de la masse du tissu interstitiel.
- des problèmes orthopédiques affectant 21% des patients, associant affaissement de la voûte plantaire et scoliose.
- des otites moyennes à répétition chez 85% des patients (Hagerman 1987).
- des crises épileptiques chez 22% des patients.

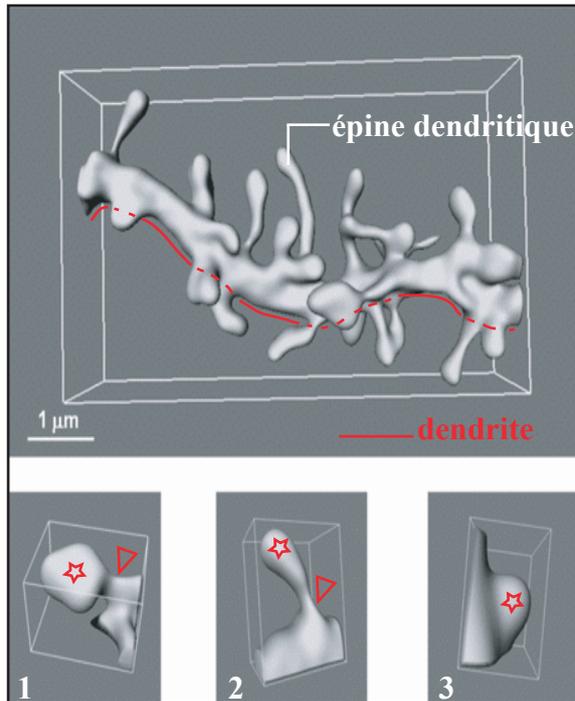
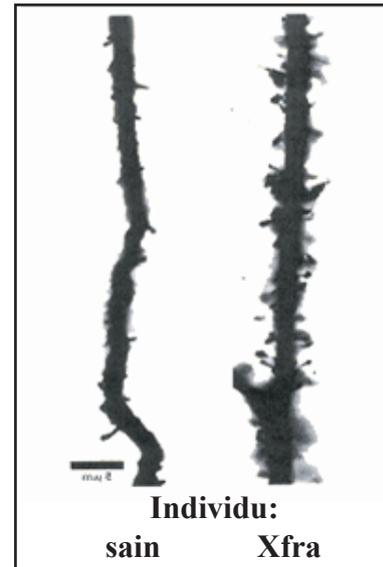
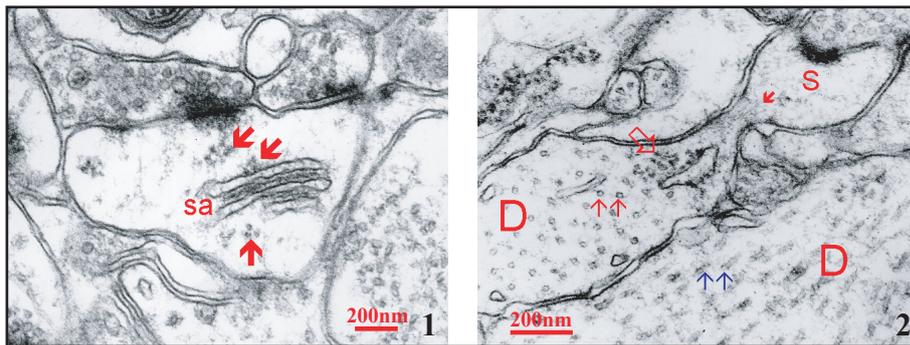
A.**C.****B.**

Figure 5. Epines dendritiques: morphologie, ultrastructure et anomalies dans le syndrome de l'X fragile.

A. Reconstitution tridimensionnelle d'une portion de dendrite et de ses épines, à partir d'observations en microscopie électronique. Les principaux types morphologiques d'épines sont indiqués: 1) en forme de champignon, 2) fine, 3) acaule. Les étoiles et les flèches indiquent respectivement les zones correspondant à la tête et au cou des épines. Adapté de *McKinney, 2005*.

B. Ultrastructure d'épines dendritiques, observées en microscopie électronique, montrant la présence: 1) de polyribosomes (flèches), dont un associé au réseau de réticulum endoplasmique (sa) dans la tête d'une épine, 2) de polyribosomes (flèche pleine) et de filaments d'actine (petite flèche) dans le cou d'une épine, les doubles flèches indiquant la présence de microtubules dans les dendrites (D). Photos adaptées de *Synapse web*.

C. Morphologie et densité des épines dendritiques chez un patient atteint du syndrome de l'X fragile (Xfra) et chez un individu sain, le long d'un dendrite coloré selon la méthode d'imprégnation de Golgi. Adapté de *Irwin et al., 2000*.

3.2) Caractéristiques anatomopathologiques

a) Atteintes cérébrales

Echelle anatomique

Plusieurs anomalies ont été décrites à l'échelle anatomique, dont une réduction de la taille du vermis inférieur et du gyrus temporal supérieur (Reiss, Freund et al. 1991), et une augmentation de la taille du 4^{ème} ventricule et de l'hippocampe (Reiss, Lee et al. 1994). Au niveau histologique, des altérations de la voie axonale fronto-striatale et des voies sensorimotrices pariétales ont été décrites chez des patientes (Barnea-Goraly, Eliez et al. 2003) mais restent à confirmer. L'existence de relations de cause à effet entre ces anomalies et la survenue du retard mental n'est pas démontrée.

Echelle cellulaire : les épines dendritiques

Des observations réalisées sur des échantillons issus d'autopsie ont permis d'identifier des anomalies quantitatives et qualitatives de contacts synaptiques particuliers, les épines dendritiques, dans le cerveau de patients atteints du syndrome de l'X fragile (cf. Figure 5C) (Hinton, Brown et al. 1991).

Les épines dendritiques sont de petites protrusions émergeant des dendrites de plusieurs types de neurones du système nerveux central, tels que les neurones pyramidaux du cortex et de l'hippocampe ou les cellules de Purkinje du cervelet. Ces épines dendritiques furent observées pour la première fois par Ramon y Cajal, qui postula qu'il s'agissait de contacts synaptiques entre axones et dendrites, impliqués dans les phénomènes d'apprentissage (Tashiro and Yuste 2003). Les travaux de microscopie électronique de Gray en 1959 apportèrent la preuve de la nature synaptique des épines dendritiques, qui sont actuellement considérées comme les principales synapses excitatrices du système nerveux central (Tashiro and Yuste 2003).

Une épine dendritique comporte classiquement une tête sphérique de 0,5 à 1,5 µm de diamètre et un cou étroit de diamètre inférieur à 0,5 µm la raccordant à la dendrite. Cependant, leur morphologie est extrêmement variable et on en distinguera trois types principaux (cf. Figure 5A) (Tashiro and Yuste 2003):

- les épines fines, pourvues d'un long cou et d'une tête de faible diamètre.

- les épines en forme de champignon, possédant au contraire une tête de grand diamètre.
- les épines acaules, dépourvues de cou.

Dans tous les cas, les épines dendritiques constituent des micro-compartiments, au sein desquels l'ouverture de quelques récepteurs suffit à déclencher les modifications biochimiques nécessaires à la transduction du signal (Hering and Sheng 2001).

Les épines dendritiques contiennent des récepteurs membranaires aux neurotransmetteurs, des canaux ioniques mais également des polyribosomes et l'ensemble de la machinerie nécessaire à la traduction locale d'ARNm (cf. Figure 5B) (Tashiro and Yuste 2003). Contrairement à celui des dendrites, principalement constitué de microtubules, le cytosquelette des épines dendritiques comporte essentiellement des filaments d'actine (Matus 2000). Ces microfilaments forment des faisceaux parallèles au niveau du cou et de la tête des épines, et s'organisent en un réseau dense sous la membrane plasmique, notamment au niveau de la densité post-synaptique (PSD). Les épines dendritiques sont des structures labiles, dont la morphologie évolue au cours du développement -jusqu'à 50% des épines dendritiques d'un neurone peuvent être modifiées en quelques secondes à certaines périodes du développement- et lors des phénomènes de renforcement synaptique (Parnass, Tashiro et al. 2000; Bonhoeffer and Yuste 2002). La morphologie de ces contacts synaptiques reflète donc leurs caractéristiques fonctionnelles. Les changements de forme des épines dendritiques repose sur la réorganisation dynamique du réseau d'actine (cf. Figure 5B) (Matus 2000). En effet, la morphologie des épines dendritiques ne change plus lorsque la polymérisation de l'actine est inhibée (Dunaevsky, Tashiro et al. 1999). De plus, l'utilisation d'actine marquée à la GFP (Green Fluorescent Protein) a permis de suivre directement la restructuration du cytosquelette d'actine à l'origine du remodelage des épines dendritiques (Fischer, Kaech et al. 1998)

Deux types de défauts ont été observés dans le cerveau des patients atteints du syndrome de l'X fragile (cf. Figure 5C) (Hinton, Brown et al. 1991):

- la présence d'épines dendritiques anormalement fines et tortueuses. Cette morphologie rappelle celle des filopodes, particulièrement abondants pendant la période post-natale. Ces filopodes évoluent pour aboutir à la morphologie classique des épines dendritiques au cours de la période de maturation (Fiala, Feinberg et al. 1998), quoique la transition inverse ait été mise en évidence *in vivo*, limitant ainsi l'établissement d'une corrélation

entre la morphologie des épines et le stade du développement (Parnass, Tashiro et al. 2000).

- une augmentation de la densité des épines le long des dendrites. Là encore, la présence d'épines surnuméraires est réminiscente des premiers stades de la synaptogenèse, au cours de laquelle un excès de contacts synaptiques est mis en place puis éliminé en fonction de leur utilisation (LeVay, Wiesel et al. 1980).

Ces anomalies pourraient être à l'origine de dysfonctionnements de la transmission synaptique et expliquer ainsi l'apparition d'un retard mental et de troubles comportementaux chez les patients. De tels défauts dans la structure et/ou le nombre des épines dendritiques ont d'ailleurs été observés dans le cerveau de patients atteints d'autres formes de retards mentaux, et notamment dans le cas des syndromes de Down, de Patau et de Rett (Kaufmann and Moser 2000). Ces anomalies pourraient donc être un dénominateur commun à la survenue de déficiences intellectuelles.

3.3) Variabilité phénotypique et prévalence du syndrome

a) Variabilité phénotypique

La sévérité moindre des symptômes associés au syndrome de l'X fragile chez les femmes s'explique par la présence d'un chromosome X normal en plus du chromosome X porteur du site fragile. Dans chaque cellule, les gènes d'un seul des deux chromosomes sont exprimés, l'autre chromosome étant inactivé. L'inactivation d'un des deux chromosomes est aléatoire. Lorsque le chromosome fragile est inactivé, la cellule fonctionne normalement, puisqu'elle exprime l'ensemble des gènes à partir de la copie normale du chromosome X. La sévérité du phénotype est donc inversement proportionnelle au nombre de cellules dans lesquelles le chromosome fragile est inactivé. Cet état de fait pourrait être renforcé par une inactivation préférentielle du chromosome X fragile dans certaines cellules : une étude a démontré une inactivation préférentielle des allèles mutés dans les cellules sanguines de patientes, suggérant un processus de sélection qui favorise les allèles exprimant le gène normal (Rousseau, Heitz et al. 1991).

Au sein d'un même sexe, la gravité du retard mental et des symptômes associés varie également. D'autre part, deux patients de même QI ne présentent pas nécessairement les mêmes troubles associés, qu'il s'agisse des symptômes physiques ou comportementaux. Cette variabilité s'explique en partie par le mécanisme mutationnel à l'œuvre dans le syndrome de l'X fragile, décrit au paragraphe II.1.5.

b) Conséquences de la variabilité phénotypique sur l'estimation de la prévalence

Compte tenu de la variabilité des symptômes, l'estimation de la prévalence du syndrome de l'X fragile est délicate et souvent variable d'une étude à l'autre. Les premières estimations basées sur la méthode cytogénétique de visualisation du site fragile présentèrent deux biais d'effets opposés : d'un côté, cette méthode ne permettait pas d'identifier tous les porteurs de la mutation, mais de l'autre, la présence d'un autre site fragile en Xq28 (FRAXE) conduisait à une surestimation de la prévalence (Sutherland and Baker 1992). L'extension des tests de dépistage et l'utilisation des analyses de séquence a permis une évaluation plus fiable de l'incidence : on estime actuellement que le syndrome de l'X fragile atteint 1 garçon sur 4000 et 1 fille sur 6500 à 8000 (Murray, Youings et al. 1996; Turner, Webb et al. 1996; Imbert, Feng et al. 1998).

II. Le Syndrome de l'X Fragile : des causes génétiques aux causes moléculaires

1) Le syndrome de l'X fragile : une maladie monogénique à expansion de triplets nucléotidiques

1.1) Identification du gène *FMRI* au niveau du site fragile

Dès l'identification du site fragile en 1969, des travaux de cartographie furent entrepris afin de préciser sa localisation et d'identifier le ou les gène(s) muté(s) situé(s) dans cette région. La combinaison d'études cytogénétiques et d'analyses de liaison a permis de positionner le site fragile en Xq27.3 (Krawczun, Jenkins et al. 1985) et de le flanquer notamment de deux marqueurs génétiques, le gène codant l'hypoxanthine phosphoribosyl

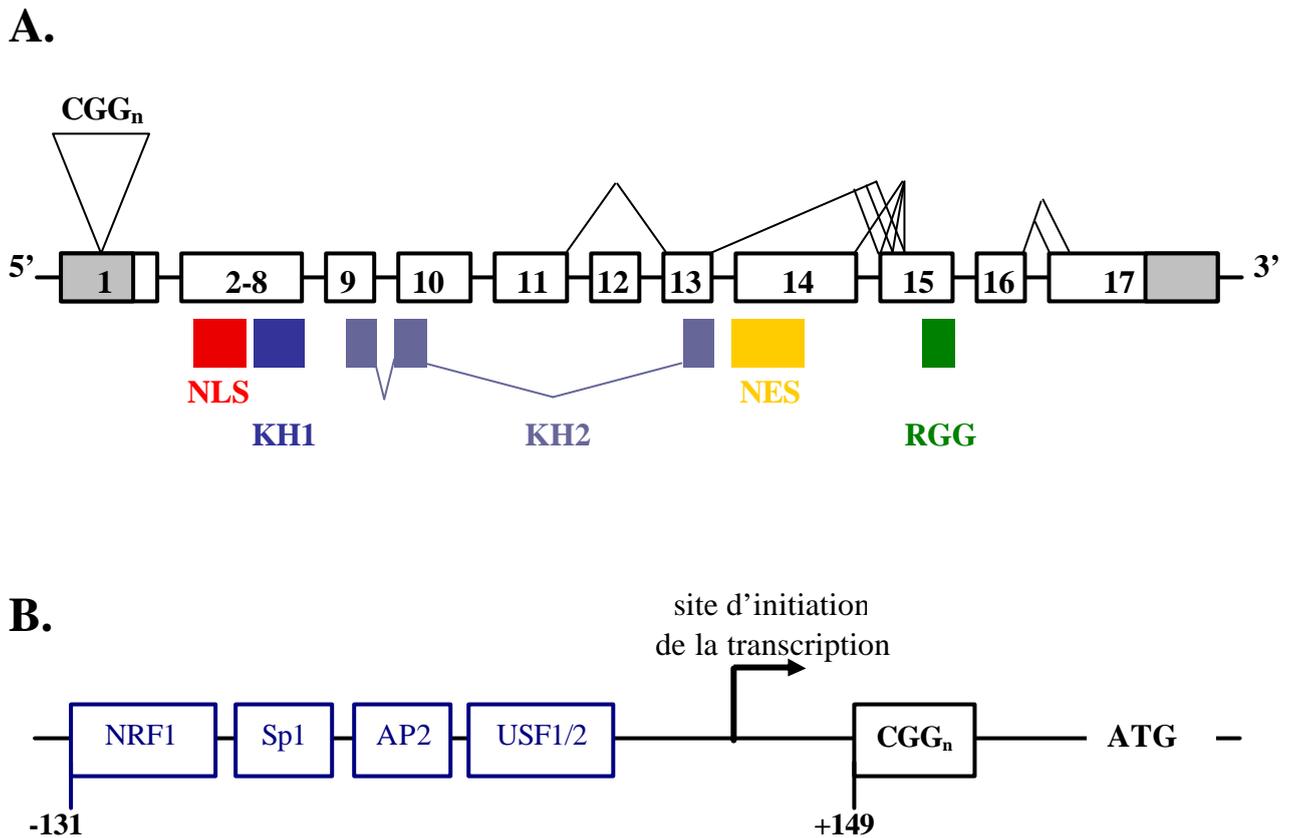


Figure 6. Organisation du gène *FMRI* humain et de son promoteur.

A. Structure du gène *FMRI* : les exons sont représentés par des rectangles, les introns par des traits. Les régions 5' et 3'UTR correspondent aux aires grisées. Les sites d'épissage alternatifs sont schématisés au-dessus du gène. Les positions des domaines fonctionnels sont indiquées en dessous par des rectangles de couleurs. NLS : Signal de Localisation Nucléaire ; KH1/KH2 : K Homology 1/2 ; NES : Signal d'Export Nucléaire ; RGG : boîte arginine-glycine-glycine.

B. Structure du promoteur : les sites de fixation des facteurs NRF1, Sp1, AP2 α , USF1 et USF2 sont indiqués et positionnés relativement aux triplets CGG et au codon initiateur.

Espèces	Pourcentage d'identité relativement aux séquences humaines :					
	de nucléotides			d'acides aminés		
	<i>FMRI</i>	<i>G6PD</i>	<i>α-globine</i>	FMRP	<i>G6PD</i>	<i>α-globine</i>
<i>Canis familiaris</i>	90.6	87.0		97.4	92.8	
<i>Mus musculus</i>	95.1	87.3	80.8	96.9	93.6	85.9
<i>Rattus norvegicus</i>	94.7	87.0	78.9	97.2	94.4	78.2
<i>Gallus gallus</i>	94.3	70.0	70.4	86.7	70.7	73.7

Tableau 3. Conservation interspécifique du gène *FMRI* par rapport aux gènes *G6PD* (Glucose 6 Phosphate Déshydrogénase) et *α -globine*.

Source : NCBI-Homologene.

transférase (HPRT), localisé en Xq26, et celui codant la glucose 6-phosphate déshydrogénase (G6PD), localisé en Xq28 (Warren, Zhang et al. 1987).

Ces deux marqueurs furent utilisés pour créer une série de cellules hybrides permettant d'isoler des fragments d'ADN correspondant au site fragile (Warren, Zhang et al. 1987). Ces cellules ont été établies par fusion de cellules de hamster, déficientes en HPRT et G6PD, et de lymphocytes d'un patient atteint du syndrome de l'X fragile. La technique utilisée a consisté à traiter les cellules hybrides contenant uniquement le chromosome X humain au thymidylate, de manière à induire des points de cassure préférentiellement au niveau du site fragile. L'analyse de la ségrégation des marqueurs HPRT et G6PD a alors permis de sélectionner les cellules dans lesquelles la translocation entre chromosome humain et chromosomes de rongeurs avait effectivement eu lieu au niveau du site FRAXA, que le fragment transloqué corresponde à sa partie proximale (Xpter→Xq27.3) ou distale (Xq27.3→Xqter). Ces hybrides ont ensuite été utilisés pour isoler des clones YACs contenant le site fragile (Verkerk, Pieretti et al. 1991). Le criblage d'une banque d'ADNc de cerveau fœtal humain par les fragments d'ADN sélectionnés dans l'étape précédente a abouti à l'identification de deux ADNc, correspondants à l'intégralité de la séquence codante du gène *FMRI* (*Fragile X Mental Retardation 1*) (Verkerk, Pieretti et al. 1991).

1.2) Structure du gène *FMRI*

Le gène *FMRI* comporte 17 exons et s'étend sur 38 kb au niveau de la région Xq27.3 (Eichler, Richards et al. 1993). Le transcrit complet de *FMRI* mesure 3,9 kb: 0,2 kb correspond à la partie 5'UTR (Untranslated Region) non traduite, 1,9 kb à la séquence codante et 1,8 kb à la partie 3' UTR. Des transcrits additionnels sont produits par différents épisodes d'épissage alternatif, affectant la présence des exons 12 et 14, et le choix des sites accepteurs des exons 15 et 17 (cf. Figure 6A) (Ashley, Sutcliffe et al. 1993; Verkerk, de Graaff et al. 1993).

1.3) Conservation interspécifique du gène *FMRI*

Des orthologues du gène *FMRI* ont été identifiés chez la souris (Ashley, Sutcliffe et al. 1993), le poulet (Price, Zhang et al. 1996), le xénope (Siomi, Siomi et al. 1995), le

poisson-zèbre (van't Padje, Engels et al. 2005) et la drosophile (Wan, Dockendorff et al. 2000). Aucun orthologue n'a, à ce jour, été clairement mis en évidence chez le nématode *Caenorhabditis elegans* (Shtang, Perry et al. 1999). Au contraire, un orthologue de *FMRI* a été découvert chez *Hydractinia echinata*, qui fait partie de l'embranchement des Cnidaires, l'un des embranchements les plus primitifs des Métazoaires (Guduric-Fuchs, Mohrlen et al. 2004).

Le degré de conservation du gène est extrêmement élevé, notamment chez les Vertébrés : les séquences d'acides aminés codées par les gènes de souris, de poulet et de xénope sont identiques respectivement à 97%, 86.7% et 86% à la séquence humaine. Ces scores sont analogues, voire supérieurs, à ceux de gènes codant des protéines de fonction biochimique essentielle, comme la glucose 6-phosphate déshydrogénase (G6PD) ou l' α -globine par exemple (cf. Tableau 3).

1.4) Expression spatio-temporelle du gène *FMRI*

a) Structure du promoteur et régulation de la transcription du gène *FMRI*

La cartographie de la partie 5'UTR du gène *FMRI* a conduit à l'identification de plusieurs sites de fixation putatifs de facteurs transcriptionnels (cf. Figure 6B) (voir (Lim, Booker et al. 2005; Stoyanova and Hoogeveen 2005) pour revue). L'utilisation de la technique dite de l'empreinte et des expériences d'immunoprécipitation de chromatine ont permis de confirmer l'association de quatre de ces facteurs à la région promotrice de *FMRI* :

- NRF1 se lie à une séquence palindromique située à l'extrémité 5' de la région régulatrice.
- Sp1 et AP-2 α peuvent ensuite s'associer au niveau d'éléments GC.
- USF1 et USF2 reconnaissent enfin une boîte E en amont du codon d'initiation.

L'implication de NRF1 et USF1/2 dans l'activation de la transcription de *FMRI* a été confirmée, puisque la mutagenèse de leur site de fixation induit une diminution de l'expression du gène.

L'expression de ces facteurs est précisément régulée au cours du développement : le facteur AP-2 α est, par exemple, abondant au cours du développement embryonnaire et pendant le début de la période postnatale, puis son niveau d'expression diminue ensuite

progressivement (Lim, Booker et al. 2005). L'intervention séquentielle de tels facteurs à différentes périodes du développement, mais également dans différents tissus, pourrait donc expliquer le profil d'expression de *FMRI* au sein de l'organisme (voir paragraphe II.1.4.b et II.1.4.c).

b) Expression du gène *FMRI* au cours du développement

Le profil d'expression de *FMRI* au cours du développement embryonnaire a été étudié par hybridation *in situ* et immunohistochimie sur différents tissus humains et murins. Les résultats issus des hybridations *in situ* sont parfois en contradiction avec ceux obtenus à l'aide des anticorps, en raison, notamment, de l'utilisation de sondes reconnaissant également les ARNm des gènes homologues de *FMRI*, *FXR1* et *FXR2* (*Fragile X Related gene 1/2*, cf. paragraphe II.2.4.b).

Les résultats obtenus permettent néanmoins de définir la dynamique d'expression de *FMRI* au cours du développement :

- chez la souris, *Fmr1* n'est pas exprimé pendant les tous premiers stades du développement embryonnaire, puisque les analyses immunohistochimiques indiquent l'absence de protéine jusqu'au deuxième jour de l'embryogenèse (De Diego Otero, Bakker et al. 2000).
- à partir du 2^{ème} jour et jusqu'au 14^{ème} jour environ, le niveau d'expression du gène augmente progressivement dans tous les tissus murins testés (De Diego Otero, Bakker et al. 2000). Quoique ubiquitaire, l'expression du gène est particulièrement élevée dans les tissus d'origine ectodermique (cerveau, ganglions de la base, épithélium olfactif, placode otique...) et dans les gonades. Des résultats similaires ont été obtenus lors d'hybridations *in situ* réalisées sur des coupes d'embryons humains de 8 et 9 semaines (Abitbol, Menini et al. 1993; Agulhon, Blanchet et al. 1999).
- à partir du 14^{ème} jour chez la souris, le profil d'expression de *Fmr1* devient plus spécifique : le niveau d'expression du gène est toujours élevé dans les gonades, dans les tissus d'origine ectodermique, et dans le cerveau. Il diminue en revanche dans d'autres tissus comme les muscles squelettiques et cardiaques. Cette tendance se poursuit pendant toute la fin de l'embryogenèse et pendant la période néonatale, pour aboutir au profil d'expression observé chez l'adulte (cf. paragraphe II.1.4.c) (De Diego Otero, Bakker et al.

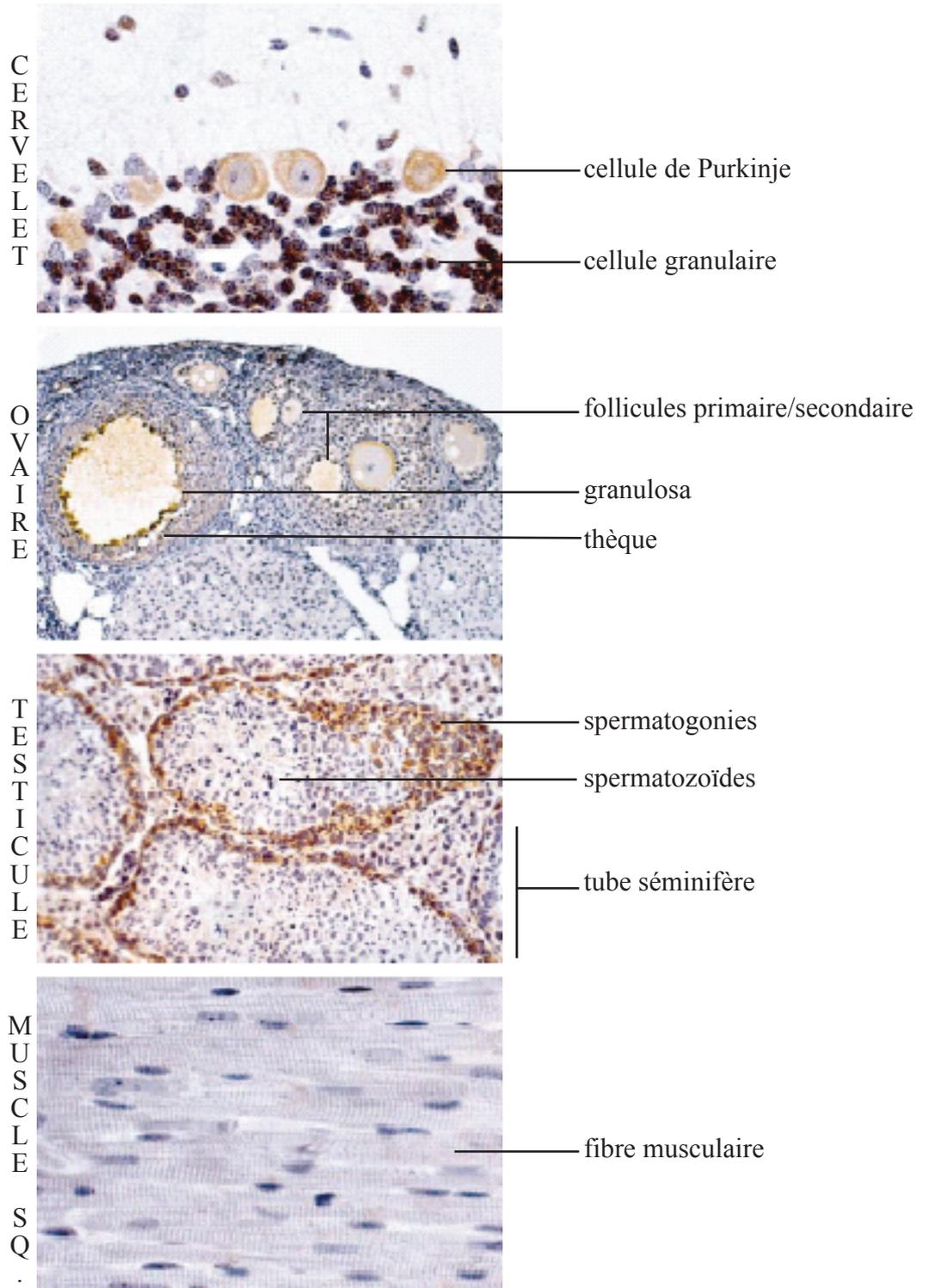


Figure 7. Analyse immunohistochimique de l'expression du gène *Fmr1* dans différents tissus de souris adulte.

Muscle sq.: Muscle squelettique. Adapté de *Bakker et al, 2000*.

2000). Les études réalisées chez l'homme pendant la fin du développement anténatal indiquent que le niveau d'expression de *FMRI* est également élevé dans les testicules (analyse réalisée sur des fœtus de 20 semaines) (Tamanini, Willemsen et al. 1997) et dans le cerveau, notamment dans l'hippocampe et dans le noyau magnocellulaire, deux régions cérébrales impliquées dans la mémorisation (analyse réalisée sur des fœtus de 18 et 25 semaines) (Abitbol, Menini et al. 1993).

c) Expression du gène *FMRI* chez l'adulte

Les résultats d'hybridations *in situ* et d'immunohistochimies, obtenus chez la souris à l'âge adulte, permettent de définir trois niveaux d'expression de *Fmr1* (cf. Figure 7) (Bakker, de Diego Otero et al. 2000) :

- très faible dans le cœur, les vaisseaux sanguins, le derme et les muscles squelettiques. De la même manière, aucune expression de *FMRI* n'a été détectée chez l'homme dans le derme et dans le cœur (Devys, Lutz et al. 1993).
- modéré dans l'intestin, l'utérus, la thyroïde, le foie, les reins ou les poumons.
- fort dans le thymus, dans l'épithélium de la rétine et dans celui de l'œsophage, mais surtout, dans le cerveau, les testicules et les ovaires. Dans le cerveau, l'expression est particulièrement élevée dans les neurones pyramidaux de l'hippocampe et dans les cellules de Purkinje du cervelet. Dans les testicules, *Fmr1* est majoritairement exprimé dans les spermatogonies de type A. Un patron d'expression analogue a été observé dans le cerveau et dans les testicules chez l'homme (Devys, Lutz et al. 1993).

FMRI est donc exprimé de manière relativement ubiquitaire. Le fait que l'expression de ce gène ne se limite pas au système nerveux central laisse supposer que sa fonction s'exerce dans d'autres tissus. Cette observation est à mettre en relation avec l'existence, dans le syndrome de l'X fragile, de symptômes autres que le retard mental. Il est également intéressant de noter que le cerveau et les testicules, dont la morphologie et/ou le fonctionnement sont altérés dans le syndrome de l'X fragile, sont les sites d'expression préférentielle de *FMRI*.

1.5) Mutations du gène *FMRI*

a) Le syndrome de l'X fragile : une maladie à expansion de triplets nucléotidiques

Du paradoxe de Sherman au modèle de l'expansion des triplets CGG : approche historique

En 1985, Sherman fit l'hypothèse que le mécanisme de mutagenèse à l'origine du syndrome de l'X fragile soit particulier (Sherman, Jacobs et al. 1985). En analysant la transmission du syndrome dans plusieurs familles, Sherman estima tout d'abord que sa pénétrance chez les hommes était de l'ordre de 80%, et que 20% des individus porteurs de site fragile étaient donc asymptomatiques. Elle remarqua en outre que les filles de ces porteurs sains avaient un risque de transmettre le syndrome à leur descendance plus élevé que celui de leur grand-mère, ou encore que si les frères des porteurs sains n'étaient que rarement atteints, leurs petits-fils l'étaient fréquemment et leurs arrière-petits-fils encore davantage. Pour expliquer ce résultat, connu sous le nom de «paradoxe de Sherman», elle postula qu'il puisse exister une prémutation sans effet phénotypique, mais susceptible d'évoluer vers une mutation lorsque transmise par la mère.

Les bases moléculaires du «paradoxe de Sherman» furent précisées en 1991. L'identification par Southern blot de fragments chromosomiques de tailles variables, et systématiquement plus longs chez les patients, au niveau du site fragile, permit de démontrer l'existence d'une séquence instable au niveau du site fragile (Oberlé, Rousseau et al. 1991; Yu, Pritchard et al. 1991). Ce résultat fut renforcé par la caractérisation dans cette zone d'une série de triplets CGG de taille variable, instable par clonage et PCR (Fu, Kuhl et al. 1991; Kremer, Pritchard et al. 1991; Oberlé, Rousseau et al. 1991).

Le «paradoxe de Sherman» fût finalement expliqué par Fu *et al* (Fu, Kuhl et al. 1991), qui montrèrent qu'au-delà d'une certaine taille, la série de CGG devient instable et peut s'étendre lors des divisions cellulaires. Or, le phénomène s'auto-amplifie, puisque le risque d'expansion augmente avec la taille de la série, pour atteindre finalement le seuil correspondant à une mutation. L'analyse du profil de migration obtenu après digestion de cette série de triplets par des endonucléases sensibles à la méthylation (Oberlé, Rousseau et al. 1991), combinée à la cartographie physique de la région (Verkerk, Pieretti et al. 1991), aboutirent au modèle de pathogenèse suivant : au-delà d'un certain nombre de triplets CGG,

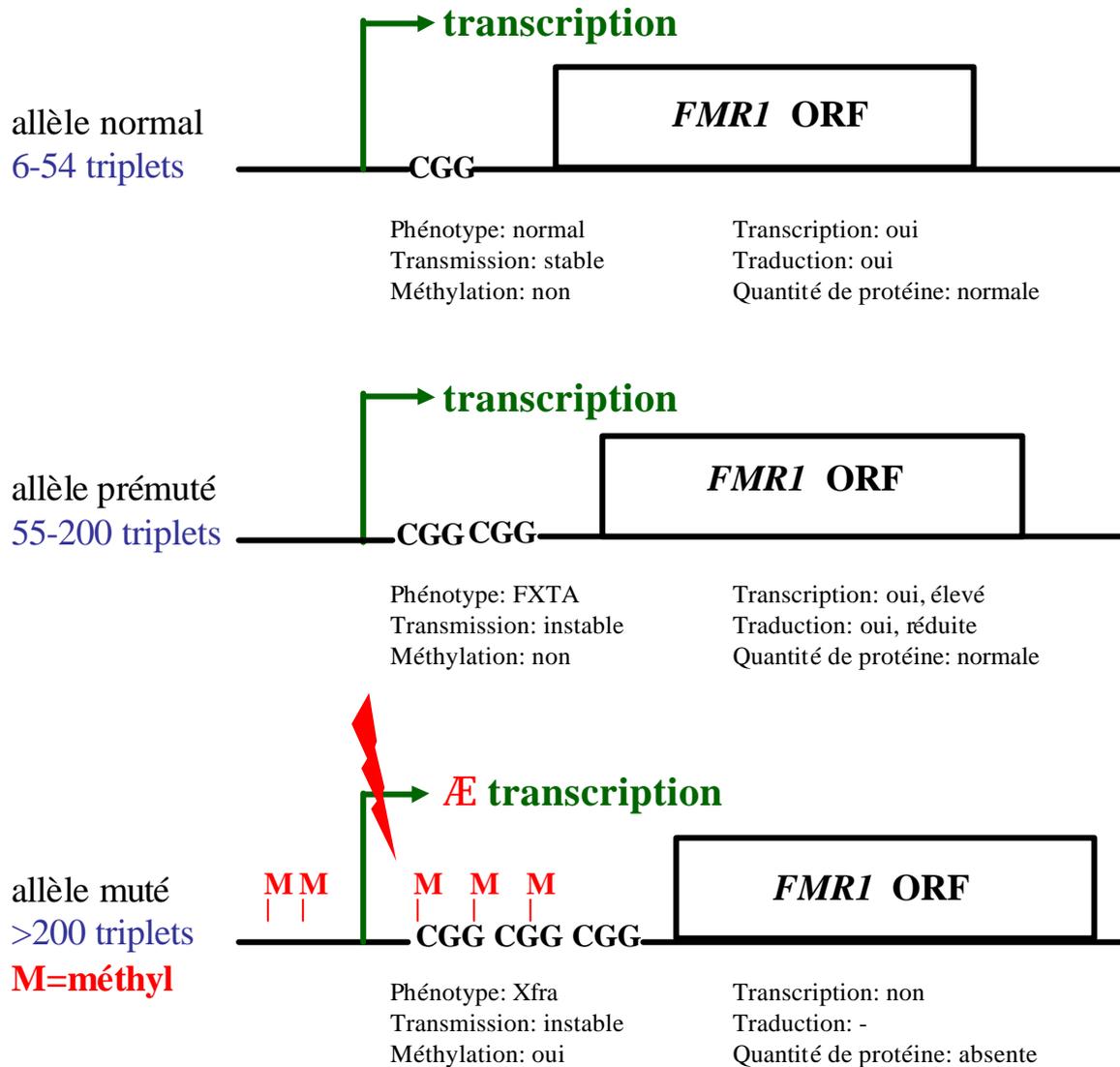


Figure 8. Classification des allèles de *FMRI* en fonction de la longueur de la série de triplets CGG.

Représentation schématique de l'allèle normal et des allèles prémuté et muté, résultant de l'expansion de la série CGG. Au-delà de 200 triplets, le promoteur du gène *FMRI* est méthylé (M). FXTA : syndrome d'ataxie à tremblements liée à l'X fragile ; Xfra: syndrome de l'X fragile ; ORF : phase ouverte de lecture.

une hyperméthylation de la série de trinuécléotides et des îlots CpG, situés en 5', se produit et empêche l'expression du gène *FMRI*.

Caractéristiques générales de la série trinuécléotidique

Dans la grande majorité des cas répertoriés, le syndrome de l'X fragile est donc dû à l'expansion d'une série de triplets nucléotidiques CGG. Cette série de triplets est localisée dans la partie 5'UTR du gène *FMRI*, 150 nucléotides en aval du site d'initiation de la transcription (cf. Figure 8).

Chez les individus sains, la série comporte de 6 à 54 triplets CGG, entre lesquels s'intercalent de un à trois triplets AGG. Cette série est extrêmement polymorphe quant au nombre de triplets CGG et à la position des triplets AGG, puisque Kunst et Warren identifièrent 47 allèles singuliers lors du séquençage de 82 allèles de *FMRI* (Kunst and Warren 1994). Les allèles les plus fréquents comportent 29 ou 30 triplets CGG entre lesquels s'intercalent deux triplets AGG. Seuls 7% des allèles comportent moins de 18 ou plus de 40 triplets CGG. Les allèles comportant entre 40 et 54 triplets CGG pourraient être légèrement instables et constituer un groupe de transition vers les allèles dits prémutés.

Les allèles prémutés comportent de 55 à 200 répétitions de triplets CGG, et seulement un triplet AGG intercalé dans 70% des cas. L'emploi du terme de «prémuation» pour désigner ce premier niveau d'expansion est lié au fait qu'il précède l'apparition des mutations (cf. paragraphe suivant). Les individus porteurs d'allèles prémutés ont longtemps été considérés comme asymptomatiques. Seul un risque accru de ménopause précoce avait été décelé chez les femmes porteuses de ces allèles (Sherman 2000). Cependant, le développement chez 20 à 30% des hommes de plus de 50 ans porteurs de prémutations, d'un trouble neurologique évolutif connu sous le nom de «syndrome d'ataxie à tremblements liée à l'X fragile», a récemment été mis en évidence (Hagerman and Hagerman 2004). Les patients présentent des difficultés à marcher, des pertes d'équilibre et des tremblements, qui s'aggravent progressivement et rendent difficile l'écriture ou la manipulation précise de petits objets. Ces symptômes sont associés, d'un point de vue neuroanatomique, à une atrophie des cortex cérébral et cérébelleux (Brunberg, Jacquemont et al. 2002). Des inclusions intranucléaires, acidophiles et positives à l'ubiquitine, sont présentes dans les neurones et les astrocytes du cerveau et du tronc cérébral de ces patients (Greco, Hagerman et al. 2002). Une vingtaine de protéines a récemment été identifiée au sein de ces inclusions, parmi lesquelles

l'a/B-crystalline, des protéines de la famille des histones et la protéine hnRNPA2 (Iwahashi, Yasui et al. 2006). Ces inclusions pourraient résulter d'un excès de transcription du gène *FMRI* et de l'agrégation de protéines sur les ARNm produits (Tassone, Hagerman et al. 2000).

Enfin, la mutation complète à l'origine du syndrome de l'X fragile désigne les séries comportant plus de 200 triplets CGG. Ces allèles ont souvent perdu les deux triplets AGG intercalés et peuvent comporter plus de 1000 triplets CGG ininterrompus.

Mécanismes d'expansion de la série trinuécléotidique

L'expansion de la série trinuécléotidique se fait par addition de triplets CGG supplémentaires à son extrémité 3'. Le mécanisme moléculaire à l'origine de l'instabilité des allèles prémutés et mutés n'est pas clairement identifié. L'ADN polymérase pourrait patiner pendant la réplication sur des structures en épingle à cheveux formées par association des triplets CGG, lorsque la série trinuécléotidique excède une certaine longueur. La perte de triplets AGG dans les allèles prémutés et mutés pourrait renforcer ce phénomène : en effet, ces triplets empêchent la formation mais aussi la dimérisation des structures en épingle à cheveux (voir (Stoyanova and Hoogeveen 2005) pour revue).

Méthylation de la série trinuécléotidique et conséquence sur l'expression de *FMRI*

La méthylation de l'ADN et les modifications des histones par phosphorylation, acétylation ou méthylation, sont autant de mécanismes épigénétiques de régulation de l'expression génétique (Berger 2002; Egger, Liang et al. 2004). L'expansion de la série de triplets CGG induit ce type de modifications biochimiques. En effet, outre la méthylation excessive des cytosines de la série CGG et des îlots CpG localisés en amont, le profil d'acétylation et de méthylation des histones est également modifié (Coffee, Zhang et al. 1999; Coffee, Zhang et al. 2002). La configuration correspondant à un état de transcription actif du gène est une acétylation des histones H3 et H4, associée à une méthylation de la lysine 4 de l'histone H3. Or, dans les cellules de patients, les histones H3 et H4 sont desacétylées et c'est la lysine 9 de l'histone H3 qui est méthylée.

L'ensemble de ces modifications épigénétiques empêche la transcription du gène *FMRI* via deux mécanismes (voir (Lim, Booker et al. 2005; Stoyanova and Hoogeveen 2005) pour revue) :

- certains des facteurs de transcription de *FMRI*, comme AP-2 α ou NRF1, sont sensibles à la méthylation. Des expériences conduites *in vitro* ont permis de montrer que les capacités de liaison de ces facteurs et d'activation de la transcription du gène *FMRI* sont diminuées lorsque les cytosines du promoteur sont méthylées.
- la méthylation de l'ADN et la désacétylation des histones induisent une condensation de la chromatine en amont du gène *FMRI*. Sous cette forme condensée, le promoteur du gène n'est plus accessible, ni pour la machinerie de transcription, ni pour les facteurs de transcription.

L'expansion de la série CGG ne semble pas en elle-même empêcher la transcription de *FMRI*. En effet, le gène est transcrit chez la plupart des hommes porteurs de prémutations de taille comprise entre 100 et 200 triplets, et même chez certains porteurs de mutation complète dont la série CGG n'est pas anormalement méthylée (Smeets, Smits et al. 1995; Tassone, Hagerman et al. 2000; Tassone, Hagerman et al. 2001). Des essais pharmacologiques de réactivation de la transcription de *FMRI* ont donc été entrepris. L'utilisation de 5-azadeoxycytidine et de trichostatine A, induisant respectivement une déméthylation passive de l'ADN et l'inhibition de l'activité des histones désacétylases, ont notamment permis la restauration de la transcription de *FMRI* dans des cellules de patients (Chiurazzi, Pomponi et al. 1998; Chiurazzi, Pomponi et al. 1999).

Instabilité de l'expansion et transmission du syndrome de l'X fragile

L'étude de la ségrégation du syndrome au sein de familles a permis d'établir que la transition des allèles prémutés en allèles mutés ne se fait que par transmission maternelle. Aucune mutation complète et aucun site fragile en Xq27.3 n'ont été observés chez les femmes dont le père est porteur d'un allèle prémuté. L'absence de transmission paternelle pourrait s'expliquer par l'existence d'un processus de réversion et de sélection limitant la taille de l'expansion dans la lignée germinale mâle. En effet, Moric-Petrovic et Laca ont montré que des hommes porteurs d'allèles mutés avaient transmis à leurs filles des allèles prémutés, ceci étant à mettre en rapport avec l'identification de prémutations dans la lignée germinale de trois individus porteurs de la mutation complète dans les cellules somatiques (Moric-Petrovic and Laca 1983; Reyniers, Vits et al. 1993). La transmission paternelle des allèles normaux pourrait par contre être sujette à une légère instabilité (Sullivan, Crawford et al. 2002).

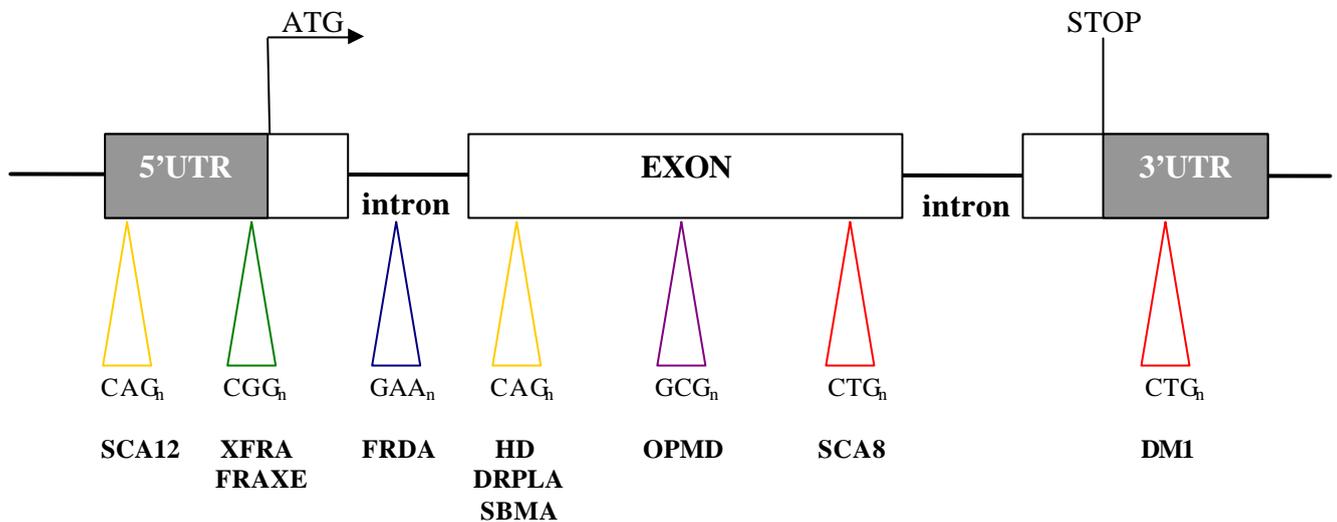


Figure 9. Maladies monogéniques à expansion de triplets nucléotidiques.

Le schéma représente la localisation dans le gène et la séquence des triplets à l'origine des seize maladies monogéniques à expansion de triplets nucléotidiques.

SCA8/12 : Ataxies SpinoCérébelleuses 8/12 ; XFRA : syndrome de l'X FRAGile ; FRAXE : retard mental associé au site fragile ; FRDA : Ataxie de FRieDreich ; HD : maladie de Huntington ; DRPLA : Atrophie DentatoRubroPallidoLuisienne ; SBMA : AMyotrophie SpinoBulbaire ; OPMD : Dystrophie Musculaire Oculo-Pharyngée ; DM1 : Dystrophie Myotonique de Steinert.

La transmission maternelle du syndrome s'explique par l'instabilité des prémutations (et des mutations) pendant les divisions méiotiques de l'oogenèse (Fu, Kuhl et al. 1991). L'existence de jumeaux monozygotes possédant des allèles de tailles différentes et d'individus mosaïques porteurs d'allèles normaux, mutés et prémutés dans différentes cellules suggère que l'instabilité et l'expansion de la série puisse se prolonger pendant les tous premiers stades de l'embryogenèse (Devys, Biancalana et al. 1992; Krayer, Mila et al. 1994; Moutou, Vincent et al. 1997).

La détermination du risque de transition d'un allèle prémuté en un allèle muté est délicate puisque ce risque est fonction de la taille de l'expansion (Fu, Kuhl et al. 1991). La fréquence d'apparition d'une mutation complète est inférieure à 5% lorsque les allèles maternels comportent moins de 60 triplets, il est de 50% lorsque les allèles comportent environ 80 répétitions et atteint 95% lorsque leur taille dépasse 100 répétitions. Par ailleurs, les allèles prémutés ont tendance à s'étendre pendant l'oogenèse, même lorsque le seuil de la mutation n'est pas atteint. Ceci explique l'augmentation du risque de transmission du syndrome au cours des générations, initialement mis en évidence par Sherman.

Autres maladies à expansion

Le syndrome de l'X fragile est la première maladie à expansion de triplets nucléotidiques à avoir été découverte. Seize autres maladies possédant le même mécanisme mutationnel ont été identifiées depuis (cf. Figure 9) (Cummings and Zoghbi 2000). Dans tous les cas, l'apparition de mutations résulte de l'instabilité et de l'expansion, au cours des générations, d'une série de triplets CGG, GAA, CAG, CTG ou GCG. Dans le cas des maladies à expansion à transmission dominante, autosomique ou liée à l'X, cet allongement progressif des expansions donne lieu au phénomène d'anticipation, caractérisé par une augmentation du degré de sévérité de la pathologie et/ou l'apparition des symptômes de plus en plus précocement et/ou une augmentation du risque de transmission de la pathologie au cours des générations. Ce phénomène ne s'observe pas dans les maladies à transmission autosomique récessive car la maladie apparaît généralement seulement au niveau d'une génération.

Les maladies à expansion de triplets peuvent être subdivisées en deux groupes en fonction de la localisation de la série trinuécléotidique :

- le syndrome de l'X Fragile, l'ataxie de Friedreich, le retard mental associé au site fragile (FRAXE) et la dystrophie myotonique de Steinert constituent un premier groupe de maladies dont les séries trinuéotidiques sont localisées hors de la séquence codante du gène à l'origine de la pathologie. Les expansions de ces séries induisent une perte de fonction des protéines correspondantes ou, au contraire, un gain de fonction lié à l'apparition d'un transcrit muté. Dans tous les cas, la transmission se fait par expansion de prémutations. Le mode de transmission varie au sein du groupe : le syndrome de l'X Fragile et le retard mental associé au site fragile sont les seules pathologies liées à l'X et se transmettent respectivement de manière dominante avec une pénétrance incomplète et de manière récessive ; la dystrophie myotonique de Steinert et l'ataxie de Friedreich sont à transmission autosomique, dominante pour la première, récessive pour la seconde.
- le second groupe comprend les maladies à expansions codantes. L'amyotrophie spino-bulbaire est liée à l'X et se transmet de manière récessive. Les autres maladies se transmettent de manière autosomique et dominante. Les séries trinuéotidiques étant localisées à l'intérieur des exons, les conséquences de l'expansion sont observables au niveau protéique. Les expansions de polyglutamines (expansions trinuéotidiques CAG) ou de polyalanines (expansions trinuéotidiques GCG) confèrent des propriétés toxiques aux protéines et induisent la formation d'agrégats intracellulaires. Contrairement au groupe des maladies à expansions non codantes, la transmission des maladies à expansions codantes s'effectue sans passage par le stade intermédiaire des prémutations.

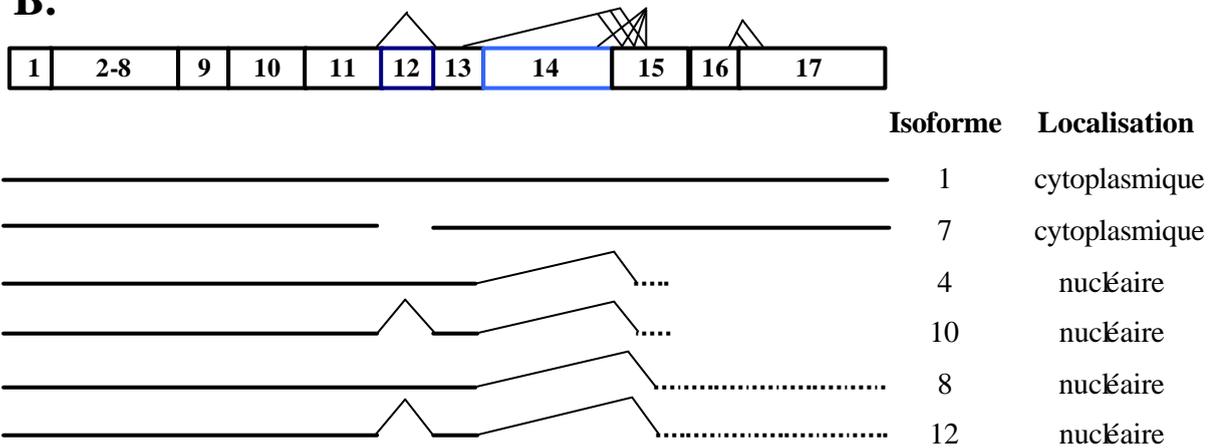
b) Autres Mutations

Plusieurs cas de patients présentant les caractéristiques cliniques du syndrome de l'X-fragile sans l'expansion typique de triplets nucléotidiques ont été rapportés à partir de 1991. Dans trois cas, des mutations ponctuelles induisant une modification du cadre de lecture ou affectant un site d'épissage furent identifiées (De Boulle, Verkerk et al. 1993; Lugenbeel, Peier et al. 1995). Seul un cas de mutation ponctuelle faux-sens est connu à ce jour (De Boulle, Verkerk et al. 1993). Cette mutation conduit au remplacement d'une isoleucine hydrophobe en asparagine hydrophile au niveau de l'acide aminé 304 de la protéine (mutation I304N). Enfin, des délétions allant de 1,6 kilobases à plusieurs mégabases, et aboutissant à une délétion partielle ou totale du gène *FMRI*, ont été décrites ((Gedeon, Baker et al. 1992; Trottier, Imbert et al. 1994; Wolff, Gustashaw et al. 1997) et voir (Bardoni and Mandel 2002) pour revue).

A.

	Site accepteur n°1 de l'exon 17		Sans exon 12		Site accepteur n°2 de l'exon 17		Sans exon 12	
			Site accepteur n°1 de l'exon 17				Site accepteur n°2 de l'exon 17	
a	Iso1	71.1	Iso7	68.9	Iso13	69.1	Iso17	66.9
b	Iso2	69.9	Iso8	67.7	Iso14	67.9	Iso18	65.7
c	Iso3	68.4	Iso9	66.2	Iso15	66.4	Iso19	64.2
D14a	Iso4	50.9	Iso10	48.7	Iso4		Iso10	
D14b	Iso5	49.5	Iso11	47.3	Iso5		Iso11	
D14c	Iso6	61.0	Iso12	58.8	Iso16	59.0	Iso20	56.8

B.



C.

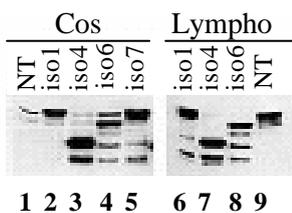


Figure 10. Isoformes de FMRP.

A. Description des différentes isoformes putatives de FMRP et de leur masse moléculaire (en kDa). a, b, c : sites accepteurs 1, 2 et 3 de l'exon 15 ; $\Delta 14$: délétion de l'exon 14. Adapté de *Sittler et al., 1996*.

B. Structure et localisation de quelques isoformes putatives de FMRP, dont l'isoforme majoritaire n°7. Adapté de *Sittler et al., 1996*.

C. Comparaison des profils de migration des isoformes endogènes de FMRP (ligne 1, ligne 9), avec celui d'isoformes transfectées (lignes 2-8). L'isoforme 4 n'est pas détectée de manière endogène. NT : non transfecté ; Lympho : Lymphoblastes. Adapté de *Sittler et al., 1996*.

La découverte de telles mutations, affectant directement l'intégrité du gène *FMRI*, a permis de confirmer son rôle causal exclusif dans la survenue du syndrome de l'X-fragile.

2) FMRP et le métabolisme des ARNm

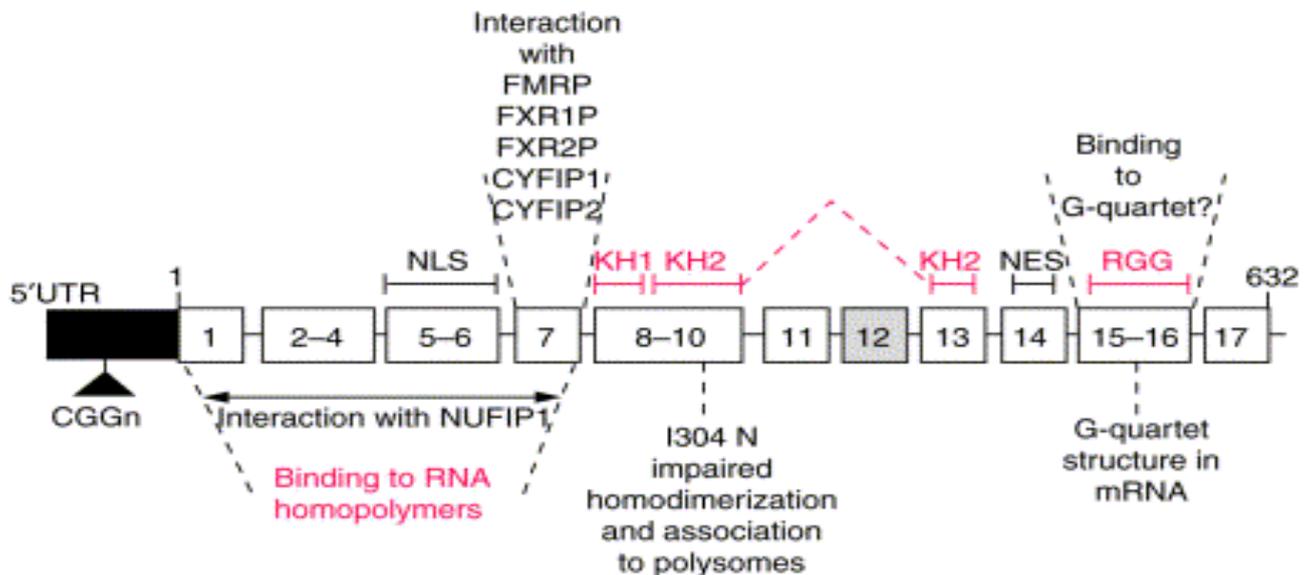
Dans la très grande majorité des cas, le syndrome de l'X fragile est dû à l'absence d'expression du gène *FMRI*. D'un point de vue moléculaire, la pathologie résulte donc de l'absence de la protéine FMRP (Fragile X Mental Retardation Protein) codée par ce gène, sous sa forme fonctionnelle tout au moins (Pieretti, Zhang et al. 1991; De Boulle, Verkerk et al. 1993). L'objectif de cette partie est de dégager les différentes fonctions possibles de FMRP à partir de l'étude de ses caractéristiques structurales et biochimiques pour aboutir à un modèle décrivant son fonctionnement global.

2.1) FMRP : une protéine aux différentes isoformes

FMRP désigne en réalité l'ensemble des isoformes résultant de la traduction des différents ARNm produits par épissage alternatif du gène *FMRI* (Verkerk, de Graaff et al. 1993). Vingt isoformes différentes sont prédites sur les bases de l'analyse de produits de RT-PCR (cf. Figure 10), mais seules quatre à six bandes sont détectées par western blot (cf. Figure. 10) (Khandjian, Fortin et al. 1995). Leur poids moléculaire est compris entre 70 et 80 kDa, et elles pourraient correspondre à dix isoformes différentes. L'isoforme la plus longue, codée par l'ensemble des exons, comporte 632 acides aminés (iso1). L'isoforme la plus fréquente est analogue à l'isoforme 1, mais elle est dépourvue de l'exon 12 (iso7). La structure de FMRP et ses domaines fonctionnels connus sont décrits sur la Figure 11.

2.2) FMRP : une protéine navette entre le noyau et le cytoplasme

En immunofluorescence, FMRP est majoritairement détectée dans le cytoplasme, notamment autour du noyau (Eberhart, Feng et al. 1995). Cependant, des expériences de transfection ont permis de montrer que les isoformes minoritaires dépourvues de l'exon 14 sont localisées dans le noyau (Sittler, Devys et al. 1996). Ces résultats ont conduit à l'identification d'un signal d'export nucléaire (NES) dans l'exon 14 de FMRP (Eberhart, Malter et al. 1996). Ce NES est analogue à celui de la protéine Rev du virus de



Current Opinion in Genetics & Development

Figure 11. Domaines fonctionnels de FMRP et régions impliquées dans l'association à ses interacteurs.
 Le schéma indique la position des domaines fonctionnels le long de la séquence d'acides aminés. Les exons sont indiqués par des rectangles numérotés. Les domaines potentiellement impliqués dans la liaison à l'ARN sont en rouge.
 NES : Signal d'Export Nucléaire ; NLS : Signal de Localisation Nucléaire ; KH1/2 : K Homology domain 1/2 ; RGG : boîte arginine-glycine-glycine ; NUFIP (NUclear FMRP Interacting Protein ; 82-FIP : 82 kDa-FMRP Interacting Protein ; FMRP : Fragile X Mental Retardation Protein ; FXR1/2P : Fragile X Related Protein 1/2 ; CYFIP1/2 : CYtoplasmic Interacting Protein ; I304N : mutation ponctuelle remplaçant une isoleucine par une asparagine, identifiée chez un patients. Adapté de *Bardoni et al, 2002*.

l'immunodéficienciae acquise humaine et consiste en une dizaine d'acides aminés comportant quatre résidus hydrophobiques au sein d'une série hydrophile. La localisation nucléaire des isoformes dépourvues de l'exon 14 suggérait également la présence d'un signal de localisation nucléaire (NLS). L'analyse de la localisation de formes tronquées de FMRP et de protéines produites par fusion d'un gène rapporteur à différentes portions de *FMR1* a permis l'identification d'un NLS entre les résidus 115 et 196 de FMRP (Eberhart, Feng et al. 1995; Bardoni, Sittler et al. 1997). Ce NLS diffère de ceux riches en lysine et en arginine, reconnus par les importines α et β , et ni sa structure, ni son mode de fonctionnement ne sont clairement connus. La présence simultanée d'un NLS et d'un NES le long de la séquence d'acides aminés a suggéré que FMRP puisse faire la navette entre le noyau et le cytoplasme. Cette hypothèse fut confirmée par des expériences d'inhibition de l'export nucléaire par traitement des cellules par la leptomycine B, qui induisent une accumulation partielle de la protéine FMRP dans le noyau (Tamanini, Kirkpatrick et al. 2000). De plus, FMRP a été détectée au niveau des pores nucléaires en microscopie électronique (Feng, Gutekunst et al. 1997). Une partie de FMRP serait donc en transit entre le noyau et le cytoplasme au sein de la cellule.

2.3) FMRP : une protéine se liant aux ARN

a) FMRP possède des domaines de liaison à l'ARN

Les premières pistes quant à la détermination du rôle de FMRP furent fournies par l'analyse bioinformatique de sa séquence et l'identification de trois domaines putatifs de liaison à l'ARN, deux domaines K homologues (KH) et une boîte arginine-glycine (RGG) (Siomi, Siomi et al. 1993).

Les domaines KH

Les premiers domaines KH ont été identifiés sur la protéine hnRNP K (heterogeneous nuclear RiboNucleoProtein K), puis par homologie de séquences, dans plusieurs protéines faisant partie de groupes phylogénétiquement éloignés (protéine ribosomale S3 de l'archéobactérie *Halobacterium halobium*, protéine MER1 de la levure *Saccharomyces cerevisiae*...), témoignant ainsi de la conservation de ces motifs au cours de l'évolution (Siomi, Matunis et al. 1993; Burd and Dreyfuss 1994). L'unique point commun entre ces protéines étant leur association physique et/ou fonctionnelle aux ARN, il a été postulé que ces

motifs soient des domaines de liaison aux ARN. Au niveau structural, les domaines KH comportent classiquement environ 70 acides aminés adoptant une structure tridimensionnelle formée par l'enchaînement de feuillets β et d'hélices α (motif typique $\beta\alpha\alpha\beta\beta\alpha$) entre lesquels s'insèrent deux boucles, dont une boucle Gly-X-X-Gly invariante (Burd and Dreyfuss 1994; Musco, Stier et al. 1996).

FMRP comporte deux domaines KH de liaison à l'ARN, le premier entre les acides aminés 212 et 266 (KH1), le second entre les acides aminés 285 et 328 (KH2). L'importance fonctionnelle de ces domaines fut démontrée par l'identification d'un patient présentant un phénotype sévère associé à une mutation ponctuelle unique, modifiant une isoleucine très conservée du domaine KH2 en asparagine (mutation I304N) (De Boule, Verkerk et al. 1993). Cette mutation modifie la structure tridimensionnelle du domaine KH2 et altère les propriétés de FMRP (voir paragraphe II.2.3.b, II.2.4.a et II.2.5.a) (Musco, Stier et al. 1996).

La boîte RGG

Le domaine RGG a été identifié chez une autre hnRNP, hnRNP U (heterogeneous nuclear RiboNucleoProtein U), puis dans différentes protéines se liant aux ARN (nucléoline, SSB-1, fibrillarine, hnRNP A1...) (Kiledjian and Dreyfuss 1992). La fusion d'un tel multimère de glycines et d'arginines à une protéine suffit à lui conférer la capacité de se lier à l'ARN.

FMRP contient un seul motif RGG, localisé en C terminal, entre les acides aminés 527 et 552.

b) FMRP se lie à l'ARN *in vitro*

Mise en évidence

Comme le suggérait l'existence des motifs KH et RGG, FMRP est effectivement capable de se lier à des homopolymères ribonucléotidiques *in vitro*, avec une forte affinité pour les séquences polyG et polyU, mais une affinité plus faible pour les séquences polyA et polyC (Siomi, Siomi et al. 1993; Siomi, Choi et al. 1994; Brown, Small et al. 1998). La mutation I304N altère la capacité d'interaction de FMRP à ces homopolymères en présence de hautes concentrations de sel (Siomi, Choi et al. 1994), mais ne semble pas affecter cette propriété en conditions physiologiques de salinité (Brown, Small et al. 1998). FMRP se lie également à environ 4% des ARNm de cerveau fœtal humain (Ashley, Wilkinson et al. 1993).

Il s'associe à son propre ARNm au niveau de la partie 3'UTR, mais aussi, avec une affinité plus faible, à la séquence anti-sens correspondante (Ashley, Wilkinson et al. 1993; Brown, Small et al. 1998; Schaeffer, Bardoni et al. 2001). Enfin, FMRP se lie seulement à certains ARNm biotinylés transcrits à partir d'ADNc du cerveau (Brown, Small et al. 1998; Sung, Conti et al. 2000).

L'ensemble de ces données suggère que FMRP puisse se lier de manière globale aux séquences ribonucléotidiques, mais possède un degré de sélectivité permettant une association préférentielle à certains ARNm.

Domaines d'interaction de FMRP

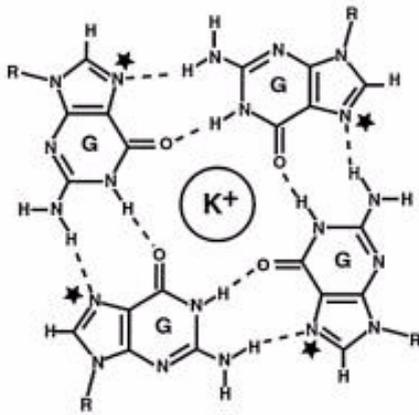
Différents travaux de caractérisation du rôle effectif des domaines KH et de la boîte RGG dans l'association de FMRP aux ARN ont été conduits. Des tests d'interaction entre des formes tronquées de FMRP et des homopolymères d'ARN ont abouti à la conclusion que seuls les domaines KH1 et RGG sont fonctionnels et responsables respectivement d'une liaison sélective et large aux ARN (Adinolfi, Bagni et al. 1999). Des tests analogues indiquent au contraire que le domaine KH2 est nécessaire à l'association de FMRP avec des ARNm transcrits à partir d'ADNc de cerveau humain (Sung, Conti et al. 2000). Par ailleurs, quoique dépourvu de séquence consensus, la partie N-terminale de FMRP est capable de se lier aux ARN, suggérant l'existence d'un motif de liaison encore inconnu (Adinolfi, Bagni et al. 1999).

Ces résultats suggèrent que les différents domaines de liaison de FMRP puissent être fonctionnels, et responsables de la reconnaissance de différents ARN.

Motif(s) de liaison à l'ARN

L'utilisation de fragments de l'ARNm *FMR1* a permis de montrer que, *in vitro*, FMRP se lie spécifiquement et avec une forte affinité à une structure particulière, connue sous le nom de G-quartet (Darnell, Jensen et al. 2001; Schaeffer, Bardoni et al. 2001). L'utilisation de la technique de SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment) a permis de confirmer que FMRP se lie préférentiellement à d'autres ARNm au niveau de cet agencement et que cette liaison dépend du domaine RGG de la protéine (Darnell, Jensen et al. 2001).

A.



B.

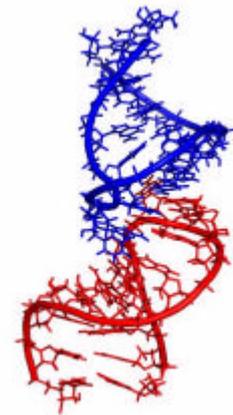
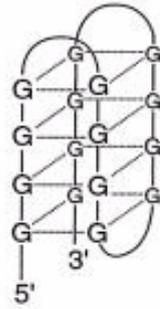


Figure 12. Motifs potentiels de liaison de FMRP à l'ARNm

A. Structure plane et tridimensionnelle du G-quartet, formée par association de quatre séries de quatre purines. Adapté de *Schaeffer et al, 2001*.

B. Structure tridimensionnelle du « kissing-complex », formé par association de deux boucles. Site web : *Freshman seminar*

Les G-quartets sont des structures tridimensionnelles constituées par la superposition de quatre couches planes de quatre purines (cf. Figure 12). L'association des bases sous forme de quadruplex dépend de la formation de liaisons hydrogène de type Watson/Crick et de type Hoogsteen (voir (Schaeffer, Beaulande et al. 2003.) pour revue). Ces structures sont stabilisées par l'insertion de cations monovalents de grande taille comme le potassium, mais déstabilisées par les cations de petite taille, comme le sodium ou le lithium. Cette particularité biochimique permet d'identifier les structures en G-quartet potentielles en comparant la réverse transcription des ARN candidats en présence de sodium et de potassium. En effet, la persistance des structures en G-quartet en présence de potassium induit l'arrêt de la réverse transcriptase : l'analyse différentielle des pauses effectuées par l'enzyme en présence de K^+ mais pas de Na^+ sur gels permet d'identifier les structures en G-quartet éventuelles (Schaeffer, Beaulande et al. 2003.).

L'application de la technique de SELEX à des formes tronquées de FMRP restreintes aux domaines KH a récemment permis d'identifier un nouveau motif de liaison sur l'ARN, le kissing-complex (Darnell, Fraser et al. 2005). Ce complexe tridimensionnel est formé par l'association de deux structures de type tige-boucle réunies par une charnière simple brin. Le domaine KH2 de FMRP est nécessaire et suffisant à l'établissement de cette interaction : en effet, la forme mutante I304N de FMRP ne peut s'associer aux ARN via cette structure, alors qu'elle est reconnue par une forme tronquée de FMRP restreinte au domaine KH2. Le phénotype sévère du patient présentant la mutation I304N pourrait donc provenir notamment de l'incapacité de la forme mutée de FMRP à s'associer à des cibles ARN présentant un kissing-complex, attestant alors de l'importance fonctionnelle de cette structure.

c) FMRP reconnaît des ARNm *in vivo*

La rétention de FMRP provenant d'extraits cytoplasmiques par chromatographie d'affinité sur des colonnes d'oligoDT a suggéré que la protéine soit également associée à des ARNm *in vivo* (Corbin, Bouillon et al. 1997).

Plusieurs méthodes de criblage à grande échelle ont été utilisées pour identifier des cibles ARNm de FMRP *in vivo*. L'analyse des ARNm immunoprécipités par FMRP sur micropuces à ADN a permis l'identification de 432 ARNm candidats dans des extraits de cerveau de souris (Brown, Jin et al. 2001). Une autre méthode basée sur l'amplification

d'ARNm par des oligonucléotides liés de manière covalente à l'anticorps dirigé contre FMRP (Antibody-Positioned RNA Amplification, ou APRA) a permis la mise en évidence sur macropuces de 81 autres ARNm cibles neuronales (Miyashiro, Beckel-Mitchener et al. 2003). Cependant, le taux de recouvrement entre les ARNm candidats isolés dans les deux criblages est extrêmement faible. Ceci est probablement imputable au faible taux de chevauchement entre les sondes d'ADNc utilisées pour l'hybridation, puisque seuls 17 des 80 meilleurs candidats isolés sur micropuces étaient présents sur les macropuces (Schaeffer, Beaulande et al. 2003.). Cependant, si ces analyses ont permis de vérifier l'existence d'une interaction entre ARNm et FMRP *in vivo*, l'existence d'une interaction spécifique entre FMRP et la plupart des candidats identifiés reste à démontrer.

2.4) Intégration de FMRP au sein d'un complexe ribonucléoprotéique

a) FMRP fait partie de complexes ribonucléoprotéiques associés aux polysomes

Les résultats de marquage cellulaire par immunofluorescence montrent que FMRP est associée à des granules dans le cytoplasme, et qu'elle colocalise avec des structures ribosomiques notamment au niveau du réticulum endoplasmique rugueux (RER) périnucléaire (Khandjian, Corbin et al. 1996; Feng, Gutekunst et al. 1997; Mazroui, Huot et al. 2002). Des tests de fractionnement cellulaire sur gradient de sucrose ont permis de montrer que FMRP est associée aux polyribosomes au sein du cytoplasme, et que la mutation B04N empêche la formation de ce complexe (Khandjian, Corbin et al. 1996; Corbin, Bouillon et al. 1997; Feng, Absher et al. 1997). L'association de FMRP aux polyribosomes dépend de l'occurrence de la liaison FMRP-ARNm. En effet, le traitement d'un extrait cellulaire avec de la RNase induit la dégradation des ARNm et la dissociation des polyribosomes, sans toutefois altérer la structure des ribosomes. Or, ce traitement détache FMRP des ribosomes et induit son relargage sous forme libre ou au sein de complexes ribonucléoprotéiques (RNP) de faible poids moléculaire. Au contraire, FMRP est associée à des fractions qui sédimentent majoritairement autour de 100S sur gradient de sucrose, lorsque la dissociation des ribosomes est induite par traitement des extraits cellulaires à l'EDTA (Corbin, Bouillon et al. 1997; Feng, Absher et al. 1997; Ohashi, Koike et al. 2002). Le pic de sédimentation de FMRP est donc clairement distinct de ceux correspondants aux sous-unités ribosomiques 30S et 60S dans ces conditions. Ce comportement est analogue à celui d'autres complexes RNP résistants

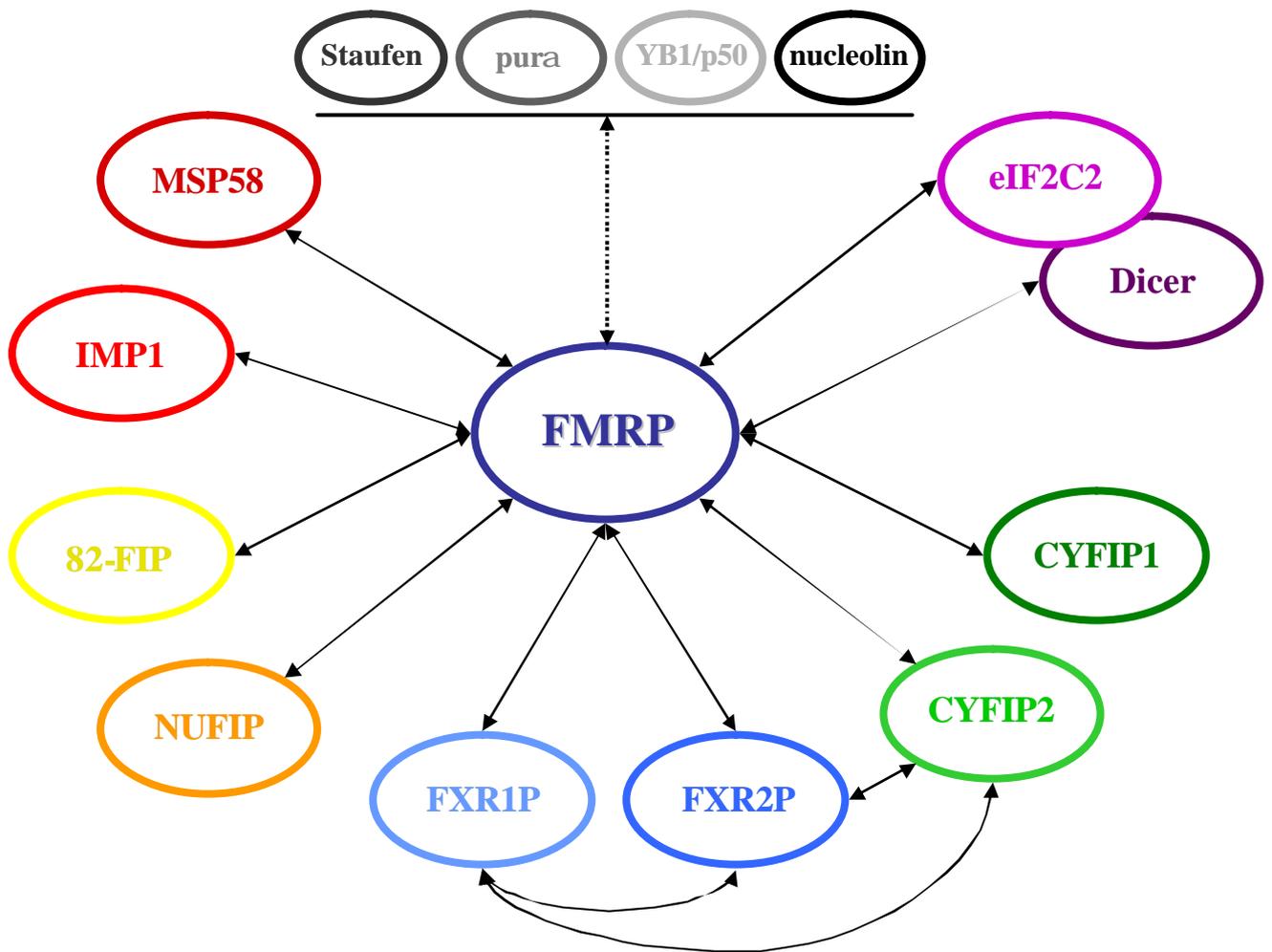


Figure 13. Schéma du réseau des interacteurs de FMRP.

Les flèches pleines indiquent les protéines entre lesquelles une interaction directe a été démontrée. Les flèches en pointillés indiquent les protéines avec lesquelles FMRP a été trouvée au sein de complexes. La famille FXR est indiquée en bleu, la famille CYFIP en vert, et les protéines du complexe RISC en violet.

FMRP : Fragile X Mental Retardation Protein ; FXR1/2P : Fragile X Related Protein 1/2 ; NUFIP : NUclear FMRP Interacting Protein ; 82-FIP : 82 kDa-FMRP Interacting Protein ; CYFIP 1/2 : CYtoplasmic FMRP Interacting Protein 1/2 ; IMP1 : Insulin-like growth factor II mRNA binding Protein I ; MSP58 : MicroSpherule Protein 58 ; YB-1 : Y-Box-binding Protein 1.

à l'EDTA précédemment identifiés. Enfin, FMRP est retrouvée au sein de complexes RNP collectés sur colonne oligodT (Corbin, Bouillon et al. 1997; Feng, Absher et al. 1997).

FMRP fait donc partie de large(s) complexe(s) RNP, qui peuvent s'associer aux polyribosomes, au sein du cytoplasme.

b) Principaux interacteurs de FMRP (Publication 1)

Plusieurs interacteurs susceptibles d'être engagés dans la formation d'un ou de plusieurs complexes RNP et/ou protéiques avec FMRP ont été identifiés (cf. Figure 13).

FMRP peut tout d'abord former des hétérodimères avec chacune de deux autres protéines membres de la famille FXR, FXR1P et FXR2P (Fragile X Related Protein 1/2) (Siomi, Siomi et al. 1995; Zhang, O'Connor et al. 1995). Contrairement à *FMRI*, les gènes *FXR1* et *FXR2* sont autosomiques et respectivement localisés en 3q28 et 17p13.1. Aucune pathologie due à l'inactivation de *FXR1* ou *FXR2* n'est connue. Les protéines FXR présentent un haut degré d'homologie et possèdent chacune deux domaines KH, une boîte RGG, un NLS et un NES. Ces similarités suggèrent une possible redondance fonctionnelle. Cette hypothèse vient d'être renforcée par l'analyse d'un modèle murin invalidé simultanément pour les gènes *Fmr1* et *Fxr2*, dont le phénotype comportemental est plus sévère que celui observé dans chacun des modèles murins knockout simples (Spencer, Serysheva et al. 2006). Chez la drosophile, *dFMRI* est l'unique orthologue de la famille FXR des Vertébrés (cf. paragraphe III.2.1.a).

FMRP interagit également avec d'autres protéines se liant à l'ARN. Les protéines NUFIP (NUclear FMRP Interacting Protein) et 82-FIP (82kDa-FMRP Interacting Protein) sont deux protéines de fonctions inconnues, identifiées au sein du laboratoire lors du criblage double hybride d'une banque d'ADNc d'embryon de souris par la partie N-terminale de FMRP (Bardoni, Castets et al. 2003; Bardoni, Willemsen et al. 2003). L'existence d'une interaction directe entre FMRP et la protéine IMP1 (Insulin-like Growth Factor II mRNA binding protein I), intervenant dans le transport d'ARN, a été démontrée en utilisant un système de complémentation de fluorescence (système BiFC, ou Bimolecular Fluorescence Complementation) (Rackham and Brown 2004). Récemment, un criblage double hybride a permis de montrer que FMRP se lie à la protéine Microsphérule 58 (MSP58), qui pourrait jouer un rôle dans l'export d'ARNm hors du noyau (Davidovic, Bechara et al. 2006). Enfin, la

nucléoline, YB1/P50 (Y-box-binding protein 1), Pur α , mStaufen et la myosine Va ont été immunoprécipités dans des complexes contenant FMRP, sans que la preuve d'une association directe avec FMRP ne soit apportée (Ceman, Brown et al. 1999; Ceman, Nelson et al. 2000; Ohashi, Koike et al. 2002). Les protéines Pur α , mStaufen et la myosine Va pourraient réguler le transport de polyribosomes le long des microtubules et des filaments d'actine. La nucléoline est impliquée dans la biogenèse des ribosomes et la protéine YB1/P50 pourrait réguler l'expression de gènes au niveau transcriptionnel et traductionnel.

Lors du criblage double hybride précédemment décrit, deux autres interacteurs de FMRP ne se liant pas aux ARN ont été découverts. Les protéines CYFIP1 et CYFIP2 (CYtoplasmic FMRP Interacting Protein 1/2) sont deux protéines homologues, constituant la famille de protéines CYFIP (Schenck, Bardoni et al. 2001). CYFIP1 avait déjà été identifié en tant qu'interacteur de la Rho GTPase Rac1 (Kobayashi, Kuroda et al. 1998). D'autre part, CYFIP2 fait partie du complexe WAVE, impliqué dans l'activation de la nucléation de l'actine, via le complexe Arp2/3 (cf. paragraphe III.2.3.c) (Eden, Rohatgi et al. 2002; Kunda, Craig et al. 2003; Schenck, Qurashi A. et al. 2004).

Enfin, un lien entre dFMR1, l'orthologue de FMRP chez la Drosophile, et le complexe RISC (RNA-Induced Silencing Complex) a été identifié, puisque dFMR1 fait partie d'un complexe contenant la protéine Argonaute 2 et interagit directement avec l'enzyme Dicer (Caudy, Myers et al. 2002; Ishizuka, Siomi et al. 2002). L'association de FMRP au complexe RISC semble conservée chez les Vertébrés puisque des interactions entre FMRP et eIF2C2, l'orthologue d'Argonaute2, d'une part, et FMRP et Dicer d'autre part, ont récemment été mises en évidence (Jin, Zarnescu et al. 2004; Lugli, Larson et al. 2005).

Les caractéristiques des différents interacteurs de FMRP ainsi que leur apport dans la compréhension du rôle de FMRP sont précisées dans la Publication 1.

c) Mobilité des RNP

Dans le cytoplasme, les granules contenant FMRP ne sont pas uniquement localisés autour du noyau, mais sont visibles jusque dans les neurites et les cônes de croissance de cellules PC-12, ou dans les dendrites et les épines dendritiques de neurones hippocampaux (de Diego Otero, Severijnen et al. 2002; Antar, Afroz et al. 2004). L'application de méthodes d'imagerie fluorescente à haute résolution a permis de montrer que, dans les prolongements

neuronaux, ces granules colocalisent avec des ribosomes, la chaîne lourde de la kinésine, FXR1P et des ARN, dont l'ARNm MAP1B, cible potentielle de FMRP (De Diego Otero, Severijnen et al. 2002). Par ailleurs, la quantité de FMRP augmente rapidement dans les dendrites de neurones hippocampaux, sous l'effet d'une dépolymérisation par du chlorure de potassium par exemple, sans que ce processus ne fasse intervenir une synthèse *de novo* (Antar, Afroz et al. 2004). Ces résultats suggèrent que les particules RNP contenant FMRP sont mobiles dans la cellule, et que leur mise en mouvement peut être déclenchée par différents stimuli.

L'utilisation d'une protéine FMRP fusionnée à la GFP a permis de montrer que les granules contenant FMRP bougent effectivement le long des neurites de cellules PC-12 et dans les dendrites de neurones hippocampaux à partir du corps cellulaire (de Diego Otero, Severijnen et al. 2002). Leur mouvement est bidirectionnel à petite échelle, mais globalement unidirectionnel et antérograde sur des distances plus longues. La vitesse moyenne de ces complexes RNP le long des processus cellulaires est de $0,19\mu\text{m/s}$, ce qui correspond aux ordres de grandeur obtenus dans le cadre de mesures du transport particulaire d'ARNm. Enfin, le déplacement de ces granules dépend de l'intégrité du réseau de microtubules.

Le transport d'ARNm au sein de RNP est un élément déterminant dans le maintien d'une asymétrie cellulaire (Bassell, Oleynikov et al. 1999). De plus, la traduction locale d'ARNm au niveau synaptique semble importante dans les phénomènes de plasticité (cf. paragraphe III.1.2.c). FMRP pourrait donc jouer un rôle dans le ciblage d'ARNm vers des sites particuliers de la cellule.

2.5) Implication de FMRP dans la régulation de la traduction

a) Mise en évidence *in vitro*

FMRP inhibe la traduction d'ARNm injectés dans des oocytes de xénope ou en suspension dans des extraits de réticulocytes de lapin (Laggerbauer, Ostareck et al. 2001). Lorsque FMRP est purifiée à partir de la souche bactérienne *Escherichia coli*, cet effet inhibiteur est indépendant de la nature de l'ARNm testé, alors qu'il est spécifique de certains ARNm lorsque la protéine est préparée à l'aide de baculovirus (Li, Zhang et al. 2001; Schaeffer, Bardoni et al. 2001). Des modifications post-transcriptionnelles pourraient donc restreindre l'action inhibitrice de FMRP à des cibles ARNm particulières.

In vitro, la forme mutante I304N de FMRP n'a aucun effet sur la traduction d'ARNm (Laggerbauer, Ostareck et al. 2001). Hormis les structures en kissing-complex (Darnell, Fraser et al. 2005), la protéine I304N conserve ses capacités d'interaction à l'ARN en conditions salines physiologiques mais perd celles de dimérisation et d'hétérodimérisation avec les protéines FXR1P et FXR2P (Laggerbauer, Ostareck et al. 2001). Le domaine KH2 de FMRP semble donc nécessaire à l'interaction avec différents partenaires protéiques et cette propriété semble requise *in vitro* pour la régulation de la traduction d'ARNm.

b) Confirmation *in vivo*

FMRP est associée aux polysomes en cours de traduction

FMRP est associée aux polysomes dans le cytoplasme, non seulement au niveau du RER périmoléculaire mais également plus localement, au niveau synaptique par exemple (Khandjian, Corbin et al. 1996; Feng, Absher et al. 1997; Weiler, Irwin et al. 1997). Au contraire, le mutant I304N de FMRP est absent des fractions lourdes correspondant aux polyribosomes sur gradient de sucrose. Compte tenu du phénotype sévère dû à cette mutation, l'association de FMRP aux polysomes semble donc fonctionnellement importante.

Le traitement de cellules par de l'azide de sodium permet le repérage des polysomes engagés dans la traduction d'ARNm, puisqu'il bloque l'initiation de la traduction sans empêcher l'élongation des protéines déjà en cours de synthèse. Il en résulte une dissociation des polysomes actifs, les ribosomes se détachant progressivement des ARNm traduits sans pouvoir se réassocier sur de nouveaux ARNm. Cette dissociation se manifeste par une diminution des fractions lourdes sur gradient de sucrose et par une augmentation du pic à 80S, correspondant aux ribosomes libres. Or, sous l'effet de ce traitement, la majeure partie de FMRP disparaît également des fractions lourdes (Feng, Absher et al. 1997). FMRP est donc associée aux polyribosomes en cours de traduction dans le cytoplasme, ce qui est en faveur de son implication *in vivo* dans le contrôle de la traduction.

Conséquences de l'absence de FMRP sur la traduction d'ARNm

Une augmentation du niveau de synthèse protéique a récemment été observée dans plusieurs régions du cerveau de souris invalidées pour le gène *Fmr1* (cf. paragraphe III.1.1),

ARNm cible potentiel	Liaison à FMRP	Présence de G-quartet	Conséquence sur la traduction
KIAA0964/SAPAP4	Oui	Non	↑ association aux polysomes
Munc13	Oui	Oui, 3'UTR	↑ association aux polysomes
KIAA1091/Rab6 interacting protein	Oui	Oui, région codante	↑ association aux polysomes
Similar to adenylate cyclase	Oui	?	↑ association aux polysomes
Similar to MKP-dusPTPase	Oui	Non	↑ association aux polysomes
TP63	Oui	Oui, 3'UTR	↑ association aux polysomes
Casein kinase, $\gamma 2$	Oui	Non	↑ association aux polysomes
NAP22	Oui	Non	↑ association aux polysomes
MAP1B	Oui	Oui, 5'UTR	↓ association aux polysomes, ↓ quantité de protéine
Similar to I38022 hypothetical protein	Oui	?	↓ association aux polysomes
Msx2 interacting nuclear target homolog	Oui	Oui, région codante	↓ association aux polysomes
KIAA0317	Oui	Oui, 3'UTR	↓ association aux polysomes
Arg/Abl interacting protein	Oui	Non	↓ association aux polysomes
Transmembrane protein 1	Oui	Oui, 3'UTR	↓ association aux polysomes
α -CaMKII	Via BC1?	?	↓ association aux polysomes
Arc	Via BC1?	?	↓ association aux polysomes
EF-1A	Oui, <i>in vitro</i>	?	↓ quantité de protéine
PSD-95	?	Oui, 3'UTR	↑ quantité de protéine
G protein-coupled receptor kinase II	Oui	Non	↑ quantité de protéine
Regulator of G protein Signalling 5	Oui	Non	↑ quantité de protéine
Dystroglycan-associated glycoprotein 1	Oui	Oui, 3'UTR	↑ quantité de protéine
Cyclin D dependent Kinase 4	Oui	Oui, région codante	↑ quantité de protéine

Tableau 4. Principales cibles ARNm potentielles de FMRP.

Ce tableau résume quelques uns des ARNm, dont la traduction pourrait être régulée par FMRP. Ces cibles potentielles ont été identifiées lors de différents cribles (en bleu : Brown *et al*, 2001 ; en rosé : Miyashiro *et al*, 2001 ; en vert : Zalfa *et al*, 2003 ; en blanc : études indépendantes). MAP1B est indiqué en grisé, car il a été identifié dans plusieurs études.

confirmant le rôle de FMRP dans la régulation de la traduction *in vivo* (Qin, Kang et al. 2005).

Les conséquences de l'absence de FMRP sur le niveau de traduction d'ARNm ont été étudiées via deux méthodes lors des cribles à grande échelle destinés à identifier des cibles ARN de FMRP.

A l'aide de micropuces, Brown *et al* ont identifié 251 ARNm, dont le profil d'association aux polyribosomes est modifié dans des cellules lymphoblastoïdes de patients par rapport à celui observé dans des individus sains (Brown, Jin et al. 2001). Seuls 14 de ces ARNm avaient également été immunoprécipités avec FMRP, ce taux faible de recouvrement s'expliquant d'une part par l'analyse de tissus différents (cerveau versus lymphoblastoïdes) et par le faible niveau de correspondance des oligonucléotides présents sur les micropuces utilisées dans les deux études. En absence de FMRP, l'association de 6 de ces ARNm aux polyribosomes est augmentée, alors qu'elle est diminuée pour les 8 autres (cf. Tableau 4). FMRP pourrait donc, selon l'ARNm cible considéré, empêcher ou, au contraire, promouvoir l'association d'ARNm aux polyribosomes. Si l'on considère que le niveau d'association aux polyribosomes reflète celui de traduction de l'ARNm, FMRP pourrait donc jouer *in vivo* le rôle d'inhibiteur ou d'activateur traductionnel, selon l'ARNm considéré. Par ailleurs, 8 de ces ARNm possèdent un Gquartet. Cette proportion est élevée, puisque seul 4% des ARNm totaux comporterait une telle structure (Schaeffer, Beaulande et al. 2003.).

Une analyse quantitative directe par western blot a également permis de montrer que deux protéines, GRK2 (G protein-coupled Receptor Kinase 2) et β DAG1 (Dystroglycan-Associated Glycoprotein 1), correspondant à deux des 81 ARNm cibles potentielles, identifiés via la technique d'APRA par Miyashiro *et al*, sont plus abondantes dans le cerveau de souris sauvages que dans celui de souris invalidées pour le gène *Fmr1* (cf. Tableau 4) (Miyashiro, Beckel-Mitchener et al. 2003). Deux autres protéines, RGS5 (Regulator of G protein Signalling 5) et CDK4 (Cyclin D dependent Kinase 4), dont les ARNm avaient également été identifiés lors de ce criblage, sont plus abondantes dans des extraits de synaptoneurosomes de souris sauvages que dans ceux de souris invalidées pour le gène *Fmr1* (cf. Tableau 4).

Ce résultat est en faveur d'un rôle d'activateur traductionnel de FMRP, même si le nombre faible de cibles ne permet pas d'exclure l'hypothèse du rôle simultané de répresseur traductionnel. Les travaux de Zalfa *et al* montre d'ailleurs, que la traduction des protéines Arc

(Activity-Regulated Cytoskeleton associated protein), MAP1B (Microtubules Associated Protein 1B), FXR2P et α -CaMKII pourrait être réprimée par FMRP, puisque ces protéines sont en quantité plus importante dans les extraits de cerveau totaux et/ou de synaptoneurosomes de souris invalidées pour le gène *Fmr1* (Zalfa, Giorgi et al. 2003).

Enfin, quelques approches par «gène candidat» ont permis d'identifier des ARNm liés par FMRP, codant des protéines dont la quantité est modifiée en absence de FMRP (cf. Tableau 4). C'est notamment le cas du facteur d'élongation EF-1A (Elongation Factor 1 A) (Sung, Dolzhanskaya et al. 2003) ou de la protéine associée aux microtubules MAP1B, dont la traduction semble inhibée par FMRP au cours du développement (Lu, Wang et al. 2004). Au contraire, sous l'effet de l'activation de récepteurs au glutamate, la quantité de la protéine chaperonne PSD-95 (Post-Synaptique Density 95) est augmentée lorsque FMRP est exprimée, mais n'est pas modifiée en son absence (Todd, Mack et al. 2003). De manière intéressante, la régulation s'effectue ici au niveau synaptique. FMRP pourrait donc également contrôler la traduction de certains ARNm localement.

Mécanismes potentiels de régulation de la traduction

Les mécanismes moléculaires, grâce auxquels FMRP contrôlerait la traduction d'ARNm cibles, restent mal connus. Cependant, l'interaction de FMRP avec eIF2C2 et Dicer suggère que FMRP puisse inhiber la traduction d'ARNm en utilisant le complexe RISC (Jin, Zarnescu et al. 2004; Lugli, Larson et al. 2005). Cette hypothèse est renforcée par la démonstration d'une interaction entre FMRP et des micros-ARN *in vivo* (Jin, Alisch et al. 2004; Jin, Zarnescu et al. 2004). Les micros-ARN sont synthétisés par clivage d'ARN comportant 60 à 80 nucléotides et repliés en épingle à cheveux, résultant eux-mêmes du clivage d'ARN transcrits à partir de séquences génomiques. Ces micros-ARN peuvent s'apparier à un ARNm cible et inhiber la traduction immédiatement après l'initiation en induisant une gêne stérique (Schaeffer, Beaulande et al. 2003.).

Une autre hypothèse fait intervenir l'ARN non-codant BC1, qui interagit avec les facteurs d'initiation et réprime la traduction en empêchant l'assemblage du complexe d'initiation 48S (Cristofanilli, Iacoangeli et al. 2006). FMRP pourrait se lier à BC-1 *in vivo* (Zalfa, Giorgi et al. 2003). De plus, l'association entre FMRP et certains ARNm semble dépendre de la présence de BC1. FMRP pourrait donc réprimer indirectement la traduction de

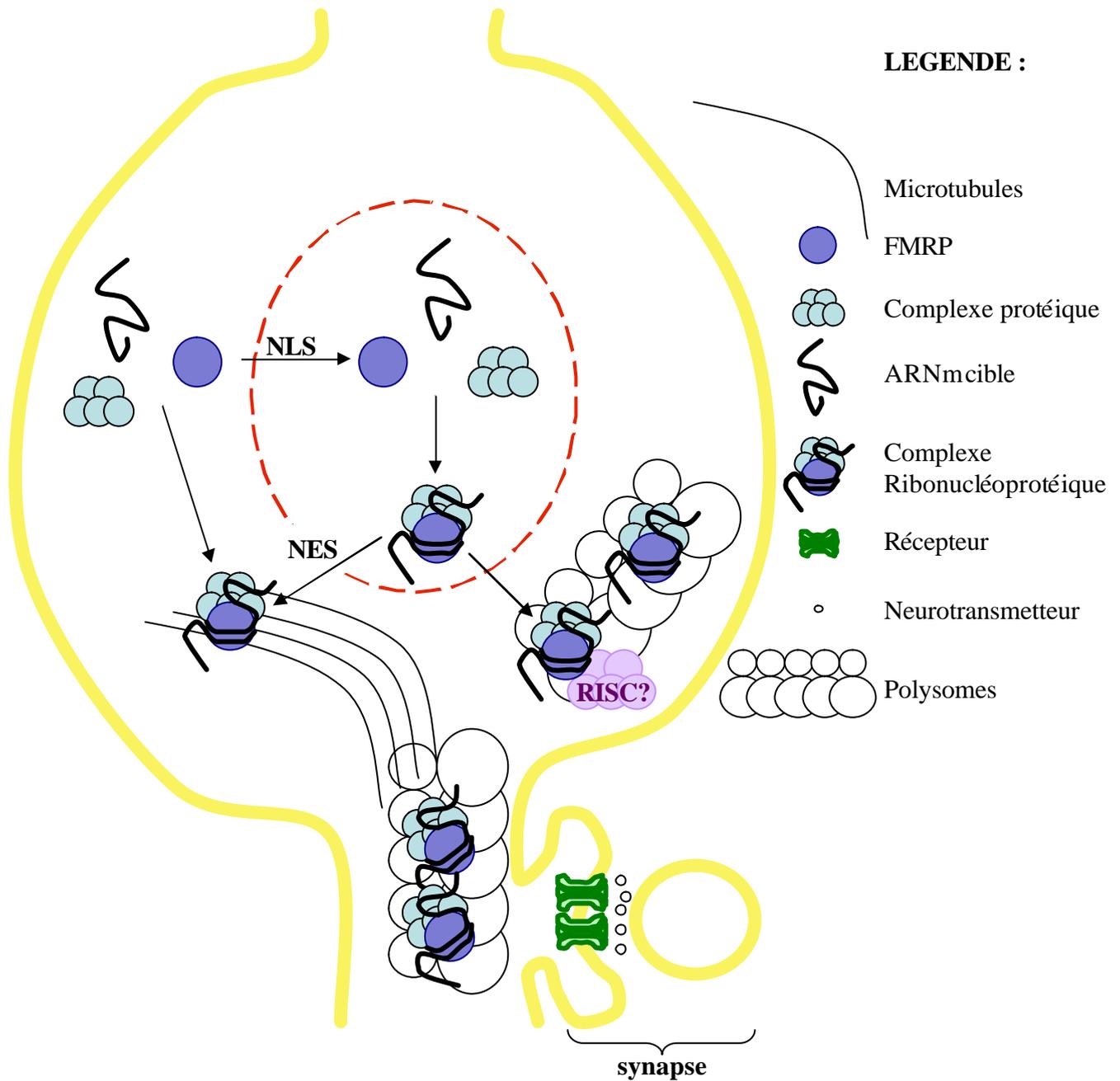


Figure 14. Modèle du rôle cellulaire de FMRP: schéma dans un neurone.

FMRP fait partie de complexes ribonucléoprotéiques dans le cytoplasme et/ou le noyau. Au sein de ces complexes, FMRP pourrait réguler l'export d'ARNm cibles. FMRP pourrait également réguler la traduction de ces ARNm en s'associant aux polyribosomes dans le cytoplasme, notamment au niveau synaptique.

NLS : Signal de Localisation Nucléaire ; NES : Signal d'Export Nucléaire ; RISC : RNA Induced Silencing Complex.

certaines ARNm via BC1, qui jouerait le rôle d'adaptateur en s'appariant aux ARNm cibles et en inhibant leur traduction. Cependant, BC1 est uniquement présent dans les dendrites, où il se concentre dans des zones post-synaptiques (Cristofanilli, Iacoangeli et al. 2006). Ce modèle ne permet donc pas de rendre compte d'un contrôle traductionnel de FMRP à l'échelle cytoplasmique.

Enfin, aucun de ces deux modèles ne permet d'expliquer le rôle éventuel de FMRP dans l'activation de la traduction de certains ARNm.

2.6) Modèle du rôle cellulaire de FMRP

Le modèle communément admis consiste à postuler que FMRP fasse partie d'un ou de plusieurs complexe(s) ribonucléoprotéique(s) impliqué(s) dans le contrôle du métabolisme des ARNm. FMRP pourrait réguler l'export nucléaire d'ARNm, mais également intervenir dans leur transport ciblé vers des zones particulières du cytoplasme, comme les synapses par exemple. FMRP semble également réguler la traduction d'un certain nombre d'ARNm cibles, à l'échelle cellulaire et/ou plus localement, au niveau synaptique notamment (cf. Figure 14).

III. Le syndrome de l'X fragile : de l'étude des modèles animaux aux modèles moléculaires de pathogenèse

1) Apport du modèle murin à la compréhension du rôle synaptique de FMRP

1.1) Caractéristiques générales du modèle murin

a) Elaboration du modèle murin

La souris est un modèle animal présentant plusieurs avantages dans l'étude fonctionnelle de gènes humains (Cox and Brown 2003):

- 80% des gènes murins ont un orthologue humain, dont la fonction est souvent au moins partiellement conservée, du fait notamment de la proximité phylogénétique entre les deux espèces (classe des Mammifères).

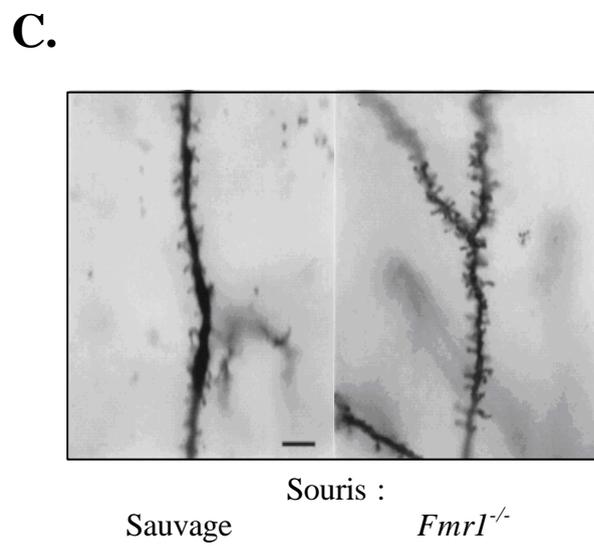
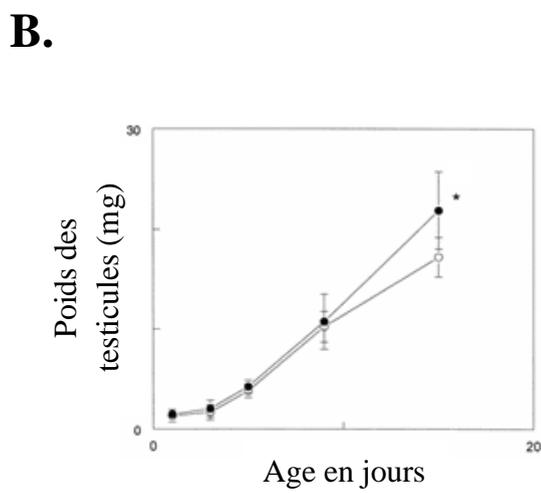
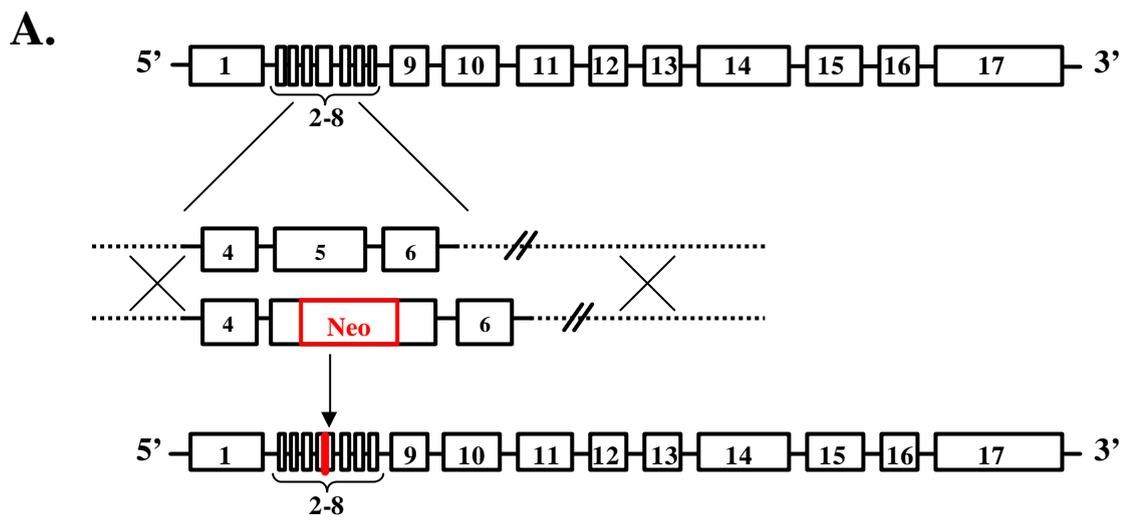


Figure 15. Modèle murin du syndrome de l’X fragile.

A. Schéma du gène *Fmr1*, montrant la stratégie d’inactivation utilisée. Les 17 exons sont représentés par des rectangles, les introns par des traits. L’inactivation du gène est obtenue par recombinaison homologue, en induisant le remplacement de l’allèle normal par un allèle interrompu par une cassette néomycine dans l’exon 5. Adapté de *Oostra et Willems, 1998*.

B. Apparition d’une macroorchidie chez les souris *Fmr1*^{-/-}. Le volume testiculaire des souris *Fmr1*^{-/-} (ronds noirs) devient significativement supérieur à celui des souris sauvages (ronds blancs) une dizaine de jours après la naissance. Adapté de *Slegtenhorst-Eegdeman et al, 1998*.

C. Anomalies de forme et de nombre des épines dendritiques chez les souris *Fmr1*^{-/-}. Les épines dendritiques du cortex des souris *Fmr1*^{-/-} sont plus nombreuses et plus longues que celles des souris sauvages. Adapté de *Comery et al, 1997*.

- la petite taille des animaux, leur cycle de reproduction rapide (temps de gestation de 21 jours), leur taux de fécondité élevé facilitent leur élevage.
- le génome murin est séquencé depuis 2002, grâce à l'achèvement du séquençage du génome murin.
- et enfin, le développement de techniques de transfert de gènes permet la réalisation de manipulations génétiques et la mise au point d'animaux transgéniques.

Par ailleurs, dans le cas précis du syndrome de l'X fragile, la forte homologie de séquence ainsi que la grande similitude du profil d'expression des deux gènes, humain et murin, suggéraient que la fonction du gène puisse être conservée entre les deux espèces (Oostra and Willems 1998). La création d'un modèle animal pour le syndrome de l'X fragile répondait à une triple attente :

- la possibilité de disposer de tissus, notamment cérébraux, en quantité suffisante pour mener à bien des études anatomiques et moléculaires.
- la mise en œuvre de tests comportementaux permettant de caractériser les secteurs de l'apprentissage altérés en absence de FMRP.
- la réalisation de croisements avec d'autres modèles murins, de manière à étudier les interactions entre gènes.

Une stratégie de knock-out a été utilisée pour établir le modèle murin du syndrome de l'X fragile (cf. Figure 15A) (Khandjian, Corbin et al. 1996; Feng, Absher et al. 1997). La copie normale du gène *Fmr1* a été remplacée, par recombinaison homologue dans des cellules souches embryonnaires, par une copie mutée, dont la séquence avait été interrompue par insertion du gène de la néomycine dans l'exon 5. Ces cellules souches recombinées ont ensuite été injectées dans des embryons au stade blastula et transférés dans l'utérus de femelles pseudogestantes. Des femelles hétérozygotes pour la mutation ont été obtenues par croisement de mâles chimères issus de ces embryons et de femelles sauvages ; le croisement de ces femelles hétérozygotes avec des mâles sauvages a permis l'obtention de mâles porteurs du gène muté. Récemment, un modèle conditionnel a été élaboré, en flanquant le promoteur et le premier exon du gène *Fmr1* de sites lox P (Mientjes, Nieuwenhuizen et al. 2006). Le croisement de cette lignée lox P avec une lignée exprimant la recombinaise Cre, dans certains tissus et/ou de manière inductible, permet de restreindre l'existence de la mutation nulle à

certain types cellulaires et/ou à un temps donné. Une lignée invalidée pour le gène *Fmr1* exclusivement dans les cellules de Purkinje a ainsi été créée.

b) Phénotype global des souris *Fmr1* knock-out

La mutation nulle introduite ne reproduit pas exactement l'expansion de triplets nucléotidiques existant chez les patients, mais aboutit au même résultat d'un point de vue moléculaire, c'est-à-dire à l'absence de FMRP. La validation de ce modèle a été apportée par les similarités existant entre les phénotypes des souris invalidées pour *Fmr1* et ceux des patients.

Les souris knock-out ont en effet une espérance de vie, un taux de fécondité et une morphologie similaires à celles des souris sauvages (Kooy, D'Hooge et al. 1996). Aucune différence majeure n'a été observée au niveau du poids et de la morphologie globale des organes vitaux (cœur, reins, rate, foie, poumons) (Consortium 1994). En revanche, plus de 90% des souris *Fmr1* knock-out ont un volume testiculaire supérieur à la normale dès 15 jours de vie (cf. Figure 15B) (Consortium 1994). Cette macroorchidie pourrait être causée par une augmentation du niveau de prolifération des cellules de Sertoli, à l'origine d'une hausse du nombre de cellules germinales (Slegtenhorst-Eegdeman, de Rooij et al. 1998).

Aucune anomalie majeure n'a été observée au niveau de l'anatomie du cerveau (Kooy, Reyniers et al. 1999). Les dimensions du vermis et du noyau caudé ne sont pas modifiées, alors qu'elles pourraient l'être chez les patients. En revanche, tout comme chez les patients, la présence d'une quantité anormalement élevée d'épines dendritiques longues et fines a été mise en évidence dans le cortex occipital des souris *Fmr1*^{-/-} (cf. Figure 15C) (Comery, Harris et al. 1997; Irwin, Idupulapati et al. 2002) et des anomalies ont récemment été observées au niveau de l'hippocampe (Grossman, Elisseou et al. 2006). Cette caractéristique phénotypique est supposée jouer un rôle majeur dans la genèse du retard mental chez les patients et sa présence chez la souris est donc extrêmement intéressante pour comprendre les bases moléculaires du syndrome.

La réalisation de tests comportementaux et moteurs a d'ailleurs permis de montrer que les souris souffrent d'hyperactivité, qu'elles sont sujettes à des crises épileptiques, induites par des stimuli sonores ou par stimulation des récepteurs mGluR1 de l'hippocampe, et qu'elles présentent des troubles dans certains secteurs de l'apprentissage (Consortium 1994; Musumeci, Bosco et al. 2000; Chen and Toth 2001; Chuang, Zhao et al. 2005). La piscine de

Morris permet de tester la mémoire à court-terme des souris, ainsi que leur capacité à se reconnaître visuellement dans l'espace. Ce dispositif comporte une piscine d'eau opaque, dissimulant une plateforme sur laquelle la souris peut s'agripper. Si les souris *Fmr1*^{-/-} mémorisent l'emplacement de la plateforme de manière aussi performante que les souris sauvages, elles présentent en revanche des difficultés pour retrouver l'emplacement de la plateforme, et pour mémoriser ce changement, lorsque sa position a été modifiée (Consortium 1994; Van Dam, D'Hooge et al. 2000), même si ce défaut pourrait dépendre du fond génétique de la lignée de souris utilisée (Dobkin, Rabe et al. 2000). Ce type d'altérations provient généralement de dysfonctionnements au niveau des circuits de la mémoire et de l'apprentissage de l'hippocampe.

1.2) Introduction générale : les bases de la mémoire, de l'échelle cérébrale à l'échelle moléculaire

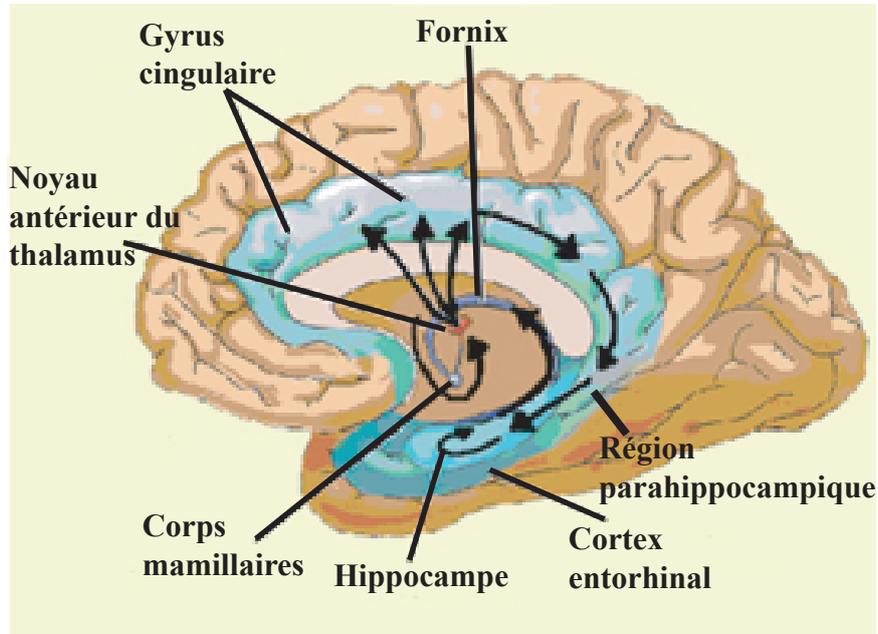
a) Définition

L'apprentissage est un processus actif qui permet la conservation des informations acquises, des états affectifs et des impressions, qui sont, en retour, capables d'influencer le comportement (Kandel, Schwartz et al. 2000). L'apprentissage requiert un remaniement constant de la structure du cerveau et constitue la première étape du processus de mémorisation, c'est à dire à la phase de «mise en mémoire» des données. La mémoire est la résultante de cette phase d'apprentissage et correspond au stockage de souvenirs personnels et de connaissances générales.

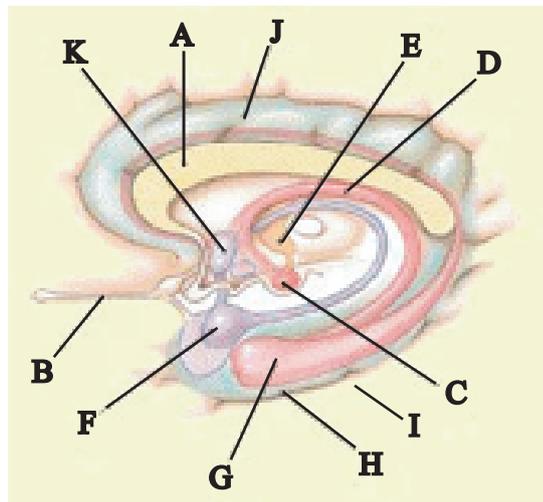
La mémoire peut-être subdivisée en trois niveaux, selon l'importance de la phase d'apprentissage mise en jeu et, par voie de conséquence, selon la durée de stockage des informations (Atkinson and Shiffrin 1968):

- la mémoire sensorielle repose sur la rétention, pendant quelques secondes, d'images et de sons perçus par les systèmes visuel et auditif.
- la mémoire à court terme correspond au maintien, pendant une durée de l'ordre de la minute, de données issues de la mémoire sensorielle et conservées grâce à l'attention que le sujet leur a portée.

A.



B.



- A- Corps calleux
- B- Voie olfactive
- C- Corps mammillaires**
- D- Fornix
- E- Noyau antérieur du thalamus**
- F- Amygdale
- G- Hippocampe**
- H- Cortex entorhinal**
- I- Région parahippocampique**
- J- Gyrus cingulaire**
- K- Noyaux hypothalamiques

C.

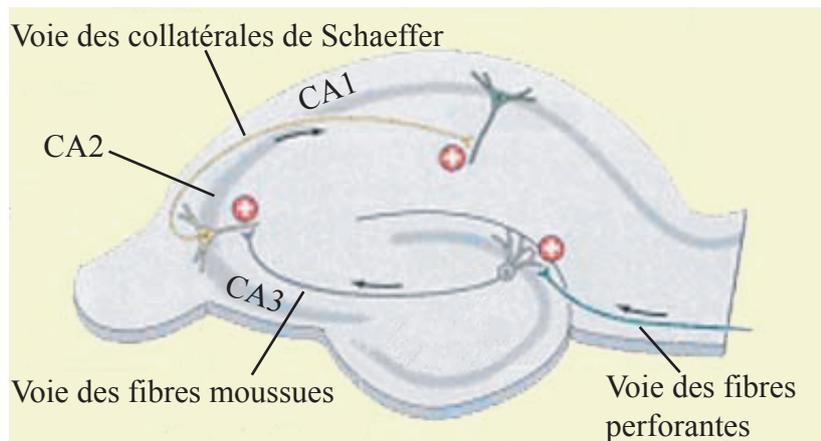


Figure 16. Réseaux neuronaux impliqués dans la mémoire.

A. Circuit neuronal de Papez. Les flèches indiquent le sens de déplacement des informations au travers des différentes régions cérébrales.

B. Détail de la région thalamique. Les régions indiquées en gras font partie du circuit neuronal de Papez.

C. Organisation tri-synaptique de l'hippocampe. CA: Corne d'Ammon.

Adapté du site web : "Le cerveau à tous les niveaux."

- enfin, la mémoire à long terme stocke à la fois les informations correspondant aux faits récents, encore fragiles, et les informations correspondants aux faits plus anciens, consolidées au fur et à mesure des processus d'association.

b) Plasticité des réseaux neuronaux : les bases cellulaires de la mémoire

Au niveau cellulaire, la trace mnésique repose sur l'activation, lors de l'apprentissage, et sur la stimulation, lors de la restitution, de réseaux de neurones «précablés». L'existence d'une carte spatiale a ainsi pu être mise en évidence au niveau de l'hippocampe chez le rat : l'activation des réseaux de neurones pyramidaux dépend en effet de la localisation du rat dans son environnement (O'Keefe and Dostrovsky 1971). Ces réseaux neuronaux établissent une jonction entre les différentes aires cérébrales. La mémoire à long terme repose ainsi sur le circuit neuronal de Papez(cf. Figure 16) (Papez 1937): l'information, perçue au niveau des différentes aires du cortex sensoriel, circule ensuite de la région parahippocampique du cortex jusqu'au cortex enthorinal, pour aboutir finalement au niveau de l'hippocampe. A l'intérieur de l'hippocampe, les informations sont alors relayées via une boucle trisynaptique, comportant successivement les neurones granuleux de l'aire CA3 (Corne d'Ammon 3), les neurones pyramidaux de l'aire CA2 (Corne d'Ammon 2), dont les axones forment les collatérales de Schaeffer qui projettent finalement sur les épines dendritiques des neurones pyramidaux de l'aire CA1 (Corne d'Ammon 1). Les neurones hippocampaux relaient ensuite les informations qui ont convergé vers le corps mamillaire, le thalamus et finalement le gyrus cingulaire, constituant le cortex péri- limbique.

Les réseaux neuronaux mis en jeu dans les processus de mémoire ne sont pas figés, mais évoluent au fur et à mesure des phénomènes d'apprentissage, de consolidation, de restitution et...d'oubli. L'un des supports cellulaires associés au remodelage de ces réseaux est la plasticité synaptique. La plasticité synaptique repose sur le principe selon lequel l'efficacité de la transmission synaptique entre deux neurones est fonction de l'importance des échanges ayant existé entre ses neurones. Il existe deux grandes formes de plasticité synaptique, la potentialisation à long terme (LTP) et la dépression à long terme (LTD), qui sont mises en jeu dans les différentes aires cérébrales de la mémoire (voir (Bear and Malenka 1994) pour revue).

La LTP est un processus de renforcement synaptique, déclenchée à la suite de stimulations répétées du neurone post-synaptique (Bliss and Collingridge 1993; Bear and Malenka 1994). La LTP permet une augmentation de l'amplitude de la réponse post-synaptique : suite aux modifications associées à ce type de plasticité synaptique, une stimulation unique du neurone pré-synaptique suffit à déclencher une réponse intense qui perdure pendant plusieurs heures au niveau du neurone post-synaptique. La LTD est un phénomène complémentaire, qui conduit à la mise sous silence de la synapse. La LTD pourrait permettre de rétablir un fonctionnement normal au niveau d'une synapse potentialisée par la LTP. Cependant, elle jouerait également un rôle actif dans la mise en mémoire d'informations, notamment pour inhiber des réseaux neuronaux impliqués dans le déclenchement de mouvements erronés au niveau du cervelet (Ito, Sakurai et al. 1982; Ito 2001).

La LTP et la LTD peuvent être modélisées *in vitro*, en appliquant des stimulations de fréquence particulière sur les voies afférentes de tranches d'hippocampe (Mulkey and Malenka 1992; Dudek and Bear 1993; Bear and Malenka 1994; Malenka 1994) ou de néocortex (Bear and Kirkwood 1993; Kirkwood, Dudek et al. 1993; Kirkwood and Bear 1994). La LTD est, par exemple, induite par des trains de fréquence de l'ordre de 1 à 3 Hz. La LTP peut-être déclenchée par des stimulations de type «theta-burst», comprenant quelques bouffées de stimulation de fréquence comprise entre 5 et 8 Hz, chaque bouffée étant composée de quelques pics de fréquence 100 Hz, l'ensemble pouvant être répété plusieurs fois à une dizaine de secondes d'intervalle ; elle peut également être induite par des stimuli de type tétanique, comportant une stimulation d'une à deux secondes à haute fréquence (100 à 200 Hz), répétée ou non plusieurs fois.

c) Récepteurs au glutamate et calcium: les bases moléculaires de la mémoire.

Caractéristiques générales des récepteurs au glutamate

Le glutamate est le principal neurotransmetteur exciteur du système nerveux central (Fonnum 1984). Dans l'hippocampe, il est notamment responsable de la transmission entre les collatérales de Schaeffer et les épines dendritiques des cellules pyramidales de l'aire CA1, et intervient donc au niveau des circuits neuronaux de la mémoire. Le glutamate agit sur deux types de récepteurs, les récepteurs ionotropiques, qui sont des canaux ioniques dont

l'ouverture est déclenchée par la fixation du ligand, et les récepteurs métabotropiques, qui sont couplés à une protéine G et induisent une dépolarisation en activant une cascade de messagers secondaires.

Trois classes de récepteurs ionotropiques ont été définies selon le seuil limite de voltage nécessaire à leur activation, selon leur distribution dans le cerveau et selon leur sensibilité aux différents agonistes et antagonistes du glutamate (voir (Ozawa, Kamiya et al. 1998) pour revue). Ces récepteurs-canaux sont désignés selon le nom de leur agoniste principal et on distingue :

- les récepteurs NMDA (activés par le N-méthyl-D-aspartate), qui forment des canaux perméables aux ions potassium, sodium et calcium. Un site cationique voltage-dépendant, occupé par des ions magnésium, empêche le passage des ions potassium, sodium et calcium, au travers du canal, tant que la dépolarisation de la membrane reste en-dessous d'un certain seuil. Chaque récepteur est composé de quatre sous-unités (NMDA-R1 à R4), comportant des sites de phosphorylation pour la protéine kinase C (PKC), pour la protéine kinase calcium-calmoduline-dépendante (CaMKII) et pour des tyrosines kinases. Ces modifications post-traductionnelles pourraient moduler l'excitabilité de ce récepteur (Bading and Greenberg 1991; Moss, Blackstone et al. 1993; Wang, Orser et al. 1994) et jouer un rôle dans la plasticité synaptique (Collingridge 1987). Par ailleurs, l'entrée d'ions calcium via ces récepteurs déclenche l'activation de messagers secondaires essentiels au renforcement synaptique.
- les récepteurs AMPA (activés par le α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionate), qui sont des canaux perméables aux ions sodium et potassium, constitués de quatre sous-unités (GluR1-4). Ces récepteurs AMPA sont rapidement activés et sont donc responsables de la phase précoce de la transmission synaptique. Leurs propriétés (affinité et taux de désensibilisation au glutamate, amplitudes des courants activés...) peuvent être modulées par phosphorylation : le domaine intracellulaire des récepteurs AMPA comporte en effet trois sites de phosphorylation pour la protéine kinase A (PKA) (Greengard, Jen et al. 1991; Raymond, Blackstone et al. 1993), un site pour la protéine kinase C (PKC) (Tan, Wenthold et al. 1994), et un site pour la CaMKII (Yakel, Vissavajhala et al. 1995; Barria, Muller et al. 1997). Ces modifications pourraient à encore constituer un support des phénomènes de plasticité synaptique.

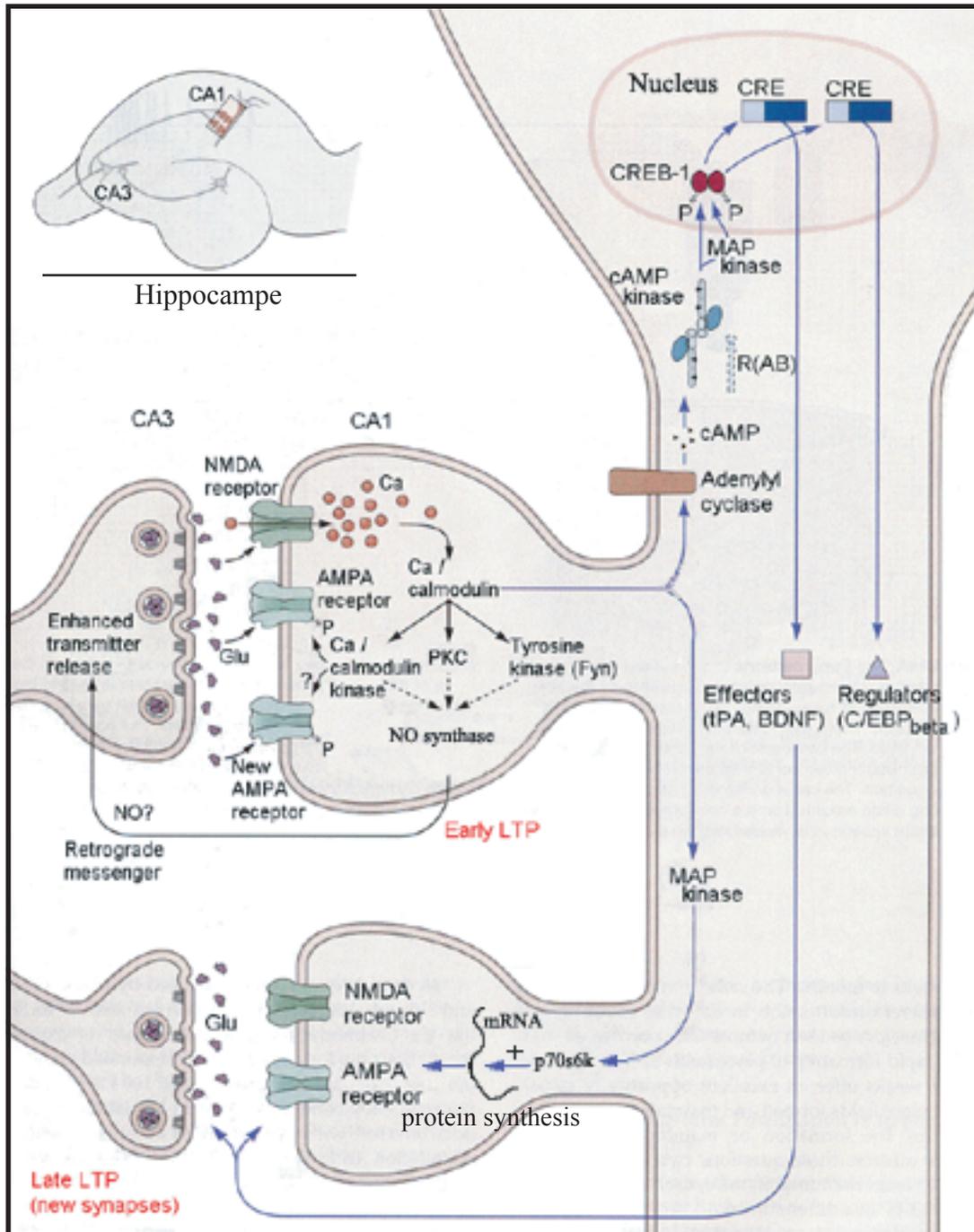


Figure 17. Mécanismes moléculaires de la Potentialisation à Long Terme (LTP) dépendante des récepteurs NMDA dans l'hippocampe.

Les deux phases de la LTP, précoce (Early LTP) et tardive (Late LTP), sont schématisées.

Glu : glutamate ; NO : monoxyde d'azote

- les récepteurs kaïnate (activés par le kaïnate), qui sont perméables au potassium, au sodium et au calcium. Ils sont particulièrement concentrés dans les cellules pyramidales de l'aire CA3 de l'hippocampe. Ces récepteurs ont longtemps été confondus avec les récepteurs AMPA, qui possèdent une faible affinité pour le kaïnate.

Les récepteurs métabotropiques au glutamate comportent sept domaines transmembranaires (Ozawa, Kamiya et al. 1998). La fixation de glutamate sur ces récepteurs induit une modification de leur conformation, déclenchant l'activation de protéines G (protéines se liant au GTP). Il existe huit récepteurs métabotropiques différents (mGluR1-8), répartis en trois groupes en fonction de leur homologie de séquences. Les récepteurs mGluR1 et mGluR5 constituent le groupe 1. Ils sont couplés à une protéine Gq, qui active la phospholipase-C (PLC). Cette enzyme catalyse alors la transformation de phospholipides membranaires en inositol 3-phosphate (IP3) et diacylglycérol (DAG). L'augmentation du taux d'IP3 provoque la libération de calcium à partir des stocks intracellulaires et la production de DAG entraîne l'activation de la PKC. L'augmentation de la teneur intracellulaire en calcium et l'activation de la PKC pourraient expliquer le rôle de ces récepteurs dans la plasticité synaptique (Bashir, Jane et al. 1993; Aiba, Chen et al. 1994; Aiba, Kano et al. 1994).

Mécanismes moléculaires d'induction de la LTP et de la LTD

Les mécanismes moléculaires mis en jeu lors de l'induction de LTP et de LTD sont complexes et varient en fonction de la région du cerveau considérée. Par ailleurs, selon le stimulus appliqué, les récepteurs à l'origine de la transduction du signal peuvent être différents. Quelques caractéristiques générales peuvent néanmoins être dégagées (cf. Figure 17).

L'utilisation d'antagonistes spécifiques a permis d'établir l'implication des récepteurs NMDA dans la LTP (Morris, Anderson et al. 1986). Ces récepteurs ne deviennent fonctionnels que lorsque la synapse atteint un degré d'activité tel que la libération de glutamate coïncide avec l'existence d'un potentiel post-synaptique excitateur (PPSE) d'amplitude suffisante au niveau de la membrane post-synaptique. L'activation des récepteurs NMDA déclenche une entrée massive d'ions Ca^{2+} à partir du milieu extracellulaire. Les ions Ca^{2+} sont des médiateurs essentiels dans le renforcement synaptique, puisque la LTP est bloquée par la réduction de leur concentration extracellulaire ou par introduction de chélateurs

(Lynch, Larson et al. 1983). Les ions Ca^{2+} activent plusieurs cascades enzymatiques, en se fixant initialement sur la CaMKII et l'adénylate cyclase (Kandel, Schwartz et al. 2000). La CaMKII pourrait augmenter la conductance des récepteurs NMDA et des récepteurs AMPA en les phosphorylant. Elle possède par ailleurs la capacité de s'auto-phosphoryler, ce qui permet le maintien de la LTP après la restauration de la concentration intracellulaire en Ca^{2+} . L'entrée de calcium pourrait aussi activer la NO synthase : la diffusion du NO dans la fente synaptique serait responsable de changements au niveau présynaptique (Huang 1997). L'ensemble de ces modifications post-traductionnelles constitue la phase précoce de la LTP (Early-LTP, ou E-LTP). La persistance de la LTP lors de la phase dite tardive (Late-LTP, ou L-LTP) requiert la synthèse de nouvelles protéines, telles que la CaMKII ou les récepteurs AMPA (Kandel 2001). La voie induite par l'adénylate cyclase serait responsable pour partie de cette synthèse *de novo*, en activant le facteur de transcription CREB (cAMP-Response Element-Binding Protein). La synthèse locale, au niveau des dendrites et des épines dendritiques, de nouvelles protéines semble également jouer un rôle crucial dans le maintien de la L-LTP. L'activation de la kinase p70 S6 (p70S6k), par la phosphatidylinositol 3-kinase notamment, serait, par exemple, requise (Cammalleri, Lutjens et al. 2003). p70S6k stimule la traduction en induisant la synthèse de protéines faisant partie de la machinerie traductionnelle.

Outre les récepteurs NMDA, les récepteurs mGluR1 et mGluR5 pourraient également jouer un rôle dans l'induction de la L-LTP, en stimulant la synthèse protéique localement au niveau synaptique. En effet, les souris inactivées pour le gène *mGluR5* présentent des altérations de certains types de LTP (Lu, Jia et al. 1997). De plus, l'application d'un antagoniste des récepteurs mGluR, le 2-méthyl-6-(phényéthynyl)-pyridine (MPEP), empêche l'activation de la p70S6k, et, par voie de conséquence, la synthèse protéique nécessaire à la L-LTP (Francesconi, Cammalleri et al. 2004). Le rôle des récepteurs métabotropiques dans l'induction de la LTP reste cependant controversé (Ozawa, Kamiya et al. 1998). En effet, si une activation modérée des récepteurs métabotropiques du groupe 1 facilite l'induction de LTP au niveau de l'aire CA1 de l'hippocampe, une activation intense a l'effet inverse. Dans tous les cas, l'action des récepteurs mGluR est bloquée par l'ajout d'inhibiteurs traductionnels.

Au niveau du cervelet, l'induction de la LTD est déclenchée par l'activation des récepteurs AMPA et mGluR1 (Linden, Dickinson et al. 1991). L'implication des récepteurs mGluR1 dans cette forme de plasticité synaptique a été établie grâce à l'étude de souris

knock-out, dont le phénotype ataxique est imputable à des déficiences dans l'induction de LTD au niveau du cervelet (Aiba, Kano et al. 1994). L'activation de ces récepteurs est également relayée par une augmentation de la concentration en Ca^{2+} dans la terminaison post-synaptique, mais plus modérée que dans le cas de la LTP. Cet influx de Ca^{2+} conduit à l'activation de la PKC, qui déclenche l'endocytose des récepteurs AMPA, selon un mécanisme dépendant de la clathrine (Carroll, Beattie et al. 1999). La réduction du nombre de récepteurs au glutamate diminue la conductance globale de la membrane post-synaptique et donc l'amplitude des PPSE générés par une stimulation pré-synaptique. L'inhibition des phosphatases PP1 (Protéine Phosphatase 1) et PP2A (Protéine Phosphatase 2 A) favorise également la LTD (Ito 2001).

Au contraire, PP1, PP2A, PP2B seraient activées pendant la LTD dans l'hippocampe (Mulkey RM 1993). La déphosphorylation de la sous-unité GluR1 du récepteur AMPA par PP1, PP2A, PP2B diminuerait la conductance du canal aux ions et rétablirait ainsi le potentiel post-synaptique à son niveau normal. Deux types de LTD co-existeraient dans l'hippocampe, déclenchées respectivement par les récepteurs NMDA et mGluR1-5. Dans les deux cas, une diminution du nombre de récepteurs AMPA sur la membrane post-synaptique est également observée. De plus, l'induction de la LTD par les récepteurs mGluR1-5 dépend d'une synthèse protéique rapide (Huber, Kayser et al. 2000).

1.3) Implication de FMRP dans les phénomènes de plasticité synaptique : émergence du modèle des récepteurs au glutamate

a) Implication de FMRP dans la régulation de la traduction induite par les récepteurs mGluR au niveau synaptique

Dans les neurones, FMRP est principalement située autour du noyau, notamment au niveau du RER. Cependant, des analyses de microscopie électronique ont permis de montrer que la protéine est également localisée dans les dendrites, au niveau des points de ramifications, mais également à la base et dans la partie apicale des épines dendritiques (Feng, Gutekunst et al. 1997). La localisation subcellulaire de FMRP suggérait donc qu'elle puisse jouer un rôle dans la transmission synaptique. Cette hypothèse a été renforcée par plusieurs résultats montrant que la synthèse de FMRP augmente localement au niveau synaptique en réponse à différents stimuli activant les récepteurs métabotropiques au glutamate (Weiler, Irwin et al. 1997). Ainsi, l'association de l'ARNm *Fmr1* aux polyribosomes et la quantité de

protéines présentes sont augmentées dans des cultures primaires de neurones corticaux et dans des préparations de synaptoneurosomes, quelques minutes après la stimulation des récepteurs mGluR1 par du DHPG (DiHydroxyPropoxymethylGuanine). De même, la quantité de FMRP augmente dans les fractions cellulaires synaptiques du cortex pariétal après la stimulation des vibrisses chez le rat, et l'utilisation d'antagonistes a permis de montrer que cette synthèse protéique locale dépend, là encore, de l'activation des récepteurs au glutamate NMDA et mGluR (Todd, Malter et al. 2003). Par ailleurs, la proportion de granules RNP contenant FMRP et/ou son ARNm augmente dans les dendrites mais diminue dans les synapses de neurones hippocampaux, en réponse à une dépolarisation induite par du chlorure de potassium ; ces relocalisations sont également bloquées par des antagonistes des récepteurs mGluR (Antar, Afroz et al. 2004).

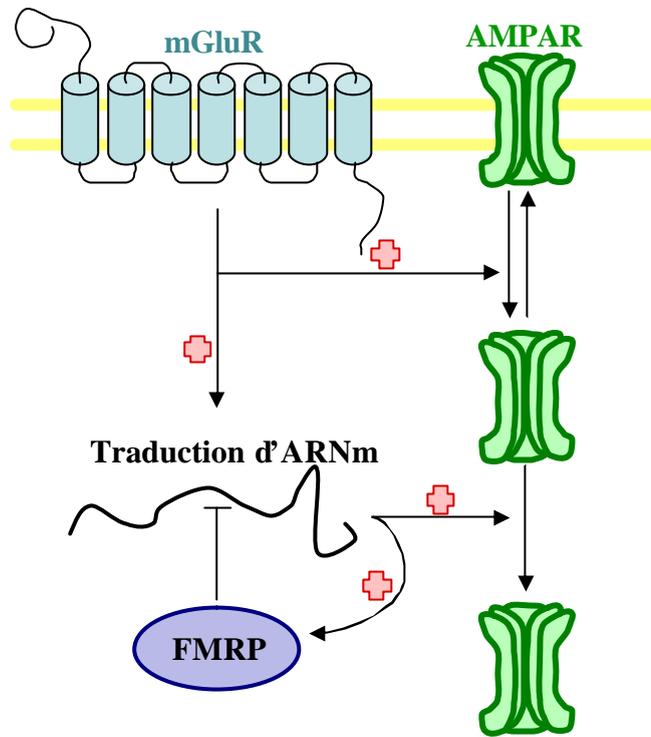
FMRP semble, de plus, impliquée dans la régulation de la synthèse d'ARNm en réponse à la stimulation des récepteurs mGluR. En effet, le taux de synthèse protéique induit par le DHPG diminue dans des préparations de synaptoneurosomes de souris *Fmr1*^{-/-} (Greenough, Klintsova et al. 2001). Par ailleurs, la traduction de l'ARNm codant la protéine chaperonne synaptique PSD-95 est normalement augmentée en réponse au DHPG, mais cette induction disparaît dans les neurones corticaux de souris *Fmr1*^{-/-} (Todd, Mack et al. 2003). Enfin, la quantité de la sous-unité GluR1 des récepteurs AMPA est plus faible chez les souris knock-out, globalement à l'échelle du cortex, mais également dans des extraits corticaux de membranes plasmiques synaptiques (Li, Pelletier et al. 2002).

L'ensemble de ces résultats suggère que FMRP puisse jouer un rôle dans la transduction du signal induit par l'activation des récepteurs métabotropiques au glutamate, en contrôlant la traduction et/ou la localisation d'ARNm au niveau synaptique.

b) Mise en évidence d'altérations de la plasticité synaptique dans le cerveau des souris *Fmr1* knock-out

Compte-tenu : i) du phénotype des souris *Fmr1* knock-out, ii) des anomalies quantitatives et qualitatives de la structure des épines dendritiques en absence de FMRP, et iii) de l'implication probable de FMRP dans la régulation de la traduction d'ARNm induite par les récepteurs mGluR, des analyses électrophysiologiques ont été conduites dans plusieurs régions du cerveau impliquées dans les processus de mémoire et d'apprentissage, afin de

A.



B.

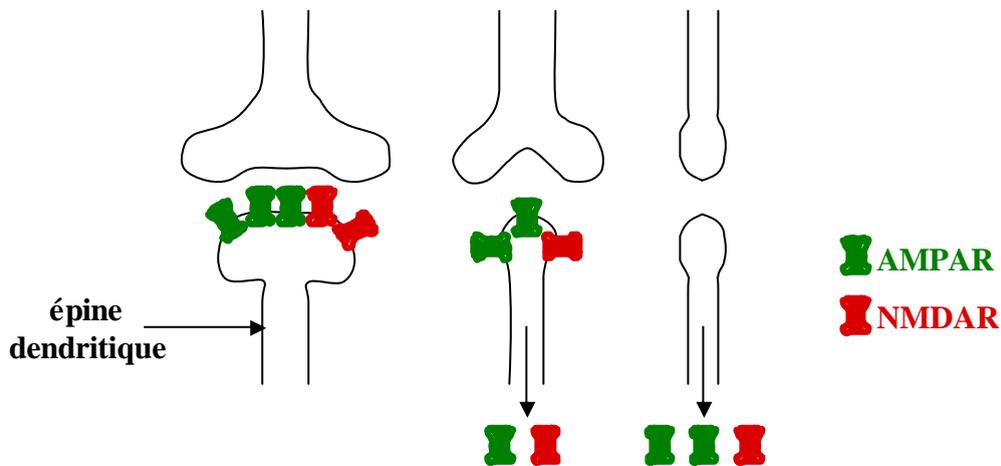


Figure 18. Pathogenèse du syndrome de l’X fragile : modèle moléculaire des récepteurs au glutamate.

A. L’établissement d’une dépression à long terme (LTD) requiert notamment l’élimination de récepteurs AMPA de la membrane post-synaptique. Ce processus dépend de la synthèse de nouvelles protéines. FMRP pourrait être synthétisée en même temps, et exercer un rétrocontrôle, en inhibant les traductions en cours. La disparition de ce rétrocontrôle, en absence de FMRP, pourrait expliquer l’augmentation de la LTD dans les souris invalidées pour *Fmr1*. mGluR : récepteur métabotrope au glutamate. Adapté de *Bear et al., 2004*.

B. L’élimination progressive des récepteurs post-synaptiques, au fur et à mesure du renforcement de la LTD, induit un affaiblissement et une modification de la morphologie synaptique. Ces modifications pourraient expliquer l’existence d’épines dendritiques anormalement longues observées en absence de FMRP. AMPAR : récepteur AMPA au glutamate ; NMDAR : récepteur NMDA au glutamate. Adapté de *Bear et al., 2004*.

détecter d'éventuelles altérations des phénomènes de plasticité synaptique en absence de FMRP.

La forme de LTD dépendant d'une synthèse protéique, induite dans les neurones de l'aire CA1 par la stimulation à basse fréquence des collatérales de Schaeffer, est augmentée dans des tranches d'hippocampe de souris *Fmr1*^{-/-} (Huber, Gallagher et al. 2002). De même, l'ajout de DHPG induit une réponse correspondant à une dépression à long terme, dont l'intensité est augmentée en absence de FMRP.

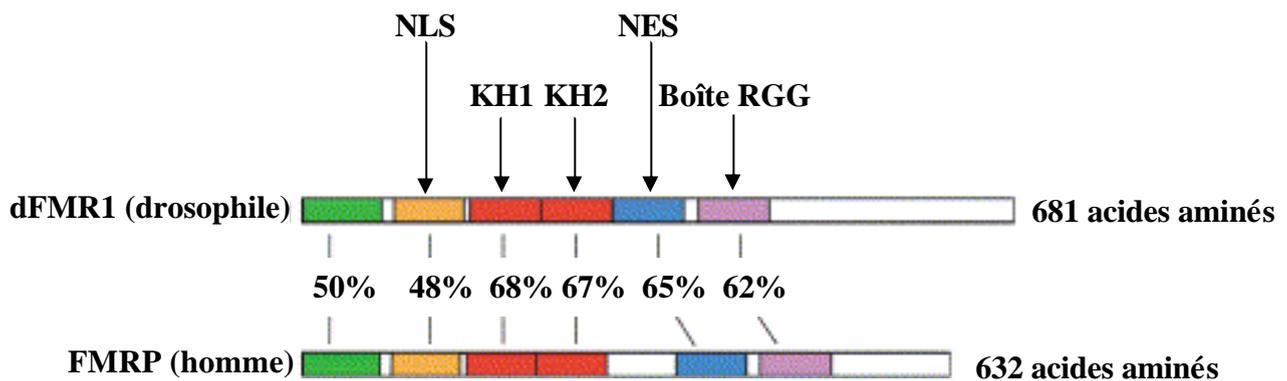
La L-LTP, dépendant de la synthèse de protéines, n'est pas modifiée dans l'hippocampe de souris mutantes (Godfraind, Reyniers et al. 1996; Paradee, Melikian et al. 1999; Huber, Gallagher et al. 2002). En revanche, l'amplitude de la LTP, induite par la stimulation simultanée des neurones pré et post-synaptiques, est plus faible dans le gyrus cingulaire et l'amygdale latérale des souris (Zhao, Toyoda et al. 2005) ; des résultats similaires ont été obtenus suite à l'induction d'une LTP par des stimuli téaniques au niveau du cortex (Li, Pelletier et al. 2002).

En absence de FMRP, différentes formes de plasticité synaptique mises en jeu dans des processus de mémoire et d'apprentissage sont donc altérées.

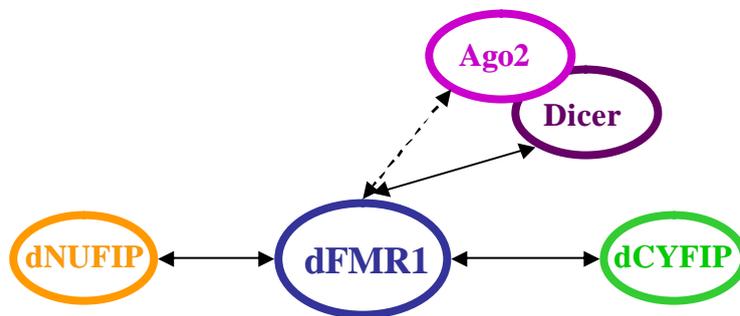
c) Bilan : modèle de pathogenèse des récepteurs au glutamate

Certaines formes de LTD et de LTP, induites notamment par l'activation des récepteurs mGluR1-5, dépendent de la synthèse de protéines. FMRP pourrait être l'une des protéines traduites lors de ces processus, et exercer en retour un contrôle sur les synthèses protéiques en cours (cf. Figure 18). Dans le cas de la LTD, FMRP pourrait inhiber la synthèse de protéines intervenant dans l'internalisation des récepteurs AMPA au niveau de la membrane plasmique post-synaptique, et diminuer de fait l'amplitude de la dépression induite. Dans le cas de la LTP, FMRP semble au contraire activer la synthèse de protéines, telles que la sous-unité GluR1 des récepteurs AMPA, et participerait de ce fait à la potentialisation de la synapse. La potentialisation à long terme influence la morphologie et le nombre de contacts synaptiques (Toni, Buchs et al. 1999; Hering and Sheng 2001). L'altération de ces formes de plasticité synaptique en absence de FMRP pourrait donc conduire à une maturation anormale des synapses et expliquer les anomalies quantitatives et

A.



B.



C.

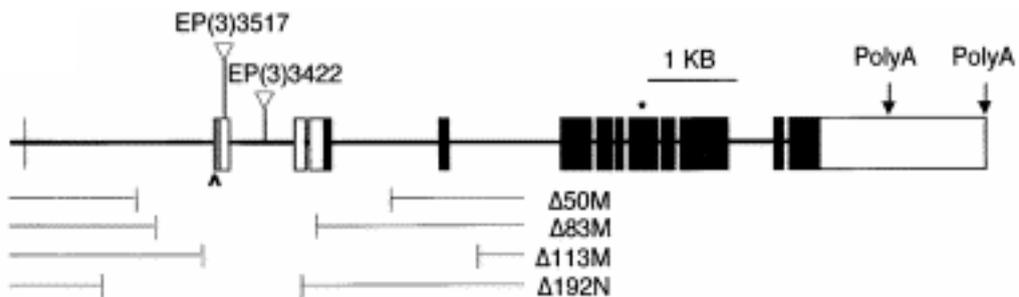


Figure 19. Modèle drosophile du syndrome de l’X fragile.

A. Comparaison des structures de FMRP et de dFMR1. Les pourcentages indiquent les taux d’identité entre les différents domaines fonctionnels des deux protéines. KH 1/2 : K Homology domain 1/2 ; RGG : boîte arginine-glycine-glycine ; NES : Signal d’Export Nucléaire ; NLS : Signal de Localisation Nucléaire. Adapté de Zhang *et al*, 2001.

B. Complexe protéique de dFMR1. dFMR1 est l’unique orthologue de la famille FXR des Mammifères. Les interactions directes sont indiquées par des flèches pleines. Les protéines présentes au sein d’un même complexe sont réunies par des flèches pointillées. Les interactions avec dCYFIP (CYtoplasmic Interacting Protein), l’orthologue de la famille CYFIP de Mammifères, et dNUFIP (NUclear FMRP Interacting Protein), l’orthologue de NUFIP, sont conservées. dFMR1 fait également partie d’un complexe contenant Argonaute2, l’orthologue de EIF2C2, et se lie à l’enzyme Dicer.

C. Etablissement de lignées mutantes de drosophile. Les exons et les introns du gène *dFMR1* sont respectivement représentés par des rectangles, noirs si codants, et des traits pleins. Deux lignées hypomorphes possèdent un élément P en 5’UTR. Quatre mutants nuls ont été obtenus par excision d’un des éléments P (lignées Δ). Adapté de Zhang *et al*, 2001.

qualitatives des épines dendritiques observées dans le cerveau des souris *Fmr1*^{-/-} et dans celui des patients.

2) Apport du modèle drosophile à l'établissement d'un lien entre FMRP et le cytosquelette

2.1) Caractéristiques générales du modèle drosophile

a) Complexe FMRP chez la drosophile

Le gène *dFMR1* a été identifié par criblage d'une banque d'ADNc d'ovaires de drosophile, à l'aide d'une sonde correspondant à la séquence codante N-terminale de l'orthologue de *FMR1* chez le poisson-zèbre (Wan, Dockendorff et al. 2000). La protéine *dFMR1* comporte 681 acides aminés. L'homologie entre la séquence de *dFMR1* et celles des protéines FXR est élevée (taux d'identité et de similarité de 35% et 56% avec FMRP, de 37% et 65% avec FXR1P, et de 36% et 65% avec FXR2P), particulièrement en N-terminale (50% d'identité et 84% de similarité avec FMRP) et au niveau des domaines fonctionnels (Zhang, Bailey et al. 2001). *dFMR1* comporte, en effet, deux domaines KH, le domaine protéique responsable de la dimérisation des protéines FXR, une boîte RGG, un signal de localisation nucléaire, et un signal d'export nucléaire (cf. Figure 19A).

dFMR1 est exprimé de manière ubiquitaire au cours des premiers stades embryonnaires (Wan, Dockendorff et al. 2000; Schenck, Van de Bor et al. 2002). Au fur et à mesure du développement, le niveau d'expression du gène devient plus particulièrement important dans le cerveau, la chaîne nerveuse ventrale et les muscles, ainsi que dans les disques imaginaux, la glande prothoracique et les testicules. Ce profil d'expression résume en quelques sortes celui des trois protéines FXR observé chez les Mammifères. Dans la cellule, *dFMR1* est essentiellement localisée dans le cytoplasme, et jusque dans les prolongements axonaux et dendritiques des neurones. Contrairement à FMRP, la protéine est absente des synapses de la chaîne nerveuse ventrale et de la plaque motrice.

Certaines caractéristiques fonctionnelles des protéines FXR sont également conservées chez la Drosophile, puisque *dFMR1* interagit avec *dCYFIP* et *dNUFIP*, les orthologues des

protéines CYFIP1/CYFIP2 et NUFIP de Mammifères, et qu'elle se lie à l'ARN (Wan, Dockendorff et al. 2000; Schenck, Bardoni et al. 2003). Enfin, dFMR1 pourrait réprimer la traduction d'ARNm via le complexe RISC (cf. Figure 19B) (Caudy, Myers et al. 2002; Ishizuka, Siomi et al. 2002).

dFMR1 constitue donc l'orthologue unique des trois gènes *FMRI*, *FXR1*, *FXR2* de Mammifères et pourrait être proche évolutivement de leur ancêtre commun.

b) Elaboration du modèle drosophile

L'utilisation d'un modèle drosophile présente plusieurs atouts majeurs en génétique :

- 75% des gènes humains ont un équivalent dans le génome de drosophile (Fortini, Skupski et al. 2000; Reiter, Potocki et al. 2001).
- la séquence du génome est complète depuis 2002, et des banques d'EST couvrent environ 70% du transcriptome.
- une grande collection de lignées mutantes est disponible. Elle inclut notamment des lignées UAS-GAL4, permettant l'expression ciblée, dans le temps et dans l'espace, de gènes d'intérêt et le système FRT-Flipase permettant la genèse d'animaux mosaïques.
- une facilité d'élevage, en raison notamment du peu d'espace nécessaire et de la rapidité de leurs cycles de reproduction et de développement (10 jours seulement entre la fécondation et le stade adulte).

Dans le cas du syndrome de l'X fragile, la drosophile constituait un modèle particulièrement intéressant à plusieurs titres :

- l'homologie de séquence et la conservation de certaines caractéristiques fonctionnelles suggéraient que dFMR1 et FMRP puissent jouer des rôles similaires dans la cellule.
- l'existence d'orthologues uniques des familles FXR et CYFIP simplifie l'étude des interactions biochimiques et fonctionnelles entre ces protéines.
- de manière plus générale, le développement du système nerveux est bien connu chez la drosophile : la mise en place de la jonction neuromusculaire constitue par exemple un bon modèle d'étude de synaptogenèse. Ce modèle a déjà été utilisé pour mieux

comprendre certaines maladies neurodégénératives et certaines voies de signalisation impliquées dans des retards mentaux par exemple (Bonini and Fortini 2003).

Plusieurs lignées mutantes de drosophile ont été créées, par insertion d'éléments P dans la séquence du gène *dFMR1*, suivis ou non de leur excision (cf. Figure 19C) (Zhang, Bailey et al. 2001). Deux lignées mutantes hypomorphes ont été générées par insertion d'un élément P dans la région 5'UTR du gène *dFMR1*. L'induction de la remobilisation de l'élément P dans l'une d'entre elles a permis d'obtenir quatre lignées comportant des délétions plus ou moins larges de la partie 5' de la séquence codante du gène *dFMR1*. L'analyse de l'expression de *dFMR1* dans ces lignées a permis d'établir que ces délétions correspondent à des mutations nulles. Une lignée comportant une mutation ponctuelle I307N dans le domaine KH2, équivalente à la mutation I304N de FMRP, a également été établie. Enfin, des mutants gains de fonction ont été produits en surexprimant le gène *dFMR1* dans différents tissus grâce au système UAS-Gal4.

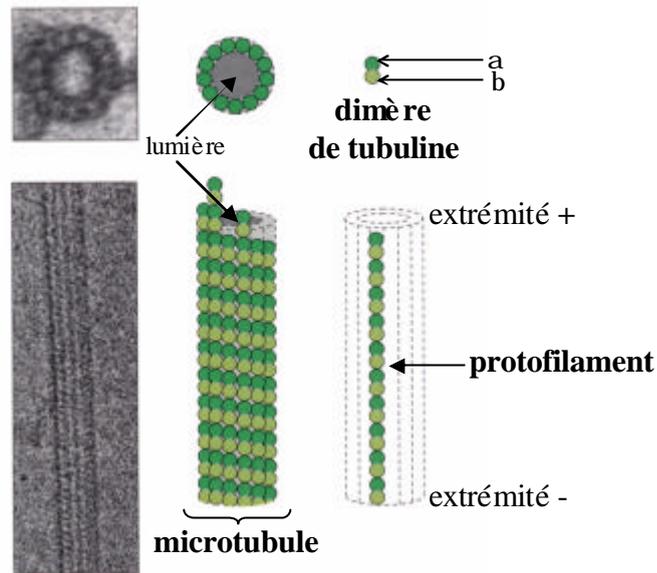
c) Caractéristiques phénotypiques générales

Les mutants *dFMR1*^{-/-} ont une espérance de vie similaire à celle des drosophiles sauvages. De même, leurs capacités photo- et chimiotactiques ne sont pas altérées. Une augmentation du volume testiculaire analogue à celle observée chez les Mammifères a été mise en évidence, et elle est associée à une diminution du taux de fécondité chez les mâles mutants (Zhang, Matthies et al. 2004).

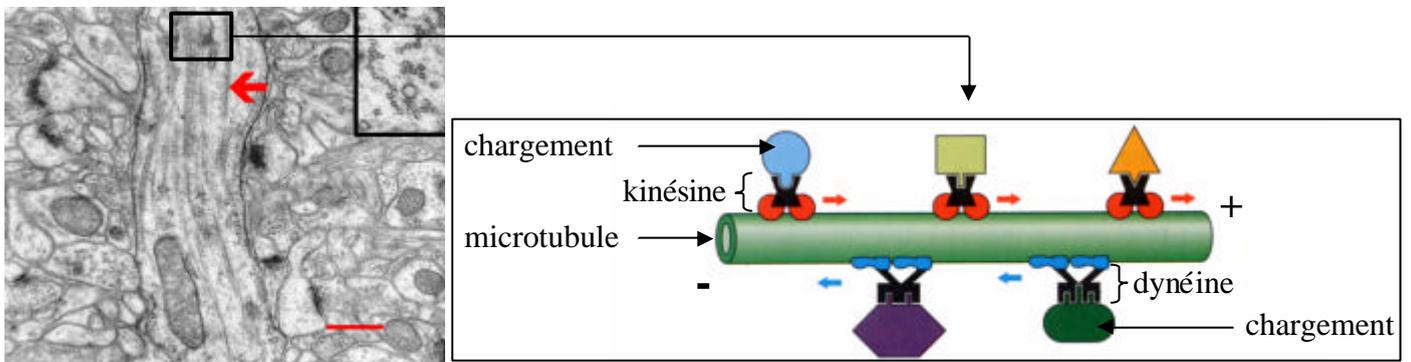
D'un point de vue comportemental, les mâles *dFMR1*^{-/-} perdent la capacité d'effectuer correctement leur parade nuptiale (McBride, Choi et al. 2005). De plus, le rythme circadien de certains événements est anormal chez les mutants *dFMR1*^{-/-} (Dockendorff, Su et al. 2002; Morales, Hiesinger et al. 2002). Ainsi, la périodicité des rythmes d'éclosion et d'activité locomotrice est réduite, voire nulle en absence de *dFMR1*.

Ces déficits peuvent être mis en relation avec des anomalies au niveau de la structure des réseaux neuronaux. Si l'anatomie du cerveau est globalement normale, des défauts ont été observés au niveau de la croissance, du guidage et du branchement des axones des neurones latéraux et du noyau dorsal, impliqués respectivement dans le contrôle de l'éclosion et de l'activité locomotrice (Dockendorff, Su et al. 2002; Morales, Hiesinger et al. 2002). Par ailleurs, les synapses des jonctions neuromusculaires sont anormalement larges chez les

A.



B.



C.

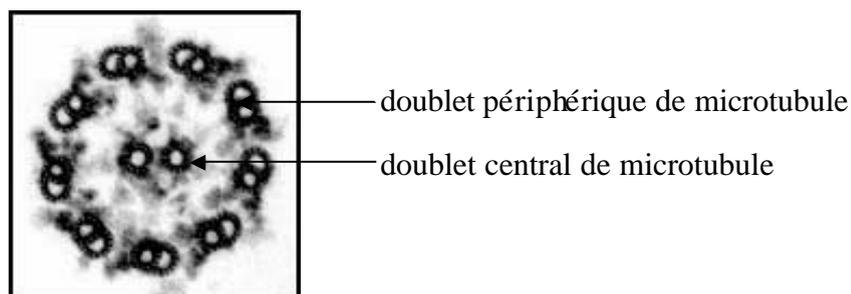


Figure 20. Organisation et rôles du cytosquelette de microtubules.

A. Structure d'un microtubule. A gauche: vue transversale et longitudinale d'un microtubule en microscopie électronique ; à droite : schématisation de la structure d'un microtubule. Adapté du site web : www.tmd.ac.jpg/artsci:biol/textbook/cellmove.htm.

B. Microtubules et transport cytoplasmique. A gauche : réseau axonal de microtubules parallèles, observés en microscopie électronique ; à droite : schématisation des transports antérograde (flèches rouges) et rétrograde (flèches bleues), utilisant le réseau de microtubules. Adapté des sites webs : « Synapse Web » et www.tmd.ac.jpg/artsci:biol/textbook/cellmove.htm.

C. Coupe transversale de l'axonème d'un flagelle de Chlamydomonas, montrant l'organisation classique en 9 doublets périphériques de microtubules, entourant un doublet central. Adapté du site web : « Structural Biology Biochemistry Biophysics ».

mutants *dFMR1*^{-/-}, cette anomalie rappelant celles observées au niveau des épines dendritiques en absence d'expression de FMRP chez les Mammifères (Zhang, Bailey et al. 2001; Schenck, Bardoni et al. 2003).

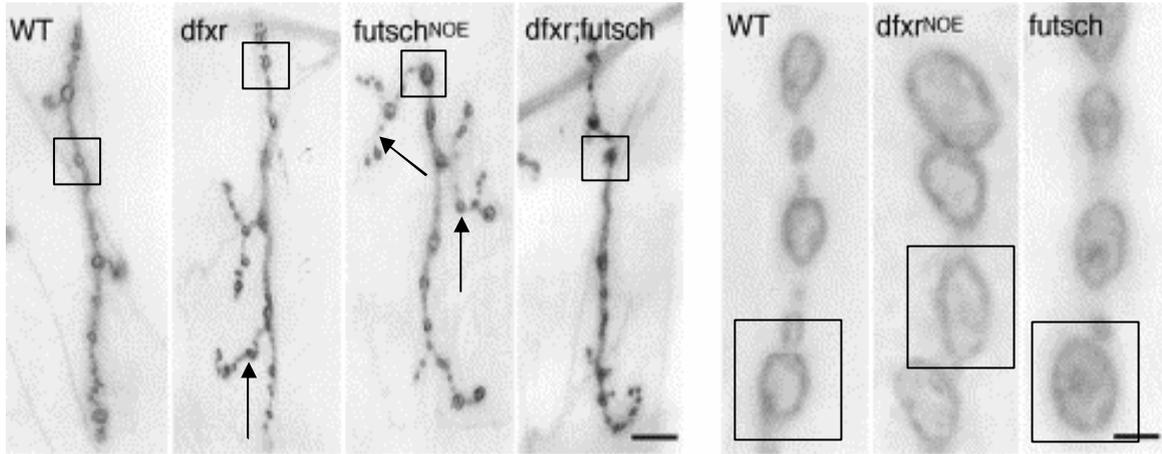
2.2) Etude du modèle drosophile et mise en évidence de l'importance des protéines dFMR1/FMRP dans la réorganisation du cytosquelette de microtubules

a) Organisation et dynamique du réseau de microtubules

Les microtubules forment l'un des trois réseaux de filaments du cytosquelette chez les eucaryotes. Chaque microtubule est un cylindre de 25 nm de diamètre, formé par l'assemblage de 13 protofilaments (cf. Figure 20A). Chaque protofilament est un hétérodimère de tubuline α et β , deux protéines globulaires de 4 à 5 nm de diamètre, dont les masses moléculaires avoisinent 50 kDa. Les microtubules ne sont pas des structures figées : la polymérisation de dimères de tubulines α et β à l'extrémité (+) des microtubules et leur dépolymérisation au niveau de l'extrémité (-) sont des phénomènes dynamiques, finement régulés au niveau cellulaire. En particulier, l'hydrolyse du GTP fixé sur chaque dimère de tubulines, au niveau de la sous-unité β , destabilise le filament. Plusieurs protéines, de nature variable en fonction du tissu et du type cellulaire, s'associent aux microtubules et modifient leur stabilité (Gordon-Weeks and Fischer 2000; Garcia and Cleveland 2001). Ces protéines peuvent être réparties en trois groupes, les protéines tau, de masse moléculaire comprise entre 55 et 70 kDa, les protéines MAP3 et MAP4 (Microtubules Associated Proteins) de masse moléculaire intermédiaire, et les protéines MAP1A, MAP1B et MAP2 de 300 kDa environ. Les protéines MAP stimulent la formation des microtubules et stabilisent ensuite les filaments.

Les microtubules jouent un rôle clé au moment de la division cellulaire en tant que principaux constituants du fuseau mitotique. Par ailleurs, ces filaments constituent un réseau utilisé pour le transport intracytoplasmique d'organites, d'ARN ou de protéines. Dans les neurones, les microtubules forment en particulier des rails permettant l'acheminement de différents constituants cellulaires jusqu'à l'extrémité des prolongements axonaux et dendritiques (Goldstein and Yang 2000). Ces transports utilisent deux protéines jouant le rôle d'adaptateurs moléculaires, la dynéine et la kinésine. La dynéine et la kinésine possèdent une

A.



B.

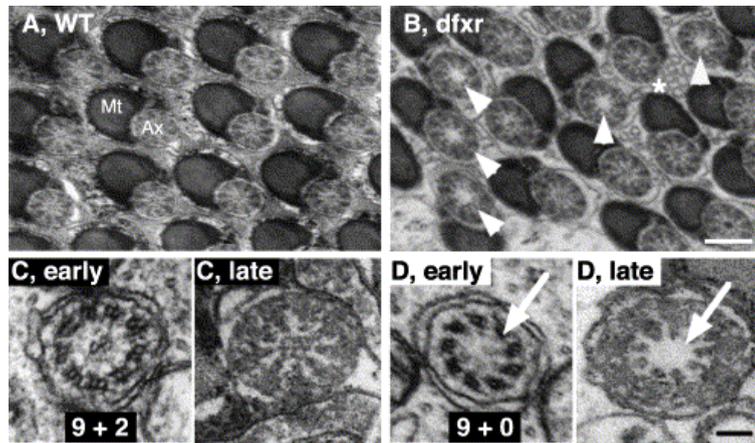


Figure 21. dFMR1 (dFxr) et le cytosquelette de microtubules.

A. Architecture de la partie terminale de la jonction neuromusculaire dans des drosophiles sauvages (WT), invalidées ou surexprimant le gène *dFmr1* (respectivement désignées par les abréviations *dFxr* et *dFxr^{NOE}*), et invalidées ou surexprimant le gène *futsch* (respectivement désignées par les abréviations *futsch* et *futsch^{NOE}*). Des branchements surnuméraires (flèches) et une hypertrophie des boutons synaptiques (encadrés) sont observés dans les lignées *dFxr* et *futsch^{NOE}*. Ces anomalies sont absentes dans les lignées invalidées simultanément pour *futsch* et *dFmr1*. Adapté de Zhang *et al*, 2004.

B. Disparition progressive du doublet central de microtubules de l'axonème du flagelle des spermatides, chez les drosophiles invalidées pour le gène *dFmr1*. L'observation de coupes transversales de cystes de drosophiles sauvages (WT) et mutants nuls (*dFxr*) révèle une désorganisation de l'orientation des flagelles de spermatides. Les flèches indiquent l'absence du doublet central de microtubules, qui disparaît progressivement (cf. « early » et « late ») au cours de la spermatogenèse chez les drosophiles mutantes (cf. photos C et D). Adapté de Zhang *et al*, 2004.

activité ATPasique, et convertissent l'énergie libérée par l'hydrolyse de l'ATP en énergie mécanique, qui est alors utilisée respectivement dans les transports antérograde et rétrograde le long des axones et des dendrites (cf. Figure 20B). Les microtubules forment aussi la charpente des flagelles et des cils : l'axonème de ces expansions membranaires comporte en effet 9 doublets de microtubules entourant un doublet central (cf. Figure 20C). Pendant la neurogenèse, la réorganisation dynamique du réseau de microtubules participe également à la morphogenèse du neurone.

b) Analyse de la neurogenèse chez les mutants *dFMR1* de drosophile : l'hypothèse Futsch/MAP1B

Chez la drosophile, *dFMR1* régule la mise en place des réseaux axonaux : l'analyse du phénotype des mutants nuls et gains de fonction révèle qu'elle contrôle le guidage des axones et inhibe leur extension et leur ramification (Morales, Hiesinger et al. 2002). *dFMR1* inhibe également la ramification de l'arborisation dendritique de neurones. L'absence de la protéine *dFMR1* conduit à une augmentation de la dimension et du degré de ramification des synapses neuromusculaires, alors que sa surexpression aboutit au phénotype inverse (cf. Figure 21A) (Zhang, Bailey et al. 2001). Ces anomalies sont de même nature, mais inverses, à celles observées en absence de la protéine Futsch, l'orthologue de MAP1B chez la drosophile. L'absence de Futsch s'accompagne, en effet, d'une réduction de la taille et de la complexité des synapses, d'un raccourcissement des axones et d'une simplification du degré de ramification de l'arbre dendritique (Zhang, Bailey et al. 2001). Ces similitudes phénotypiques ont été expliquées par des analyses génétiques (cf. Figure 21A) et biochimiques : l'effet de *dFMR1* sur l'architecture du réseau neuronal s'effectuerait en effet via Futsch, puisque *dFMR1* semble réprimer sa traduction (Zhang, Bailey et al. 2001).

Cette cascade moléculaire semble conservée chez les Mammifères, puisque la stabilité du réseau de microtubules est accrue dans des neurones *Fmr1* knock-out, ce défaut pouvant être expliqué par un taux anormalement élevé de la protéine MAP1B, dont la traduction serait normalement inhibée par FMRP au cours du développement (Lu, Wang et al. 2004).

dFMR1 et FMRP pourraient donc contrôler indirectement l'architecture et la dynamique des filaments de microtubules, en régulant respectivement le niveau d'expression des gènes *futsch* et *MAP1B*. Ce contrôle traductionnel suffit à expliquer les défauts de

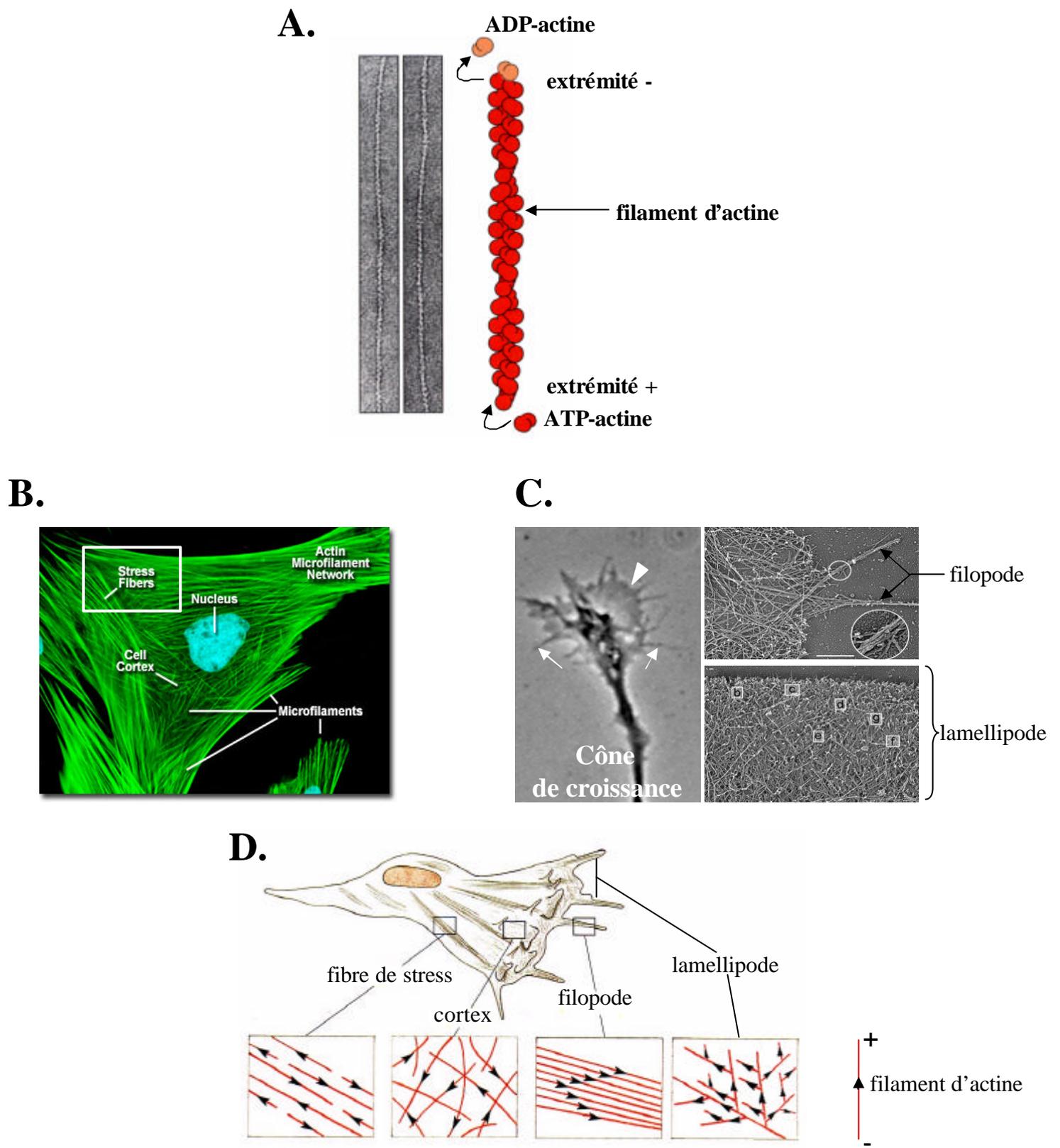


Figure 22. Organisation des microfilaments d'actine.

A. Structure d'un microfilament. A gauche : photographie en microscopie électronique ; à droite : schématisation d'un microfilament. Adapté du site web : www.tmd.ac.jpg/artsci/biol/textbook/cellmove.htm.

B. Organisation des fibres de tension («stress fibers») dans un fibroblaste. L'actine est marquée en vert. Adapté de <http://micro.magnet.fsu.edu/cells/microfilaments/microfilaments.html>.

C. Lamellipodes (triangle) et filopodes (flèches) à l'extrémité d'un cône de croissance. L'architecture du réseau d'actine, dans les filopodes et dans les lamellipodes, observée en microscopie électronique, est indiquée sur les photographies de droite. Adapté de : *Biyasheva et al, 2004* ; sites web : «*Borisy Lab group*» et «*Kalil Lab*».

D. Schéma de l'organisation et de l'orientation des fibres d'actine dans le cytoplasme d'une cellule. Adapté du site web : «http://personalpages.manchester.ac.uk/staff/j.gough/lectures/the_cell/cytoskeleton/filopodia.jpg».

morphogénèse synaptique observés en absence de dFMR1. En revanche, la modification de l'architecture et de la dynamique du réseau de microtubules en absence de FMRP permet difficilement d'expliquer les anomalies observées au niveau des épines dendritiques, dont la morphologie dépend essentiellement du réseau d'actine.

c) Mise en évidence de l'implication des protéines dFMR1/FMRP dans l'organisation des microtubules : importance dans la spermatogénèse

L'implication de dFMR1/FMRP dans l'établissement d'un réseau correct de microtubules a été confirmée par l'observation en microscopie électronique de l'architecture de l'axonème du flagelle des spermatozoïdes dans les modèles mutants (cf. Figure 21B) (Zhang, Matthies et al. 2004). Chez la drosophile, le doublet central de microtubules disparaît en effet en absence de dFMR1. L'architecture du réseau de microtubules constituant l'axonème est également altérée dans les spermatides de souris *Fmr1*^{-/-} (Zhang, Matthies et al. 2004). Cependant, contrairement aux défauts observés pour la neurogenèse, ces effets ne peuvent être expliqués par le contrôle traductionnel de l'expression de Futsch/MAP1B, puisque aucune anomalie n'a été observée au niveau testiculaire chez ces mutants (Zhang, Matthies et al. 2004). Ces résultats suggèrent donc que dFMR1/FMRP puissent réguler l'organisation du cytosquelette de microtubules par un deuxième mécanisme moléculaire.

2.3) Etablissement d'une connexion entre *dFMR1* et la voie *dRac1* des Rho GTPases : importance dans l'organisation dynamique du cytosquelette d'actine

a) Organisation et dynamique du cytosquelette d'actine

Actine monomérique et filaments d'actine

Outre les microtubules, le cytosquelette comporte également des microfilaments formés par l'enroulement d'hélices d'actine et dont le diamètre est compris entre 7 et 9 nm (cf. Figure 22A). L'actine est une protéine de 42 kDa extrêmement abondante, puisqu'elle représente de 1 à 10% de la quantité totale des protéines, selon le type cellulaire considéré. Dans le cytoplasme, l'actine existe sous forme de monomère globulaire (actine G) ou de polymère au sein de filaments (actine F). Tout comme les microtubules, les microfilaments d'actine sont des structures polaires : les monomères d'actine G ayant fixé une molécule d'ATP s'associent au niveau de l'extrémité (+) du filament, et l'hydrolyse de l'ATP en ADP

induit progressivement la dépolymérisation de l'actine F au niveau de l'extrémité (-). Dans des conditions physiologiques, la polymérisation et la dépolymérisation d'actine ont lieu spontanément. Le taux de renouvellement effectif des filaments dans la cellule est cependant plus rapide que prévu, cette différence étant due à l'intervention de plusieurs protéines se liant à l'actine et modulant son organisation dynamique. La polymérisation peut être bloquée par le masquage de l'extrémité (+) des filaments par des protéines telles que capG ou capZ (capping protein G/Z) (Cooper and Schafer 2000; Pollard 2002). L'ADF (Actin Depolymerizing Factor) et la Cofiline sont deux protéines de 19 kDa qui augmentent le taux de dissociation des monomères d'actine au niveau de l'extrémité (-) et peuvent fragmenter les filaments d'actine existants (ADF et Cofiline sont rassemblées dans la suite du texte sous le terme de Cofiline) (Didry, Carlier et al. 1998; Bamburg 1999). Au contraire, l'élongation des filaments est stimulée par une petite protéine de 16 kDa, la profiline (Theriot and Mitchison 1993; Didry, Carlier et al. 1998). La profiline accélère le taux d'échange de l'ADP fixé à l'actine en ATP d'un facteur 1000, renouvelant ainsi le pool d'actine monomérique susceptible de polymériser. Enfin, le complexe Arp2/3 permet la nucléation de nouveaux filaments d'actine et la ramification des filaments existants (Pollard and Beltzner 2002).

Structure et rôle du cytosquelette d'actine

Dans le cytosol, les filaments d'actine forment un maillage tridimensionnel de câbles très structurés, les fibres de tension, ancrés de part et d'autre de la membrane plasmique au niveau de contacts focaux (cf. Figure 22B-D) (Small 1988; Ridley and Hall 1992). Ces fibres permettent l'adhésion de la cellule à son substrat. Les filaments d'actine forment également un réseau bidimensionnel dense sous la membrane plasmique (cf. Figure 22C-D). Le réseau d'actine peut être stable, comme c'est le cas au niveau des microvillosités ou dans les cellules musculaires. Mais la charpente d'actine est souvent labile et sa réorganisation dynamique permet à la cellule de se diviser, de changer de forme, de se déplacer ou d'émettre des projections membranaires, qu'il s'agisse de pseudopodes, de filopodes ou de lamellipodes.

Les filopodes et les lamellipodes sont abondants au niveau du front de migration des cellules (cf. Figure 22C-D). Les filopodes sont de longs et fins processus membranaires cylindriques, alors que les lamellipodes sont des protrusions cytoplasmiques aplaties et larges (Kozma, Ahmed et al. 1995; Svitkina and Borisy 1999). Ces expansions membranaires sont soutenues par un réseau d'actine formé respectivement de fibres d'actine parallèles et de fibres ramifiées constituant un maillage dense. Dans les deux cas, l'extrémité (+) des

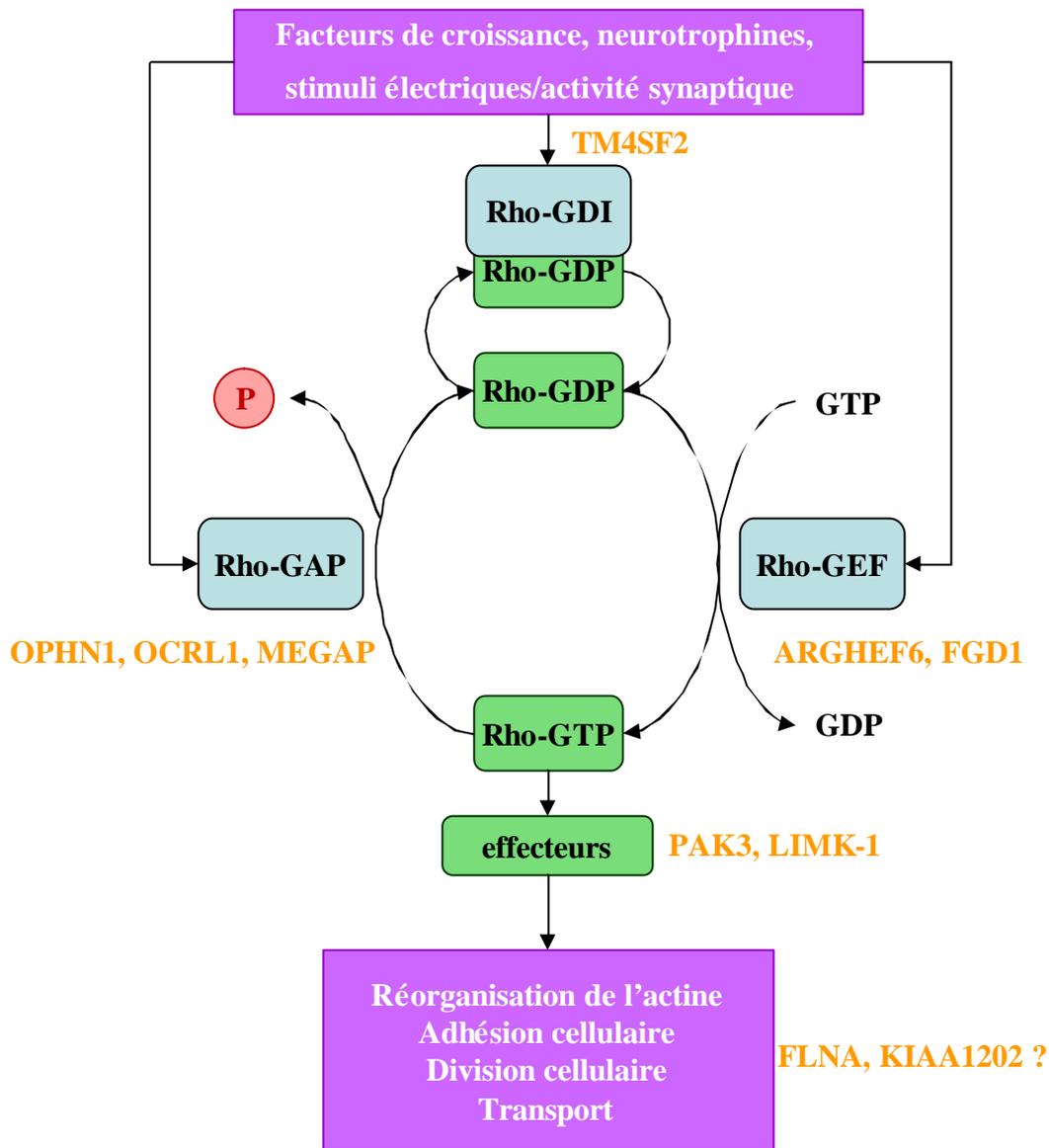


Figure 23. Cycle des Rho GTPases et molécules du cycle impliquées dans des retards mentaux chez l'homme.

Les Rho GTPases (Ras homologs Guanosines TriPhosphatases) oscillent entre deux états, l'un actif lorsqu'elles sont liées au GTP, l'autre inactif lorsqu'elles sont liées au GDP. La transition entre ces deux états est influencée par les Rho GAPs (GTPases Activating Proteins), les Rho GEFs (Guanine nucleotide Exchange Factors), et les Rho GDIs (Guanine nucleotide Dissociation Inhibitors). Lorsqu'elles sont activées, les Rho GTPases déclenchent des cascades de signalisation, aboutissant au remodelage du cytosquelette d'actine.

Plusieurs gènes de la voie des Rho GTPases (en orange) sont impliqués dans des formes syndromiques et non syndromiques de retards mentaux chez l'homme, témoignant de l'importance de ces voies dans la neurogenèse. Adapté de *Schenck et al, 2005*.

filaments est dirigée vers la membrane plasmique. La propulsion de la membrane est assurée par un mécanisme en « tapis roulant » : les monomères d'actine se dissocient de l'extrémité située à l'arrière de la zone d'étirement de la cellule et s'associent au niveau des extrémités (+) des filaments, c'est-à-dire au bord avant des cellules, créant ainsi une force de poussée sous la membrane (Small and Resch 2005). Ce mécanisme est à la base de la progression du cône de croissance pendant la neurogenèse (Gungabissoon and Bamburg 2003; Kalil and Dent 2005).

b) Rôle des Rho GTPases dans la réorganisation dynamique du cytosquelette d'actine et importance dans la neurogenèse

Caractéristiques générales de la famille des Rho GTPases

Les protéines de la famille des Rho GTPases (Ras homolog Guanosines TriPhosphatases) font partie de la super famille des protéines Ras (voir (Etienne-Manneville and Hall 2002) pour revue). Cette famille regroupe des petites protéines (20-30 kDa) monomériques possédant une activité GTPasique. Les Rho GTPases comportent environ 200 acides aminés pour un poids moléculaire de 21 kDa. Leur taux d'identité est compris entre 50% et 90%, alors qu'il est de 30% avec les autres protéines de la super famille Ras. Outre leur site de fixation au GTP/GDP, les protéines Rho ont en commun une séquence tétrapeptidique CAAX en C terminale, à l'origine de modifications post-traductionnelles, et deux domaines responsables de l'interaction avec leurs effecteurs, dont un propre à cette famille. Chez les Mammifères, vingt membres de la famille des Rho GTPases ont été identifiés, incluant cinq protéines Rho (RhoA, B, C, D, T), quatre protéines Rac (Rac1, 2 et 3, RhoG), cinq protéines Cdc42 (Cdc42, TC10, TCL, Wrch1, Wrch2), trois protéines Rnd (Rnd1, Rnd2, Rnd3/RhoE) et trois protéines Rho BTB (Rho BTB1, 2 et 3) (Etienne-Manneville and Hall 2002). Seul le rôle des trois principales Rho GTPases, RhoA, Rac1 et Cdc42, sera exposé.

Régulation de l'activité des Rho GTPases

Le fonctionnement des Rho GTPases repose sur l'alternance entre deux formes, une forme inactive liée au GDP et une forme active liée au GTP, sous laquelle elles activent différentes cascades de signalisation intracellulaire (cf. Figure 23). L'alternance entre les deux formes est contrôlée par trois classes de molécules (Boettner and Van Aelst 2002):

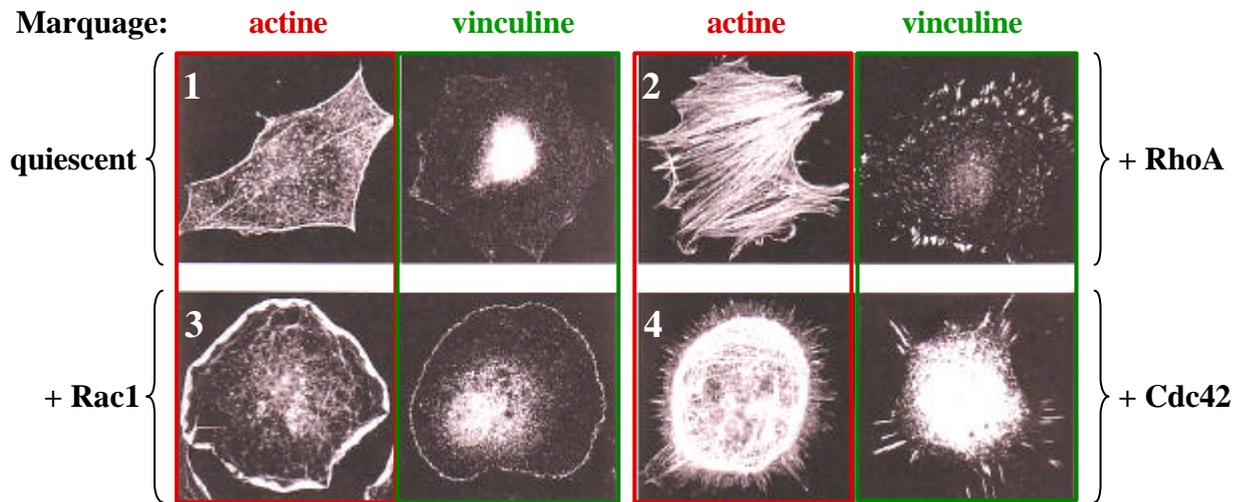


Figure 24. RhoA, Rac1 et Cdc42 contrôlent différents aspects de la réorganisation du cytosquelette d'actine.

Les filaments d'actine et les complexes d'adhésion moléculaires (repérés grâce au marquage de la vinculine) sont peu abondants dans des fibroblastes Swiss 3T3 cultivés sans sérum (cadre 1). L'ajout d'acide lypophosphatidique active RhoA (cadre 2) et induit la formation de fibres de tension et de contacts focaux. La microinjection de la forme constitutivement active de Rac1 (cadre 3) déclenche la formation de lamellipodes et des complexes d'adhésion qui leur sont associés. Enfin, l'activation de Cdc42 par microinjection d'une Cdc42-GEF (Guanine nucleotide Exchange Factor) induit la formation de filopodes et de contacts focaux à leur extrémité. L'actine est marquée par de la rhodamine-phalloïdine, la vinculine par un anticorps spécifique. Adapté de *Hall, 1998*.

- les GEFs (Guanine nucleotide Exchange Factors) facilitent l'échange du GDP en GTP et participent donc à l'activation des Rho GTPases.
- les GAPs (GTPases Activating Proteins) stimulent au contraire l'hydrolyse du GTP et inhibent donc les Rho GTPases.
- enfin, les protéines GDIs (Guanine nucleotide Dissociation Inhibitors) séquestrent les Rho GTPases liées au GDP dans le cytoplasme et prolongent ainsi leur inactivation.

Les protéines GAPs, GEFs, et GDIs interagissent avec les Rho GTPases en réponse à l'activation d'un grand nombre de récepteurs. Plus de 60 GEFs et 70 GAPs ont été répertoriées à ce jour, témoignant de la diversité des voies de signalisation convergeant vers les Rho GTPases (Etienne-Manneville and Hall 2002).

Contrôle de la réorganisation du cytosquelette d'actine par les Rho GTPases.

L'introduction de mutations affectant la capacité d'hydrolyse du GTP ou le relargage du GDP a permis la genèse de formes constitutivement actives et dominantes négatives des Rho GTPases. Ces mutants ont été utilisés pour déterminer le rôle des Rho GTPases dans différents modèles cellulaires.

Les travaux de Ridley et de Hall ont permis de montrer que l'injection de formes actives de RhoA et Rac1 dans des fibroblastes induit une réorganisation dynamique du cytosquelette d'actine, conduisant respectivement à la formation de fibres de tension et de lamellipodes (cf. Figure 24) (Ridley and Hall 1992; Ridley, Paterson et al. 1992). De plus, le remodelage du cytosquelette d'actine induit par des facteurs de croissance est inhibé par l'injection de dominants négatifs de l'une ou l'autre protéine. Des résultats analogues ont été obtenus pour Cdc42, qui stimule la formation de filopodes (Kozma, Ahmed et al. 1995). Ces premières expériences ont permis d'établir que RhoA, Rac1 et Cdc42 suffisent à déclencher un remaniement du réseau d'actine et sont notamment impliqués dans les voies de signalisation issues des facteurs de croissance (Hall 1994; Hall 1998).

L'effet des Rho GTPases est relayé par différentes voies de signalisation effectrices, aboutissant à l'activation ou à l'inhibition de protéines influant directement sur la dynamique du cytosquelette d'actine (cf. Figure 25) (Luo 2002; Ramakers 2002). Ces cascades débutent par une modification conformationnelle d'un premier effecteur, induite par l'interaction avec une Rho GTPase liée au GTP. La liaison de Rac1-GTP à une protéine PAK (p21 activated

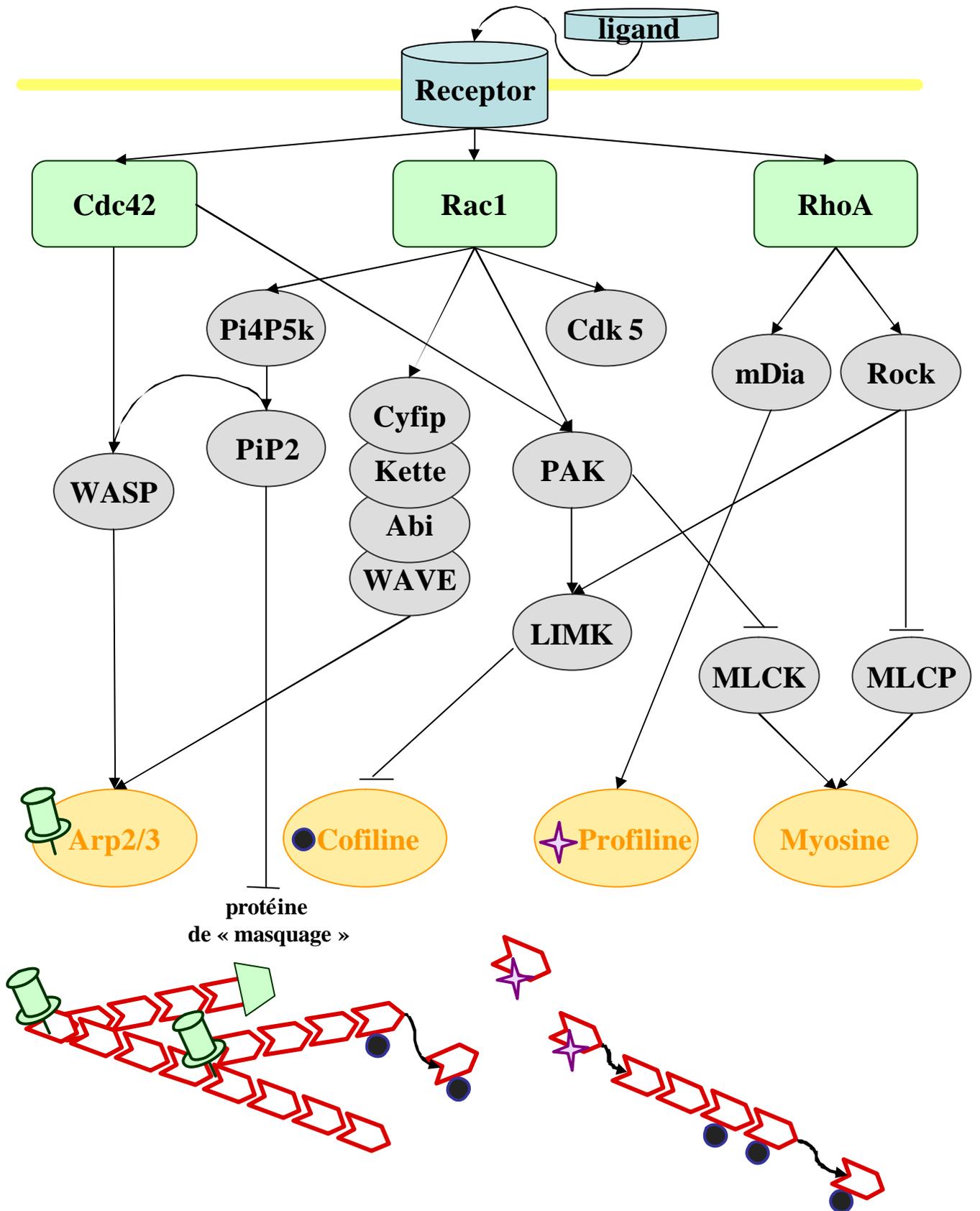


Figure 25. Voies de signalisation effectrices des Rho GTPases.

Cdc42, Rac1 et RhoA activent un réseau complexe de cascades moléculaires. Ces voies régulent l'activité du complexe de nucléation Arp2/3, ainsi que celles de la Cofiline et de la Profiline, contrôlant respectivement la dépolymérisation et la polymérisation des filaments d'actine, de la myosine, qui régule le flux rétrograde de monomère, et celle des protéines stabilisant les extrémités (–) des filaments d'actine en les masquant («protéines de masquage»). Adapté de *Schenck et al, 2005*.

kinase) déplace ainsi un domaine intramoléculaire bloquant l'activité kinase de l'enzyme (Zhao, Manser et al. 1998). Une fois activés, ces premiers effecteurs modifient soit directement, soit, plus fréquemment, via une cascade de signalisation, l'activité du complexe de nucléation Arp2/3, celle de la profiline, de la cofiline ou de la myosine.

Rôle des Rho GTPases dans la neurogenèse

Du fait de leur action sur la dynamique du cytosquelette d'actine, les Rho GTPases participent au contrôle de la morphogenèse, de l'adhésion, de la migration et de la division des cellules ainsi qu'au flux intracellulaire de membranes (Ridley 2001; Ridley 2001).

Ces fonctions cellulaires sont notamment cruciales pendant la neurogenèse. L'élaboration des réseaux neuronaux requiert, en effet, la migration de neurones jusqu'à un emplacement déterminé, la croissance et le ciblage d'axones vers des neurones précis et l'élaboration d'un arbre dendritique correctement connecté d'un point de vue synaptique. L'ensemble de ces modifications morphologiques implique un remodelage du cytosquelette et particulièrement du cytosquelette d'actine.

Les cônes de croissance sont des expansions membranaires en forme d'éventail situés à l'extrémité des axones en cours d'élongation. Leur migration nécessite un flux d'actine aboutissant à l'adjonction de monomères sous la membrane plasmique. Ce processus est régulé par les Rho GTPases (voir (Luo 2002) pour revue). Différents travaux réalisés sur des modèles animaux ou dans des lignées neuronales ont permis de montrer que Rac1 et Cdc42 promeuvent la croissance de l'axone, alors que Rho induit un remodelage du cytosquelette d'actine aboutissant à sa rétraction (Mueller 1999; Luo 2000). De même, les Rho GTPases interviennent dans la dendritogenèse (Li, Van Aelst et al. 2000; Nakayama, Harms et al. 2000). La formation de l'arbre dendritique débute par l'extension de quelques dendrites primaires depuis le corps cellulaire, qui se ramifie ensuite par extension, stabilisation ou rétraction de nouvelles branches. RhoA semble inhiber la croissance des dendrites de neurones tectaux et hippocampaux, alors que Rac1 et Cdc42 les stabilisent et stimulent leur ramification.

De manière intéressante, les protéines Rho contrôlent également la morphologie des épines dendritiques, les structures synaptiques altérées dans le cerveau des patients atteints du syndrome de l'X fragile (Luo 2002; Ramakers 2002). L'expression de la forme constitutivement active de Rac1 dans les cellules de Purkinje chez la souris aboutit ainsi à la

formation d'un nombre anormalement élevé de petites épines dendritiques en forme de filopodes. Des anomalies similaires ont été observées dans le cerveau de souris invalidées pour le gène de la LIMK-1 (LIM Kinase-1), un des effecteurs de la voie Rac1 (Meng, Zhang et al. 2002). Enfin, la transfection de tranches de neurones hippocampaux par les formes constitutivement active et dominante négative de Rac1 modifie la morphologie et le nombre des épines dendritiques en place (Nakayama, Harms et al. 2000). Rac1 contrôle donc non seulement la mise en place des épines dendritiques au cours du développement, mais également leur remodelage au cours du temps et en fonction de l'utilisation du réseau synaptique. Des résultats analogues ont été obtenus pour RhoA et Cdc42 (Tashiro and Yuste 2004).

Implication des Rho GTPases dans les retards mentaux

L'implication des voies de signalisation des Rho GTPases dans la neurogenèse a été définitivement confirmée par l'identification de mutations à l'origine de retards mentaux liés à l'X (cf. Figure 23). La forte proportion de gènes codant des protéines faisant partie de ces voies, au regard de l'ensemble des fonctions des gènes responsables de RMLX, témoigne d'ailleurs de l'importance des Rho GTPases dans l'établissement et la plasticité des réseaux neuronaux (Ropers and Hamel 2005).

Des mutations dans les gènes *PAK3*, *ARHGEF6/aPix*, *FGD1* et *TM4SF2*, sont à l'origine de RMLX-NS. *PAK3* est un effecteur de Rac1 et de Cdc42 ; il fait partie de la famille des protéines kinases p21, qui régule la dynamique du cytosquelette d'actine et l'expression de gènes (Allen, Gleeson et al. 1998). *FGD1* et *ARHGEF6/aPix* sont des GEFs, modulant respectivement l'activité de Cdc42, et de Rac1/Cdc42 (Zheng, Fischer et al. 1996; Kutsche, Yntema et al. 2000; Lebel, May et al. 2002; Ropers and Hamel 2005). Enfin, *TM4SF2* code une protéine de la famille des tétraspanines, interagissant avec les intégrines et situées en amont des Rho GTPases (Zemni, Bienvenu et al. 2000).

Quatre gènes sont impliqués dans l'apparition de RMLX-S. Le gène *OPHNI* code une GAP, l'oligophrénine, qui inhibe l'activité de RhoA, Rac1 et Cdc42 *in vitro*. Des expériences d'ARN interférence dans neurones hippocampaux de rat ont permis de montrer que l'oligophrénine intervient dans la morphogenèse des épines dendritiques et régule leur longueur en inhibant RhoA (Govek, Newey et al. 2004). Des mutations du gène *OPHNI* sont responsables de cas de retards mentaux associés à une hypoplasie du cervelet, alors que celles

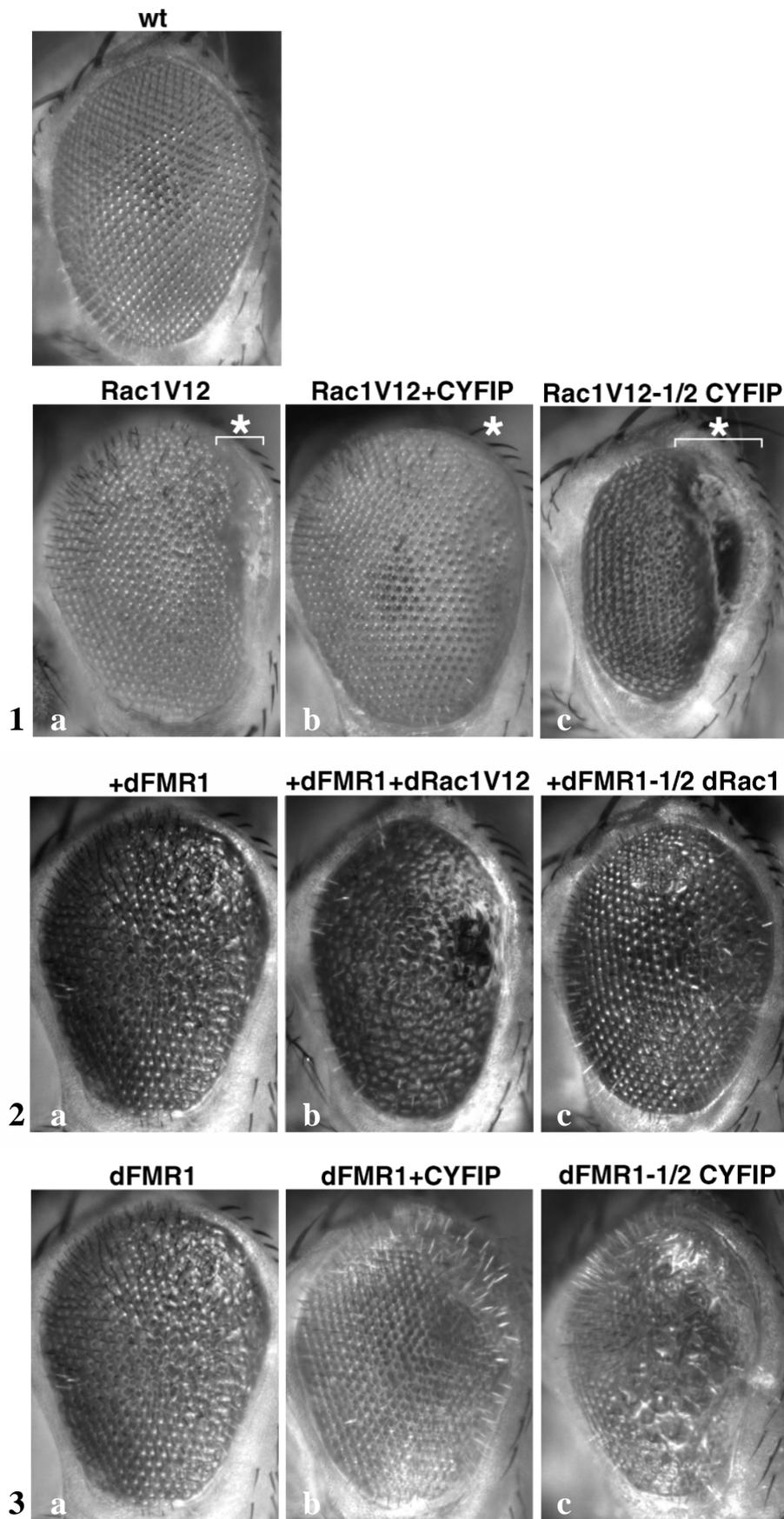


Figure 26. Interactions génétiques entre *dRac1*, *dCYFIP* et *dFMR1* dans l'œil de drosophile.

L'expression de la forme constitutivement active de *dRac1* (cadre 1a), *dRac1V12*, provoque la disparition de la partie postérieure de l'oeil. (astérisque). La surexpression simultanée de *dCYFIP* restaure ce phénotype (cadre 1b), et la délétion d'un de ses allèles l'aggrave (cadre 1c). De la même manière, la désorganisation des ommatidies induite par surexpression de *dFMR1* (cadre 3a) est restaurée par la surexpression simultanée de *dCYFIP* (cadre 3b), et aggravée par la délétion d'un de ses allèles (cadre 3c). Au contraire, le phénotype produit par surexpression de *dFMR1* (cadre 2a) est aggravé par l'expression de *dRac1V12* (cadre 2b), et restauré par suppression d'un des deux allèles de *dRac1* (cadre 2c). Ceci suggère que les trois gènes font partie d'une même voie schématisée à droite. Adapté de *Schenck et al, 2003*.

affectant le gène *OCRL1*, qui code une GAP inhibant Rac1, sont à l'origine du syndrome de Lowe, associant des atteintes rénales et oculaires à des formes sévères de RM (Faucherre, Desbois et al. 2003; Faucherre, Desbois et al. 2005). Les gènes *FLNA* et *KIAA1202* sont également responsables de RMLX-S et codent des protéines se liant à l'actine mais de fonctions encore mal connues (Ropers and Hamel 2005).

Enfin, les gènes *LIMK-1* et *MEGAP* (Mental disorder-associated GAP protein) sont responsables de forme autosomique de RM. Le gène *LIMK-1*, qui code une kinase inhibant la Cofiline, fait partie de la région du chromosome 7 délétée chez les patients atteints du syndrome de Williams-Beuren (Hoogenraad, Akhmanova et al. 2004). Ce syndrome inclut une dysmorphie faciale, une cardiopathie, un retard mental et des troubles caractéristiques du comportement. Le gène *MEGAP*, situé sur le chromosome 3, code une protéine GAP, inhibant l'activation du complexe WAVE par Rac1. L'inactivation de ce gène est associée à une forme grave de retard mental (Endris, Wogatzky et al. 2002).

c) Interactions génétiques entre dFMR1 et dRac1 : dCYFIP, le lien manquant ?

CYFIP1, identifiée lors de la recherche d'interacteurs de FMRP par criblage double hybride, avait été précédemment répertoriée en tant que protéine se liant à Rac1 (Kobayashi, Kuroda et al. 1998). De plus, CYFIP2, qui interagit aussi avec FMRP, fait partie du complexe hétéropentamérique WAVE (Eden, Rohatgi et al. 2002; Kunda, Craig et al. 2003; Schenck, Qurashi A. et al. 2004). Ce complexe est également constitué des protéines WAVE/SCAR, Hem-2/NAP1/Kette, Abi et HSPC300, et il active le complexe de nucléation de l'actine Arp2/3 en réponse à différents stimuli.

Un seul orthologue de CYFIP1 et 2 a été identifié chez la drosophile, simplifiant ainsi l'étude de l'interaction avec les protéines FXR (Schenck, Bardoni et al. 2003). dCYFIP est identique à 67% aux protéines CYFIP de Mammifères, et sa capacité à se lier à dFMR1 d'une part, et à dRac1 d'autre part, a été confirmée (Schenck, Bardoni et al. 2003).

Les similitudes phénotypiques existant entre les mutants dFMR1, dCYFIP et dRac1, notamment au niveau de l'organisation des jonctions neuromusculaires et/ou de la mise en place des axones, ont conduit à étudier les interactions génétiques entre les trois protéines (cf. Figure 26) (Schenck, Bardoni et al. 2003). La surexpression de la forme constitutivement

active de *dRac1* dans l'œil induit la disparition de la région postérieure et la désorganisation des ommatidies. Ce phénotype disparaît si *dCYFIP* est également surexprimé, et il est au contraire aggravé si la surexpression de *dRac1* a lieu dans des drosophiles possédant seulement une copie du gène *dCYFIP* (Schenck, Bardoni et al. 2003). Un résultat similaire a été obtenu entre *dFMR1* et *dCYFIP*. Enfin, les anomalies dues à la surexpression de *dRac1* sont augmentées si *dFMR1* est surexprimé en même temps et diminuées dans le cas contraire. L'ensemble de ces résultats suggère que les trois protéines dRac1, dCYFIP et dFMR1 fassent partie d'une même cascade de signalisation, dans laquelle dRac1 inhiberait dCYFIP, qui inhiberait à son tour dFMR1 (cf. Figure 26).

2.4) L'hypothèse du cytosquelette

L'ensemble des données présentées dans cette section a conduit à proposer un autre modèle moléculaire de pathogenèse pour le syndrome de l'X fragile. Les symptômes cognitifs et comportementaux des patients pourraient résulter, d'un point de vue moléculaire, d'altérations dans l'organisation dynamique du cytosquelette d'actine et/ou de microtubules, provoquant des défauts dans la mise en place et dans la plasticité des réseaux neuronaux, notamment au niveau des épines dendritiques. Ces altérations pourraient résulter de la dérégulation du transport et/ou de la traduction d'ARNm cibles de FMRP et codant des protéines régulant l'architecture du cytosquelette.

PUBLICATION 1

FMRP (Fragile X Mental Retardation Protein) Interacting proteins: from a complex to a pathway.

Marie Castets¹, Jean-Louis Mandel¹, Barbara Bardoni^{2, 3}

1. IGBMC – Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, INSERM, CNRS, ULP, Collège de France, BP10142 – 1, rue L.Fries, 67404 Illkirch C.U. de Strasbourg, France.

2. IFR50, FRE 2720, Faculté de Médecine, Av. de Valombrose, 06107 Nice – France.

3. Corresponding author: B.Bardoni,

bardoni@unice.fr

Tel: 00 33 493377786

Fax: 00 33 493533071

Running Title: FMRP-containing complexes

ABSTRACT

FMRP (Fragile X Mental Retardation Protein) is a component of a large complex (around 700 kDa) implicated in different steps of RNA metabolism. In order to identify the other components of this complex and unravel the FMRP function, several strategies have been used: two-hybrid screening, immunoprecipitation, tap-tag assay. These efforts resulted in the identification of many proteins that are likely components of the FMRP-containing complex. Most of these proteins are RNA-binding proteins like FMRP, however, several of them seem to be able to directly interact with FMRP, such as: FXR1P, FXR2P, NUFIP1, 82-FIP, CYFIP1, CYFIP2, IMP1 and RanBPM. In *Drosophila*, dFXR, the protein homologous to FMRP and FXR1/2P, is also able to interact with dCYFIP (the homologue of CYFIP1/2) but also with AGO2, Dmp68, Dicer and the two ribosomal proteins L5 and L11. The direct interaction with AGO2 and Dicer has suggested a possible role of FMRP in RISC function. In addition, in *Drosophila* genetic studies have shown that dFXR is part of the same pathway as AGO1 but also genetically interacts with dCYFIP and dRac. In mammalian cells, we have recently demonstrated that the link with Rac is mediated via the regulation of the expression of PP2Ac by FMRP. Since PP2A is involved in dephosphorylation of actin, a major mediator of Rac1 signalling, FMRP could play a key role in modulation of actin dynamics.

INTRODUCTION

A critical step in the understanding of the FMRP (Fragile X Mental Retardation Protein) function is related to the results obtained by laboratories of E.W. Khandjian and S. Warren, which show that FMRP is part of a 700kDa ribonucleoproteic complex associated to polyribosomes (1, 2). The following results suggested that FMRP is probably part of several different complexes, each involved in different steps of RNA metabolism, such as transport from nucleus to cytoplasm or along neurites and translational control (3).

Identification and characterization of some FMRP (directly and/or indirectly) interacting proteins: tracks for the understanding of FMRP function

The full comprehension of FMRP physiopathology goes through the identification of direct FMRP interacting proteins. The first step in this research was performed by Dreyfuss laboratory and resulted in the identification of the two homologous proteins of FMRP, respectively Fragile X Related Protein 1 and 2 (FXR1P and FXR2P) (4, 5). The three proteins are able to hetero/homo-dimerize, probably forming some large complexes (5). This interaction is mediated by a domain encoded by exon 7 (6, 7). The three members of the FXR family, i.e. FMRP, FXR1P and FXR2P, are highly homologous (70% amino acid sequence identity) and share some functional properties: they can bind RNA via their three RNA-binding domains (two KH domains and one RGG box), and they are endowed with a Nuclear Localization Signal (NLS) and a Nuclear Export Signal (NES) (3). Thus, they could have some redundant functions. However, the non-complete overlapping pattern of their tissue expression and the nucleolar sublocalization of FXR1P and FXR2P suggest that the precise functions of these three paralogues have diverged from their common ancestor during evolution (8, 9, 10). FXR1P is in particular abundantly expressed in muscle, in the form of two specific isoforms (FXR1P-82 and 84 kDa) (11). Expression of these muscle's isoforms is an early event during *in vitro* differentiation of myoblasts into myotubes and correlates with the activation of muscle-specific genes. FXR1P-82 and 84 kDa are sequestered in the nuclei of undifferentiated myoblasts, whereas they are associated with cytoplasmic mRNPs in myotubes (12). Recently, an *Fxr1* KO mouse model has been generated. Homozygous *Fxr1* KO neonates die shortly after birth, most likely due to cardiac or respiratory failure: indeed,

cellular architecture and structure are disrupted in both skeletal and cardiac muscles of E19 *Fxr1* neonates compared with wild-type (WT) littermates (13). In E19 *Fxr1* KO littermates, the costameric proteins vinculin, dystrophin and α -actinin were also found to be delocalized (13). All these observations suggest that FXR1P-82 and 84 kDa may play a nuclear and cytoplasmic role in mRNA metabolism in myogenesis.

In 1997, we employed a yeast two-hybrid analysis, using the N-terminal region of FMRP (the first 218 amino acids) as bait to isolate potential FMRP-interacting proteins. Indeed, this region is highly homologous to FXR1P and FXR2P ones, is conserved during evolution. It also contains the NLS. In addition, we had previously shown that FMRP's first 115 amino acids have a high affinity for a nuclear protein (14). We screened around 4×10^6 clones of a mouse embryonic library (embryonic day E9.5-12.5) and obtained 300 positives colonies, corresponding to 10 different clones and including the two positive controls FXR1P and FXR2P (15). Among the clones, we identified four novel FMRP interacting proteins: NUFIP1 (15), 82-FIP (16), CYFIP1 and CYFIP2 (7) (Figure 1).

NUFIP1 (NUclear FMRP Interacting Protein) is a 495 amino acids protein, which contains a C2H2 zinc finger motif. It does not interact with FXR1P and FXR2P, despite the high level of sequence similarity in the N-terminal half of the three proteins. NUFIP1 is expressed in the brain, and especially in neurons of the cortex, the hippocampus and the cerebellum (Purkinje cells). It is found in a micropunctate pattern in the nucleus and colocalized with FMRP's nuclear isoforms. By virtue of an NLS and NES, NUFIP1 shuttles between the nucleus and the cytoplasm like FMRP (15, 17). NUFIP1 is also an RNA-binding protein (15) that associates with polysomes in the cytoplasm of neurons and colocalized with ribosomes in active synaptoneuroosomes (17, 18). Recently, NUFIP1 has been shown to interact with BRCA1 and to stimulate specifically the activator-independent pol II transcription in the nucleus (19). However, this function is probably minor or limited to specific cell lines or tissues: indeed, we were unable to show the colocalization of NUFIP1 with nascent mRNA in HeLa cells (17). In sum, NUFIP1 could be part of complexes linking transcription to mRNA export at least in neurons. This possible function is also supported by its homology with the fungal Rsa1p, which is involved in a nucleoplasmic assembly step of the ribosomal 60s subunit prior to its translocation from the nucleus (20).

82-FIP (82kDa FMRP Interacting Protein) binds specifically FMRP but like NUFIP1 (15) and CYFIP1 (7) does not interact with either FXR1P or FXR2P. It is devoid of already known functional motifs. 82-FIP is found associated with polysomes even in neurons, being a component of FMRP-containing mRNP complexes (16, 18). Its distribution is cell cycle-

dependent; it is cytoplasmic in the G2/M and nuclear-localized in G1 phase. This finding suggests that the composition of FMRP containing-complexes could be cell cycle-dependent (16).

The identification of this novel interactor, together with the already known NUFIP1 (15), enabled us to define a novel protein-protein interaction domain in the N-terminal region of FMRP corresponding to its first 134 amino acids (16, 21). Conversely, interaction site of the FXR1/2P and CYFIP proteins is mediated by an aminoacids sequence coded by exon 7 (6, 7). The identification of these two distinct interaction domains has led us to suggest that the association of FMRP with these various proteins could vary during development or between tissues, which may modulate FMRP function, and in particular its ability to bind RNA. This flexibility could explain the fact that many mRNA targets have been identified by different laboratories with a very minimal overlap one to the other pool.

CYFIP1 and CYFIP2 (sharing 98,6% identity) are two homologues proteins containing no known functional motifs. They are highly conserved during evolution sharing 95%, 66%, and 50% sequence identity respectively with the mouse, the *Drosophila* and the *Caenorhabditis* orthologues. CYFIP1/2 colocalize with FMRP isoforms in the cytoplasm (7). We found that CYFIP1 is not able to bind RNA and is not associated with polyribosomes by using continuous sucrose gradient fractionation (unpublished data). Both CYFIP proteins directly interact with FMRP in GST-pull down experiments but, surprisingly, CYFIP2 interacts with FXR1P and FXR2P, whereas CYFIP1 does not. The interaction between CYFIP proteins and FMRP involves the domain of FMRP that mediates homo-heterodimerization (7). These findings lead to the hypothesis that the CYFIP proteins may modulate the ability of the FXR proteins to homo-heterodimerize (7). Interestingly, CYFIP1 was previously found to interact with the small RhoGTPase Rac1 (22), linking the RhoGTPase pathways to the FMRP complex (see below). Increasing amounts of data appear to link CYFIP1/2 with the Wave complex, which is involved in the regulation of actin nucleation via Rac1 and Wave complex (23, 24, 25, 26, 27). Indeed, by controlling the stability, localization, and function of WAVE, CYFIP proteins may help to ensure that actin-related proteins (Arps) 2 and 3 (Arp2/3) complex - which nucleates actin filaments de novo and from the sides of preexisting filaments- activation and the generation of actin-based protrusions remains strictly dependent on local RhoGTPase signalling (25) (Figure 1).

Recently, also IMP1 (Insulin-like growth factor II mRNA-binding Protein I), a zip-code protein involved in mRNA transport, has been found to directly interact with FMRP (28). Interestingly, IMP1 seems to be implicated in mediating selectivity during RNP

formation and, once it is formed, in mediating the stability (29). Moreover, Menon *et al.* have used the C-terminus portion of FMRP (residues 419-632) to perform a two-hybrid screening of a human brain cDNA library. They have found that this portion of FMRP interacts with RanBPM, which is a protein apparently implicated in a variety of cellular processes, such as nuclear trafficking, cell migration and regulation of transcription regulation. It also appears to increase FMRP's affinity for poly(A) and poly (C), which could significantly affect FMRP's selectivity toward mRNA in vivo (30). Although these data are still preliminary and obtained only in an in vitro system, they seem to indicate a novel level of complexity in the functional analysis of FMRP.

Additional components of FMRP-containing identified by immunoprecipitation include nucleolin (31), Y50 (32), but also Staufen, Pur-alpha and myosin Va (33). However, evidences for direct interactions between FMRP and these proteins, or their role in FMRP's function, has yet to be fully determined. In addition, data supporting a link between FMRP and the RNAi-Induced Silencing Complex (RISC) has also been put forth. Caudy *et al.* (34) and Ishizuka *et al.* (35) were the first to demonstrate an association of dFMR1 (the fly orthologue of FMRP, FXR1P and FXR2P) with RISC. In addition, using the Tap-Tag method, Ishizuka *et al.* were able to show that dFMR1 interacts directly with AGO2, Dmp68, Dicer and the two ribosomal proteins L5 and L11 (35). More recently, by studying genetic interaction between dFMR1 and AGO1, Jin *et al.* revealed that these proteins are involved together in neural development and synaptogenesis. In this paper, the authors have also shown by immunoprecipitation that FMRP associates with eIF2C2, the vertebrate orthologues of the fly AGO1 and AGO2 (36).

FMRP in pathways: Toward a mechanism of action

FMRP and RISC

The link between FMRP and RISC may be critically important for understanding the mechanism by which FMRP could control mRNA translation. It will be important in particular to establish well whether dFMR1 is interacting with AGO1, AGO2 or both proteins. The two Argonaute proteins play distinct role in micro-RNA metabolism in *Drosophila*: AGO2 is required for the assembly of siRNA into RISC, whereas AGO1 is necessary for miRNA-directed RNA cleavage (37). Thus, FMRP's mode of action will be very different depending on whether it is involved in the generation/transport of miRNA or if it plays a role

in RISC complex organization/targeting.

FMRP and Rac

Interestingly, CYFIP1 has been found to interact with the small RhoGTPase Rac1 (22), linking the RhoGTPase pathways to the FMRP complex. Components of the RhoGTPase pathways are known to be involved in mental retardation (MR) (3, 38, 39). Like FMRP and Rac1, CYFIP1/2 are localized in dendrites (7). We have studied the genetic and molecular interactions of Rac1, CYFIP and FMRP in *Drosophila*. The generation of CYFIP null and transgenic flies allowed us to show that *Drosophila* CYFIP, like the fly FMRP and Rac1 orthologues, plays a pivotal role in the establishment of neuronal connectivity and to define the epistatic interactions among these three proteins (40). Recently, we have also analyzed the role of FMRP in actin dynamics in mammalian cells. We found that the Rac1-induced actin remodelling is modified in cells lacking FMRP, probably as a result of the reduction in phospho-ADF/Cofilin (P-Cofilin) level, a major effector of Rac1 signalling. In this study, we identified a new target of FMRP, which is the mRNA encoding the catalytic subunit of Protein Phosphatase 2A (PP2Ac), an enzyme which controls P-Cofilin dephosphorylation. In the absence of FMRP, the level of PP2Ac is increased and this provides a potential mechanism to explain FMRP interference in the Rac1 transduction cascade (41) (Figure 1). Then, since dendritic spines are actin-rich synaptic structures, it is possible that the abnormalities observed in these structures in Fragile X patients and null mice are linked to the misregulation of the Rac-CYFIP-FMRP-PP2A-Cofilin pathway because of the absence of FMRP. Furthermore, we have also shown that the intracellular localization of several FMRP interacting proteins is Rac-dependent. Indeed, in Platelet Derived Growth Factor (PDGF)-stimulated fibroblasts, CYFIP1, FXR1P, 82-FIP and NUFIP1 relocate to actin-rich regions and in particular in actin rings structures (41). This relocation is important because it suggests that FMRP-containing complexes may be differentially composed and/or organized in the presence of activated-Rac. Since proteins interacting directly or indirectly with FMRP are supposed to influence its function, it is possible to hypothesize that FMRP's role may be different following PDGF stimulation.

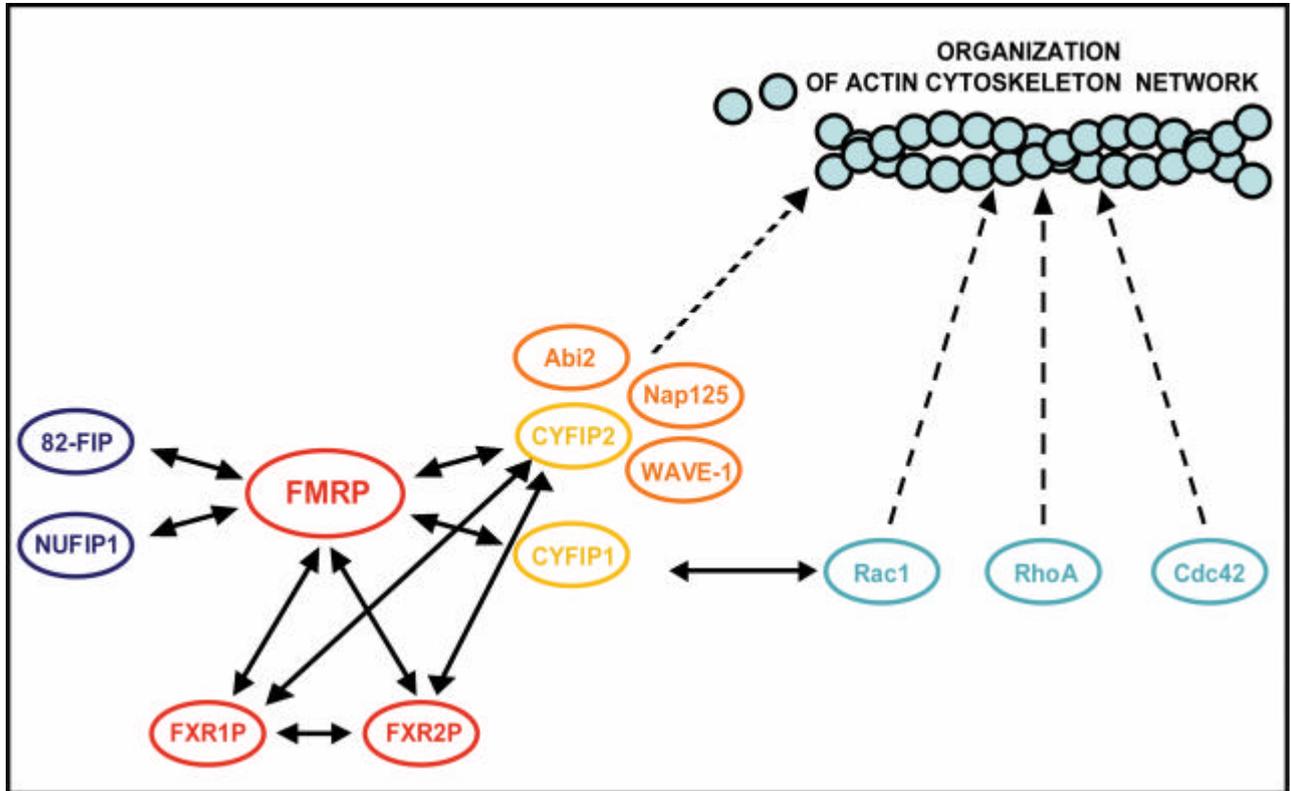


Figure 1. FMRP containing complex: from the identification of interactors to the establishment of a link with actin cytoskeleton control. FMRP interacts directly with several proteins, including its two homologues, FXR1P and FXR2P, the RNA-binding proteins 82-FIP and NUFIP1 and the cytoplasmic proteins, CYFIP1 and CYFIP2. Arrows indicate direct interactions between proteins. Studies of CYFIP1 and 2 led to the identification of a connection between FMRP and pathways involved in the control of actin cytoskeleton network (dotted arrows). CYFIP2, Abi2, NAP-125 and WAVE-1 are components of the WAVE/SCAR complex, which has a well-established role in regulating actin nucleation. CYFIP1 interacts with the RhoGTPase Rac1, which controls actin dynamics with two others RhoGTPases, Cdc42 and RhoA.

Possible role of FMRP-interacting proteins in mental retardation

Several observations lead us to speculate that mutations and defects in FMRP-interacting proteins might also be implicated in forms of Mental Retardation (MR) or cognitive impairment.

First, the FMRP-interacting proteins may have a role in the development of the nervous system and in cognitive function. Indeed, FXR2P null mice show some behavioural phenotypes similar to those observed in Fmr1 knockout mice (42). The dFMR1 mutant flies display abnormalities in neuronal morphogenesis (43, 44), similar to that reported for dCYFIP null flies (40). CYFIP2 has been observed to be an interactor of WAVE-1, a member of Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP) family involved in connecting stimulatory signals to actin cytoskeletal organization. Targeted disruption of the WAVE-1 gene resulted in generation of mice with reduced anxiety, sensorimotor retardation, and deficits in hippocampal-dependent learning and memory. These sensorimotor and cognitive deficits are analogous to the symptoms of patients with 3p-syndrome mental retardation, who are haploinsufficient for WRP/MEGAP, a component of the WAVE-1 signalling network (45). NUFIP1 is selectively associated with active synapses. By binding both FMRP and RNA, it might cooperate in the FMRP control of translation, notably at postsynaptic sites: it may recruit specific mRNPs to active synapses, leading to translational repression (or activation) of specific mRNAs relevant for synaptic plasticity (17).

Secondly, genes encoding some FMRP-interacting proteins are localized in regions linked to MR phenotypes. We assigned the gene encoding NUFIP1 to the chromosomal region 13q14-21 (46). Deletion of this region has been described in patients affected by contiguous gene syndrome including MR (47). The gene encoding for 82-FIP is localized at the 17q11.2 (Hs.462598). Deletion of this chromosomal region has also been linked to a phenotype characterized by MR (48). CYFIP2 is localized in 5q34 (UniGene cluster Hs. 258503) and trisomy of the distal portion of chromosome 5 has been associated to MR and peculiar craniofacial anomalies (49). CYFIP1 is localized in 15q11 (UniGene Hs. 77257). Structural abnormalities involving 15q11-q13 are relatively common and include interstitial/inverted duplications and deletions. Many of these rearrangements are associated with abnormal phenotypes. Paternal deletions of the region result in Prader-Willi syndrome (PWS), whereas maternal deletions lead to Angelman syndrome (AS), both characterized by MR (50). Interstitial duplications of maternal origin that include the critical region for PWS

and AS (PWACR) produce a distinct and more variable phenotype that includes hypotonia, ataxia, seizures, developmental delay and autism, typical or not, with no or only minor dysmorphic features. On the contrary, paternal duplications of the PWACR are not associated with an abnormal phenotype (51). CYFIP1 has been precisely mapped between breakpoint hotspots BP1 and BP2 of the Prader-Willi/Angelman syndromes deletion region (52). Even if CYFIP1 is not imprinted (52), deletions/duplications of this region may have a positional effect on the expression of this gene and, on the other hand its absence can have an impact on the phenotype (e.g. severity of MR) of Prader-Willi patients, as shown for the OCA2 gene (53). Thus, considering its role in nervous system development, its link to Rac1 and its chromosomal localization, CYFIP1 appears to be a very good MR gene candidate.

Conclusion and perspectives

In an effort to unravel the physiological role of FMRP, several proteins that are components of FMRP-containing complexes (directly interacting or not with FMRP) have been identified in the last 10 years. Many of these proteins are RNA-binding proteins, like FMRP. This finding fits with the implication of FMRP in different steps of RNA metabolism. Two exceptions have been found up to date in vertebrates: myosin Va that could be the motor to guarantee the movement of FMRP-containing complexes along cytoskeleton and CYFIP1/2.

The identification of CYFIP proteins as FMRP interactors has allowed us to establish a link between FMRP and the well-known Rac1 signalling pathway in flies and in mammals (40, 41). The molecular basis for this link is not fully characterized, but it appears highly interesting given the importance of the RhoGTPase Rac1 in neurogenesis and especially in dendritic spines formation and maintenance.

To better dissect FMRP function and its relationship with partners (proteins and RNAs), it will be important in future to purify the FMRP-containing complexes in different tissues, in different cell lines, and in different cellular compartments (e.g. soma and dendrites in neurons). In particular, studies on the reorganization of the complex with respect to the cell cycle and to the activation of Rac1 will be key. We believe that the final puzzle illustrating FMRP's role in cell will doubtless be much more detailed than what is presently known; nevertheless it is one to which we are committed to help paint.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Enzo Lalli for critical reading of the manuscript. The authors are supported by INSERM, CNRS, « Human Frontier Science Program » (RGP0052/2001), NIH (R01 HD40612-01) and « Fondation Jérôme Lejeune ». BB is also founded by a CNRS grant ATIP 2004 and by Fondation Recherche Médicale. M.C. is recipient of an « Allocation de Recherche » de l'Ecole Normale Supérieure (Paris) .

REFERENCES

1. Corbin, F., Bouillon, M., Fortin, A., Morin, S., Rousseau, F. and Khandjian, E.W. 1997, *Hum. Mol. Genet.*, 6, 1465.
2. Feng, Y., Absher, D., Eberhart, D.E., Brown, V., Malter, H.E. and Warren, S.T. 1997, *Mol.Cell*, 1, 109.
3. Bardoni, B. and Mandel, J.L. 2002, *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 12, 284.
4. Siomi, M.C., Siomi, H., Sauer, W.H., Srinivasan, S., Nussbaum, R.L. and Dreyfuss, G. 1995, *EMBO J.*, 14, 2401.
5. Zhang, Y., O'Connor, J.P., Siomi, M.C., Srinivasan, S., Dutra, A., Nussbaum, R.L. and Dreyfuss, R. 1995, *EMBO J.*, 14, 5358.
6. Siomi, M.C., Zhang, Y., Siomi, H. and Dreyfuss, G. 1996, *Mol. Cell. Biol.*, 16, 3825.
7. Schenck, A., Bardoni, B., Moro, A., Bagni, C. and Mandel, J.L. 2001, *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, 98, 8844.
8. Wan, L., Dockendorff, T.C., Jongens, T.A. and Dreyfuss, G. 2000, *Mol. Cell. Biol.*, 20, 8536.
9. Tamanini, F., Bontekoe, C., Bakker, C.E., van Unen, L., Anar, B., Willemsen, R., Yoshida, M., Galjaard, H., Oostra, B.A. and Hoogeveen, A.T. 1999, *Hum. Mol. Genet.*, 8, 86.
10. Tamanini, F., Willemsen, R., van Unen, L., Bontekoe, C., Galjaard, H., Oostra, B.A. and Hoogeveen, A.T. 1997, *Hum. Mol. Genet.*, 6, 1315.
11. Khandjian, E.W., Bardoni, B., Corbin, F., Sittler, A., Giroux, S., Heitz, D., Tremblay, S., Pinset, C., Montarras, D., Rousseau, F. and Mandel, J.L. 1998, *Hum. Mol. Genet.*, 7, 2121.
12. Dubé, M., Huot, M.E. and Khandjian, E.W. 2000, *B.M.C. Genet.*, 4.
13. Mientjes, E.J., Willemsen, R., Kirkpatrick, L.L., Nieuwenhuizen, I.M., Hoogeveen-Westerveld, M., Verweij, M., Reis, M., Bardoni, B., Hoogeveen, A.T., Oostra, B.A. and Nelson, D.L. 2004, *Hum. Mol. Genet.*, 13, 1291.
14. Bardoni, B., Sittler, A., Shen, Y. and Mandel, J.L. 1997, *Neurobiol. of Disease*, 4, 329.

15. Bardoni, B., Schenck, A. and Mandel, J.L. 1999, *Hum. Mol. Genet.*, 8, 2557.
16. Bardoni B, Castets M, Huot M-T, Schenck A, Adinolfi A, Corbin F, Pastore A, Khandjian EW, Mandel J-L. 2003, *Hum. Mol. Genet.*, 12, 1689.
17. Bardoni, B., Willemsen, R., Weiler, I.J., Schenck, A., Severijnen, L.-A., Hindelang, C., Lalli, E. and Mandel, J.L. 2003b, *Ex. Cell. Res.*, 289, 95.
18. Khandjian, E.W., Huot, M.E., Tremblay, S., Davidovic, L., Mazroui, R. and Bardoni, B. 2004, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 101, 13357.
19. Cabart, P., Chew, H.K. and Murphy, S. 2004, *Oncogene*, 23, 5316.
20. Maurer-Stroh, S., Dickens, N.J., Hughes-Davies, L., Kouzarides, T., Eisenhaber, F. and Pontig, C.P. 2003, *Trends Biochem. Sci.*, 28, 69.
21. Adinolfi, S., Ramos, A., Martin, S.R., DalPiaz, F., Pucci, P., Bardoni, B., Mandel, J.L. and Pastore, A. 2003, *Biochemistry*, 42, 10437.
22. Kobayashi, K., Kuroda, S., Fukata, M., Nakamura, T., Nagase, T., Nomura, N., Matsuura, Y., Yoshida-Kubomura, N., Iwamatsu, A. and Kaibuchi, K. 1998, *J. Biol. Chem.*, 273, 291.
23. Eden, S., Rohatgi, R., Podtelejnikov, A.V., Mann, M. and Kirschner, M.W. 2002, *Nature*, 418, 790.
24. Steffen, A., Rottner, K., Ehinger, J., Innocenti, M., Scita, G., Wehland, J. and Stradal, T.E. 2004, *EMBO J.*, 23, 749.
25. Kunda, P., Craig, G., Dominguez, M. and Baum, B. 2003, *Curr. Biol.*, 13, 1867-1875.
26. Bogdan, S., Grewe, O., Strunk, M., Mertens, A. and Klambt, C. 2004, *Development*, 131, 3981.
27. Schenck, A., Quraschi, A., Carrera, P., Bardoni, B., Diebold, C., Schejter, E., Mandel, J.L. and Giangrande, A. 2004, *Dev. Biol.*, 274, 260.
28. Rackham, O. and Brown, C.M. 2004, *EMBO J.*, 23, 3346.
29. Nielsen, J., Kristensen, M.A., Willemoes, M., Nielsen, F.C. and Christiansen, J. 2004, *Nucleic Acids Res.*, 32, 4368.
30. Menon, R.P., Gibson, T.J. and Pastore, A. 2004, *J. Mol. Biol.*, 343, 43.
31. Ceman, S., Brown, V. and Warren, S.T. 1999, *Mol. Cell. Biol.*, 19, 7925.
32. Ceman, S., Nelson, R. and Warren, S.T. 2000, *B.B.R.C.*, 279, 904.
33. Ohashi, S., Koike, K., Omori, A., Ichinose, S., Ohara, S., Kobayashi, S., Sato, T.A. and Anzai, K. 2002, *J Biol Chem*, 277, 37804.
34. Caudy, A.A., Myers, M., Hannon, G.J. and Hammond, S.M. 2002, *Genes & Dev*, 16, 2491.
35. Ishizuka, A., Siomi, M.C. and Siomi, H. 2002, *Genes & Dev*, 16, 2497.

36. Jin, P., Zarnescu, D.C., Ceman, S., Nakamoto, M., Mowrey, J., Jongens, T.A., Nelson, D.L., Moses, K. and Warren, S.T. 2004, *Nat. Neurosci.*, 7, 113.
37. Okamura, K., Ishizuka, A., Siomi, H. and Siomi, M.C. 2004, *Genes & Dev.*, 18, 1655.
38. Chelly, J. and Mandel, J.L. 2001, *Nature Rev.*, 2, 669.
39. Ramakers, G.J. 2002, *Trends Neurosci.*, 25, 191.
40. Schenck, A., Bardoni, B., Langmann, C., Harden, N., Mandel, J.L. and Giangrande, A. 2003, *Neuron*, 38, 887.
41. Castets, M., Schaeffer, C., Bechara, E., Schenck, A., louche, S., Khandjian, E.W., Moine, H., Rabilloud, T., Mandel, J.L. and Bardoni, B. 2005), *Hum. Mol. Genet.*,14, 850.
42. Bontekoe, C.J.M., McIlwain, K.L., Nieuwenhuizen, I.M., Yuva-Paylor, L., Nellis, A., Willemsen, R., Fang, Z., Kirkpatrick, L., Bakker, c.E., McAninch, R., Ching Cheng, N., Merriweather, M., Hoogeveen, A.T., Nelson, D., Paylor, R. and Oostra, B.A. 2002, *Hum. Mol. Genet.*, 11, 487.
43. Zhang, Y.Q., Bailey, A.M., Matthiens, H.J.G., Renden, R.B., Smith, M.A., Speese, S.D., Rubin, G.M. and Broadie, K. 2001, *Cell*, 107, 591.
44. Morales, J., Hiesinger, P.R., Schroeder, A.J., Kume, K., Verstreken, P., Jackson, F.R., Nelson, D.L. and Hassan, B.A. 2002, *Neuron*, 34, 961.
45. Soderling, S.H., Langeberg, L.K., Soderling, J.A., Davee, S.M., Simerly, R., Raber, J. and Scott, J.D. 2003, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 100, 1723.
46. Bardoni, B., Giglio, S., Schenck, A., Rocchi, M. and Mandel, J.L. 2000, *Cytogenet. Cell Genet.*, 89, 11.
47. Baud, O., Cormier-Daire, V., Lyonnet, S., Desjardins, L., Turleau, C. and Doz, F. 1999, *Clin. Genet.*, 55, 478.
48. Riva, P., Corrado, L., Natacci, F., Castorina, P., Wu, B.L., Schneider, G.H., Clementi, M., Tenconi, R., Korf, B.R. and Larizza, L. 2001, *Am. J. Hum. Genet.*, 66, 100.
49. Genuardi, M., Flamia, R., Palka, G., Parruti, G. and Neri, G. 1992, *Clin.Genet.*, 41, 259.
50. Cassidy, S.B., Dykens, E. and Williams, C.A. 2000, *Am. J. Med. Genet.*, 97, 136.
51. Browne, C.E., Dennis, N.R., Maher, E., Long, F.L., Nicholson, J.C., Sillibourne, J. and Barber, J.C. 1997, *Am. J. Hum. Genet.*, 61, 1342.
52. Chai, J.H., Locke, D.P., Grealley, J.M., Knoll, J.H., Ohta, T., Dunai, J., Yavor, A., Eichler, E.E. and Nicholls, R.D. 2003, *Am. J. Hum. Genet.*, 73, 898.
53. Fridman C, Hosomi N, Varela MC, Souza AH, Fukai K, Koiffmann CP. 2003, *Am. J. Med. Genet.*, 119A, 180.

RESULTATS

I. Identification et caractérisation d'un nouvel interacteur de FMRP, 82-FIP

1) Stratégie d'identification de nouveaux interacteurs de FMRP par criblage double-hybride

1.1) Origine du projet et objectif

Un criblage double-hybride a été entrepris par le Dr. Barbara Bardoni dès 1997, dans le laboratoire du Pr. Jean-Louis Mandel.

Quoique des progrès importants aient été réalisés dans la détermination des caractéristiques moléculaires de FMRP depuis l'identification du gène *FMR1* en 1991 (Verkerk, Pieretti et al. 1991), la fonction cellulaire de cette protéine et les bases moléculaires des anomalies à l'origine du syndrome de l'X fragile restaient mal comprises. Compte tenu de la caractérisation de FMRP en tant que protéine se liant à l'ARNm (Ashley, Wilkinson et al. 1993; Siomi, Siomi et al. 1993; Siomi, Choi et al. 1994; Brown, Small et al. 1998), les efforts de nombreuses équipes se sont concentrés sur l'identification des ARNm cibles de FMRP. La stratégie de criblage double-hybride offrait une alternative intéressante, puisque son objectif était de mieux cerner le rôle de FMRP en identifiant des interacteurs de la protéine.

1.2) Principe du criblage double-hybride

Le criblage double-hybride est une technique de biologie moléculaire utilisée de manière courante pour mettre en évidence des interactions physiques entre deux protéines *in vitro* (Fields and Song 1989). En général, l'une des protéines est connue et constitue l'«appât». Son partenaire potentiel, la «proie», peut être une protéine précise ou, successivement, chacune des séquences protéiques contenues dans une banque.

Le test repose sur l'induction d'un gène rapporteur, déclenchée par la liaison d'un facteur de transcription reconstitué sur une séquence activatrice située en amont.

Chaque facteur de transcription comporte au moins deux domaines, l'un responsable de la liaison à l'ADN (Domaine de Liaison ou DL) et l'autre de l'activation de l'expression du gène (Domaine d'Activation ou DA). Or, la plupart des facteurs de transcription

eucaryotes fonctionnent de manière modulaire et la proximité entre deux domaines, DL et DA, est nécessaire et suffisante pour induire la transcription, y compris si ces domaines proviennent de facteurs transcriptionnels différents. Dans le cadre du criblage double-hybride, le DL et le DA du facteur de transcription sont isolés et fusionnés respectivement à la protéine «appât» et à la protéine «proie». L'expression du gène rapporteur sera alors affectée uniquement si le DA est connecté de manière indirecte, via l'interaction physique entre les deux partenaires protéiques potentiels, au DL lié à l'ADN.

Les plasmides codant les deux protéines fusions sont insérés dans des souches de levure manipulées génétiquement. L'insertion de mutations dans certains gènes rend ces souches auxotrophes vis-à-vis de la synthèse d'acides aminés. Le gène rapporteur utilisé dans le système de criblage double-hybride code généralement une enzyme permettant de restaurer la prototrophie de ces souches vis-à-vis d'un acide aminé : l'occurrence d'une interaction entre la protéine «appât» et la protéine «proie» est alors évaluée en mesurant la capacité des souches de levure, initialement auxotrophes, à croître sur un milieu dépourvu de cet acide aminé. Un autre gène rapporteur fréquemment utilisé est le gène *lacZ*, qui code une enzyme, la β -galactosidase. L'hydrolyse d'un substrat chromogénique, le 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside (X-gal), par la β -galactosidase produit un substrat bleuté facilement repérable.

1.3) Identification de partenaires de FMRP

La région N-terminale de FMRP, correspondant aux 218 premiers acides aminés, a été fusionnée au domaine de liaison à l'ADN du facteur transcriptionnel Lex A, issu de la souche bactérienne *Escherichia coli*, et utilisée comme «appât» dans le criblage double-hybride. La région N-terminale de FMRP possède en effet plusieurs caractéristiques intéressantes, puisqu'elle présente un fort taux d'homologie avec les régions correspondantes des protéines FXR1P et FXR2P (Zhang, O'Connor et al. 1995), qu'elle est bien conservée au cours de l'évolution (Zhang, O'Connor et al. 1995) et qu'elle contient le signal de localisation nucléaire de FMRP (Bardoni, Sittler et al. 1997), ainsi que celui responsable de l'homo/hétéro-dimérisation des protéines FXR (Bardoni and Mandel 2002).

Les interacteurs de FMRP ont été recherchés au sein d'une banque comportant des ADNc provenant d'embryons murins âgés de 9,5 à 12,5 jours, fusionnés au domaine d'activation transcriptionnelle de la protéine VP16 du virus de l'herpès (Bardoni, Schenck et

al. 1999). Le criblage double-hybride a été réalisé au sein de la souche de levure L40, comportant les gènes rapporteurs *HIS3* et *LacZ* en aval de la séquence d'ADN cible de LexA. Cette souche est auxotrophe vis-à-vis de l'histidine : l'existence d'une interaction entre chacune des «proies» issues de la banque et la région N-terminale de FMRP a été déterminée en évaluant la restauration de la prototrophie vis-à-vis de l'histidine et l'apparition d'une coloration bleutée dans chaque colonie de levures.

Sur les 4.10^6 colonies testées, 300 colonies correspondant à 10 clones différents se sont avérées positives. Cinquante de ces colonies correspondaient notamment à FXR1P et une autre à FXR2P, attestant de l'efficacité du système. Avant mon arrivée dans le laboratoire, ce criblage avait par ailleurs permis l'identification de trois protéines, deux de manière directe, NUFIP et CYFIP1, plus CYFIP2 par homologie de séquence (Bardoni, Schenck et al. 1999; Schenck, Bardoni et al. 2001).

2) Identification d'une nouvelle protéine, 82-FIP, associée au(x) complexe(s) RNP contenant FMRP (Publication 2)

La première partie des travaux décrits dans la Publication n°2 a été réalisée avant mon arrivée dans le laboratoire par le Dr. Barbara Bardoni et le Dr. Annette Schenck, au sein de l'équipe du Pr. Jean-Louis Mandel.

2.1) 82-FIP, un nouvel interacteur de FMRP

L'un des clones positifs identifié lors du criblage double-hybride contenait une courte séquence nucléotidique de 500 pb, codant un fragment protéique s'associant à FMRP avec une forte affinité. Ce fragment protéique fait partie d'une protéine de 695 acides aminés, baptisée 82-FIP en raison de sa masse moléculaire (82 kDa-FMRP Interacting Protein). L'interaction entre la forme complète de 82-FIP et FMRP a été confirmée par des expériences de pull-down et d'immunoprécipitation. Par ailleurs, malgré la forte homologie de séquences existant entre les protéines FXR, 82-FIP n'interagit ni avec FXR1P, ni avec FXR2P.

2.2) Caractérisation du domaine d'interaction de FMRP

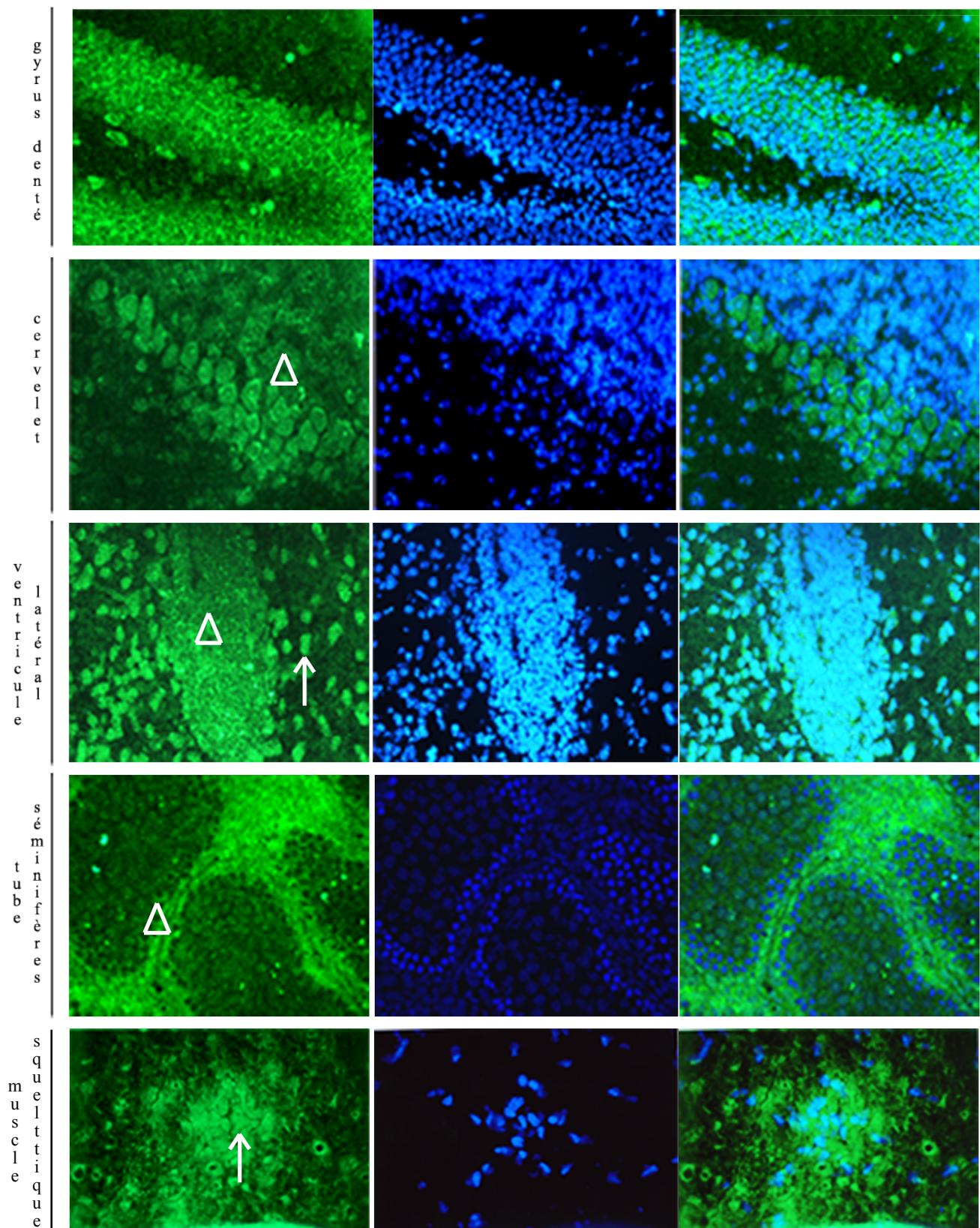


Figure 27. Analyse immunohistochimique de l'expression et de la localisation subcellulaire de 82-FIP dans différents tissus de souris adultes.

Colonne de gauche/marquage vert : 82-FIP ; colonne centrale/marquage bleu : marquage du noyau au Hoechst ; colonne de droite : co-marquage.

82-FIP est exprimée dans les différentes régions du cerveau analysées, dans les testicules et jusque dans le muscle squelettique.

La localisation de 82-FIP varie à l'échelle subcellulaire : 82-FIP est présente à la fois dans le noyau et dans le cytoplasme de la plupart des neurones et dans les fibres musculaires (flèches) ; elle est uniquement cytoplasmique dans les neurones du gyrus denté, dans les neurones granulaires du cervelet, dans les cellules épendymaires bordant les ventricules cérébraux et dans les cellules de la lignée germinale mâle (triangles).

La substitution de différentes portions de la région N-terminale de FMRP, par les fragments correspondants des protéines FXR1P ou FXR2P, a permis de localiser le domaine de liaison de FMRP à 82-FIP. L'interaction entre les deux protéines est réalisée par une région de 68 acides aminés, comprise entre les résidus 66 et 134 de FMRP. Cette région, codée par les exons 3 à 6 de *FMRI*, est également impliquée dans l'association à NUFIP (cf. Figure 11).

2.3) 82-FIP, une protéine associée à des complexes RNP

Compte tenu des caractéristiques de FMRP, la distribution de 82-FIP a été analysée sur gradient de sucrose. Ces expériences ont permis de montrer que 82-FIP sédimente dans les fractions lourdes correspondant aux polysomes. Par ailleurs, l'ajout d'EDTA induit la dissociation des polysomes et le relargage de 82-FIP dans des complexes RNP de coefficients de sédimentation analogues à ceux contenant FMRP. Des tests de rétention sur colonne oligo(dT), et par des homopolymères d'ARN fixés sur billes, ont permis de montrer que 82-FIP peut se lier à l'ARN *in vitro* et que son association aux polyribosomes pourrait dépendre de l'occurrence de ce type d'interaction.

3) 82-FIP, une protéine ubiquitaire dont la localisation subcellulaire varie au cours du cycle cellulaire

La première partie de mon travail de thèse a consisté à étudier l'expression de 82-FIP dans différents tissus murins et à analyser sa localisation au sein de la cellule, en utilisant un anticorps polyclonal spécifique mis au point par le Dr. Barbara Bardoni.

3.1) Profil d'expression de 82-FIP dans des tissus de souris adultes

L'ADNc correspondant à 82-FIP est référencé par le «Kazusa Institute» sous le numéro d'accèsion AB037742 (ADNc KIAA1321 ; <http://www.kazusa.or.jp/huge/gfpage/KIAA1321>). Les analyses de RT-PCR, conduites dans le cadre des études menées par cet institut, prévoyaient que l'expression de 82-FIP soit ubiquitaire. A l'échelle protéique, nous avons pu vérifier que 82-FIP est présente dans l'ensemble du système nerveux central. Dans le cerveau, l'expression de 82-FIP est particulièrement importante dans l'hippocampe et dans le cervelet (cf. Figure 27). 82-FIP est également exprimée dans les testicules, chez l'embryon

et chez l'adulte. Enfin, 82-FIP est présente dans les fibres de muscles squelettiques (cf. Figure 27). Compte tenu de l'absence de FMRP dans le muscle, ceci suggère que 82-FIP puisse avoir une fonction cellulaire en dehors de son interaction avec FMRP.

3.2) Variation de la localisation subcellulaire de 82-FIP au cours du cycle cellulaire

A partir des marquages immunohistochimiques, trois types de profil de distribution de 82-FIP ont été définis à l'échelle subcellulaire (cf. Figure 27) :

- 82-FIP est localisée à la fois dans le cytoplasme et dans le noyau de la plupart des cellules.
- 82-FIP est majoritairement nucléaire dans certains neurones corticaux et dans les fibres musculaires.
- 82-FIP est essentiellement cytoplasmique dans les cellules de la lignée germinale mâle mais aussi dans les neurones du gyrus denté, du bulbe olfactif, de la couche granuleuse du cervelet et dans les cellules épendymaires bordant les ventricules cérébraux.

Cette observation nous a conduit à analyser la répartition subcellulaire de 82-FIP dans plusieurs lignées (cellules COS, fibroblastes Swiss NIH-3T3, lignée NG-108 et lignées de fibroblastes, décrites au paragraphe II.1.2, exprimant ou non le gène *FMR1*). Dans tous les cas, les trois profils de localisation décrits précédemment ont pu être observés, simultanément au sein d'une même culture ou lors d'expériences indépendantes.

L'état de confluence des cellules semblant influencer le profil de distribution de 82-FIP, sa localisation subcellulaire a été analysée au cours du cycle cellulaire. Les cellules ont été bloquées à différentes phases du cycle cellulaire, par utilisation de mimosine (G1), de thymidine (S), de nocodazole (G2/M) ou via la méthode de déprivation de sérum. Cette méthode consiste à éliminer le sérum du milieu de culture pendant plusieurs heures, de manière à empêcher les cellules d'entamer un nouveau cycle de division, et à les bloquer en phase G0/G1. L'entrée dans le cycle est ensuite éventuellement induite par ajout de sérum dans le milieu.

Ces expériences nous ont permis de conclure que la localisation subcellulaire de 82-FIP varie effectivement au cours du cycle, puisque la protéine est majoritairement nucléaire

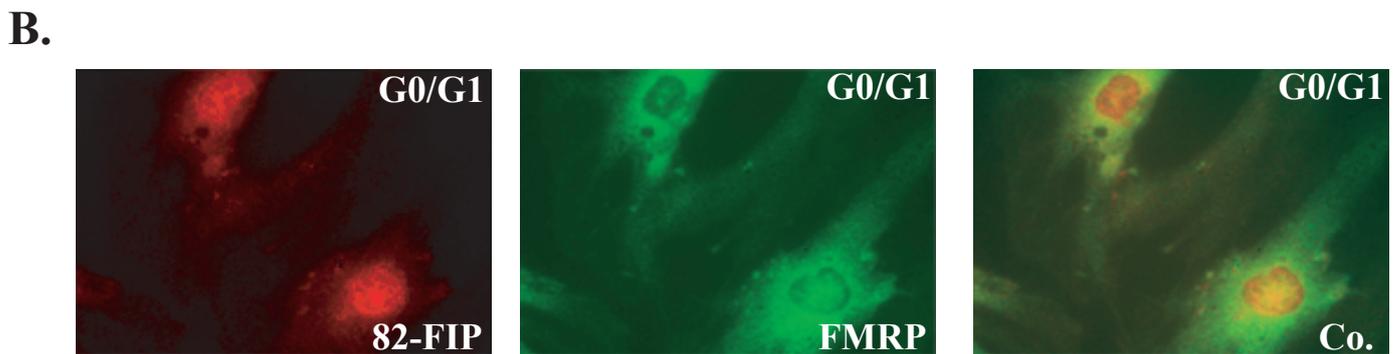
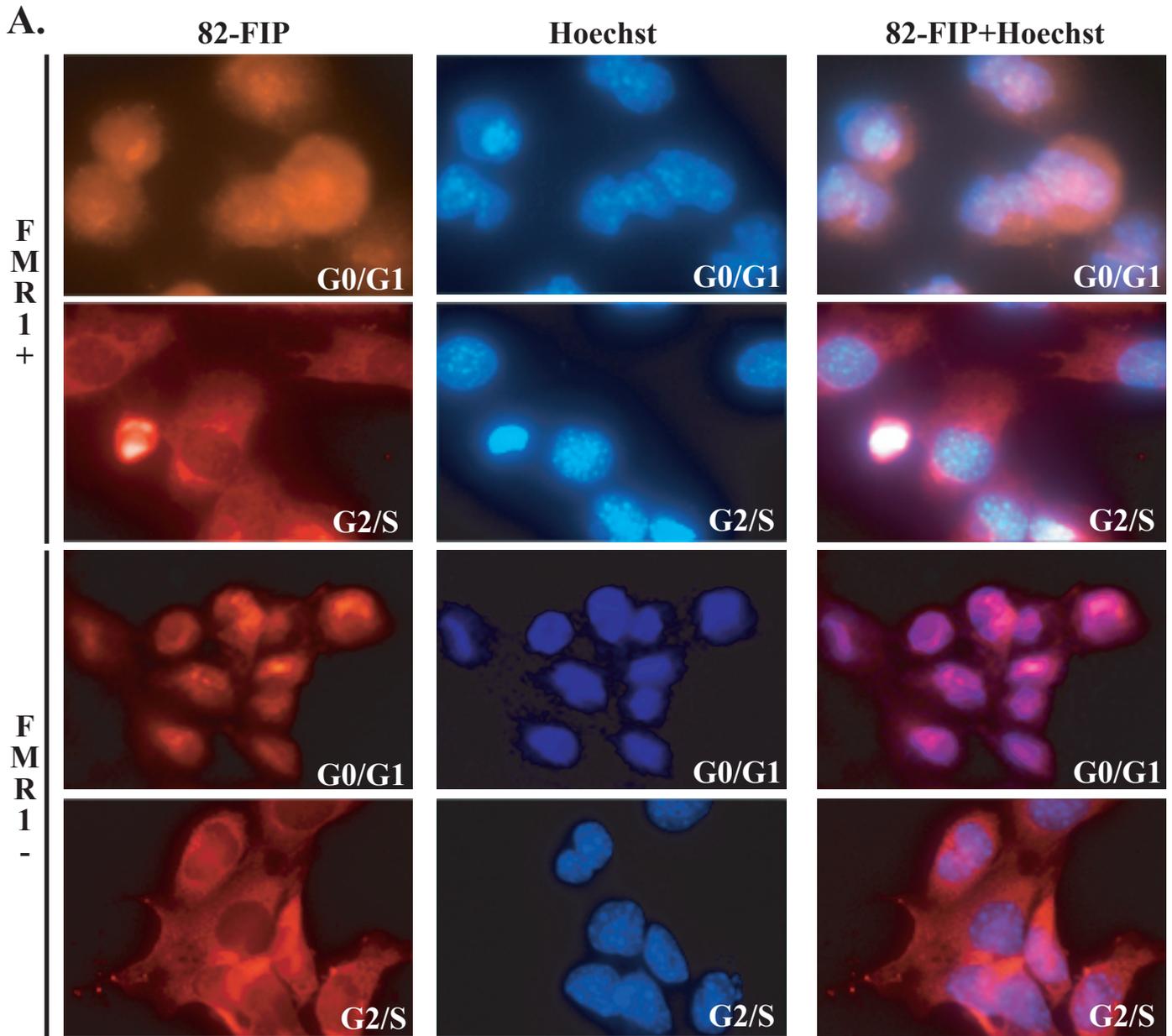


Figure 28. Absence d'influence de FMRP sur les changements de localisation de 82-FIP pendant le cycle cellulaire.

A. Localisation subcellulaire de 82-FIP (en rouge) au cours du cycle cellulaire, dans des fibroblastes exprimant *FMR1* (FMR1+) ou non (FMR1-). Les cellules sont bloquées en G0/G1 par déprivation de sérum (cf. Publication n°2). Le cycle cellulaire est relancé jusqu'à la phase G2/S par ajout de sérum dans le milieu.

B. Disparition de la colocalisation entre 82-FIP et FMRP dans des fibroblastes bloqués en G0/G1 par déprivation de sérum. Co. : Co-marquage.

en G0/G1, alors qu'elle est essentiellement cytoplasmique lorsque les cellules sont arrêtées en phase G2/S (cf. Figure 28A et Publication n°2).

La présence de FMRP n'est pas nécessaire à ces changements de localisation, puisqu'ils surviennent également dans les fibroblastes invalidés pour le gène *FMRI* (cf. Figure 28A). Par ailleurs, la localisation de FMRP demeure principalement cytoplasmique, y compris en phase G0/G1 du cycle, ce qui suggère que l'association entre les deux protéines n'est pas permanente (cf. Figure 28B).

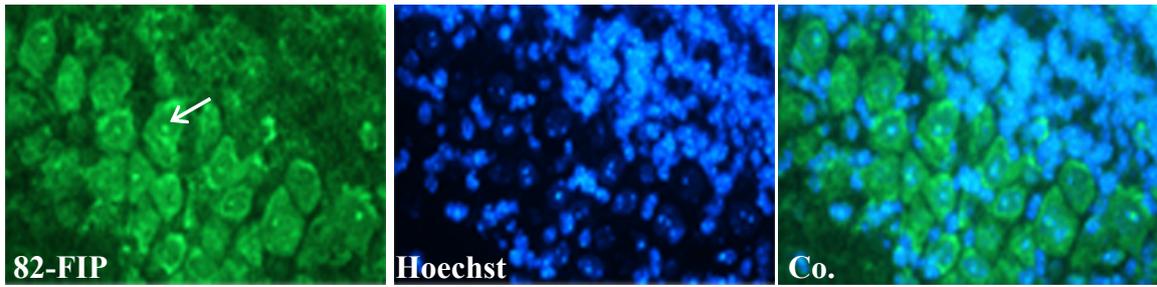
3.3) Observation de corps nucléaires contenant 82-FIP

Dans certains neurones du cortex et dans les cellules de Purkinje, 82-FIP est présente dans le noyau sous la forme d'un à deux corpuscules, qui jouxtent généralement des formations d'hétérochromatine (cf. Figure 29A et B). Nous avons cherché à déterminer la nature de ces corps nucléaires.

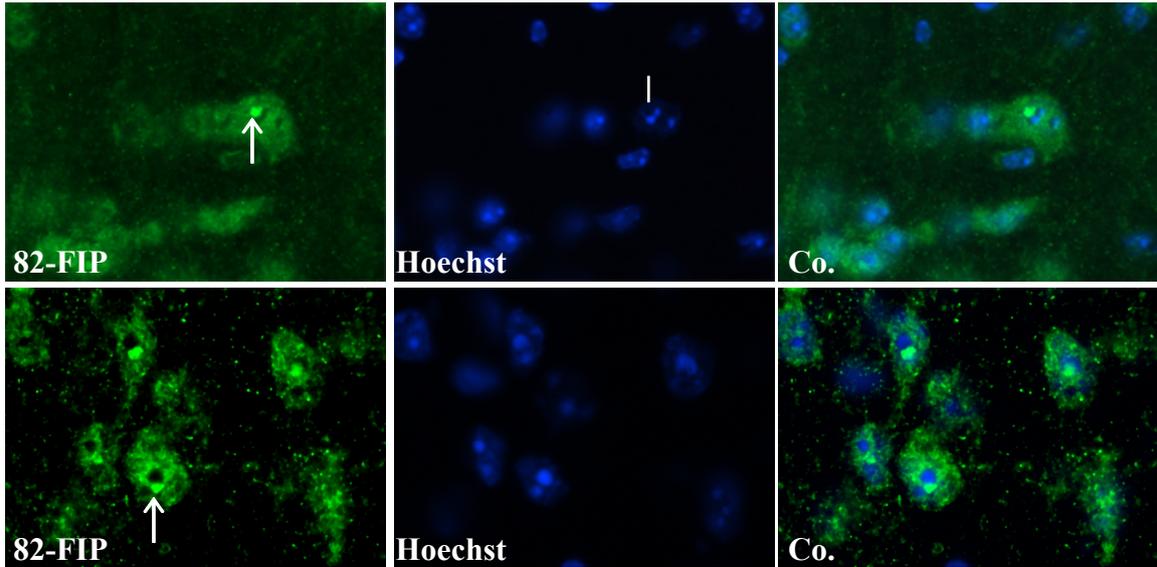
En raison de leur nombre et de leur morphologie, l'une des hypothèses que nous avons émise est qu'il puisse s'agir de corps de Cajal. Les corps de Cajal sont des structures nucléaires, situés à proximité des nucléoles dans les neurones, à raison d'un à cinq par cellule (voir (Ogg and Lamond 2002) pour revue). Ils pourraient jouer un rôle dans la formation de complexes macromoléculaires, et notamment dans celle de complexes RNPs nucléaires. Les corps de Cajal contiennent des facteurs de transcription, des protéines nucléolaires ainsi que des complexes d'épissage snRNP (small nuclear RiboNucleoProtein). La protéine SMN (Survival of Motor Neuron), à l'origine de 98% des cas d'amyotrophie spinale, est également localisée dans ces corpuscules nucléaires et nous l'avons donc utilisée comme marqueur (Carvalho, Almeida et al. 1999).

Les marquages réalisés indiquent que les corps nucléaires contenant 82-FIP sont clairement distincts des corps de Cajal contenant SMN (cf. Figure 29C). L'identité de ces corpuscules reste à déterminer.

A.



B.



C.

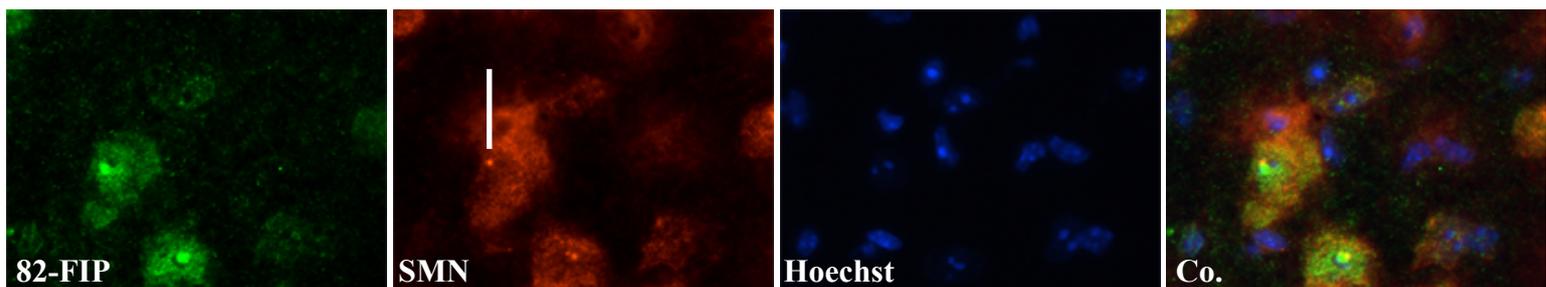


Figure 29. Localisation de 82-FIP dans des corps nucléaires jouxtant l'hétérochromatine dans des neurones de souris sauvages.

A. Marquage immunohistochimique de 82-FIP (en vert), révélant la présence d'agrégats nucléaires (flèche), dans des cellules de Purkinje du cervelet.

B. Observation à plus forte résolution (x100) d'agrégats analogues (flèche) localisés à proximité de l'hétérochromatine (marquage bleu au Hoechst) et du nucléole (trait) dans des neurones corticaux.

C. Absence de colocalisation entre les agrégats nucléaires contenant 82-FIP (en vert) et les corps de Cajal (à la verticale du trait, en rouge), identifiés par marquage de la protéine SMN (Survival of Motor Neuron).

Co. : Co-marquage.

PUBLICATION 2

[Signalement bibliographique ajouté par : ULP – SCD – Service des thèses électroniques]

82-FIP, a novel FMRP (Fragile X Mental Retardation Protein) interacting protein, shows a cell cycle-dependent intracellular localization

Barbara Bardoni, **Marie Castets**, Marc-Etienne Huot, Annette Schenck, Salvatore Adinolfi, François Corbin, Annalisa Pastore, Edouard W. Khandjian and Jean-Louis Mandel

Human Molecular Genetics 2003, Vol. 12, 1689-1698

Pages 1689 à 1698 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Pour les utilisateurs ULP, il est possible de consulter cette publication sur le site de l'éditeur :
<http://hmg.oxfordjournals.org/cgi/content/full/12/14/1689>

Il est également possible de consulter la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP:
peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr

II. Etablissement d'une connexion entre FMRP et la voie de signalisation Rac1 : implication de FMRP dans la réorganisation du cytosquelette d'actine (Publication 3)

1) Objectif de l'étude et description du modèle utilisé

1.1) Objectif

La Rho GTPase Rac1 est impliquée dans la morphogenèse et la maturation des épines dendritiques. L'expression de la forme constitutivement active de Rac1 (Rac1V12) dans des cellules de Purkinje ou l'inactivation du gène codant l'un de ses effecteurs, la LIMK-1, dans des modèles de souris transgéniques, provoque en effet des anomalies de la forme et du nombre des épines dendritiques, analogues à celles observées dans le cerveau des patients atteints du syndrome de l'X fragile (Luo, Hensch et al. 1996; Meng, Zhang et al. 2002).

La mise en évidence de l'existence d'une connexion génétique entre *dFMR1* et *dRac1* chez la drosophile par le Dr. Annette Schenck était donc extrêmement intéressante et permettait d'envisager un modèle moléculaire de pathogenèse plausible. La deuxième partie de mon travail de thèse a donc consisté à vérifier l'existence d'un lien entre FMRP et Rac1 chez les Mammifères et à préciser ses bases moléculaires. L'ensemble des résultats est présenté dans la Publication n°3.

1.2) Mise au point d'un modèle cellulaire

Les fibroblastes constituent un système cellulaire classique pour étudier les mécanismes moléculaires mis en jeu dans la restructuration du cytosquelette d'actine (Ridley and Hall 1992) (Ridley, Paterson et al. 1992) (Hall 1998) (Dawe, Minamide et al. 2003; Serge, Fourgeaud et al. 2003). Leur cytosquelette est, en effet, une structure labile, dont la réorganisation permet notamment aux cellules d'émettre des expansions membranaires ou de se déplacer sur leur substrat. Les fibroblastes constituent par ailleurs un modèle expérimental relativement simple de cellules différenciées.

Afin de mettre en évidence une connexion éventuelle entre FMRP et la voie de signalisation Rac 1, nous avons établi un modèle cellulaire constitué de quatre types de clones, à partir d'une lignée de fibroblastes provenant d'embryons de souris *Fmr1* knock-out :

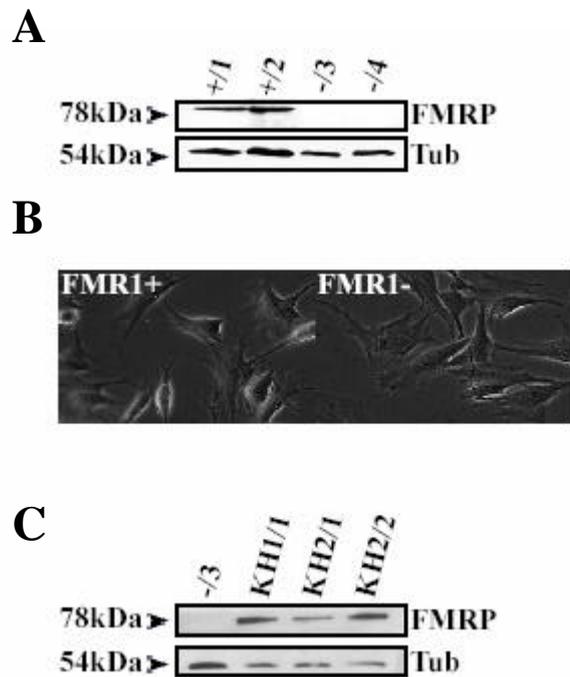


Figure 30. Etablissement d'un modèle cellulaire à partir d'une lignée de fibroblastes provenant d'embryons de souris *Fmr1*^{-/-}.

A. Détermination du niveau d'expression de FMRP par western blot (anticorps 1C3), dans des fibroblastes *Fmr1*^{-/-}, transfectés soit avec le plasmide pTL1 vide (FMR1⁻ ; -/3, -/4), soit avec le plasmide pTL1 contenant le gène *FMR1* (FMR1⁺ ; +/1,+/2).

B. Morphologie des cellules FMR1⁺ et FMR1⁻, observées en microscopie par contraste de phase.

C. Détermination du niveau d'expression de FMRP par western blot (anticorps 1C3), dans des fibroblastes *Fmr1*^{-/-}, transfectés soit avec le plasmide pTL1 vide (FMR1⁻ ; -/3), soit avec le plasmide pTL1 contenant le gène *FMR1* comportant une mutation ponctuelle dans le domaine KH1 (FMR1^{KH1} ; KH1/1), ou dans le domaine KH2 (FMR1^{KH2} ; KH2/1, KH2/2).

- le premier groupe de clones est constitué de cellules exprimant l'isoforme sauvage n°1 du gène *FMR1* humain (clones $FMR1^+$).
- le deuxième groupe de clones comporte des cellules exprimant l'isoforme n°1 du gène *FMR1* humain, dans laquelle la mutation ponctuelle I304N découverte chez un patient a été introduite (clones $FMR1^{KH2}$) (De Boule, Verkerk et al. 1993). La protéine correspondante conserverait la capacité de se lier à certains ARN, mais perd celle de s'associer aux polysomes (Feng, Absher et al. 1997; Brown, Small et al. 1998).
- le troisième groupe de clones est constitué de cellules exprimant l'isoforme n°1 du gène *FMR1* humain, dans laquelle une mutation équivalente à celle décrite précédemment a été introduite en position 241 dans le domaine KH1 (mutation I241N, clones $FMR1^{KH1}$). Des expériences de sédimentation sur gradient de sucrose montrent que cette protéine perd également la capacité de s'associer aux polysomes (Khandjian *et al*, données non publiées).
- Enfin, le quatrième groupe de clones comporte des cellules transfectées avec un plasmide vide et n'exprimant donc aucun allèle du gène *FMR1* (clones $FMR1^-$).

Le niveau d'expression des formes sauvage et mutées de FMRP a été restauré dans plusieurs clones (cf. Figure 30A et 30C), à un niveau environ deux fois supérieur à celui observé dans des fibroblastes Swiss NIH-3T3. En condition de culture normale, les taux de croissance et la morphologie des cellules $FMR1^+$, $FMR1^-$, $FMR1^{KH1}$ et $FMR1^{KH2}$ sont analogues (cf. Figure 30B).

2) Perturbations de la voie de signalisation Rac1 en absence de protéine FMRP fonctionnelle

2.1) Potentialisation de l'effet du PDGF sur la réorganisation du cytosquelette d'actine dans les cellules $FMR1^-$, $FMR1^{KH1}$ et $FMR1^{KH2}$

Afin de mettre en évidence d'éventuelles anomalies de remodelage du cytosquelette dans les cellules dépourvues de FMRP fonctionnelle, nous avons traité les fibroblastes $FMR1^+$, $FMR1^-$, $FMR1^{KH1}$ et $FMR1^{KH2}$, privés de sérum pendant 16 heures, par le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF). Le PDGF active en effet une cascade de signalisation aboutissant à l'activation de Rac1 et à la formation de cercles d'actine

caractéristiques et facilement quantifiables (Fleming, Elliott et al. 1996; Buccione, Orth et al. 2004). Ces cercles d'actine apparaissent transitoirement et constituent des sites de restructuration du réseau d'actine impliqués dans la formation d'expansions membranaires (Hedberg, Bengtsson et al. 1993).

La privation de sérum induit la structuration du cytosquelette sous forme de fibres de tension dans les quatre types de cellules (cf. Publication n°3). Après quelques minutes de traitement au PDGF, ces fibres se dépolymérisent et le cytosquelette se réorganise effectivement au niveau des cercles d'actine dans les cellules FMR1⁺, FMR1⁻, FMR1^{KH1} et FMR1^{KH2}. En revanche, le pourcentage de cellules présentant ce type de structures, 10 et 30 minutes après le début de l'induction, est significativement plus faible dans les cellules FMR1⁺.

La réorganisation du cytosquelette déclenchée par le traitement au PDGF est donc potentialisée en absence de FMRP fonctionnelle.

2.2) Diminution du taux de Phospho-Cofiline (P-Cofiline) dans les cellules FMR1⁻, FMR1^{KH1} et FMR1^{KH2}

Compte tenu de l'implication de FMRP dans la régulation de la traduction et afin de préciser les bases moléculaires des différences observées sous l'effet du PDGF, les quantités de plusieurs protéines de la voie Rac1 ont été comparées dans les lignées FMR1⁺, FMR1⁻, FMR1^{KH1} et FMR1^{KH2}. La Rho GTPase Rac1 active plusieurs cascades effectrices aboutissant à la réorganisation du cytosquelette d'actine. L'une d'entre elles conduit à l'activation de la LIMK-1, qui phosphoryle alors la Cofiline (Yang, Higuchi et al. 1998). Sous forme phosphorylée, la Cofiline est inactive et perd donc la capacité de fragmenter les filaments d'actine et de promouvoir leur dépolymérisation (Bamburg 1999).

Aucune différence significative n'a été détectée entre les fibroblastes FMR1⁺ et FMR1⁻, concernant les quantités totales des protéines Rac1, LIMK-1 et Cofiline. En revanche, le taux de P-Cofiline est significativement plus élevé dans les cellules FMR1⁺ que dans les cellules FMR1⁻, FMR1^{KH1} et FMR1^{KH2}.

La perturbation du ratio P-Cofiline/Cofiline pourrait modifier le turnover d'actine dans la cellule et expliquer les différences de réorganisation observées.

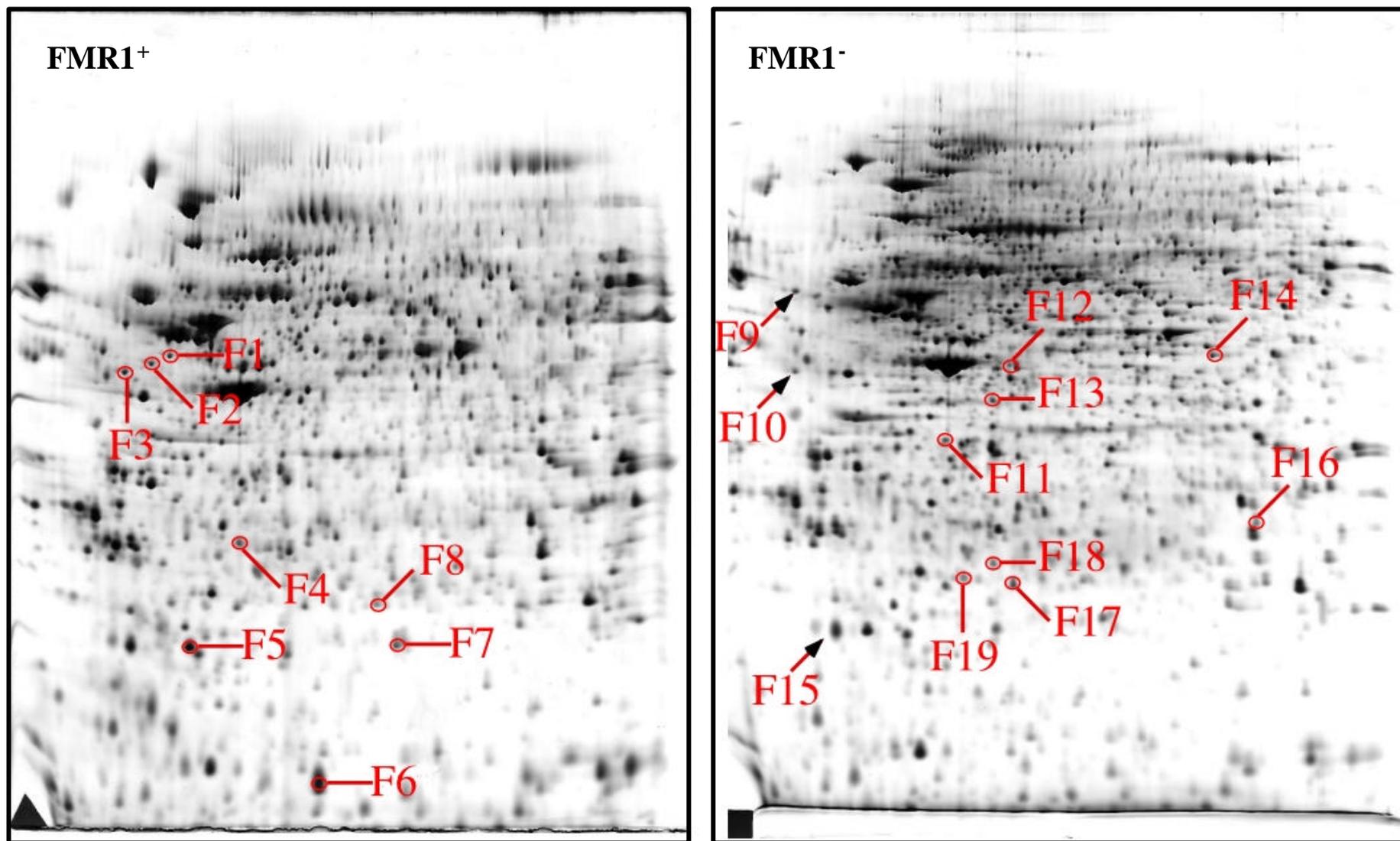


Figure 31. Cartes protéomiques de fibroblastes FMR1⁺ et FMR1⁻ obtenues par électrophorèse bidimensionnelle.

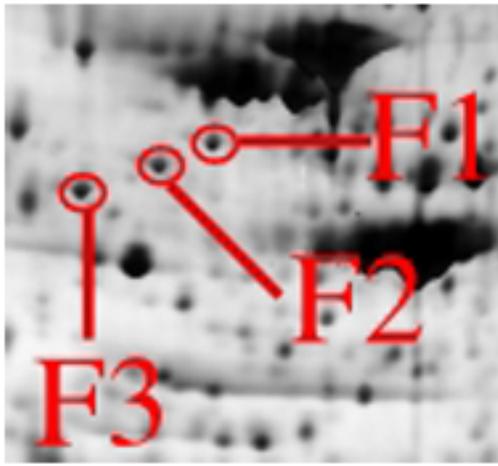
Les numéros indiquent les spots d'intensité différentielle entre les lignées FMR1⁺ et FMR1⁻. Certaines protéines correspondantes sont référencées dans le tableau n°5.

Numéro des spots	Protéines identifiées	Masse Moléculaire/ point Isoélectrique	Taux de recouvrement
1	Vimentine	535246 / 5,06	690%
2	Vimentine	535246 / 5,06	16%
3	Vimentine	535246 / 5,06	32%
4	Peroxi-rédoxine 2	21765/5,2	56%
6	protéine Hint Bab22484	13768 /6.36	46%
7	Adénine phosphoribosyltransférase	19724/6,31	30%
8	Thiorédoxine	28109/7,15	23%
11	Protéine Phosphatase 2a, sous-unité catalytique beta	66018.2 / 8.16	20%
13	farnesyl diphosphate synthétase	13391 / 8.73	25%
14	protéine ribosomale 30S	28013/5,44	30%
15	thiorédoxine peroxidase 1	21765/5,2	47%

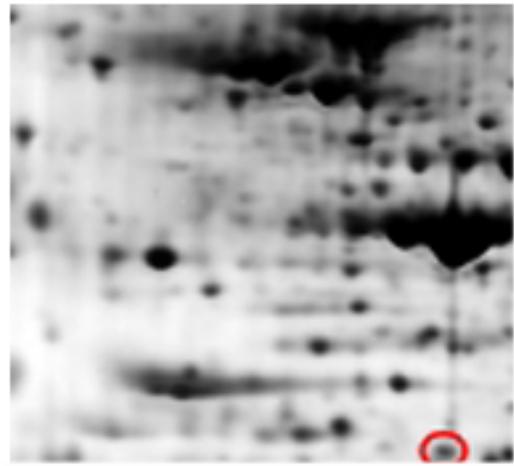
Tableau 5. Résultats de l'identification par spectrométrie de masse des protéines correspondant à des spots d'intensité différentes sur les gels en deux dimensions des cellules FMR1⁺ et FMR1⁻.

Les numéros des spots correspondent à ceux indiqués sur la Figure 31. La masse moléculaire en daltons et le point isoélectrique de chaque protéine sont indiqués. Le taux de recouvrement entre la séquence peptidique analysée par western blot et la protéine identifiée est indiqué en pourcentage.

Les protéines surlignées en jaune sont impliquées dans la régulation du stress oxydatif, celles surlignées en vert ont un lien avec le cytosquelette.



FMR1+



FMR1-

Figure 32. Mise en évidence de spots surnuméraires correspondant à la vimentine sur gel d'électrophorèse bidimensionnelle.

Les trois spots additionnels sur le gel correspondant aux fibroblastes FMR1+ sont indiqués par des cercles rouge numérotés F1, F2, F3.

3) PP2A, une nouvelle cible de FMRP

3.1) Comparaison du protéome des cellules FMR1⁺ et FMR1⁻ par électrophorèse bidimensionnelle (EBD)

a) Objectif

La plupart des recherches visant à identifier des cibles de FMRP se sont concentrées à l'échelle de l'ARN. Nous avons choisi de rechercher d'éventuelles modifications de la traduction d'ARNm particuliers en absence de FMRP directement au niveau protéomique. Une collaboration a été initiée dans ce but avec l'équipe du Dr Thierry Rabilloud au CEA de Grenoble.

b) Principe de l'EBD

L'EBD repose sur la séparation des protéines suivant leur masse moléculaire et leur point isoélectrique (pI). Elle permet d'obtenir une cartographie de protéines exprimées par une cellule. L'intensité des spots reflète le niveau d'expression des protéines, et leur position sur le gel est indicatrice de la survenue de modifications post traductionnelles.

c) Identification de cibles putatives de FMRP

Les cartes protéomiques de deux clones FMR1⁺ et de deux clones FMR1⁻ ont été comparées visuellement et à l'aide du logiciel Mélanie (cf. Figure 31). 19 spots d'intensité différente dans les lignées FMR1⁺ et FMR1⁻ ont été excisés des gels et ont permis l'identification de 12 protéines susceptibles d'être dérégulées en absence de FMRP (cf. Figure 31 et Tableau 5). Trois de ces protéines, la peroxirédoxine 2, la thiorédoxine peroxidase 1, et la thiorédoxine, sont impliquées dans la régulation du stress oxydatif. Différents spots additionnels, correspondant tous à la vimentine, ont été détectés dans les lignées FMR1⁺ (cf. Figure 32). Ces spots ont des pI différents et pourraient correspondre à plusieurs niveaux de phosphorylation de la protéine. Enfin, un spot d'intensité plus forte dans les cellules FMR1⁻ correspond à la sous-unité catalytique β de la Protéine Phosphatase 2A (PP2Ac β).

3.2) PP2A, une cible probable de FMRP

a) Augmentation du taux de PP2A en absence de FMRP fonctionnelle

La PP2A est une sérine-thréonine phosphatase composée d'une sous-unité catalytique, α ou β , et d'une sous-unité structurale. Cette enzyme ubiquitaire est impliquée dans la régulation du cycle cellulaire, dans le contrôle de la traduction mais aussi dans la réorganisation du cytosquelette (voir (Zolnierowicz 2000) pour revue). De manière intéressante au vue des résultats décrits précédemment, la PP2A est notamment capable de déphosphoryler la P-Cofiline (Ambach, Saunus et al. 2000; Meberg and Bamberg 2000; Samstag and Nebl 2003).

Les sous-unités catalytiques sont identiques à 97% et aucun anticorps disponible ne permet de discriminer les sous-unités α des sous-unités β . Afin de confirmer les données d'EBD, nous avons donc comparé la quantité globale de sous-unités catalytiques de la PP2A (PP2Ac) dans différents clones de cellules $FMR1^+$, $FMR1^-$, $FMR1^{KH1}$ et $FMR1^{KH2}$.

La quantité de PP2Ac est significativement plus élevée dans les cellules invalidées pour *FMR1* ou exprimant un allèle muté. L'augmentation du niveau d'expression de cette phosphatase pourrait expliquer la diminution de niveau de phosphorylation de la Cofiline dans les cellules $FMR1^-$, $FMR1^{KH1}$ et $FMR1^{KH2}$.

3.3) Interaction entre FMRP et l'ARNm de la PP2A

Ces expériences ont été conduites en collaboration avec l'équipe du Dr Hervé Moine à l'IBMC (Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire) de Strasbourg.

La capacité de différentes portions de l'ARNm de la PP2Ac β à déplacer le complexe formé par FMRP et l'ARNm *FMR1* radiomarqué a été évaluée par gel shift. Les résultats obtenus indiquent que la partie 5'UTR de l'ARNm de la PP2A se lie effectivement avec une forte affinité et une forte spécificité à FMRP. Nous avons également pu mettre en évidence 4 séquences susceptibles de former des structures en G-quartet, en comparant les pauses survenant lors de la reverse transcription de la partie 5'UTR de l'ARNm de la PP2Ac β en présence d'ions K^+ mais pas d'ions Na^+ (cf. Introduction, paragraphe II.2.3.b). L'une de ces séquences est localisée seulement 18 nucléotides en amont du codon initiateur et la liaison de

FMRP au niveau de cette région est susceptible de créer une gêne stérique affectant le niveau de traduction de l'ARNm.

4) Réorganisation du cytosquelette et relocalisation de FMRP et de ses interacteurs

4.1) Traitement au PDGF et relocalisation de quatre interacteurs de FMRP au niveau des cercles d'actine

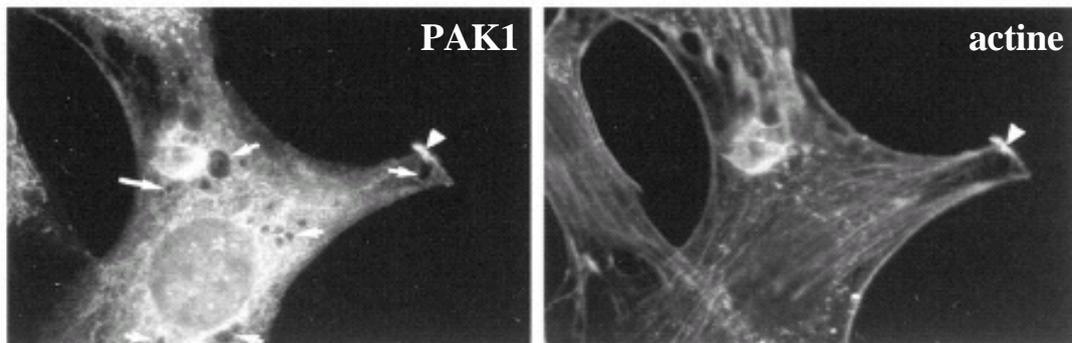
La réorganisation du cytosquelette déclenche et nécessite le recrutement de protéines et d'ARNm vers les sites de polymérisation et de dépolymérisation (Mingle, Okuhama et al. 2005). C'est le cas de Rac1, qui, sous forme activée, est dirigée au niveau du bord avant des cellules, sous la membrane plasmique (Kraynov, Chamberlain et al. 2000). De même, l'un de ses effecteurs, PAK1 (p21-Activated Kinase 1) est associé au cercle d'actine précédemment décrit lorsqu'il est activé (Dharmawardhane, Sanders et al. 1997).

FMRP n'a pas été détectée au niveau des sites de restructuration de l'actine après traitement des cellules au PDGF. Nous avons en revanche observé la relocalisation de FXR1P, de CYFIP1, de 82-FIP et de NUFIP au niveau des cercles d'actine. FXR1P et CYFIP1 sont également recrutées au niveau d'expansions de la membrane plasmique. FMRP n'est pas nécessaire à la survenue de ces relocalisations, puisqu'elles interviennent aussi bien dans les cellules FMR1⁺ que dans les cellules FMR1⁻.

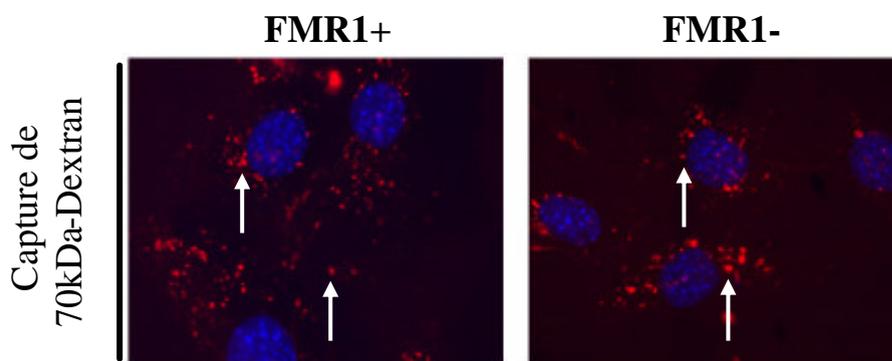
4.2) Relocalisation de FMRP, FXR1P et CYFIP1 autour des vésicules de macropinocytose

Le traitement des fibroblastes au PDGF et l'activation de Rac1, ou de son effecteur, PAK1, déclenchent la formation de vésicules de plus de 0,2 µm de diamètre selon le processus de macropinocytose (Ridley, Paterson et al. 1992; Dharmawardhane, Schürmann et al. 2000). La macropinocytose est une forme d'endocytose, impliquée dans la capture aspécifique de macromolécules en solution dans le liquide extracellulaire. L'induction rapide et transitoire de la formation de ces vésicules sous l'effet des facteurs de croissance pourrait participer aussi aux flux de membranes nécessaires au changement de forme et à la migration des cellules.

A.



B.



C.

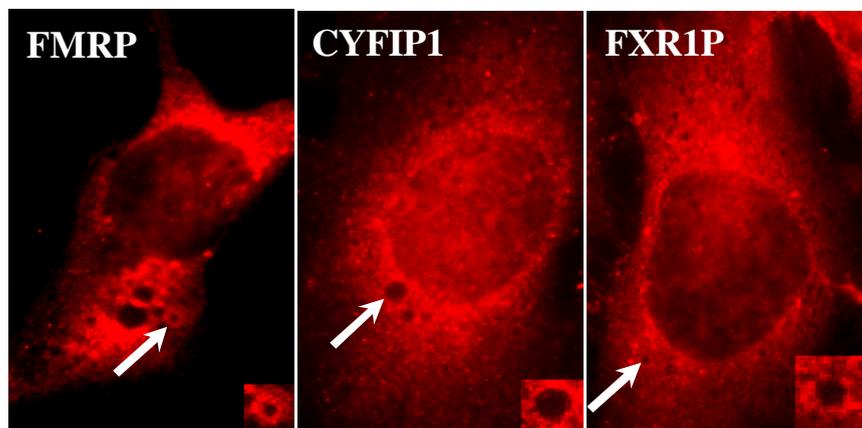


Figure 33. Relocalisation des protéines FMRP, CYFIP1 et FXR1P autour des vésicules de macropinocytose.

A. Relocalisation de l'effecteur de Rac1, PAK1, autour de vésicules de macropinocytose (flèche rouge) associées à des cercles d'actine dans des fibroblastes. Adapté de *Dharmawardhane et al., 2000*.

B. Evaluation du processus de macropinocytose dans des fibroblastes FMR1⁺ et FMR1⁻ à l'aide de dextran de 70 kDa marqué au Texas red. Les vésicules sont indiquées par des flèches.

C. Relocalisation des protéines FMRP, CYFIP1 et FXR1P autour de vésicules de macropinocytose dans des fibroblastes FMR1⁺ traités au PDGF.

L'utilisation de dextran de 70 kDa marqué par un fluorochrome permet d'évaluer la formation des vésicules de macropinocytose. Nous avons stimulé ce processus à l'aide de PDGF et observé la formation de ces vésicules dans des fibroblastes FMR1⁺ et FMR1⁻, placés dans un milieu de culture contenant du dextran marqué au Texas Red. Des résultats préliminaires permettent de penser que ce processus n'est pas affecté par l'absence de FMRP (cf. Figure 33). En revanche, l'analyse de marquages immunofluorescents de fibroblastes FMR1⁺ traités au PDGF indique que FMRP, FXR1P et CYFIP1 sont recrutées autour de ces vésicules (cf. Figure 33).

4.3) Localisation de FXR1P au niveau de faisceaux de microtubules impliqués dans la formation de lamellipodes

FXR1P est relocalisée au niveau des cercles d'actine après traitement des fibroblastes au PDGF (cf. paragraphe III.4.1). L'analyse des marquages immunofluorescents indique que FXR1P est également distribuée sous la forme de filaments et de faisceaux, distincts du réseau d'actine, dans les cellules traitées au PDGF (cf. Figure 34) et dans les cellules privées de sérum. Afin de déterminer la nature de ces structures, nous avons étudié la localisation de FXR1P par rapport à celle du réseau de microtubules par immunofluorescence. En effet, FXR1P est associée aux microtubules dans le flagelle des spermatozoïdes chez la souris (Huot, Mazroui et al. 2001). De plus, la formation de faisceaux de microtubules, constitués de fibres parallèles émanant du noyau et dirigés vers la membrane plasmique, est nécessaire à l'émission de lamellipodes : les microtubules seraient responsables de l'activation locale de Rac1 et de la localisation correcte des sites de polymérisation de l'actine (Waterman-Storer, WorthyLake et al. 1999).

Les résultats obtenus par marquage simultané de FXR1P et de la β -tubuline, montrent que FXR1P est associée aux faisceaux de microtubules courts, émergeant du noyau des fibroblastes FMR1⁺ cultivés sans sérum pendant 24 heures (cf. Figure 35A et B). La formation de lamellipodes, induite par ajout de sérum dans le milieu pendant 1 ou 2 heures, s'accompagne effectivement de la formation de longs faisceaux de microtubules courant d'un bout à l'autre de ces prolongements. De manière intéressante, FXR1P est étroitement associée à ces faisceaux dans le cytoplasme (cf. Figure 35A et 34B). Cette localisation ne dépend pas de la présence de FMRP, puisqu'elle survient également dans les cellules FMR1⁻. Enfin, nous avons pu vérifier l'existence de sites de restructuration du réseau d'actine à l'extrémité de ces

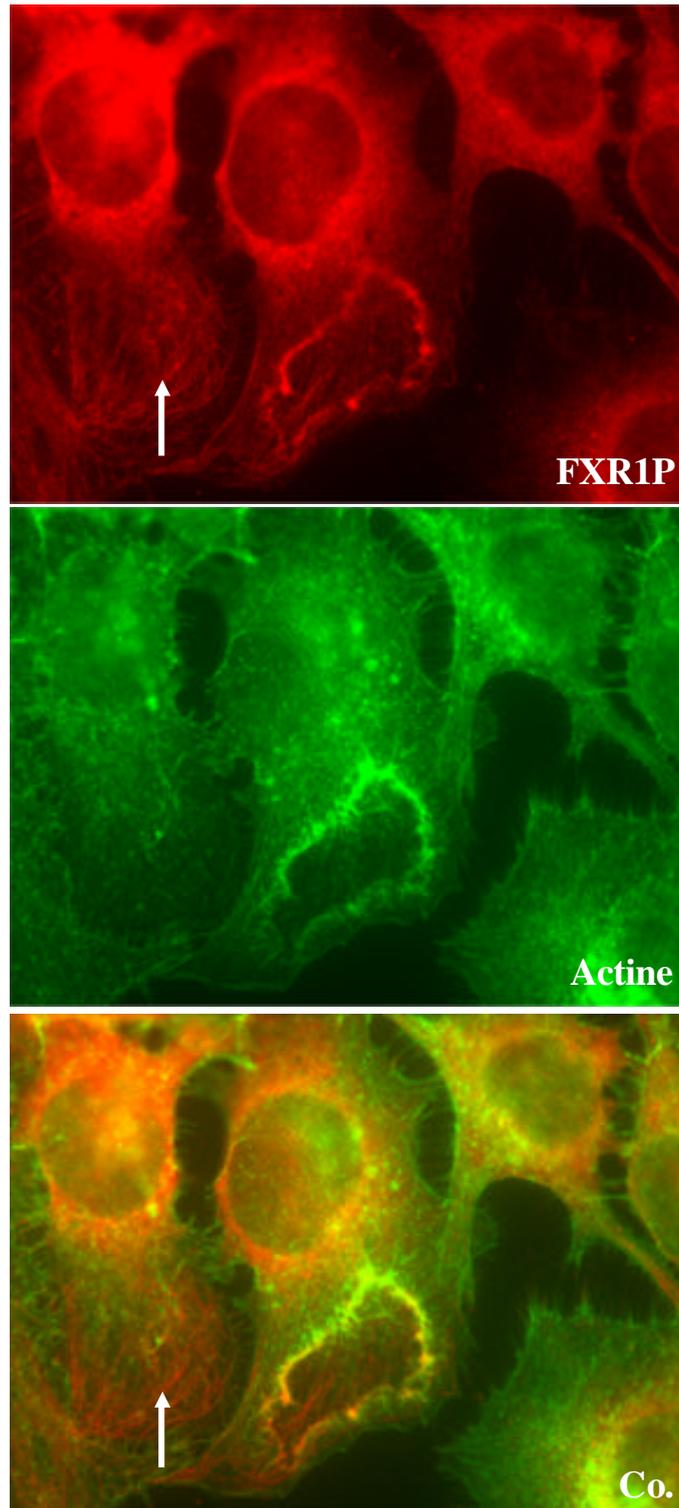


Figure 34. Localisation de FXR1P au niveau de structures en faisceaux (flèches) distinctes du cytosquelette d'actine.

FXR1P (en rouge) est marquée par l'anticorps 830, l'actine est repérée à l'aide de phalloïdine-FITC.

Co. : Comarquage.

faisceaux (cf. Figure 35C), analogues à ceux au niveau desquels FXR1P se relocalise (cf. paragraphe III.4.1), en marquant le cytosquelette d'actine et le réseau de microtubules respectivement à l'aide de phalloïdine-Tritc et d'un anticorps dirigé contre la β -tubuline.

Lors de l'émission de lamellipodes, la localisation de FXR1P pourrait donc varier non seulement lors de la restructuration du cytosquelette d'actine, mais également lors de la réorganisation du réseau de microtubules.

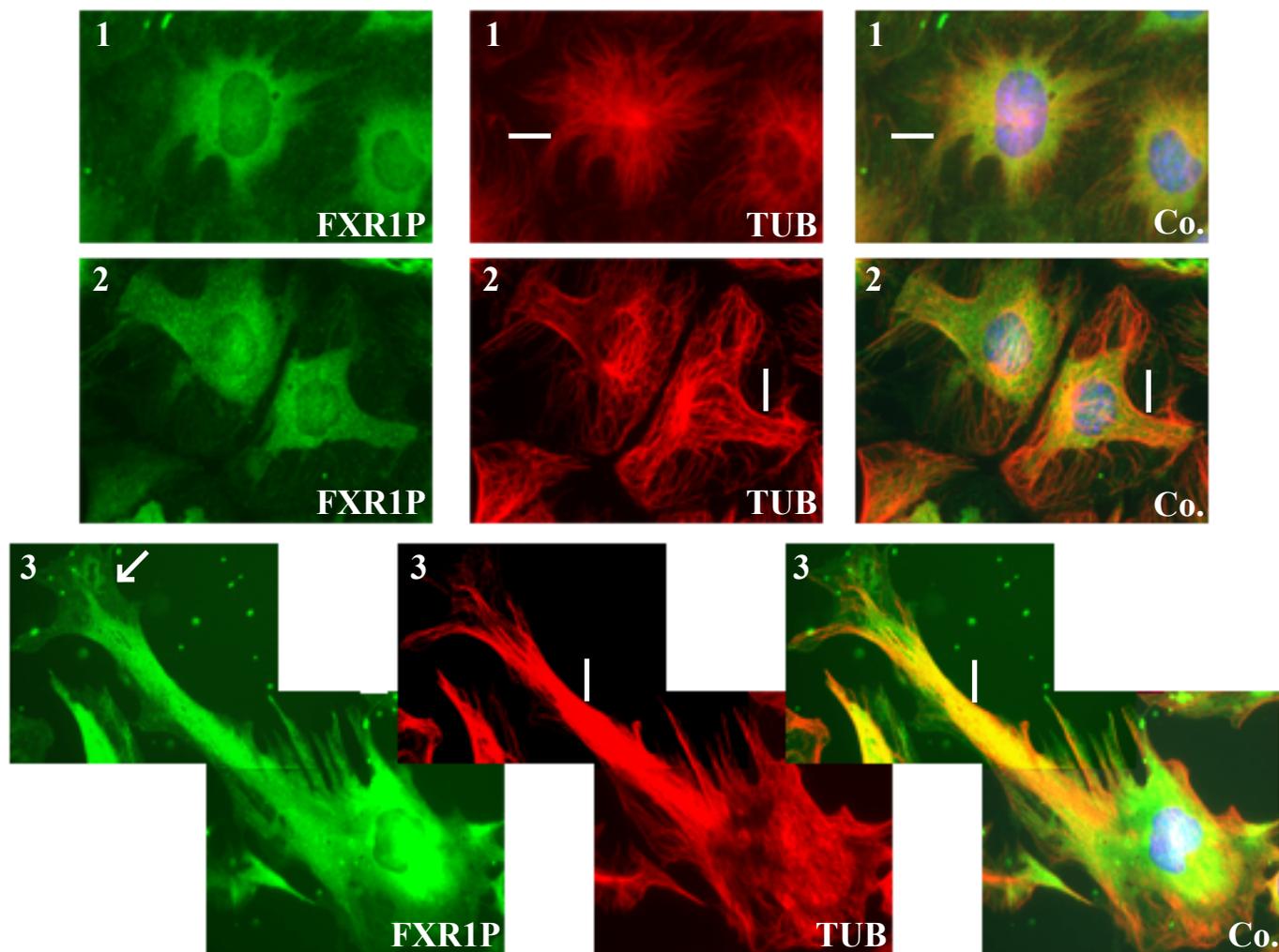
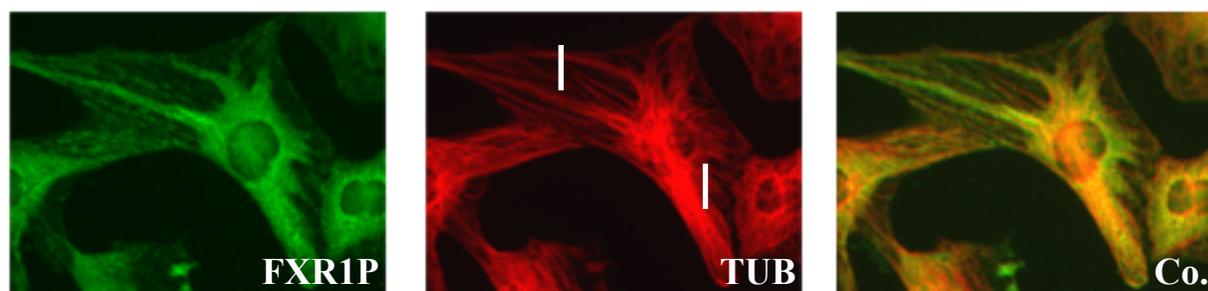
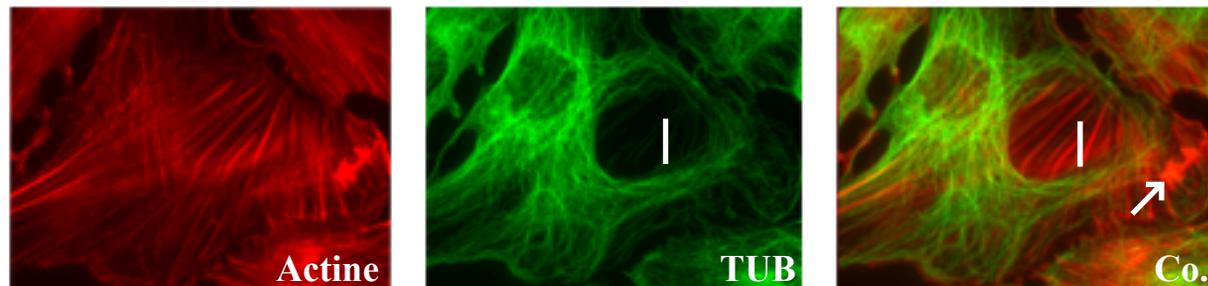
A.**B.****C.**

Figure 35. Localisation de FXR1P au niveau de faisceaux de microtubules.

A. Distribution de FXR1P (anticorps 830, marquage vert) au niveau de faisceaux (traits) de microtubules (anticorps contre la beta-tubuline, marquage rouge) dans des fibroblastes FMR1+ privés de sérum (1), puis replacés dans un milieu complet pendant 1 heure (2) ou 2 heures (3). L'extrémité d'un lamellipode est indiquée par un flèche.

B. Distribution de FXR1P (anticorps 830, marquage vert) au niveau de faisceaux (traits) de microtubules (anticorps contre la beta-tubuline, marquage rouge) dans des fibroblastes FMR1- privés de sérum.

C. Association entre la direction d'extension d'un faisceau (trait) de microtubules (anticorps contre la beta-tubuline, marquage vert) et les zones d'actine (phalloïdine-Tritc, marquage rouge) en cours de restructuration.

PUBLICATION 3

[Signalement bibliographique ajouté par : ULP – SCD – Service des thèses électroniques]

FMRP interferes with the Rac1 pathway and controls actin cytoskeleton dynamics in murine fibroblasts

Marie Castets, Céline Schaeffer, Elias Bechara, Annette Schenck, Edward W. Khandjian, Sylvie Luche, Hervé Moine, Thierry Rabilloud, Jean-Louis Mandel and Barbara Bardoni

Human Molecular Genetics 2005, Vol. 14, 835-844

Pages 835 à 844:

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Pour les utilisateurs ULP, il est possible de consulter cette publication sur le site de l'éditeur :
<http://hmg.oxfordjournals.org/cgi/content/full/14/6/835>

Il est également possible de consulter la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP: peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr

I. Etude du rôle de la PP2A dans la déphosphorylation de FMRP

1) Modifications post-traductionnelles et régulation de l'activité de FMRP

Deux types de modifications post-traductionnelles ont récemment été mises en évidence et pourraient réguler l'activité de FMRP en modifiant ses propriétés biologiques.

1.1) Modification de FMRP par méthylation

FMRP serait méthylée en cours de traduction par des méthyl-transférases, au niveau des arginines de la boîte RGG. L'analyse de l'association entre FMRP et des homopolymères d'ARN fixés sur des billes d'agarose suggère que la méthylation des arginines renforce l'interaction FMRP-ARN *in vitro* (Denman 2002). *In vivo*, la méthylation pourrait influencer l'association de FMRP aux ribosomes engagés dans une synthèse protéique, en modifiant l'affinité de FMRP pour ces ARNm cibles et en modulant la formation de dimères FMRP-FXR1P (Dolzhanskaya, Merz et al. 2006).

1.2) Modification de FMRP par phosphorylation

FMRP est également modifiée de manière post-traductionnelle par phosphorylation.

Chez la drosophile, la phosphorylation s'effectue au niveau de la sérine 406. *In vitro*, cette modification semble diminuer la capacité de dFMR1 à se dimériser et à interagir avec l'ARN (Siomi, Higashijima et al. 2002). L'enzyme dCKII (*Drosophila* Casein Kinase II) interagit avec dFMR1 *in vitro* et *in vivo*. De plus, la sous-unité alpha de dCKII phosphoryle dFMR1 *in vitro*. Ces données suggèrent que la phosphorylation de la sérine 406 de dFMR1 résulte de l'activité de dCKII (Siomi, Higashijima et al. 2002).

Chez les Mammifères, la Caséine Kinase II (CKII) phosphoryle également FMRP au niveau de la sérine 499 (Ceman, O'Donnell et al. 2003). Cette modification pourrait déclencher un mécanisme en cascade, aboutissant à la phosphorylation des sérines comprises entre les résidus 483 et 521, en aval de la boîte RGG. La délétion du domaine compris entre les résidus 443 et 527 n'altère pas l'association de FMRP à des homopolymères d'ARN *in vitro* (Mazroui, Huot et al. 2003). De même, des analyses réalisées sur micropuces à ADN indiquent que la substitution d'un acide aspartique ou d'une alanine en position 499, mimant

respectivement une hyper et une hypo-phosphorylation, ne modifie pas l'association de FMRP à des ARNm cibles *in vivo* (Ceman, O'Donnell et al. 2003). Contrairement aux résultats obtenus chez la drosophile, l'interaction entre FMRP et l'ARN ne serait donc pas affectée par la phosphorylation. De même, l'association de FMRP aux polysomes ne serait pas modifiée par la phosphorylation (Ceman, O'Donnell et al. 2003; Mazroui, Huot et al. 2003). En revanche, le traitement de cellules à l'azide de sodium suivi de leur fractionnement sur gradient de sucrose (cf. Introduction, paragraphe II.2.5.b) semble indiquer que la forme non phosphorylée de FMRP puisse être davantage associée aux polysomes actifs, engagés dans des synthèses protéiques.

2) Hypothèse et objectif de l'étude (Manuscript 4)

Le niveau d'expression de la PP2A serait régulé au niveau post-transcriptionnel, par modulation de l'association de son ARNm aux polysomes (Baharians and Schönthal 1998). De plus, la quantité de PP2A dans la cellule serait maintenue à une valeur stable par un mécanisme d'autorégulation, dans lequel la PP2A régulerait elle-même son niveau d'expression en activant une protéine inhibant sa traduction (Baharians and Schönthal 1998).

Or, la PP2A est responsable de la déphosphorylation de certains substrats de la CKII (Ulloa, Dombradi et al. 1993; Wang, Guo et al. 1999; Klumpp, Maurer et al. 2004). De plus, la sous-unité alpha de la CKII pourrait réguler l'activité de la PP2A, en s'associant directement à la phosphatase (Heriche, Lebrin et al. 1997; Lebrin, Bianchini et al. 1999). Enfin, les résultats décrits au paragraphe II de cette partie, suggèrent que FMRP puisse inhiber la traduction de la PP2Ac. Compte tenu de ces données, nous avons émis l'hypothèse que la PP2A puisse être une phosphatase de FMRP.

La troisième partie de mon travail de thèse a donc consisté à inhiber chimiquement l'activité de la PP2A, et à étudier la survenue de modifications post-traductionnelles au niveau de FMRP, ainsi que leur(s) éventuelle(s) conséquence(s) fonctionnelle(s). L'ensemble des résultats obtenus est décrit dans le Manuscript 4, en préparation.

3) Inhibition de la PP2A par traitement à l'acide okadaïque et modifications post-traductionnelles de FMRP

L'addition d'un groupement phosphate augmente la masse moléculaire d'une protéine de 79 Da. La modification de masse moléculaire due à l'ajout de plusieurs phosphates peut, de ce fait, être suffisante pour modifier la migration de la protéine sur western blot.

Compte tenu du mécanisme de phosphorylation en cascade décrit (Ceman, O'Donnell et al. 2003), nous avons analysé le profil de migration de FMRP sur western blot, dans des fibroblastes FMR1⁺ traités ou non à l'acide okadaïque (OA). L'OA est un inhibiteur spécifique des phosphatases PP2A et PP1 (Protéine Phosphatase 1). La PP2A est cependant plus sensible à cet agent chimique, puisque l'application de 50 nM d'OA sur des fibroblastes Swiss NIH-3T3 pendant 24 heures réduit l'activité de la PP2A de 80% sans modifier celle de PP1 (Jaramillo-Babb, Sugarmans et al. 1996).

Le traitement des fibroblastes FMR1⁺ à l'OA induit l'apparition d'une bande de plus haut poids moléculaire, susceptible de correspondre à une forme phosphorylée de FMRP. Ces données ont été renforcées par l'analyse du profil de migration obtenu par EBD : des spots additionnels, correspondant à des formes de FMRP de pI plus acides et de masses moléculaires plus élevées, apparaissent sur gel après traitement de fibroblastes FMR1⁺ et Swiss NIH-3T3 à l'OA. Ces modifications sont compatibles avec celles déclenchées par l'addition de groupement(s) phosphate(s) sur la protéine, puisque la charge négative portée par chaque phosphate abaisse le pI des protéines.

4) Effet de l'acide okadaïque sur la localisation de FMRP et sur son association aux polysomes

4.1) Influence de l'inhibition de la PP2A sur la localisation subcellulaire de FMRP

Nous avons comparé la localisation de FMRP dans des fibroblastes FMR1⁺, traités ou non à l'OA, par immunofluorescence. Ces expériences indiquent que la localisation de FMRP n'est pas modifiée par l'addition d'OA dans le milieu de culture. En particulier, FMRP est présente au sein de granules cytoplasmiques, que les cellules aient été traitées ou non. Ces résultats sont compatibles avec ceux obtenus par Ceman *et al*, indiquant que la substitution de la sérine 499 de FMRP par un acide aspartique (mutant Ser499Asp) ou par une alanine

(mutant Ser499Ala), mimant respectivement une hyper et une hypo-phosphorylation, ne modifie pas la localisation intracellulaire de FMRP.

4.2) Absence d'effet de l'acide okadaïque sur l'association de FMRP aux polysomes

En conditions normales de culture, la forme sauvage de FMRP et les mutants Ser 499Asp et Ser499Ala sédimentent tous dans les fractions contenant les polyribosomes sur gradient de sucrose (Ceman, O'Donnell et al. 2003). En revanche, le traitement des cellules à l'azide de sodium induit la dissociation préférentielle du mutant Ser499Ala de FMRP, qui serait donc davantage associé aux polysomes engagés dans une synthèse (Ceman, O'Donnell et al. 2003).

Nous avons testé l'effet de l'inhibition de la PP2A sur l'association de FMRP aux polysomes, en analysant le profil de distribution de FMRP le long du gradient de sucrose, dans des fibroblastes FMR1⁺ traités ou non à l'OA. Aucune différence d'association globale aux polysomes n'a été détectée après traitement des cultures cellulaires à l'OA. De même, l'OA ne modifie pas le profil de distribution de FMRP sur gradient de sucrose après traitement des cellules à l'azide de sodium.

MANUSCRIPT 4

Effects of okadaic acid treatment on FMRP posttranslational modifications and biological properties

Marie Castets¹, Eric Flatter¹, Hervé Moine¹, Barbara Bardoni² and Jean-Louis Mandel¹

1. IGBMC – Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, INSERM, CNRS, ULP, Collège de France, BP10142 – 1, rue L.Fries, 67404 Illkirch C.U. de Strasbourg, France.

2. IFR50, FRE 2720, Faculté de Médecine, Av. de Valombrose, 06107 Nice – France.

3. Corresponding author: Pr. Jean-Louis Mandel,

Jean-Louis.MANDEL@igbmc.u-strasbg.fr

Tel: 00 33 388653210

Introduction

Fragile X syndrome is the main cause of inherited mental retardation, affecting around 1/4000 males and 1/8000 females [1]. This syndrome is due to mutations in *FMR1*, a gene localized at the distal end of the X chromosome [2]. In almost all known cases, mutations consist in an expansion of a CGG stretch in *FMR1* 5'UTR. This expansion leads to hypermethylation of the region and to *FMR1* silencing [3, 4]. Fragile X syndrome consequently results from the absence of *FMR1* encoded protein FMRP (Fragile X Mental Retardation Protein).

Identification of three RNA binding domains in FMRP sequence, two KH domains and one RGG box, led to the hypothesis that FMRP was an RNA binding protein [5]. Its ability to interact with RNA was confirmed *in vitro* and *in vivo* [5-9]. FMRP is also associated with polyribosomes, which are translation complexes containing mRNAs bound by several ribosomes [10-12]. FMRP involvement in translation control has been strengthened by several experimental arguments. Indeed, FMRP inhibits translation of reporter mRNAs *in vitro* [13-15]. Global approaches have also led to the identification of a few hundreds of putative mRNA targets associated with FMRP [8, 9, 16, 17]. Association profile to polyribosomes and/or amount of encoded proteins have been shown to be modified for some of them in absence of FMRP.

Mechanisms that could regulate FMRP function in cells remain poorly understood. Posttranslational modification had been suggested to regulate FMRP activity. This occurrence, as well as its consequences, was first investigated by Siomi *et al* [18]. They have shown that FMRP *Drosophila* ortholog dFMR1 can be phosphorylated on the highly conserved serine 406 residue. This phosphorylation alters dFMR1 possibility to form homopolymers, but also its ability to interact with RNA *in vitro*. FMRP phosphorylation was then shown to occur on the corresponding serine 499 residue [19]. Moreover, this first event could trigger in series

phosphorylation of nearby serine residues [19]. Phosphorylation was not correlated with an alteration of FMRP binding on specific mRNAs *in vivo*, but it could modify the activity degree of polyribosomes it associates with [19]. Indeed, unphosphorylated FMRP seems to associate with actively translating polyribosomes, whereas phosphorylated FMRP is found on more stalled ones.

dCasein Kinase II (dCKII) and its mammalian ortholog (CKII) can trigger *in vitro* phosphorylation of dFMR1 and FMRP, respectively [18]. Identity of the phosphatase(s) that could reverse this modification is not known. We have sought whether the serine-threonine phosphatase Protein Phosphatase 2A (PP2A) could be a candidate. For this purpose, we inhibited its activity using Okadaic Acid (OA) treatment and analyzed FMRP migration profile on western blot and two-dimensionnal electrophoresis (2D) gel. We observed a mobility shift of FMRP towards higher molecular weight after OA treatment on western blot and several FMRP spots of different isoelectric points (pI) using 2D gel analysis. These changes fit well with an increase in FMRP phosphorylation level due to inhibition of PP2A. OA treatment does not induce major changes in FMRP subcellular localization and does not modify FMRP association to polyribosomes.

Material and Methods

Cell Culture

Fibroblasts derived from *fmr1* null mouse and expressing human *FMRI* isoform1 (STEK FMR1+) or not (STEK FMR1-) were cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) supplemented with 10% Fetal Calf Serum (FCS) and hygromycin (150 μ g/ml) until they reach 80% confluence. Swiss NIH-3T3 fibroblasts and PC-12 cells were cultured respectively in DMEM supplemented with 10% Newborn Calf Serum and in DMEM supplemented with 5% FCS and 10% Horse Serum.

To inhibit PP2A activity, Okadaic Acid Sodium salt from Calbiochem was resuspended in DMSO to a final concentration of 100 μ M and added to culture medium for 1 hour at different concentrations.

2D gel electrophoresis and immunoblot

For 2D gel analysis, cells were rinsed with PBS and lysed in urea 7 M, thiourea 2 M, CHAPS 4%. Seventy five micrograms of proteins were diluted in 150 μ l of rehydration buffer (7 M urea, 2 M thiourea, 4% CHAPS, 2% ampholytes (BioRad), 50 mM DTT) and used to rehydrate 17 cm pH 3-10 immobilized pH gradient strips (ReadyStrip, BioRad). Isoelectric focusing was conducted according to manufacturer's instructions (50V for 9 hours, 200V for two hours, 1000V for 6,5 hours / 50 μ A per strip maximum). Strips were then equilibrated 15 minutes by rocking in a solution of urea 6 M, SDS 2%, TrisHCl pH 8.8 0,375 M, glycerol 20%, DTT 130 mM, and embedded at the top of 8% acrylamide gels in 1 ml low melting agarose. Proteins separation according to their molecular weight was carried out at 4°C, 30 minutes at

25V and then overnight at 20mA. Proteins were transferred at 4°C on nitrocellulose membranes 2 hours at 200 mA. Membranes were blocked in PBS supplemented with 3% milk, probed overnight at 4°C with 1C3 antibody (1/2000) and anti-L7 (1/10000, kindly provided by Pr. E.W. Khandjian), and incubated with peroxidase-conjugated goat anti-mouse/rabbit antibodies (1/5000). Immunoreactive bands were visualized with the Supersignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce).

Immunoblot analysis was performed as previously described [20].

Linear sucrose gradient fractionation

STEK FMR1+ and PC-12 cells were grown until they reach 80% confluence. For polyribosomes extraction and run-off experiments, cells were treated respectively 15 minutes with cycloheximide at 100 µg/ml and 30 minutes with 25 mM Sodium azide, as previously described [19]. Cells lysis, ultracentrifugation of cytoplasmic extracts on linear sucrose gradient (made up in Tris-HCl pH 7.4, 100 mM KCl and 5 mM MgCl₂) and collect of proteins were performed as described previously [21].

Immunofluorescence

Cells were fixed for immunofluorescence experiments as previously described [22]. Fixed cells were permeabilized in PBS containing 0,1% Triton, and incubated with 1C3 antibody (1/1000). After PBS rinses, goat anti-mouse Alexa594 was added for 1 hour. Cells were then rinsed again and mounted in Kaiser's glycerol gelatin (Merck). Immunofluorescence was analyzed using a Leica DB microscope.

RESULTS

Influence of OA on FMRP posttranslational modifications

Phosphorylation increases proteins molecular weight by 79 Da per site and then slows down their electrophoretic mobility on acrylamide gel [23]. Thus, we compared FMRP expression profile on western blot in cells treated or not with OA. Since *FMR1* mRNA alternative splicing produces different FMRP isoforms, we used the STEK FMR1+ fibroblast model we designed, which expressed only FMRP isoform1. Indeed, differential migration of FMRP isoforms could interfere with the detection of a shift due to phosphorylation. As expected, a single band corresponding to FMRP isoform1 was detected on western blot in untreated cells. In treated cells, we observed a shift of this band towards higher molecular weight (Fig. 1A). Since OA treatment leads to serine-threonine phosphatases inhibition, such a change in FMRP mobility could be due to an increase of its phosphorylation level. Analogous shifts have previously been observed for Histidine-dFMR1 in presence of CKII and a few hours after ³⁵S metabolic labeling of FMRP in pulse chase experiments [18, 19].

Phosphate carries a negative charge, which decreases proteins isoelectric points (pI). Two dimensional (2D) electrophoresis allows proteins separation according to their molecular weight and their pI. Thus, we used this technique to confirm that FMRP modification(s) observed on western blot after OA treatment correspond(s) to phosphorylation. After 2D electrophoresis, gels were blotted and membranes were hybridized with 1C3 specific antibody for FMRP detection. As expected, only one FMRP spot was detected in untreated cells, whereas one additional spot was observed in cells treated with 100 nM OA (Fig. 1B). Same result was obtained for both FMRP isoforms detected in Swiss NIH-3T3 fibroblasts (Fig. 1.B).

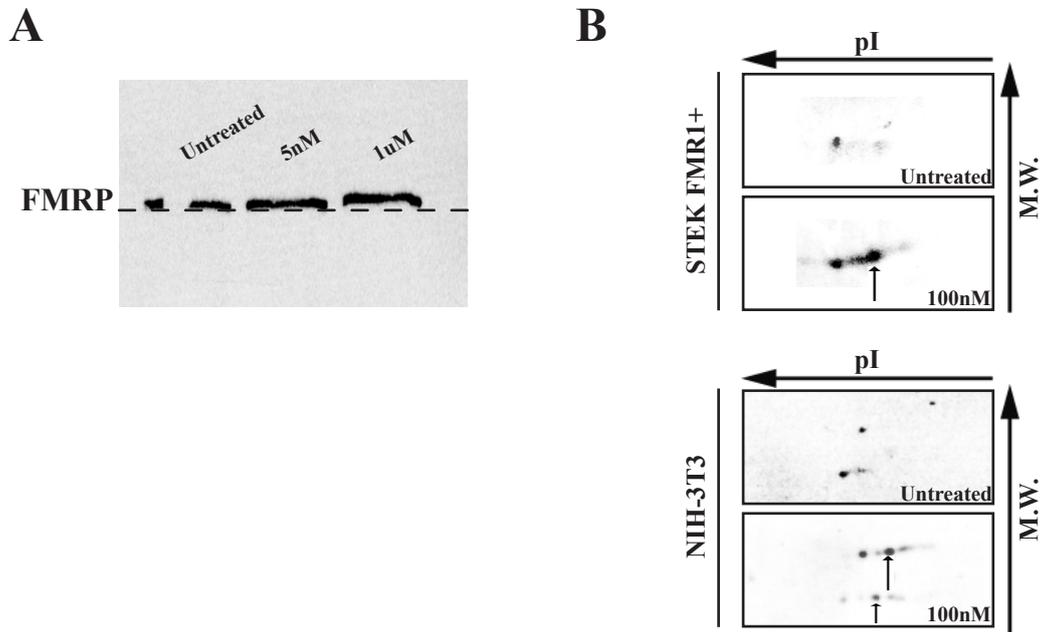


Figure 1. FMRP migration profile is modified after Okadaic Acid (OA) treatment.

(A) Western blot analysis of FMRP mobility in STEK FMR1+ fibroblasts treated or not with different concentrations of OA. (B) Comparison of FMRP forms present on two dimensional electrophoresis gel with and without OA treatment. Experiments were performed on STEK FMR1+ and NIH-3T3 fibroblasts. Additional spots induced by OA treatment are indicated by arrows. pI: Isoelectric Point; M.W.: Molecular Weight.

No signal was detected on gels corresponding to STEK FMR1- control cells, which lack FMRP expression (data not shown). In all cell types tested, molecular weight and pI of additional spots were respectively increased and decreased. Thus, OA treatment leads to FMRP modifications that likely correspond to an increase in phosphorylation degree.

Effect of OA treatment on FMRP subcellular localization

FMRP is mainly localized in cytoplasm where it has been identified in granules that are thought to be ribonucleoparticles [11, 24]. A small percentage of the protein is also present in the nucleus [25]. Identification of a Nuclear Localization Signal and a Nuclear Export Signal in FMRP sequence, as well as its nuclear export inhibition induced by leptomycin B treatment, have led to suggest that FMRP is able to shuttle between the nucleus and the cytoplasm, and could then play a role in regulation of targets mRNAs transport [26-28]. In any cases, FMRP localization could reflect its activity at a given time.

We performed immunofluorescence analysis in STEK FMR1+ to see whether OA-induced modifications alter FMRP localization. We did not observe major changes in FMRP localization in treated cells, compared to control ones (Fig. 2). In both cases, FMRP was almost exclusively found in cytoplasm (Fig. 2A). Moreover, FMRP containing granules were still present in cells treated with OA (Fig. 2B). This result is consistent with previous datas, showing that substitution of FMRP serine 499 by an alanine (Ser499Ala) or by an aspartic acid (Ser499Asp), respectively mimicking hypo and hyper-phosphorylated forms of FMRP, were both present in the cytoplasm and that FMRP phosphorylation domain is not required for FMRP association to mRNP granules [19, 21].

Consequences of OA treatment on FMRP association to polyribosomes

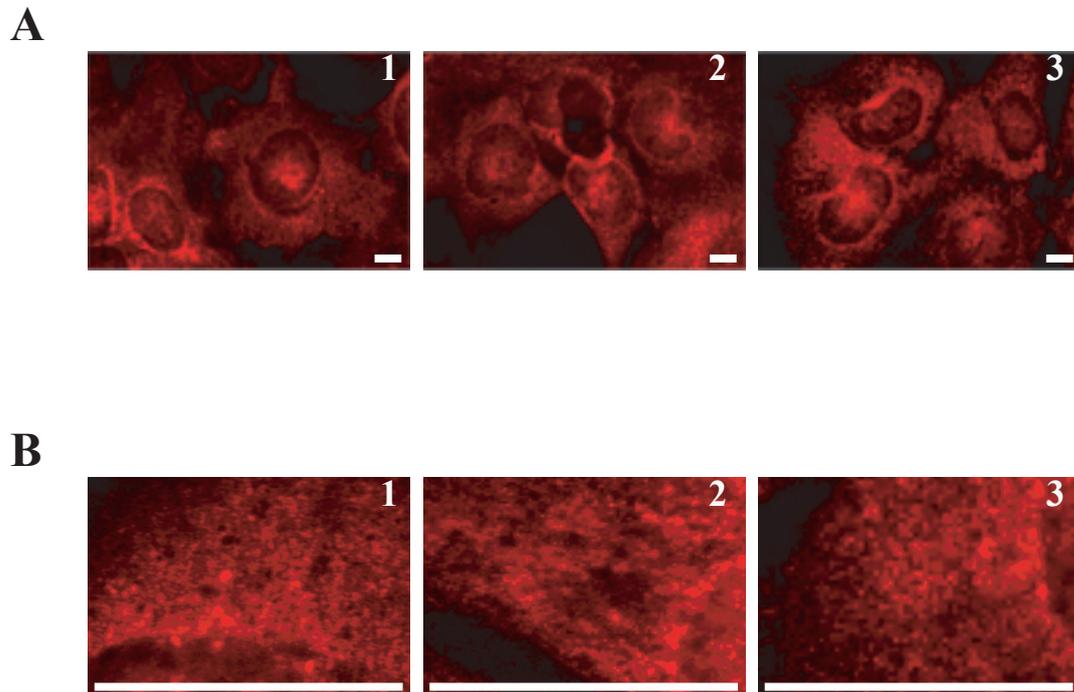


Figure 2. FMRP localization is not sensitive to Okadaic Acid (OA) treatment.

FMRP distribution was analyzed by immunofluorescence in STEK FMR1+ fibroblasts, using 1C3 specific antibody. Cells were either left untreated (column1), or treated with 100 nM OA (column2), or 1 μ M OA (column3). (A) Global repartition of FMRP in cells. (B) Granular distribution of FMRP in cytoplasm.

FMRP is associated to polyribosomes in cytoplasm. Its role in regulation of translation could depend on this association [11, 12]. To determine OA influence on FMRP incorporation into polyribosomes, cytoplasmic extracts from OA treated and control STEK FMR1+ cells were fractionated on sucrose density gradient. FMRP amount in each fraction was then determined by western blot. FMRP profiles along the gradient fit with classical distributions and were similar in both cases (Fig. 3A). In particular, similar FMRP amounts were detected in the heaviest fractions that contain the polyribosomes. Same results were obtained using PC-12 cells (data not shown). These results are compatible with previous data showing that mutant FMRP deleted for the phosphorylation domain, as well as the already described Ser499Ala and Ser499Asp ones, share the same profile of association to mRNP particles than the wild type isoform [19, 21].

Ribosome run-off experiments allow the detection of actively translating polyribosomes [12, 19]. This experiment consists in treating cells with sodium azide, which inhibits translation initiation but not the elongation process. Active ribosomes will progress along the mRNA while the inhibition, but won't be replaced. This will result in the loss of heaviest polyribosomes since no incorporation of new ribosomes will occur. We used the experimental protocol described by Ceman *et al*, who have shown that hypophosphorylated Ser499Ala mutant and wild type FMRP are differentially distributed in heaviest fractions after ribosome run-off induction [19]. Again, we did not detect differences in FMRP sedimentation profile in cells treated with OA compared to untreated cells, neither at the global level (data not shown), nor for the heaviest fractions (Fig. 3B). In particular, FMRP was still associated to heaviest polyribosomes in both cases. This fits with the fact that no difference was observed in similar ribosome run-off experiments between wild type FMRP and the Ser499Asp mutant mimicking an hyperphosphorylated form [19].

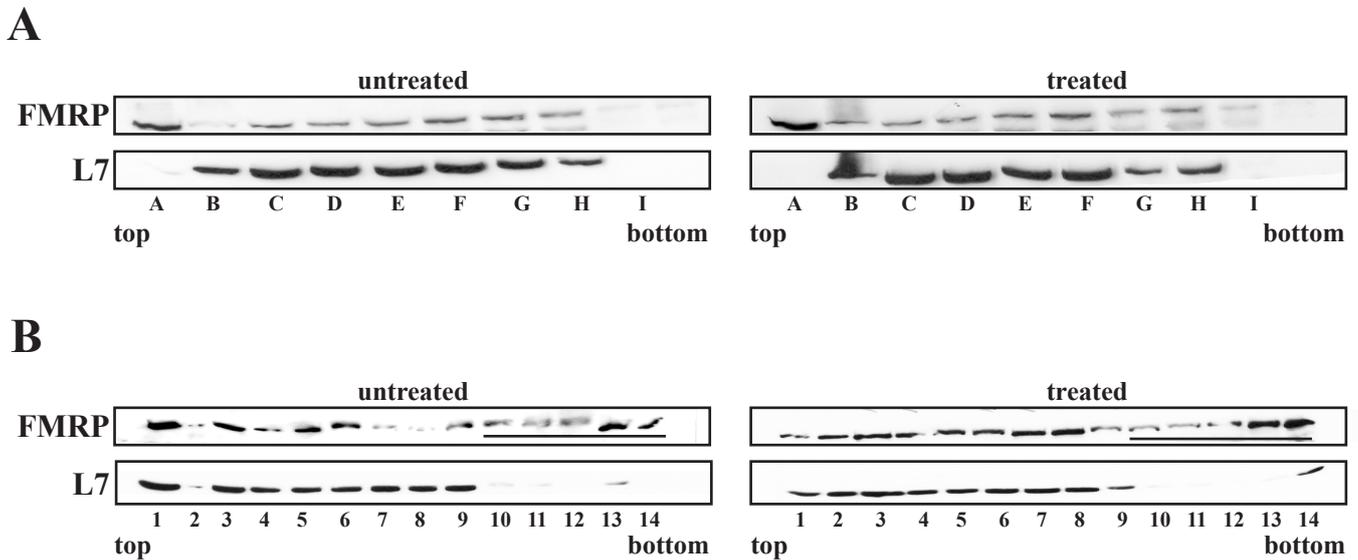


Figure 3. FMRP association to polyribosomes is not changed by Okadaic acid.

STEK FMR1+ fibroblasts were cultured one hour with (treated) or without (untreated) 100 nM OA. Cytoplasmic extracts were then sedimented through 15-45% sucrose density gradient. (A) Distribution of FMRP along the gradient in cells treated with cycloheximide. Fractions collected after separation on sucrose gradient were pooled (A=fractions 1-5 ; B=fractions 6-8 ; C=fractions 9-10 ; D=fractions 11-12 ; E=fractions 13-14 ; F=fractions 15-16 ; G=fractions 17-18 ; H=fractions 19-20 ; I=fractions 20-21) and analyzed by western blot, using specific antibodies for FMRP (1C3) and L7 (anti-L7 serum). The L7 ribosomal protein is used as control. (B) Details of FMRP repartition between active and stalled polyribosomes in cells treated with sodium azide. Only the fourteen heaviest fractions of the gradient are represented. Stalled polyribosomes are underlined by a mark.

DISCUSSION

FMRP absence is responsible for Fragile X Mental Retardation Syndrome. FMRP is involved in translation regulation of target mRNAs, in a constitutive manner or in response to stimuli. Phosphorylation mediated by Casein Kinase II (CKII) was recently reported to be a likely mechanism for regulation of FMRP activity [18, 19]. However, identity of FMRP phosphatase(s) remained unexplored.

We thought that the widely expressed Protein Phosphatase 2A (PP2A) could be a good candidate. Indeed, this serine-threonine phosphatase antagonizes CKII action on some substrates [29-31]. Here, we have shown that treatment of cells with PP2A inhibitor Okadaic Acid (OA) induces modifications of FMRP, which very likely correspond to increase in its phosphorylation degree. These modifications alter neither FMRP localization, nor its association profile to polyribosomes.

2D gel analysis indicate that, in basal conditions, the main form of FMRP is not or under-phosphorylated compared to the one observed after OA inhibition. We could then have expected differences in FMRP distribution in ribosomes run-off experiments before and after OA treatment. Indeed, unphosphorylated form of FMRP was suggested to be more abundant in actively translating polyribosomes, based on analysis of Ser499Ala mutant behaviour in such experiments [19]. This discrepancy could be due either to the fact that FMRP is not absolutely free from phosphate in normal growth conditions or that FMRP association to active polyribosomes is regulated in a more complex manner.

Okadaic acid is a polyketal fatty acid that binds to and inhibits the serine-threonine phosphatases PP1 (Protein Phosphatase 1) and PP2A [32]. However, sensitivities of both phosphatases to OA are not identical. Indeed, a concentration of 5 nM is sufficient to

inhibit PP2A activity by 85% in vitro, whereas PP1 activity remains unaffected. Consistently, it was shown that treatment of Swiss NIH-3T3 fibroblasts 24 hours with 50 nM reduces PP2A activity by 80%, without modifying PP1 ones [33]. In the same way, treatment of MCF7 cells with 100 nM OA was shown to inhibit specifically PP2A [34]. Thus, even if we can not exclude that PP1 could participate to FMRP dephosphorylation, modifications that we observed on 2D gels after OA treatment likely result, at least in majority, from PP2A inhibition.

Involvement of PP2A in FMRP dephosphorylation is interesting, since PP2A was shown to adjust its expression to constant level through activation of an unknown translational repressor [35]. We have recently shown that FMRP is a likely translational inhibitor of PP2Ac : indeed, it binds PP2Ac mRNA with high affinity and its absence in cells leads to an increase in PP2Ac amount [20]. Thus, there could exist an autoregulation mechanism, in which PP2A regulates its expression via activation, through dephosphorylation, of its translational repressor FMRP (Fig. 4).

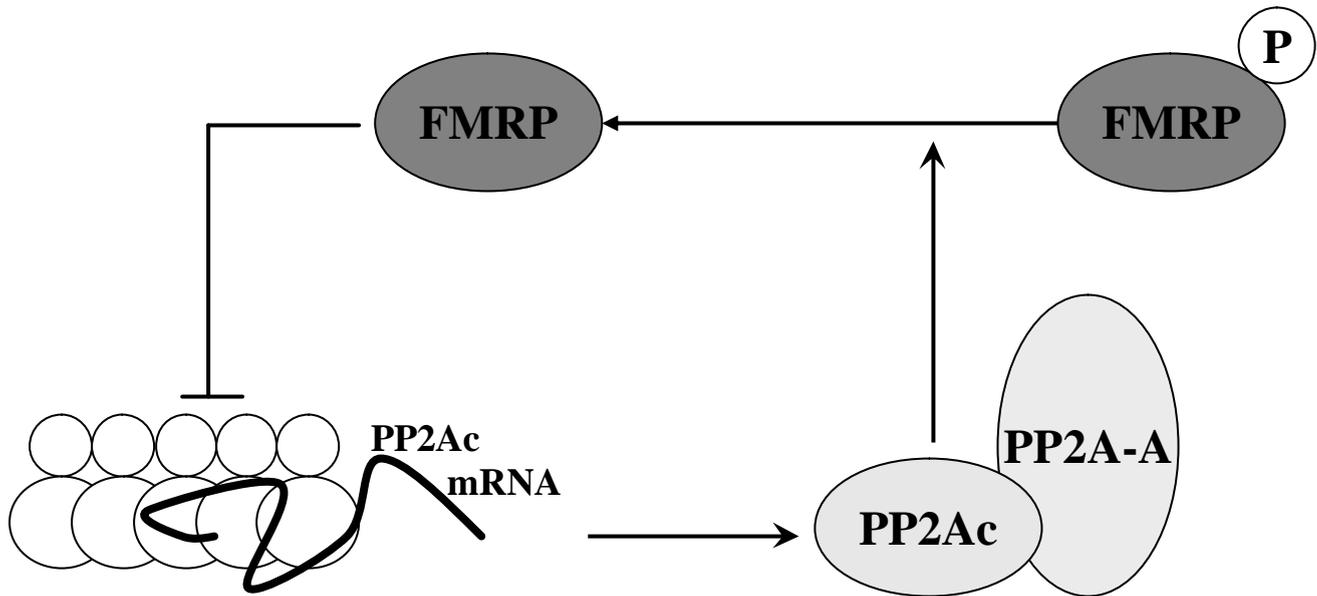
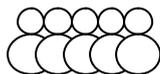


Figure 4. Schematic model of the putative regulation loop between FMRP and PP2A.

PP2A could activate FMRP through dephosphorylation. FMRP would in turn inhibit PP2Ac translation, thereby maintaining a constant level of PP2Ac in cells.

PP2Ac : Protein Phosphatase 2A, catalytic subunit ; PP2A-A : Protein Phosphatase 2A, structural subunit ; P : Phosphate.

 : polyribosomes.

BIBLIOGRAPHY

1. Imbert G, Feng Y, Nelson D, Warren ST, Mandel J-L: **FMR1 and mutations in Fragile X syndrome: molecular biology, biochemistry, and genetics**. In: *Genetic Instabilities and Hereditary Neurological Diseases*. Edited by Warren ST, Wells RD: Academic Press; 1998: 27-53.
2. Verkerk AJMH, Pieretti M, Sutcliffe JS, Fu YH, Kuhl DPA, Pizzuti A, Reiner O, Richards S, Victoria MF, Zhang F *et al*: **Identification of a gene (FMR-1) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome**. *Cell* 1991, **65**:905-914.
3. Oberlé I, Rousseau F, Heitz D, Kretz C, Devys D, Hanauer A, Boue J, Bertheas MF, Mandel JL: **Instability of a 550-base pair DNA segment and abnormal methylation in fragile X syndrome**. *Science* 1991, **252**:1097-1102.
4. Yu S, Pritchard M, Kremer E, Lynch M, Nancarrow J, Baker E, Holman K, Mulley JC, Warren ST, Schlessinger D *et al*: **Fragile X genotype characterized by an unstable region of DNA**. *Science* 1991, **252**(5010):1179-1181.
5. Siomi H, Siomi MC, Choi MC, Nussbaum RL, Dreyfuss G: **The protein product of the fragile X gene, FMR1, has characteristics of an RNA-binding protein**. *Cell* 1993, **74**:291-298.
6. Ashley CT, Jr., Wilkinson KD, Reines D, Warren ST: **FMR1 protein: conserved RNP family domains and selective RNA binding**. *Science* 1993, **262**:563-566.
7. Brown V, Small K, Lakkis L, Feng Y, Gunter C, Wilkinson KD, Warren ST: **Purified recombinant Fmrp exhibits selective RNA binding as an intrinsic property of the fragile X mental retardation protein**. *JBiolChem* 1998, **273**:15521-15527.
8. Miyashiro KY, Beckel-Mitchener A, Purk TP, Becker KG, Barret T, Liu L, Carbonetto S, Weiler IJ, Greenough WT, Eberwine J: **RNA Cargoes Associating with FMRP Reveal Deficits in Cellular Functioning in Fmr1 Null Mice**. *Neuron* 2003, **37**(3):417-431.
9. Brown V, Jin P, Ceman S, Darnell JC, O'Donnell WT, Tenebaum SA, Jin X, Wilkinson KD, Keene JD, Darnell RB: **Microarray identification of FMRP-associated brain mRNAs and altered mRNA translational profiles in fragile X syndrome**. *Cell* 2001, **107**:12-20.
10. Corbin F, Bouillon M, Fortin A, Morin S, Rousseau F, Khandjian EW: **The fragile X mental retardation protein is associated with poly(A)⁺ mRNA in actively translating polyribosomes**. *Human Molecular Genetics* 1997, **6**:1465-1472.

11. Khandjian EW, Corbin F, Woerly S, Rousseau F: **The fragile X mental retardation protein is associated with ribosomes.** *Nature Genetics* 1996, **12**:91-93.
12. Feng Y, Absher D, Eberhart DE, Brown V, Malter HE, Warren ST: **FMRP associates with polyribosomes as an mRNP, and the I304N mutation of severe fragile X syndrome abolishes this association.** *MolCell* 1997, **1**:109-118.
13. Lagerbauer B, Ostareck D, Keidel E-M, Ostareck-Lederer A, Fischer U: **Evidence that fragile X mental retardation protein is a negative regulator of translation.** *HumMolGenet* 2001, **10**:329-338.
14. Li Z, Zhang Y, Ku L, Wilkinson KD, Warren ST, Feng Y: **The fragile X mental retardation protein inhibits translation via interacting with mRNA.** *Nucleic Acids Research* 2001, **29**(11):2276-2283.
15. Schaeffer C, Bardoni B, Mandel JL, Ehresmann B, Ehresmann C, Moine H: **The Fragile X mental retardation protein interacts specifically with its own mRNA via a purine-quartet structure.** *EMBO J* 2001, **20**:4803-4813.
16. Sung Y-J, Conti J, Currie JR, Denman RB: **RNAs that interact with the fragile-X syndrome RNA binding protein FMRP.** *BBRC* 2000, **275**:973-980.
17. Darnell JC, Jensen KB, Jin P, Brown V, Warren ST, Darnell RB: **Fragile X Mental Retardation Protein targets G quartet mRNAs important for neuronal function.** *Cell* 2001, **107**:1-11.
18. Siomi MC, Higashijima K, Ishizuka A, Siomi H: **Casein Kinase II phosphorylates the fragile X mental retardation protein and modulates its biological properties.** *Mol Cell Biol* 2002, **22**:8438-8447.
19. Ceman S, O'Donnell WT, Reed M, Patton S, Pohl J, Warren ST: **Phosphorylation influences the translation state of FMRP-associated polyribosomes.** *Hum Mol Genet* 2003, **12**(24):3295-3305.
20. Castets M, Schaeffer C, Khandjian EW, Schenck A, Luche S, Bechara E, Moine H, Rabilloud T, Mandel JL, Bardoni B: **FMRP interferes with Rac1 pathway and controls actin cytoskeleton dynamics in mouse fibroblasts.** *Human Molecular Genetics* 2004.
21. Mazroui R, Huot ME, Tremblay S, Boilard N, Labelle Y, Khandjian EW: **Fragile X Mental Retardation protein determinants required for its association with polyribosomal mRNPs.** *Hum Mol Genet* 2003, **12**(23):3087-3096.
22. Sittler A, Devys D, Weber C, Mandel JL: **Alternative splicing of exon 14 determines nuclear or cytoplasmic localisation of fmr1 protein isoforms.** *Human Molecular Genetics* 1996, **5**:95-102.

23. Carr SA, Huddleston MJ, Annan RS: **Selective detection and sequencing of phosphopeptides at the femtomole level by mass spectrometry.** *Anal Biochem* 1996, **239**(2):180-192.
24. Mazroui R, Huot ME, Tremblay S, Filion C, Labelle Y, Khandjian EW: **Trapping of messenger RNA by Fragile X Mental Retardation protein into cytoplasmic granules induces translation repression.** *Hum Mol Genet* 2002, **11**(24):3007-3017.
25. Eberhart DE, Malter HE, Feng Y, Warren ST: **The Fragile X mental retardation protein is a ribonucleoprotein containing both nuclear localization and nuclear export signals.** *Human Molecular Genetics* 1996, **5**:1083-1091.
26. Feng Y, Gutekunst CA, Eberhart DE, Yi H, Warren ST, Hersch SM: **Fragile X mental retardation protein: nucleocytoplasmic shuttling and association with somatodendritic ribosomes.** *Journal of Neuroscience* 1997, **17**:1539-1547.
27. Bardoni B, Sittler A, Shen Y, Mandel JL: **Analysis of domains affecting intracellular localization of the FMRP protein.** *Neurobiology of Disease* 1997, **4**:329-336.
28. Tamanini F, Bontekoe C, Bakker CE, van Unen L, Anar B, Willemsen R, Yoshida M, Galjiaard H, Oostra BA, Hoogeveen AT: **Different targets for the fragile X related proteins revealed by distinct nuclear localization.** *Hum Mol Genet* 1999, **8**:863-869.
29. Klumpp S, Maurer A, Zhu Y, Aichele D, Pinna LA, Kriegstein J: **Protein kinase CK2 phosphorylates BAD at threonine-117.** *Neurochem Int* 2004, **45**(5):747-752.
30. Ulloa L, Dombradi V, Diaz-Nido J, Szucs K, Gergely P, Friedrich P, Avila J: **Dephosphorylation of distinct sites on microtubule-associated protein MAP1B by protein phosphatases 1, 2A and 2B.** *FEBS Lett* 1993, **330**(1):85-89.
31. Wang Y, Guo W, Liang L, Esselman WJ: **Phosphorylation of CD45 by casein kinase 2. Modulation of activity and mutational analysis.** *J Biol Chem* 1999, **274**(11):7454-7461.
32. Fernandez JJ, Candenas ML, Souto ML, Trujillo MM, Norte M: **Okadaic acid, useful tool for studying cellular processes.** *Curr Med Chem* 2002, **9**(2):229-262.
33. Jaramillo-Babb VL, Sugarman JL, Scavetta R, Wang SJ, Berndt N, Born TL, Glass CK, Schonthal AH: **Positive regulation of cdc2 gene activity by protein phosphatase type 2A.** *J Biol Chem* 1996, **271**(11):5988-5992.
34. Favre B, Turowski P, Hemmings BA: **Differential inhibition and posttranslational modification of protein phosphatase 1 and 2A in MCF7 cells treated with calyculin-A, okadaic acid, and tautomycin.** *J Biol Chem* 1997, **272**(21):13856-13863.
35. Baharians Z, Schönthal AH: **Autoregulation of Protein Phosphatase type 2A expression.** *J Biol Chem* 1998, **273**:19019-19024.

DISCUSSION et PERSPECTIVES

I. Identification et caractérisation de 82-FIP

1) 82-FIP, un nouvel interacteur de FMRP impliqué dans le métabolisme de l'ARN ?

Quoique dépourvue de domaine de liaison connu, nous avons montré que 82-FIP peut se lier à l'ARN *in vitro*. D'autre part, 82-FIP est vraisemblablement associée aux polysomes dans le cytoplasme et fait partie de complexes ribonucléoprotéiques (RNP) contenant FMRP. Des expériences complémentaires sont requises pour vérifier que ces interactions ont bien lieu *in vivo*, mais l'ensemble de ces données suggère que 82-FIP soit impliquée dans un ou plusieurs aspects du métabolisme de l'ARN.

1.1) Rôle nucléaire de 82-FIP ?

La synthèse, l'épissage, les modifications chimiques des bases et la maturation des ARN ont lieu dans différents sites du noyau. La localisation nucléaire de 82-FIP dans certains types cellulaires et/ou à des phases précises du cycle cellulaire suggère qu'elle puisse intervenir dans l'un de ces processus. Cette hypothèse est renforcée par son organisation sous forme de corps nucléaires. La plupart des corps nucléaires sont, en effet, impliqués dans l'une ou l'autre des étapes du métabolisme de l'ARN se déroulant dans le noyau (voir (Spector 2001) pour revue).

La composition biochimique et le rôle de certaines de ces structures ont été déterminés de manière plus ou moins précise (Spector 2001; Andersen, Lyon et al. 2002).

Le nucléole est un compartiment nucléaire de 0,5 à 1 μm de diamètre. Il est le siège de la transcription et de la maturation des ARN ribosomiques (ARNr) et de l'assemblage des sous-unités ribosomiques (Hernandez-Verdun, Roussel et al. 2002; Koberna, Malinsky et al. 2002). L'isoforme 12 de FMRP, dépourvue de l'exon 14 et du NES qu'il code, est localisée autour des nucléoles ((Willemsen, Bontekoe et al. 1996; Bardoni and Mandel 2002) et voir Publication n°5). L'inhibition de l'export nucléaire par traitement à la leptomycine B a permis de montrer que FXR2P et certaines isoformes de FXR1P transitent également par les nucléoles (Tamanini, Bontekoe et al. 1999; Tamanini, Kirkpatrick et al. 2000). Les agrégats contenant 82-FIP semblent, en revanche, localisés à proximité mais à l'extérieur des nucléoles, repérés à l'aide du marquage au Hoechst (cf. Figure 30). Cette observation devra

néanmoins être vérifiée, en comparant la localisation de 82-FIP avec celle de l'isoforme 12 de FMRP ou avec celle d'une protéine nucléolaire, telle que la protéine B23 (Shaw and Jordan 1995).

Le couplage entre la transcription et la maturation des ARN pré-messagers (ARNpm) est assuré par la concentration de petits ARN (snARN) et de protéines nécessaires à l'épissage au niveau de domaines particuliers, les «speckles». Chaque noyau comporte entre 25 et 50 «speckles», dont la plupart forment les IGC (Interchromatine Granule Clusters), associés à l'euchromatine au niveau des sites de transcription. L'absence de colocalisation entre 82-FIP et le facteur d'épissage SC-35, localisé dans les «speckles» (Spector, Fu et al. 1991), rend cependant peu probable la coïncidence entre ces structures et celles contenant 82-FIP.

De même, aucune colocalisation n'a été observée entre 82-FIP et la protéine SMN dans les neurones corticaux de souris. 82-FIP ne ferait donc pas partie des corps de Cajal, impliqués dans la biogenèse et le trafic des snRNP (small nuclear RiboNucleoParticle). Cependant, SMN n'est pas exclusivement localisée dans les corps de Cajal. Elle est également associée à un autre type de structure, les Gems (Gemini of Cajal bodies), impliqués dans la biogenèse des snRNP et confondus avec les corps de Cajal dans la majorité des cellules (Liu and Dreyfuss 1996; Matera and Frey 1998; Carvalho, Almeida et al. 1999). Des observations prouvent que les Gems peuvent cependant être distincts des corps de Cajal (Matera and Frey 1998; Carvalho, Almeida et al. 1999; Young, Le et al. 2000). Afin d'exclure définitivement l'hypothèse d'une association entre ces derniers et les corpuscules contenant 82-FIP, la localisation de 82-FIP devra donc être étudiée par rapport à celle de la coiline, située exclusivement dans les corps de Cajal (Andrade, Chan et al. 1991; Raska, Andrade et al. 1991).

Le noyau comporte également entre 1 et 3 domaines OPT (Oct1/PTF/Transcription), situés à proximité du nucléole. Ces corps nucléaires ont un diamètre compris entre 1 et 1,5 μm de diamètre. La plupart des protéines contenues dans les domaines OPT sont des facteurs de transcription, mais certaines pourraient également intervenir dans la maturation des ARN (Pombo, Cuello et al. 1998). La morphologie et la localisation de ces corps nucléaires sont similaires à celles des structures contenant 82-FIP ; ceci justifierait l'étude d'une éventuelle colocalisation entre 82-FIP et le facteur de transcription Oct1, localisé au niveau de ces corpuscules.

Le compartiment périnucléolaire et le corps nucléaire SAM68 sont des structures uniques, de diamètre compris entre 0,25 et 1 μm , localisées à la surface du nucléole (Huang 2000). Elles contiennent de nombreuses protéines se liant aux ARN : 82-FIP pourrait donc également être associée à ces compartiments. Cependant, ces deux types de corps nucléaires ont principalement été observés dans des lignées de cellules cancéreuses et rarement dans des lignées primaires. Leur présence au sein de noyaux de neurones corticaux de souris est donc peu probable.

Enfin, le noyau contient des corps PML (ProMyelocytic Leukemia) et des corps de clivage. Entre 10 et 30 corps PML, de diamètre compris entre 0,3 et 1 μm , sont présents dans le noyau de chaque cellule et sont impliqués dans la régulation de la transcription (Maul, Negorev et al. 2000). Les corps de clivage, de diamètre équivalent, sont les sites de clivage et de polyadénylation des ARNm. Cependant, la morphologie de ces deux types de structures est relativement différente de celles contenant 82-FIP.

L'identification des corps nucléaires contenant 82-FIP permettrait de mieux cerner le rôle éventuel de cette protéine dans le noyau. En outre, cette analyse pourrait fournir des pistes permettant de comprendre la raison pour laquelle 82-FIP est concentrée au niveau de corps nucléaires dans certaines cellules seulement.

1.2) Rôle cytoplasmique de 82-FIP ?

Le rôle des protéines associées aux ARN a récemment été modélisé (Dreyfuss, Kim et al. 2002). Selon ce modèle, les ARN contiennent des séquences particulières, jouant le rôle d'étiquettes et permettant leur adressage dans des compartiments nucléaires spécifiques. Ces étiquettes sont reconnues par une ou plusieurs protéines particulières : le devenir des ARN serait alors influencé par la nature des protéines associées et ne dépendrait plus directement de leur identité (Dreyfuss, Kim et al. 2002). Ce modèle s'applique notamment au cas des jonctions entre exons (EJC pour Exons Junction Complex) : des protéines sont recrutées à la jonction entre deux exons suite à l'épissage des ARNm. La maturation, le transport, la localisation, la traduction et la stabilité des ARNm dépendraient alors de la reconnaissance et des interactions établies par ces protéines. Les conséquences d'une interaction éventuelle entre 82-FIP et certains ARN dans le noyau pourraient donc s'exercer jusque dans le cytoplasme.

De plus, 82-FIP est essentiellement cytoplasmique dans certaines cellules, et/ou selon la phase du cycle cellulaire, et elle est associée aux polysomes. Ces données suggèrent que 82-FIP puisse également avoir un rôle dans le métabolisme des ARN directement au niveau cytoplasmique, notamment dans la régulation de la traduction. Des expériences complémentaires de traduction *in vitro*, analogues à celles développées par Lagerbauer *et al* pour FMRP (Lagerbauer, Ostareck et al. 2001), sont requises pour déterminer le rôle effectif de 82-FIP dans ce processus.

1.3) Changement de localisation subcellulaire et modulation du rôle de 82-FIP ?

La localisation subcellulaire de 82-FIP semble influencée par différents stimuli. En effet, l'entrée dans le cycle cellulaire déclenche l'export de 82-FIP et sa relocalisation au niveau du cytoplasme. De même, l'activation de la voie Rac1, par traitement de fibroblastes au PDGF, induit le recrutement de 82-FIP au niveau des sites de restructuration du cytosquelette d'actine.

Ces deux mécanismes de contrôle de la localisation subcellulaire de 82-FIP ne permettent vraisemblablement pas d'expliquer les différences observées entre neurones dans le cerveau. Un troisième type de régulation pourrait donc être à l'origine de cette distribution différentielle. A ce titre, il pourrait notamment être intéressant de déterminer l'influence de stimulations électriques et/ou chimiques des neurones de différents territoires du cerveau sur la répartition subcellulaire de 82-FIP.

Ces changements de localisations suggèrent, en tous les cas, que la protéine puisse fonctionner de manière régulée, et contrôler par exemple l'export et/ou la traduction et/ou la localisation d'ARN différents en réponse à certains stimuli.

2) 82-FIP et le cycle cellulaire : rôle actif ou relocalisation passive ?

2.1) Rôle de 82-FIP dans la régulation du cycle cellulaire

L'entrée dans le cycle cellulaire suffit à déclencher la relocalisation de 82-FIP dans le cytoplasme, dans plusieurs lignées cellulaires. Réciproquement, la sortie du cycle suffit à induire son import dans le noyau.

Deux hypothèses peuvent être émises pour expliquer ces relocalisations :

- 82-FIP ne joue aucun rôle direct dans la transition entre les différentes phases du cycle cellulaire. Sa localisation différentielle au cours du cycle cellulaire sert uniquement à adapter le métabolisme de certains ARN à la physiologie cellulaire.
- 82-FIP joue un rôle actif dans le cycle cellulaire, ou, en d'autres termes, cette protéine est impliquée dans la régulation d'évènements modulant la transition entre les différentes phases du cycle.

La création de lignées cellulaires invalidées pour le gène *82-fip*, ou surexprimant au contraire la protéine, permettrait de déterminer l'influence de 82-FIP sur la progression des cellules dans le cycle.

Une meilleure compréhension des mécanismes régulant la localisation subcellulaire de 82-FIP permettrait certainement d'appréhender les différences existant entre les neurones du cerveau et d'approcher son rôle cellulaire.

2.2) Implication de Rac1 dans la relocalisation de 82-FIP au cours du cycle cellulaire ?

En réponse à l'activation des récepteurs T, Rac1 stimule l'entrée des lymphocytes T en quiescence dans le cycle cellulaire, via induction de la voie des MAP kinases et stimulation de l'expression d'une cytokine, l'interleukine-2 (voir (Etienne-Manneville and Hall 2002) pour revue).

Des travaux ultérieurs ont confirmé l'implication de RhoA, Rac1 et Cdc42 dans la régulation du cycle cellulaire dans d'autres types cellulaires : l'expression de l'une ou l'autre des Rho GTPases, sous forme constitutivement active, induit l'entrée des cellules en G1 et la progression en phase S de fibroblastes en quiescence (voir (Etienne-Manneville and Hall 2002) pour revue). Réciproquement, l'expression de mutants dominants négatifs empêche la progression du cycle cellulaire induite par ajout de sérum dans le milieu de culture. Rac1 exercerait son effet sur le cycle en régulant, de manière indirecte, la traduction de l'ARNm codant la Cycline D1.

Nous avons montré que 82-FIP est exportée hors du noyau, jusqu'aux zones de restructuration du cytosquelette d'actine, en réponse à l'activation de Rac1 par traitement de

fibroblastes en quiescence au PDGF. La relocalisation de 82-FIP entre les phases G1 et G2/S pourraient donc également dépendre de l'activation de la voie Rac1 lors de cette transition.

3) Signification fonctionnelle de l'interaction entre 82-FIP et FMRP ?

La signification fonctionnelle de l'interaction entre FMRP et 82-FIP reste indéterminée.

Cependant, la mise en évidence des changements de localisation subcellulaire de 82-FIP au cours du cycle cellulaire suggère que l'interaction entre les deux protéines est transitoire : 82-FIP pourrait alors cibler certains ARN dans les complexes RNP contenant FMRP uniquement à certaines phases du cycle.

Une autre hypothèse consiste à envisager que 82-FIP puisse moduler l'association de FMRP à certains ARNm cibles. L'étude des modifications éventuelles de l'affinité de FMRP pour certains ARN, induites par ajout de 82-FIP, n'a pas encore abouti, en raison des difficultés rencontrées pour purifier 82-FIP.

II. Connexion FMRP-Rac1

1) Identification de cibles putatives de FMRP

1.1) PP2A, une phosphatase régulée par et régulant FMRP ?

a) PP2A, une cible directe de FMRP ?

FMRP se lie *in vitro* à l'ARNm codant la PP2Ac β , avec une affinité similaire à celle existant pour son propre ARNm.

In vitro, FMRP s'associe à son propre ARNm mais aussi, avec une affinité plus faible, à la séquence anti-sens correspondante ; cet exemple illustre le fait que FMRP peut s'associer de manière aspécifique à l'ARN (Siomi, Siomi et al. 1993; Schaeffer, Bardoni et al. 2001). L'analyse de l'interaction entre FMRP et l'ARNm de la PP2Ac β dans le cadre d'une compétition avec l'ARNm *FMRI* permet cependant de garantir que l'interaction entre FMRP et l'ARNm de la PP2Ac β est de nature spécifique. Des expériences complémentaires

d'immunoprécipitation sont cependant requises, afin de vérifier l'occurrence de cette interaction *in vivo*.

Nous avons montré que la partie 5'UTR de l'ARNm de la PP2Ac β comporte quatre séquences susceptibles de former des structures tridimensionnelles en G-quartet. La formation effective de ces structures devra être précisée, en déterminant par exemple l'accessibilité de l'azote n°7 des guanines au diméthylsulfate (DMS), en présence de KCl et de NaCl. Si une structure en G-quartet se forme en présence d'ions K⁺, l'accessibilité de cet atome aux modifications induites par le DMS, observées en présence d'ions Na⁺, disparaît, du fait de son engagement dans une liaison hydrogène (Schaeffer, Bardoni et al. 2001). L'abolition par mutagenèse de la totalité de ces structures, puis de chacune successivement, permettra par ailleurs de confirmer leur rôle global et particulier dans la formation du complexe FMRP-ARNm *pp2Ac β* .

La démonstration de l'association entre FMRP et l'ARNm de la PP2Ac β , d'une part, et de la modification du niveau d'expression de la PP2Ac dans les fibroblastes FMR1⁻, FMR1^{KH1}, et FMR1^{KH2}, d'autre part, suggère fortement que FMRP régule la traduction de l'enzyme de manière directe. Cependant, l'établissement d'une relation de cause à effet entre ces deux événements doit être confirmée. Des expériences préliminaires d'inhibition de la traduction de l'ARNm de la PP2Ac β , dans des extraits de réticulocytes, par ajout de dose croissante de FMRP ont été entreprises dans ce but. Cependant, l'absence de synthèse de l'enzyme en conditions basales ne nous a pas permis d'étudier l'effet de FMRP. Cette analyse devra être reconduite en vérifiant notamment le niveau basal d'expression de FMRP dans les extraits de réticulocytes et en utilisant, le cas échéant, le système de traduction *in vitro* établi à partir de germes de blé, dans lequel l'absence de FMRP est certaine (TnT[®] Coupled Wheat Germ Extract Systems, Promega). La comparaison du niveau d'expression du gène de la luciférase, cloné en aval de la partie 5'UTR de l'ARNm de la PP2Ac β , dans les fibroblastes FMR1⁺ et FMR1⁻, devrait également permettre de déterminer si cette région est suffisante pour déclencher l'inhibition de la traduction d'un ARNm par FMRP.

b) Validité fonctionnelle du modèle proposé ?

L'inhibition de l'activité de la PP2A par traitements chimiques et la mise en évidence d'une interaction physique possible entre les deux protéines ont permis de conclure que la PP2A peut déphosphoryler la P-Cofiline *in vitro* et *in vivo* (Ambach, Saunus et al. 2000;

Samstag and Nebl 2003). Nous avons donc proposé que l'augmentation du taux de l'enzyme en absence de FMRP fonctionnelle puisse expliquer la diminution du taux de P-Cofiline observée dans les mêmes conditions.

Cependant, des travaux récents réalisés chez la drosophile ont conduit à l'identification d'une famille de phosphatases, qui semblent jouer un rôle majeur dans la déphosphorylation de la P-Cofiline (Niwa, Nagata-Ohashi et al. 2002).

La morphologie des poils et des soies présents à la surface des appendices de drosophile dépend de l'établissement d'un réseau correct de cytosquelette d'actine (Overton 1967; Tilney, Connelly et al. 2000; Tilney, Connelly et al. 2000; Tilney, Connelly et al. 2003; Tilney, Connelly et al. 2004; Tilney and DeRosier 2005). L'existence de malformations au niveau de ces structures a permis d'identifier des gènes codant des protéines impliquées dans la réorganisation des filaments d'actine, tels que les gènes *twinstar* et *chickadee* respectivement orthologues des gènes codant la Cofiline et la Profiline chez les Mammifères (Cooley, Verheyen et al. 1992; Edwards, Montague et al. 1994; Verheyen and Cooley 1994; Gunsalus, Bonaccorsi et al. 1995).

L'analyse de défauts similaires a récemment conduit à l'identification de la phosphatase Slingshot (Niwa, Nagata-Ohashi et al. 2002). L'absence de cette phosphatase, sous sa forme fonctionnelle, s'accompagne d'une augmentation drastique du taux de polymérisation de l'actine et du niveau de phosphorylation de la Cofiline (Niwa, Nagata-Ohashi et al. 2002). Trois enzymes Slingshot ont été identifiées chez l'Homme, Slingshot 1, 2 et 3 (SSH-1, -2 et -3) (Ohta, Kousaka et al. 2003).

Différents travaux ont permis de montrer que les phosphatases SSH déphosphorylent la P-Cofiline de manière efficace *in vitro* et *in vivo* (Niwa, Nagata-Ohashi et al. 2002; Endo, Ohashi et al. 2003; Ohta, Kousaka et al. 2003). De plus, l'expression de ces phosphatases supprime la réorganisation du cytosquelette d'actine induite par surexpression de la LIMK1, une des kinases responsables de la phosphorylation de la Cofiline (Niwa, Nagata-Ohashi et al. 2002). L'expression de la forme constitutivement active de Rac1 dans des cellules d'ostéosarcomes induit la colocalisation de la LIMK1 et de SSH-1 au niveau de bandes d'actines dans les lamellipodes (Soosairajah, Maiti et al. 2005). Enfin, SSH-1 interagit directement avec la LIMK1 et peut l'inactiver en la déphosphorylant, *in vitro* (Soosairajah, Maiti et al. 2005). L'ensemble de ces données suggère que les phosphatases Slingshot soient

les principales phosphatases de la P-Cofiline et qu'elles s'opposent à l'action de la LIMK1 de manière précise, régulée et coordonnée.

Un tel niveau de coordination entre l'activité de la LIMK1 et celle de la PP2A est peu réaliste, compte tenu du niveau d'expression élevé de l'enzyme dans les cellules et de la diversité de ses substrats. Cependant, l'existence de phosphatases spécifiquement responsables de la déphosphorylation de la Cofiline n'exclut pas que d'autres phosphatases, telles que la PP2A, puissent également réduire le niveau basal de phosphorylation de la Cofiline. Le niveau d'expression des protéines Slingshot devra néanmoins être comparé dans les fibroblastes FMR1⁺, FMR1^{KH1}, FMR1^{KH2}, et FMR1⁻, afin de déterminer si l'expression de ces enzymes est modifiée en absence de FMRP fonctionnelle. Par ailleurs, si notre hypothèse est exacte, l'inhibition de la PP2A par traitement chimique, et/ou réduction de son niveau d'expression par ARN interférence, devrait permettre de restaurer le taux de P-Cofiline dans les fibroblastes FMR1⁻, et pourrait ainsi confirmer, ou infirmer, l'existence d'une relation de cause à effet entre l'augmentation de l'expression de cette enzyme et la diminution du taux de P-Cofiline observées dans ces cellules.

c) Autres conséquences liées à l'augmentation du taux de PP2Ac en absence de FMRP ?

La PP2A est une sérine-thréonine phosphatase majeure, impliquée dans de nombreux processus cellulaires (voir (Goldberg 1999; Janssens and Goris 2001; Lechward, Awotunde et al. 2001) pour revues).

La PP2A est impliquée dans la régulation du cycle cellulaire, puisqu'elle inhibe notamment, jusqu'à la fin de la phase G2, le facteur inducteur de mitose MPF (Mitosis Promoting Factor), constitué par l'association de la cycline B et de la kinase p34^{Cdc42}. La PP2A module également l'activité de nombreuses kinases, parmi lesquelles la CaMKII, la PKA, la PKC ou les kinases ERK. Elle intervient de ce fait dans de nombreuses voies de signalisation, dont celle des MAP kinases. La PP2A déphosphoryle également les protéines Tau, MAP1B et MAP2 et régule donc la stabilité des microtubules.

L'augmentation du niveau d'expression de la PP2Ac dans les cellules FMR1⁻ pourrait donc avoir des conséquences en dehors de la modification éventuelle du niveau de phosphorylation de la Cofiline. Des données préliminaires suggèrent notamment que le taux de phosphorylation du facteur CREB, également substrat de la PP2A (Wadzinski, Wheat et al.

1993), soit réduit dans les fibroblastes FMR1⁻. De même, si les spots additionnels observés par EBD dans les fibroblastes FMR1⁺ correspondent effectivement à différents niveaux de phosphorylation de la vimentine, leur disparition dans les cellules FMR1⁻ peut être expliquée par l'augmentation de l'expression de la PP2Ac : cette enzyme déphosphoryle en effet la vimentine et favorise, par là même, l'assemblage des filaments intermédiaires (Turowski, Myles et al. 1999).

Cependant, nous n'avons analysé que le niveau d'expression des sous-unités catalytiques de la PP2A. Or, l'activité des sous-unités catalytiques dépend grandement de la nature des sous-unités régulatrices qui leur sont associées. La PP2A est en effet un dimère composé d'une sous-unité catalytique, α ou β , associée à la sous-unité structurale A. L'activité de cette enzyme et l'affinité pour certains substrats sont influencées par l'association d'un troisième type de sous-unité, dite régulatrice, parmi les 16 (réparties en 4 familles) possibles (voir (Janssens and Goris 2001) pour revue). Ainsi, la déphosphorylation de la vimentine dépend de l'association de la sous-unité régulatrice B β (Turowski, Myles et al. 1999). Un niveau de régulation supplémentaire est ajouté par la localisation spécifique de ces sous-unités régulatrices, aux échelles cellulaire et subcellulaire. Ainsi, la sous-unité B α est ubiquitaire, alors que la sous-unité B β est particulièrement abondante dans le cerveau (voir (Janssens and Goris 2001) pour revue). A l'échelle subcellulaire, la sous-unité B α est principalement localisée dans le noyau et au niveau du corps cellulaire des cellules de Purkinje ; la sous-unité B β est absente du noyau mais elle est en revanche répartie le long des dendrites (voir (Janssens and Goris 2001) pour revue).

Ces différents niveaux de régulation pourraient donc restreindre l'effet dû à la seule augmentation de la sous-unité catalytique, à certains substrats et/ou compartiments cellulaires et/ou types cellulaires.

d) Existence d'une boucle de régulation entre la PP2A et FMRP ?

Les résultats présentés dans la Publication 3 indiquent que la traduction de la PP2A est vraisemblablement régulée par FMRP. Ceux exposés dans le Manuscrit 4, en préparation, suggèrent que la PP2A puisse en retour modifier l'activité de FMRP en la déphosphorylant. Entre 1 et 2% de la quantité globale de la PP2A est associée aux polysomes, via interaction avec le facteur de terminaison eRF1 (eukaryotic Release Factor 1) (Andjelkovic,

Zolnierowicz et al. 1996). La PP2a pourrait donc moduler l'activité de FMRP, localement et directement au niveau des sites de synthèse protéique.

Les résultats exposés dans le Manuscrit 4 doivent cependant être complétés. Des expériences de marquage au ^{32}P de protéines FMRP purifiées, incubées dans des extraits de cellules pré-traitées ou non à l'acide okadaïque, ou réalisées en présence et en absence de la PP2A, sont en cours au sein du laboratoire. Ces tests devraient permettre de confirmer que les modifications observées sur gel d'EBD correspondent effectivement à des événements de phosphorylation. Les mutants phosphomimétique (Ser499Asp) et non-phosphorylables (Ser499Ala), décrits par Ceman *et al* (Ceman, O'Donnell et al. 2003), seront également transfectés dans des cellules Cos-7 et leur profil de migration, avant et après traitement à l'acide okadaïque, sera comparé à celui obtenu pour la protéine sauvage, sur gel d'EBD et par western blot.

Enfin, des anticorps polyclonaux dirigés contre la (ou les) forme(s) phosphorylée(s) de FMRP sont en cours de caractérisation. Ces anticorps devraient permettre de préciser la signification physiologique des cycles de phosphorylation/déphosphorylation de FMRP, dont le rôle reste mal défini. Ces anticorps permettront notamment de déterminer le niveau basal de phosphorylation de FMRP dans les cellules, de préciser la répartition des formes phosphorylées et non phosphorylées de la protéine au niveau des polysomes, ou encore d'étudier l'effet de stimuli, tels qu'une induction de la voie Rac1, sur le degré de phosphorylation de la protéine.

2) Implication de FMRP dans la régulation du stress oxydatif ?

La comparaison par EBD des protéomes de fibroblastes FMR1⁺ et FMR1⁻ a conduit à l'identification de plusieurs spots additionnels dans les cellules FMR1⁺, correspondant à des protéines impliquées dans la régulation du stress oxydatif.

L'une des protéines identifiée par spectrométrie de masse est la peroxyrédoxine 2. Cette enzyme fait partie de la famille des peroxydases, qui constitue entre 0,2 et 0,8% des protéines solubles dans les cellules. Ces protéines ont une action antioxydante, puisqu'elles catalysent la transformation du peroxyde d'hydrogène en eau.

Lors du criblage sur macropuces réalisé par Miyashiro *et al* (Miyashiro, Beckel-Mitchener et al. 2003), l'ARNm codant la Superoxyde dismutase 1 (SOD1) a été proposé

comme cible putative de FMRP. La SOD1 est une enzyme également impliquée dans l'élimination de radicaux libres, puisqu'elle catalyse la transformation de l'anion superoxyde O_2^- en peroxyde d'hydrogène.

Des travaux actuellement en cours, réalisés par E. Bechara au sein de l'équipe du Dr. Barbara Bardoni (Faculté de Médecine de Nice), ont permis de confirmer l'existence d'une association spécifique entre l'ARNm codant la SOD1 et FMRP, et ont précisé la localisation de la séquence reconnue par FMRP. De manière intéressante, cette séquence ne possède ni les propriétés d'une structure en G-quartet, ni celles du kissing-complex; elle pourrait donc constituer un autre type de site reconnu par FMRP. Les résultats obtenus indiquent également que le niveau d'expression de la protéine SOD1 est diminué dans les fibroblastes FMR1⁻ et dans des extraits totaux d'embryons de souris. Ces données suggèrent que FMRP régule la stabilité et/ou la traduction de la SOD1. L'ARNm de la peroxyrédoxine n'est pas reconnu par FMRP, ce qui suggère que la différence de niveau d'expression observée entre les cellules FMR1⁺ et FMR1⁻ ne soit pas directement due à une régulation de la traduction de cet ARNm par FMRP; ces variations pourraient être la conséquence indirecte de différences concernant l'importance et/ou la gestion du stress oxydatif en absence de FMRP.

Concernant ce point précis, se pose la question de la signification fonctionnelle du contrôle de la traduction de l'ARNm codant la SOD1 par FMRP, ainsi que celle des différences quantitatives observées pour plusieurs enzymes impliquées dans l'élimination des espèces oxygénées réactives (EOR).

La diminution du niveau d'expression d'enzymes impliquées dans l'élimination d'EOR en absence de FMRP pourrait conduire à l'apparition d'un stress oxydatif. Les pathologies associées à une augmentation de la production ou à une accumulation des EOR dans les cellules sont, en général, de type évolutives: l'augmentation du niveau de stress oxydatif au niveau cérébral se manifeste notamment par une dégénérescence progressive (Andersen 2004). Or, ce type d'évolution ne correspond pas à la pathologie du syndrome de l'X fragile.

Une autre hypothèse repose sur l'identification des EOR en tant que seconds messagers. Les EOR sont notamment des effecteurs de la voie Rac1: en effet, Rac1 déclenche la production de radicaux libres en activant le complexe NADPH oxydase (Freeman, Abo et al. 1996; Joneson and Bar-Sagi 1998; Werner 2004). Dans les macrophages, la production de ces EOR intervient dans la destruction des microorganismes phagocytés (Werner 2004). Dans d'autres types cellulaires, ces EOR sont impliquées dans la transduction de signaux. Ainsi, le

traitement de cultures de cellules PC-12 au NGF induit la production d'EOR ; cette production dépend de la voie de signalisation Rac1, puisqu'elle est inhibée par expression simultanée de la forme dominante négative de Rac1 (Suzukawa, Miura et al. 2000). Lorsque Rac1 est activée, ces EOR inhibent l'activité de RhoA et permettent ainsi la coordination de l'effet des Rho GTPases sur la réorganisation du cytosquelette d'actine (Nimnual, Taylor et al. 2003).

L'activation de la traduction de la SOD1 par FMRP pourrait donc moduler l'action de la voie Rac1, en augmentant l'élimination des EOR produits lors de l'activation de la Rho GTPase. Pour tester cette hypothèse, il serait intéressant de comparer la production d'EOR dans les cellules FMR1⁺ et FMR1⁻, avant et après activation de la voie Rac1.

3) Rac1, un modulateur de l'activité de FMRP (et de ses interacteurs) ?

3.1) Modulation de la composition des complexes RNP contenant FMRP

L'activation de Rac1 induit la relocalisation des protéines 82-FIP, NUFIP, FXR1P et CYFIP1 au niveau des sites de polymérisation de l'actine. En revanche, nous n'avons pas détecté FMRP dans ces structures. La localisation différente de FMRP et de ses interacteurs suggère que la composition des complexes RNP contenant FMRP puisse varier en réponse à différents stimuli.

Cette hypothèse a déjà été évoquée au paragraphe I.3, en relation avec la localisation nucléaire de 82-FIP en G0 ; elle pourrait donc s'appliquer également lors de l'activation de la voie Rac1. L'analyse, par immunoprécipitation ou chromatographie en phase liquide, de la composition du ou des complexe(s) contenant FMRP, et des conséquences d'éventuelles modifications sur l'interaction avec des cibles ARNm particulières, permettra de déterminer si Rac1 exerce effectivement une influence sur FMRP, comme le suggéraient les résultats de tests d'interactions génétiques obtenus chez la drosophile (Schenck, Bardoni et al. 2003).

Cependant, seule une partie des protéines 82-FIP, NUFIP, FXR1P et CYFIP1 est relocalisée lors de l'activation de Rac1. L'effet de la Rho GTPase sur la composition des complexes contenant FMRP ne sera donc vraisemblablement pas de type « tout ou rien », mais Rac1 pourrait plutôt moduler l'interaction entre les différents partenaires au niveau local.

La composition des complexes contenant FMRP pourrait donc évoluer de manière dynamique, à la fois dans l'espace et dans le temps.

Cette hypothèse s'applique tout particulièrement au cas des protéines CYFIP1 et CYFIP2. CYFIP1 interagit avec Rac1, uniquement lorsque la Rho GTPase est sous forme activée (Kobayashi, Kuroda et al. 1998). En outre, CYFIP2 fait partie du complexe WAVE, relocalisé de manière dynamique au niveau du bord avant des lamellipodes lorsque Rac1 est activée (Eden, Rohatgi et al. 2002; Steffen, Rottner et al. 2004). Enfin, dCYFIP, l'orthologue de CYFIP1 et de CYFIP2 chez la drosophile, pourrait inhiber l'activité de FMRP tant que Rac1 est inactive. L'ensemble de ces données suggère que l'interaction entre les protéines FMRP et les protéines CYFIP puisse être transitoire (tant que Rac1 n'est pas activée) mais également locale (là où Rac1 n'est pas activée).

La dynamique d'interaction entre FMRP et la protéine CYFIP1, en réponse notamment à l'activation de la voie Rac1, est en cours d'analyse par Murugan (équipe du Dr Hervé Moine, laboratoire du Pr Jean-Louis Mandel), en utilisant les techniques de FRET et de complémentation de fluorescence (Hu, Chinenov et al. 2002). En fonction des résultats obtenus et de l'efficacité des techniques, cette étude pourra être étendue à d'autres interacteurs, afin d'étudier le remodelage du (ou des) complexe(s) contenant FMRP, dans le temps et dans l'espace, en réponse à différents stimuli.

3.2) Signification fonctionnelle des relocalisations induites par Rac1

a) Au bord avant des cellules

En réponse à différents stimuli, l'ARNm codant la β -actine est déplacé puis traduit localement au niveau du bord avant des lamellipodes (Lawrence and Singer 1986; Hill, Schedlich et al. 1994; Kislauskis, Zhu et al. 1997). La perturbation de la localisation précise de cet ARNm diminue la motilité cellulaire, perturbe la polarité de la cellule et déplace les sites de polymérisation de l'actine (Shestakova, Singer et al. 2001). La localisation précise de l'ARNm de l'actine dépend de la fixation de la protéine ZBP1 (Z-DNA Binding Protein 1) au niveau d'une séquence particulière de la région 3'UTR de l'ARN (Kislauskis, Li et al. 1993; Ross, Oleynikov et al. 1997). De même, une étude récente a permis de montrer que les 7 ARNm codant l'ensemble des protéines du complexe Arp2/3 sont localisés au niveau des protrusions membranaires, en réponse à la stimulation de cellules par du sérum (Mingle,

Okuhama et al. 2005). La traduction locale de l'ensemble des 7 protéines faciliterait l'assemblage du complexe et son ciblage vers des sites cellulaires précis.

Le recrutement de protéines capables de se lier à l'ARNm, telles que 82-FIP, NUFIP et FXR1P pourrait donc permettre la relocalisation précise d'ARNm nécessaires à la transduction du signal déclenché par l'activation de Rac1.

b) Autour des vésicules de macropinocytose

L'assemblage et le désassemblage des filaments d'actine induisent la modification locale de la structure de la membrane plasmique. Ces remaniements membranaires expliquent notamment la formation de vésicules de macropinocytose lors de l'activation de la voie Rac1 (Ridley, Paterson et al. 1992; Dharmawardhane, Schürmann et al. 2000).

La signification de la relocalisation des protéines FMRP et FXR1P autour de ces vésicules reste indéfinie. Des travaux de microscopie électronique sont en cours, afin de déterminer si des ribosomes sont également présents au niveau de ces sites, et pourraient de ce fait justifier le ciblage d'ARN par ces protéines vers ces vésicules.

La relocalisation de CYFIP1 autour des vésicules de macropinocytose pourrait, en revanche, s'expliquer par son rôle d'effecteur potentiel de la voie Rac1, puisqu'un autre effecteur de cette voie de signalisation, la protéine PAK1, est également présent au niveau de ces sites (Dharmawardhane, Schürmann et al. 2000).

4) Validité de la connexion FMRP/Rac1/cytosquelette d'actine dans la pathogenèse ?

4.1) Lien FMRP/PP2A/P-Cofiline : validité chez la souris ?

Une analyse comparative des taux de PP2Ac et de P-Cofiline dans différents tissus (cerveau total, cervelet, hippocampe, cortex cérébral, testicules, ovaires...) et à différents âges devra être conduite chez des souris sauvages et invalidées pour *Fmr1*, afin de déterminer si les anomalies observées dans notre système cellulaire existent également *in vivo* chez l'animal. Des résultats préliminaires indiquent que l'expression de la PP2Ac et que le ratio P-Cofiline/Cofiline pourraient effectivement être dérégulés dans le cerveau d'embryons de souris âgés de 11 jours. De plus, la comparaison de la quantité de PP2Ac dans des extraits de

synaptoneurosomes de souris *Fmr1*^{-/-} et sauvages suggère que la traduction de l'enzyme pourrait également être affectée de manière locale.

4.2) Modification de la dynamique de restructuration du cytosquelette d'actine en absence de FMRP : rôle causal dans l'apparition d'anomalies au niveau des épines dendritiques ?

La réorganisation du cytosquelette d'actine est nécessaire à la mise en place et au remodelage des épines dendritiques (Matus 2000), mais elle intervient également dans les phénomènes de plasticité synaptique. Ainsi, le maintien de la LTP dans des tranches de neurones de l'aire CA1 est inhibée par la cytochalasine D ou la latrunculine A, deux drogues bloquant l'assemblage des filaments d'actine (Krucker, Siggins et al. 2000). De même, le taux de filaments d'actine augmente dans les épines dendritiques des neurones du gyrus denté lors de la LTP et la polymérisation de ces filaments est nécessaire au maintien dans le temps de ce processus (Fukazawa, Saitoh et al. 2003).

L'importance du remodelage du cytosquelette d'actine dans les phénomènes de plasticité synaptique pourrait s'expliquer par son rôle majeur de médiateur dans les changements de forme des épines dendritiques induits par l'activité synaptique (Engert and Bonhoeffer 1999; Toni, Buchs et al. 1999; Colicos, Collins et al. 2001). Le cytosquelette d'actine serait également impliqué dans le recyclage de récepteurs au glutamate vers la membrane plasmique (Serge, Fourgeaud et al. 2003) ; son rôle dans les flux membranaires permet de penser qu'il pourrait notamment intervenir dans l'exocytose et dans l'endocytose des récepteurs AMPA, l'un des phénomènes moléculaires à la base des modifications de l'efficacité de la transmission synaptique (Carroll, Beattie et al. 2001; Sheng and Lee 2001; Schafer 2002).

La restructuration du réseau d'actine nécessaire à la persistance de la LTP dans les neurones du gyrus denté requiert également l'inactivation de la Cofiline (Fukazawa, Saitoh et al. 2003). D'autre part, l'amplitude de la LTP est augmentée dans les neurones hippocampaux des souris invalidées pour le gène codant la LIMK1, au sein desquels la teneur en P-Cofiline est réduite de plus de 50% (Meng, Zhang et al. 2002). Ces deux derniers résultats peuvent paraître contradictoires. Ils suggèrent cependant que le contrôle précis et dynamique du ratio P-Cofiline/Cofiline soit impliqué dans les phénomènes de plasticité synaptique. Par ailleurs, l'activation de la Cofiline permet le raccourcissement des épines dendritiques lors de la LTD

dans l'hippocampe (Zhou, Homma et al. 2004) et la modification du taux de P-Cofiline pourrait expliquer les anomalies morphologiques des épines dendritiques observées dans le cerveau des souris *LimK1*^{-/-}.

Le modèle moléculaire mis en évidence à partir de l'étude des fibroblastes FMR1⁺ et FMR1⁻ pourrait donc expliquer les anomalies observées au niveau des épines dendritiques, dans le cerveau des patients et dans celui des souris invalidées pour le gène *Fmr1*, mais également les dysfonctionnements synaptiques décrits dans le cadre du modèle des récepteurs au glutamate. Outre les expériences décrites au paragraphe II.4.1, l'influence de FMRP sur la dynamique de restructuration du réseau d'actine devra être déterminée *in vivo*, en suivant, par exemple, le remodelage du cytosquelette d'actine à l'aide d'actine-GFP, dans des cultures de neurones de souris sauvages et invalidées pour *Fmr1* stimulés de manière à induire les processus de LTP et de LTD.

4.3) Les protéines FXR et la régulation de la structure et de la dynamique du cytosquelette

Depuis 2001 et la mise en évidence du rôle de dFMR1 dans la régulation de la traduction de futsch/MAP1B, un nombre important de données s'accumule en faveur du rôle des protéines FXR dans la régulation de la structure et de la dynamique des cytosquelettes d'actine et de microtubule. Ces travaux sont présentés dans la Manuscrit 6, en préparation. L'implication des protéines FXR dans la régulation des réseaux de cytosquelette est susceptible d'expliquer certains symptômes majeurs associés au syndrome de l'X fragile et constitue de ce fait un modèle moléculaire de pathogenèse pertinent et à envisager dans le cadre de recherches futures.

MANUSCRIPT 5

FXR proteins and the cytoskeleton network

Marie Castets and Jean-Louis Mandel

IGBMC – Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, INSERM, CNRS, ULP, Collège de France, BP10142 – 1, rue L.Fries, 67404 Illkirch C.U. de Strasbourg, France.

Corresponding author: Pr. Jean-Louis Mandel,

Jean-Louis.MANDEL@igbmc.u-strasbg.fr

Tel: 00 33 388653210

Introduction

The cytoskeleton is a complex network of microfilaments, microtubules and intermediate filaments, respectively elaborated by assembly of actin, tubulin or fibrous proteins monomers. Contrary to its name, the cytoskeleton is not a rigid structure but is dynamically reorganized to allow cell movement, division, or shape's change. This lability is generated by tight control of the balance between polymerization and depolymerization of monomers. In particular, RhoGTPases pathways are involved in actin cytoskeleton reorganization [1-4], whereas microtubules associated proteins (MAP) binding to tubulin modifies microtubules stability [5,6].

Neuronal differentiation requires correct development and targeting of membrane protrusions that will constitute axons and dendrites. Growth, guidance, branching and remodelling of these expansions depend both on the precise architecture of the filaments network and on its dynamic reorganization [7-9]. Impairments in control of these mechanisms have been associated to defects in neurites extension, ramification or pathfinding. For example, deficiencies in axonal elongation have been observed in cultured neurons in which Tau and MAP1B, two MAP that stabilize microtubules, are invalidated [6]. Similar inhibition of neurites outgrowth is observed in primary neurons expressing mutants of the small RhoGTPase Rac1 [4]. Cytoskeleton is also involved in synaptic transmission. First, synaptic functioning requires the local accumulation of organites, vesicles, proteins or mRNAs which are transported and even clustered on cytoskeleton structures [10,11]. Then, synapse shape and its modifications in response to stimuli are related to cytoskeleton network architecture and remodelling [12-14].

Dendritic spines are the main excitatory postsynaptic sites in mammalian cortex [15]. These small protrusions first look like immature filopodia but their morphology then evolves as the synapse strengthens to lead to the classical head and neck structure [16,17]. Dendritic

spines are mainly composed of labile actin filaments. Defects in actin organization or remodelling have been associated both to abnormal spines morphology and to synaptic transmission impairment [18]. Defects in dendritic spines morphology and functioning are also observed in brain of patients suffering from Fragile X syndrome, the main genetic cause of inherited mental retardation (1/4000 males and 1/8000 females) [19,20].

The fragile X syndrome is due to absence of the protein FMRP (Fragile X Mental Retardation Protein), encoded by the *FMRI* (*Fragile X Mental Retardation I*) gene [21]. In Vertebrates, FMRP is part of a small family, which includes its two paralogs FXR1P and FXR2P (Fragile X Related Protein 1/2) [22,23]. In *Drosophila*, dFXR (also known as dFMR1 and dFMRP) is the only member of this family and represents the ancestor of its three Vertebrate orthologs [24]. The aim of this review is to summarize findings arising from different animal models that provide evidences for links between cytoskeleton and FMRP/FXR proteins. We first describe results indicating that FXR proteins are involved in control of cytoskeleton structure and reorganization. We then summarize data showing that cytoskeleton may be required for FXR proteins actions. These molecular events could explain both common and specific phenotypic features due to lack of FXR proteins.

The fragile X syndrome

In 1969, Martin and Bell described a family case of sex linked mental retardation [25]. This was the first step in the characterization of Fragile X syndrome, the main genetic cause of inherited mental retardation. This syndrome owes its name to the local chromatin decondensation occurring at the end of the X chromosome long arm after incubation of patients' cells in low medium folate conditions (see [26] for review).

This X-linked form of mental retardation is classified in the group of syndromic mental retardation, since patients present several clinical features in addition to mental

retardation. Indeed, clinical panel also associates behavioural troubles -such as hyperactivity, stereotypes, tics, attention deficits, anxiety, and autistic features in some cases- with poor visual-motor coordination and language dysfunction [26]. Apart from cognitive and behavioural manifestations, fragile X patients display physical characteristics helpful for diagnosis [26]. The most striking one is macrorchidism in postpubertal males. Facial dysmorphism, associating long and narrow face with prominent ears, is often reported in males. Connective tissue dysplasia, which could result from incomplete arborisation of elastin in the papillary dermis, may be the underlying cause of joint laxity and mitral valve prolapse that are frequently observed [26]. Finally, occurrence of otitis media is higher, requiring specific treatment to avoid hearing loss that could worsen cognitive deficits (see [27] for review).

FMRP and the FXR family

All these abnormalities suggest that functions of the *FMR1* gene, abnormally expressed in Fragile X Syndrome, are not restricted to brain. This gene, which was identified in 1991, encodes several isoforms of FMRP generated by alternative splicing [28-30]. Orthologs have been identified in *Drosophila*, *Xenopus*, and mouse and their encoded proteins share respectively 49%, 86%, and 97% amino acids identity with the human one [22,24,31]. In Vertebrates, FMRP is part of a family that counts two other members, FXR1P and FXR2P [22,23]. Until now, no disease has been associated neither to *FXR1*, nor to *FXR2* mutations. *FMR1*, *FXR1* and *FXR2* derive from a common ancestor, whose ortholog is the single *dFXR* gene present in *Drosophila* [24]. *Drosophila dFXR* null mutants display locomotory troubles, as well as aborted courtship ritual and impaired circadian rhythm [32]. Conditioned courtship behavioural tests have recently revealed impairment in short-term memory, but not in learning during training, in *Drosophila dFXR* null mutants [33].

The FXR proteins share some biochemical properties. Indeed, these proteins all contain RNA binding domains, two KH ones and a RGG box [24,34,35]. They are associated to polyribosomes and they can shuttle between the nucleus and the cytoplasm thanks to a Nuclear Localization Signal (NLS) and a Nucle(ol)ar Export Signal (NES) [36-38]. FXR proteins can also form homo/heterodimers [23]. Thus, FXR proteins would be part of mRNP particles involved in regulation of transport and/or translation of targets mRNAs (see [39] for review).

However, the functions of these proteins are not fully redundant. The analysis of *FXR1* and *FXR2* knockout murine models revealed that lack of *FXR2* only leads to mild phenotype with cognitive impairments resembling those due to *FMR1* deficiency [40], whereas *FXR1P* absence is neonatal lethal and causes a disruption of cellular architecture and structure of striated muscle [41]. Moreover, even if they are all highly expressed in brain and testis, *FXR1P* is expressed at high level in striated muscle where *FMRP* and *FXR2P* are almost completely absent [42]. Finally, the three FXR proteins are expressed in different cell types in testis [43] and their subcellular localization varies, since *FXR2P* and some isoforms of *FXR1P* are found in the nucleolar compartment in cells treated with leptomycin B, contrary to *FMRP* [38].

Thus, FXR proteins likely share both common and specific functional features.

FXR proteins in the control of microtubules architecture and stability

FXR proteins could regulate microtubules stability via translational repression of futsch/MAP1B

Drosophila is a very useful model to study consequences of FXR proteins loss, since lack of dFXR may be considered, at least in part, as the equivalent of the loss of all three mammalian orthologs.

As stated above, the main morphological anomaly observed in Fragile X patients' brain, as well as in the corresponding mouse model, concerns the number and the shape of dendritic spines synaptic structures [44,45]. Analysis of flies lacking or overexpressing dFXR revealed similar synaptic defects. Observations made at the neuromuscular junction (NMJ) indicate that absence of functional dFXR results in increased size and complexity of this synapse [46,47]. Similar enlargement of synaptic contacts was observed in terminal arborisation of ventral lateral neurons and along mushroom body axonal projections [48,49]. In addition to its role in regulating synapse morphology, dFXR was also shown to reduce elongation and branching of central nervous system axons, especially in mushroom bodies, the fly memory center, where it limits β -lobes neurites extension, and to prevent dendrites ramification of sensory and mushroom body neurons [32,33,49-51]. Thus, dFXR modifies neuronal morphology at the axonal, dendritic and synaptic level in flies, by reducing complexity of these compartments.

Cytoskeleton, and in particular microtubules, network plays a key role in growth and maturation of neuronal processes. Thus, it was tempting to assume that alterations of cytoskeleton network in *dFXR* mutants could be the underlying cause of the neuronal defects described. This hypothesis was strengthened by the comparison of *dFXR* and *futsch* mutants' phenotypes. *Futsch* is the *Drosophila* ortholog of MAP1B, which is the first MAP to be expressed during brain development and which controls neurite extension and growth cone motility through regulation of microtubules dynamics [52]. Strikingly, *futsch* mutations result in neuronal defects opposed to those due to *dFXR* loss [46]. Crossing of both mutants rescues these phenotypes, demonstrating genetic and antagonistic interaction between *dFXR* and

futsch genes. A molecular basis for this interaction was provided by the analysis of *Futsch* level, which was shown to be significantly increased in *dFXR* mutants compared to wild-type littermates [46]. Thus, a likely model is that dFXR could regulate microtubules stability, and thus neuronal morphology, by inhibiting *Futsch* translation.

Similarly, it was shown that MAP1B time-dependent decrease observed in hippocampus during first postnatal days of development is delayed in *Fmr1* knockout mouse and that MAP1B level is also abnormally high in primary cultures of *Fmr1* knockout cortical neurons [53]. Since MAP1B mRNA was immunoprecipitated in FMRP-mRNP brain complexes, there could exist a conserved mechanism from flies to mammals, in which FMRP controls microtubules dynamic via repression of MAP1B translation [53]. However, absence of MAP1B in mouse is associated to dysgenesis in axons tracts and to partial lethality of animals [6]. No such defects in axonal growth have been reported in fragile X patients or in *Fmr1* knock-out mice. Thus, FMRP could modulate MAP1B expression in a more subtle manner than in *Drosophila*. An alternative hypothesis is that either FXR1P or FXR2P could play a more important role in MAP1B regulation.

dFXR and FMRP are involved in control of microtubules network via an alternative mechanism

Like its mammalian orthologs, *dFXR* is highly expressed in testis and in particular in developing spermatocytes [54]. Its involvement in spermatogenesis is proven first by the huge decrease of *dFXR* mutant males' fertility, which is less than 10% of wild type fecundity [54]. Zhang *et al* have shown that this sterility is explained by a late-stage spermatogenesis arrest, which leads to the production of immotile sperm. Strikingly, electronic microscopy analyses allow the identification of a major defect in the microtubule architecture of the sperm tail. Indeed, the sperm tail is normally supported by a network of nine doublets encircling a central pair of microtubules. In *dFXR* mutants, this central pair of microtubules is progressively lost

during spermatogenesis [54]. *futsch* mutants however do not show any impairment in spermatogenesis [54]. Thus, dFXR control of Futsch expression would not be responsible for the disruption of microtubules architecture in testis. Two dimensional difference gel electrophoresis analysis allowed the identification of some proteins that are abnormally expressed in *dFXR* mutant testis and that are implicated in microtubules regulation. Thus, dFXR could regulate microtubules network via two independent mechanisms, a Futsch dependent one in nervous system and an alternative one in testis.

In mammals, absence of FMRP leads to an enlargement of testis size, without apparent reduction of males' fertility [55,56]. This milder phenotype could again be attributed to partial overlap of FMRP, FXR1P and FXR2P functions during spermatogenesis. Increase in Sertoli cells proliferation was proposed to be at the basis of macroorchidism in mouse [57]. However, the precise molecular mechanism triggering this abnormality was not explained in this hypothesis. In parallel with their analysis of *dFXR* mutant phenotype, Zhang *et al* shows that spermatids are scarcer in *Fmr1* mutant mouse testis, in particular in epididymis [54]. Analogous reduction in spermatozoa production was reported twenty years ago in patients affected by Fragile X syndrome [58]. Structural examination of *Fmr1* mutant mouse spermatids revealed that plasma membrane displays an abnormal shape and seems to be disassociated from the underlying dense fibers of the sperm tail axoneme [54]. Moreover, even if the global structure of the axoneme microtubules network is maintained, the precise organization of the network is altered. Thus, even if defects observed in the murine model are milder than in *Drosophila*, this provides an alternative hypothesis of an evolutionary conserved, microtubules-based mechanism for testis deficits due to FMRP lack.

FXR proteins in the modulation of actin cytoskeleton dynamics

dFXR and FMRP proteins regulate actin dynamics via interaction with Rac1 signalling

Neuronal morphogenesis does not only depend on proper organization of the microtubules network, but is also regulated by actin microfilaments remodelling. In mammals, actin cytoskeleton is in particular involved in the correct settlement and remodelling of dendritic spines (see [59] for review), whose structure is altered when FMRP is lacking.

Identification of CYFIP1 (CYtoplasmic FMRP Interacting Protein 1, also known as p140Sra-1) as an FMRP interactor [60] has laid the foundation stone to the establishment of a connection between FXR proteins and the actin cytoskeleton. Indeed, before being characterized as a direct FMRP interactor, CYFIP1 was known to interact with the small GTPase Rac1 [61]. Rac1 belongs to the Rho GTPases family and it has been shown to play a key role in the control of actin filaments dynamic organization, by activating a signalisation cascade regulating actin filaments polymerization and nucleation [4]. In response to extracellular signals, Rac1 was shown to induce actin assembly into a meshwork leading to membrane ruffling and to lamellipodia formation in fibroblasts [2]. Control of actin cytoskeleton remodelling by Rac1 was then extended to other cell types including neurons [62]. Establishment of a link between FXR proteins and the Rac1 pathway was first performed in *Drosophila*. Interactions between CYFIP1 ortholog dCYFIP and both dFXR and dRac1 were confirmed in *Drosophila* [47]. Then, genetic interactions experiments have allowed showing that dRac1, dCYFIP and dFXR could act in a common pathway [47]. Indeed, overexpression of dFXR in *Drosophila* eye leads to ommatidia misorganization, a phenotype rescued either by dCYFIP overexpression or by reduction of dRac1 level. Similar results were obtained in the nervous system and lead to a model in which dFXR and dRac1 act in a common pathway to regulate actin reorganization, dFXR function being enhanced by dRac1, via inactivation of dCYFIP [47]. Recent works in *Drosophila* strengthened existence

of a connexion between dFXR and dRac1. Indeed, defasciculation and ectopic branching of LNV (ventral Lateral Neurons) posterior optic tract are observed in *Drosophila* heterozygotes for dRac1, and these phenotypes are worsened by loss of one *dFXR* allele [48]. This observation could be explained in light of data indicating that dRac1 and dFXR could both negatively regulate Profilin [48], an actin binding protein promoting actin polymerization [63,64]. In particular, Profilin level was shown to be induced in dFXR mutant fly head and its mRNA is associated to dFXR-containing mRNP [48]. Thus, dFXR could interfere with dRac1 signalling pathway through translation regulation of a dRac1 target.

However, the connection between dFXR and dRac1 could be more complex. First, dFXR overexpression was shown to decrease branching of dendritic arborisation neurons in *Drosophila* larvae, a phenotype also induced by the expression of *dRac1* loss-of-function mutants [50]. Genetic interaction studies confirm the existence of an antagonistic relationship between both proteins in regulation of dendritic branching in these neurons. Furthermore, dRac1 mRNA was found in dFXR-containing mRNP, suggesting that dRac1 could be a target of dFXR [50].

All together, these results fit with a feedback loop model, in which dRac1 and dFXR control of actin cytoskeleton dynamics are closely interconnected.

Transfection of dominant-negative or constitutively active Rac1 mutant in murine hippocampal neurons has been shown to modify dendritic spines shape and number [65]. Involvement of Rac1 pathway in definition of dendritic spines structure was further strengthened by observation of spines defects in brain of mouse knocked-out for the *LimK1* gene, a well-known Rac1 downstream effector [18]. Therefore, an actin-based Rac1-dependent defect could be at the origin of the abnormally high level of thin and long dendritic spines observed in FMRP absence. Involvement of FMRP in Rac1 signalling and in control

of actin dynamic was confirmed by recent work that we performed using a murine fibroblast model [66]. In this study, we have shown that PDGF-induced actin reorganization is impaired in *FMR1* null cells, and that this defect could be due to an alteration of the ratio of active versus inactive forms of Cofilin. Cofilin is an actin-binding protein which enhances actin depolymerization [67]. Its activity is negatively regulated by Rac1, via induction of its phosphorylation by LIMK1. We found that FMRP does not directly regulate Cofilin expression, but rather modulate its activation state, likely via translational repression of one of its phosphatase, PP2A.

The connection between Rac1 signalling pathway and FMRP, identified in *Drosophila*, seems to be conserved in mammals. However, the molecular bases of the Rac1-FMRP link(s) remain to be precised: in particular, it would be interesting to determine whether level of the dFXR target Profilin is also increased in mammalian cells lacking FMRP expression. And *vice et versa*, it would be important to study expression of Twinfilin, the Cofilin ortholog, in *dFXR* mutants *Drosophila*. Finally, it remains to be determined whether disruption of this connection is indeed responsible for neuronal defects observed in FMRP absence.

FXR1P could control actin cytoskeleton network architecture in muscle

Muscles give the most well-known example of actin-based cell motility. In these contractile cells, the cytoskeleton is composed of myofibers constituted by actin thin filaments overlapping with myosin thick filaments. Contrary to non muscular cells, these fibers network is fixed or, in other words, not subjected to dynamic reorganization.

Contrary to FMRP and FXR2P, FXR1P is highly expressed in skeletal and cardiac muscle [42,68]. Genesis of *Fxr1* knockout mouse model has allowed showing that FXR1P absence leads to death shortly after birth [41]. Absence of large blood vessels in *Fxr1*

knockout neonates was detected during macroscopic internal organs and skin examination. Moreover, knockout neonates' limb musculature was abnormally less developed compared to their wild type littermates, and same phenotype was observed in 6 weeks old *Fxr1* hypomorph mutant mouse [41]. Histological analyses revealed that these phenotypical features are associated with a global misorganization of cardiac and skeletal muscle tissues architecture. In particular, the characteristic organization of skeletal muscle contractile filaments is lost in *Fxr1* hypomorph mutant mouse limbs. Interestingly, FXR1P is associated to costameres, which are components of cortical cytoskeleton. Subsequent analysis of costameric organization revealed that α -actinin, vinculin and dystrophin organization is altered in *Fxr1*^{-/-} lacking cells of striated muscles [41]. These three proteins are involved in the anchoring of actin filaments to the plasma membrane. Thus, FXR1P could likely regulate indirectly the actin cytoskeleton structure by controlling actin-binding proteins distribution.

Cytoskeleton: a support for FXR proteins functions

RNA binding properties and nucleocytoplasmic abilities of FXR proteins have led to suggest that they could be involved in mRNA transport. Support for this hypothesis has been provided by observations of movements of FMRP-containing granules. In PC-12 transfected cells, GFP-tagged FMRP is localized in granules containing mRNA, ribosomal subunits, kinesin heavy-chain and FXR1P [69]. These mRNP granules are moving towards neurites extremities at 0.19 $\mu\text{m/s}$ on average. Interestingly, this trafficking is abolished when microtubules are depolymerised by nocodazole, whereas actin-cytoskeleton disruption induced by cytochalasin D has no effect [69]. Microtubules are also required to induce the mGluR-dependent translocation of FMRP-containing granules into dendrites of hippocampal neurons [70]. Similar results were obtained using *Drosophila* S2 cells: dFXR containing granules keep moving in presence of actin destabilizing drug, whereas knocking-down of

either kinesin-1 or dynein heavy-chain prevents these movements [71]. Thus, a microtubule-dependent process conserved from *Drosophila* to mammals is, at least in part, at the basis of FXR proteins mobility.

Transport of mRNAs towards local cellular sites is of key importance to allow their local translation in response to stimuli. Synapse activity leads to local translation of specific mRNAs in the postsynaptic compartment [72,73] and these synthesis were shown to be involved in establishment of long term potentiation and depression late phases [74-76]. FMRP-containing granules trafficking towards dendrites of cultured hippocampal neurons is increased in response to KCl depolarization [77]. Moreover, defects in synaptic plasticity have been described in the *Fmr1* knockout mouse model (see [19] for review).

All together, these data strongly suggest that FMRP could be involved in the transport of specific mRNAs to synaptic sites via the microtubules network, and that alterations of synaptic localization of some of these mRNAs might explain part of the phenotype observed in FMRP absence.

In the same way, localization of FXR1P close to actin structures at the leading edge of fibroblasts [66] could be related to transport of mRNAs towards these sites. Indeed, targeting to actin remodelling sites of mRNAs encoding β -actin and the seven proteins of the Arp2/3 actin-nucleation complex have been shown to occur and could be of importance in the regulation of actin dynamics [78,79]. Thus, a cytoskeleton-based transport of mRNAs associated to FXR1P towards actin remodelling sites could, in turn, be necessary for local expression of proteins playing a key role in cytoskeleton reorganization.

Conclusion

Drosophila has been a very useful tool to establish a link between FXR proteins and the cytoskeleton network. Many phenotypical defects in *Drosophila dFXR* mutants are likely

due to abnormalities in architecture and remodelling of both microtubules and actin cytoskeleton networks. Moreover, the *Drosophila* model has provided molecular bridges between dFXR and the cytoskeleton, since it has allowed showing that dFXR could control the translation of proteins involved in regulation of cytoskeleton stability [46,48].

Several lines of evidences are now emerging in favour of conservation of such mechanisms in mammals. Abnormalities in microtubules network in absence of FMRP have been reported [54]. However, their importance regarding phenotypical defects is less obvious than in *Drosophila*, probably due to partial overlap of FMRP, FXR1P and FXR2P functions. It would then be interesting to determine precisely the respective role of each FXR proteins in regulation of microtubules network stability, especially in brain and testis, in animals models invalidated for *FXR1*, *FXR2* or combinations of all of the *FXR* genes.

In mammals, FXR proteins also seem to control actin cytoskeleton structure and reorganization. In particular, FMRP could regulate actin cytoskeleton reorganization via interfering with Rac1 pathway. Extension of this result to neuronal cells would be particularly interesting, since it could explain the dendritic spines defects observed in patients' brain, which are thought to be at the basis of mental retardation.

Bibliography

1. Ridley AJ, Hall A: **The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors**. *Cell* 1992, **70**:389-399.
2. Ridley AJ, Paterson HF, Johnston CL, Diekmann D, Hall A: **The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling**. *Cell* 1992, **70**:401-410.
3. Kozma R, Ahmed S, Best A, Lim L: **The Ras-related protein Cdc42Hs and bradykinin promote formation of peripheral actin microspikes and filopodia in Swiss 3T3 fibroblasts**. *Mol Cell Biol* 1995, **15**:1942-1952.
4. Hall A: **Rho GTPase and actin cytoskeleton**. *Science* 1998, **279**:509-514.
5. Gordon-Weeks PR, Fischer I: **MAP1B expression and microtubules stability in Growing and regenerating axons**. *Microscopy Research and Technique* 2000, **48**:63-74.
6. Garcia ML, Cleveland DW: **Going new places with an old MAP: tau, microtubules and human neurodegenerative disease**. *Current Opinion in Cell Biology* 2001, **13**:41-48.
7. Luo L: **Actin cytoskeleton regulation in neuronal morphogenesis and structural plasticity**. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2002, **18**:601-635.
8. Zhou FQ, Cohan CS: **How actin filaments and microtubules steer growth cones to their targets**. *J Neurobiol* 2004, **58**:84-91.
9. Gordon-Weeks PR: **Microtubules and growth cone function**. *J Neurobiol* 2004, **58**:70-83.
10. Allison DW, Gelfand VI, Spector I, Craig AM: **Role of actin in anchoring postsynaptic receptors in cultured hippocampal neurons: differential attachment of NMDA versus AMPA receptors**. *J Neurosci* 1998, **18**:2423-2436.
11. Guzik BW, Goldstein LS: **Microtubule-dependent transport in neurons: steps towards an understanding of regulation, function and dysfunction**. *Curr Opin Cell Biol* 2004, **16**:443-450.
12. Huntley GW, Benson DL, Colman D: **Structural Remodeling of the synapse in response to physiological activity**. *Cell* 2002, **108**:1-4.
13. Colicos MA, Collins BE, Sailor MJ, Goda Y: **Remodeling of synaptic actin induced by photoconductive stimulation**. *Cell* 2001, **107**:605-616.
14. Toni N, Buchs PA, Nikonenko I, Bron CR, Muller D: **LTP promotes formation of multiple spine synapses between a single axon terminal and a dendrite**. *Nature* 1999, **402**:421-425.

15. Tashiro A, Yuste R: **Structure and molecular organization of dendritic spines.** *Histol Histopathol* 2003, **18**:617-634.
16. Harris KM: **Structure, development, and plasticity of dendritic spines.** *Current Opinion in Neurobiology* 1999, **9**:343-348.
17. Fiala JC, Feinberg M, Popov V, Harris KM: **Synaptogenesis via dendritic filopodia in developing hippocampal area CA1.** *J Neurosci* 1998, **18**:8900-8911.
18. Meng Y, Zhang Y, Tregoubov V, Falls DL, Jia Z: **Regulation of spine morphology and synaptic function by LIMK and the actin cytoskeleton.** *Rev Neurosci* 2003, **14**:233-240.
19. Antar LN, Bassel GJ: **Sunrise at the synapse: the FMRP mRNP shaping the synaptic interface.** *Neuron* 2003, **37**:555-558.
20. Irwin SA, Patel B, Idupulapati M, Harris JB, Crisostomo RA, Larsen BP, Kooy F, Willems PJ, Cras P, Kozlowsky PB, et al.: **Abnormal dendritic spine characteristics in temporal and visual cortices of patients with fragile-X syndrome: a quantitative examination.** *Am J Med Genet* 2001, **15**:161-167.
21. Bardoni B, Schenck A, Mandel JL: **The Fragile X Mental Retardation Protein.** *Brain Res Bulletin* 2001, **56**.
22. Siomi MC, Siomi H, Sauer WH, Srinivasan S, Nussbaum RL, Dreyfuss G: **FXR1, an autosomal homolog of the fragile X mental retardation gene.** *EMBO J.* 1995, **14**:2401-2408.
23. Zhang Y, O'Connor JP, Siomi MC, Srinivasan S, Dutra A, Nussbaum RL, Dreyfuss R: **The fragile X mental retardation syndrome protein interacts with novel homologs FXR1 and FXR2.** *EMBO J.* 1995, **14**:5358-5366.
24. Wan L, Dockendorff TC, Jongens TA, Dreyfuss G: **Characterization of dFMR1, a Drosophila Melanogaster homolog of the fragile X mental retardation protein.** *MCB* 2000, **20**:8536-8547.
25. Martin JP, Bell J: **A pedigree of mental defect showing sex linkage.** *J Neurol Psychiatrie* 1943, **6**:154-157.
26. Hagerman RJ, Hagerman PJ: *Fragile X Syndrome: Diagnosis, Treatment, and Research.* edn 3d. Baltimore: John Hopkins University Press; 2002.
27. Goldson E, Hagerman RJ: **The Fragile X syndrome.** *Developmental Medicine and Child Neurology* 1992, **34**:822-832.
28. Verkerk AJMH, Pieretti M, Sutcliffe JS, Fu YH, Kuhl DPA, Pizzuti A, Reiner O, Richards S, Victoria MF, Zhang F, et al.: **Identification of a gene (FMR-1) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome.** *Cell* 1991, **65**:905-914.

29. Sittler A, Devys D, Weber C, Mandel JL: **Alternative splicing of exon 14 determines nuclear or cytoplasmic localisation of fmr1 protein isoforms.** *Human Molecular Genetics* 1996, **5**:95-102.
30. Khandjian EW, Fortin A, Thibodeau A, Tremblay S, Côté F, Devys D, Mandel JL, Rousseau F: **A heterogeneous set of FMR1 proteins is widely distributed in mouse tissues and is modulated in cell culture.** *Human Molecular Genetics* 1995, **4**:783-789.
31. Ashley CT, Sutcliffe JS, Kunst CB, Leiner HA, Eichler EE, Nelson DL, Warren ST: **Human and murine FMR-1: alternative splicing and translational initiation downstream of the CGG-repeat.** *Nature Genetics* 1993, **4**:244-251.
32. Dockendorff TC, Su HS, McBride SM, Yang Z, Choi CH, Siwicki KK, Sehgal A, Jongens TA: **Drosophila lacking dfmr1 activity show defects in circadian output and fail to maintain courtship interest.** *Neuron* 2002, **34**:973-984.
33. Morales J, Hiesinger PR, Schroeder AJ, Kume K, Verstreken P, Jackson FR, Nelson DL, Hassan BA: **Drosophila fragile X protein, DFXR, regulates neuronal morphology and function in the brain.** *Neuron* 2002, **34**:961-972.
34. Corbin F, Bouillon M, Fortin A, Morin S, Rousseau F, Khandjian EW: **The fragile X mental retardation protein is associated with poly(A)⁺ mRNA in actively translating polyribosomes.** *Human Molecular Genetics* 1997, **6**:1465-1472.
35. Feng Y, Absher D, Eberhart DE, Brown V, Malter HE, Warren ST: **FMRP associates with polyribosomes as an mRNP, and the I304N mutation of severe fragile X syndrome abolishes this association.** *Mol.Cell* 1997, **1**:109-118.
36. Eberhart DE, Malter HE, Feng Y, Warren ST: **The Fragile X mental retardation protein is a ribonucleoprotein containing both nuclear localization and nuclear export signals.** *Human Molecular Genetics* 1996, **5**:1083-1091.
37. Tamanini F, Bontekoe C, Bakker CE, van Unen L, Anar B, Willemsen R, Yoshida M, Galjaard H, Oostra BA, Hoogeveen AT: **Different targets for the fragile X related proteins revealed by distinct nuclear localization.** *Hum. Mol. Genet.* 1999, **8**:863-869.
38. Tamanini F, Kirkpatrick L, Schonkeren J, van Unen L, Bontekoe C, Bakker C, Nelson DL, Galjaard H, Oostra B, Hoogeveen AT: **The fragile X-related proteins FXR1P and FXR2P contain a functional nucleolar-targeting signal equivalent to the HIV-1 regulatory proteins.** *Hum.Mol.Genet.* 2000, **9**:1487-1493.
39. Bardoni B, Mandel JL: **Advances in understanding of fragile X pathogenesis and FMRP function, and in identification of X linked mental retardation genes.** *Curr Opin Genet Dev* 2002, **12**:284-293.

40. Bontekoe CJM, McIlwain KL, Nieuwenhuizen IM, Yuva-Paylor L, Nellis A, Willemsen R, Fang Z, Kirkpatrick L, Bakker CE, McAninch R, et al.: **Knockout mouse model for Fxr2: a model for mental retardation.** *Hum. Mol. Genet.* 2002, **11**:487-498.
41. Mientjes EJ, Willemsen R, Kirkpatrick L, Nieuwenhuizen IM, Hoogenveen-Westerveld M, Verweij M, Reis S, Bardoni B, Hoogenven AT, Oostra B, et al.: **Fxr1 knockout mice show a striated muscle phenotype: implications for Fxr1p function in vivo.** *Human Molecular Genetics* 2004, **13**:1291-1302.
42. De Diego Otero Y, Bakker CE, Raghoe P, Severijnen LA, Hoogenveen AT, Oostra B, Willemsen R: **Immunocytochemical characterization of FMRP, FXR1P and FXR2P during embryonic development in the mouse.** *Gene Funct. Dis.* 2000, **1**:28-37.
43. Tamanini F, Willemsen R, van Unen L, Bontekoe C, Galjaard H, Oostra BA, Hoogenveen AT: **Differential expression of FMR1, FXR1 and FXR2 proteins in human brain and testis.** *Human Molecular Genetics* 1997, **6**:1315-1322.
44. Comery TA, Harris JB, Willems PJ, Oostra BA, Irwin SA, Weiler IJ, Greenough WT: **Abnormal dendritic spines in fragile X knockout mice: maturation and pruning deficits.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1997, **94**:5401-5404.
45. Irwin SA, Idupulapati M, Gilbert ME, Harris JB, Chakravarti AB, Rogers EJ, Crisostomo RA, Larsen BP, Mehta A, Alcantara CJ, et al.: **Dendritic spine and dendritic field characteristics of layer V pyramidal neurons in the visual cortex of fragile-X knockout mice.** *Am J Med Genet* 2002, **111**:140-146.
46. Zhang YQ, Bailey AM, Matthiensi HJG, Renden RB, Smith MA, Speese SD, Rubin GM, Broadie K: **Drosophila Fragile X-related gene regulates MAP1B homolog Futsch to control synaptic structure and function.** *Cell* 2001, **107**:591-603.
47. Schenck A, Bardoni B, Langmann C, Harden N, Mandel JL, Giangrande A: **CYFIP/Sra-1 Controls Neuronal Connectivity in Drosophila and Links the Rac1 GTPase Pathway to the Fragile X Protein.** *Neuron* 2003, **38**:887-898.
48. Reeve SP, Bassetto L, Genova GK, Kleyner Y, Leyssen M, Jackson FR, Hassan BA: **The Drosophila Fragile X Mental Retardation Protein controls actin dynamics by directly regulating profilin in the brain.** *Current Biology* 2005, **15**:1156-1163.
49. Pan L, Zhang YQ, Woodruff E, Broadie K: **The Drosophila Fragile X gene negatively regulates neuronal elaboration and synaptic differentiation.** *Current Biology* 2004, **14**:1863-1870.

50. Lee A, Li W, Xu K, Bogert BA, Su K, Gao FB: **Control of dendritic development by the *Drosophila fragile X*-related gene involves the small GTPase Rac1.** *Development* 2003, **130**:5543-5552.
51. McBride SM, Choi CH, Wang Y, Liebelt D, Braunstein E, Ferreiro D, Sehgal A, Siwicki KK, Dockendorff TC, Nguyen HT, et al.: **Pharmacological rescue of synaptic plasticity, courtship behavior, and mushroom body defects in a *Drosophila* model of fragile X syndrome.** *Neuron* 2005, **45**:753-764.
52. Gonzalez-Billault C, Jimenez-Mateos EM, Caceres A, Diaz-Nido J, Wandosell F, Avila J: **Microtubule-associated protein 1B function during normal development, regeneration, and pathological conditions in the nervous system.** *J Neurobiol* 2004, **58**:48-59.
53. Lu R, Wang H, Liang Z, Ku L, O'Donnell WT, Li W, Warren ST, Feng Y: **The fragile X protein controls microtubules-associated protein 1B translation and microtubule stability in brain neuron development.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004, **101**:15201-15206.
54. Zhang YQ, Matthies HJG, Mancuso J, Andrews HK, Woodruff E, Friedman D, Broadie K: **The *Drosophila fragile X*-related gene regulates axoneme differentiation during spermatogenesis.** *Developmental Biology* 2004, **2004**:290-307.
55. Reyniers E, Vits L, De Boule K, Van Roy B, Van Velzen D, de Graaff E, Verkerk AJ, Jorens HZ, Darby JK, Oostra B, et al.: **The full mutation in the FMR-1 gene of male fragile X patients is absent in their sperm.** *Nature Genetics* 1993, **4**:143-146.
56. Malter HE, Iber JC, Willemsen R, de Graaff E, Tarleton JC, Leisti J, Warren ST, Oostra BA: **Characterization of the full fragile X syndrome mutation in fetal gametes.** *Nature Genetics* 1997, **15**:165-169.
57. Slegtenhorst-Eegdeman KE, de Rooij DG, Verhoef-Post M, van de Kant HJG, Bakker CE, Oostra BA, Grootegoed JA, Themmen APN: **Macroorchidism in FMR1 knockout mice is caused by increased sertoli cell proliferation during testicular development.** *Endocrinology* 1998, **139**:156-163.
58. Johannisson R, Rehder H, Wendt V, Schwinger E: **Spermatogenesis in two patients with the Fragile X syndrome. I. Histology: light and electron microscopy.** *Human Genetics* 1987, **76**:141-147.
59. Lippman J, Dunaevsky A: **Dendritic spine morphogenesis and plasticity.** 2004.
60. Schenck A, Bardoni B, Moro A, Bagni C, Mandel JL: **A highly conserved protein family interacting with the fragile X Mental Retardation Protein and displaying selective**

- Interactions with the FMRP related proteins FXR1P and FXR2P.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2001, **98**:8844-8849.
61. Kobayashi K, Kuroda S, Fukata M, Nakamura T, Nagase T, Nomura N, Matsuura Y, Yoshida-Kubomura N, Iwamatsu A, Kaibuchi K: **p140Sra-1 (specifically Rac1-associated protein) is a novel specific target for Rac1 small GTPase.** *J. Biol. Chem.* 1998, **273**:291-295.
62. Luo L: **Actin Cytoskeleton Regulation in Neuronal Morphogenesis and Structural Plasticity.** *Annu Rev Cell Dev Biol* 2002, **3**:3.
63. Theriot JA, Mitchison TJ: **The three faces of profilin.** *Cell* 1993, **75**:835-838.
64. Didry D, Carlier MF, Pantaloni D: **Synergy between actin depolymerizing factor/cofilin and profilin in increasing actin filament turnover.** *J Biol Chem* 1998, **273**:25602-25611.
65. Nakayama AY, Harms MB, Luo L: **Small GTPases Rac and Rho in the maintenance of dendritic spines and branches in hippocampal pyramidal neurons.** *J Neurosci* 2000, **20**:5329-5338.
66. Castets M, Schaeffer C, Khandjian EW, Schenck A, Luche S, Bechara E, Moine H, Rabilloud T, Mandel JL, Bardoni B: **FMRP interferes with Rac1 pathway and controls actin cytoskeleton dynamics in mouse fibroblasts.** *Human Molecular Genetics* 2004.
67. Bamberg JR: **Proteins of the ADF/cofilin family: essential regulators of actin dynamics.** *Annu Rev Cell Dev Biol* 1999, **15**:185-230.
68. Bakker CE, de Diego Otero Y, Bontekoe C, Raghoe P, Luteijn T, Hoogeveen AT, Oostra BA, Willemsen R: **Immunocytochemical and biochemical characterization of FMRP, FXR1P, and FXR2P in the mouse.** *Exp Cell Res* 2000, **258**:162-170.
69. De Diego Otero Y, Severijnen LA, van Cappellen G, Schrier M, Oostra B, Willemsen R: **Transport of fragile X mental retardation protein via granules in neurites of PC12 cells.** *Mol Cell Biol* 2002, **22**:8332-8341.
70. Antar LN, Dichtenberg JB, Plociniak M, Afroz R, Bassell GJ: **Localization of FMRP-associated mRNA granules and requirement of microtubules for activity-dependent trafficking in hippocampal neurons.** *Genes Brain Behav* 2005, **4**:350-359.
71. Ling SC, Fahrner PS, Greenough WT, Gelfand V: **Transport of Drosophila fragile X mental retardation protein-containing ribonucleoprotein granules by kinesin-1 and cytoplasmic dynein.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004, **101**:17428-17433.
72. Weiler IJ, Greenough WT: **Metabotropic glutamate receptors trigger postsynaptic protein synthesis.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993, **90**:7168-7171.

73. Scheetz AJ, Nairn AC, Constantine-Paton M: **NMDA receptor-mediated control of protein synthesis at developing synapses.** *Nat Neurosci* 2000, **3**:211-216.
74. Huber KM, Kayser MS, Bear MF: **Role for rapid dendritic protein synthesis in hippocampal mGluR-dependent long-term depression.** *Science* 2000, **288**:1254-1257.
75. Cammalleri M, Lutjens R, Berton F, King AR, Simpson C, Francesconi W, Sanna PP: **Time-restricted role for dendritic activation of the mTOR-p70S6K pathway in the induction of late-phase long-term potentiation in the CA1.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, **100**:14368-14373.
76. Francesconi W, Cammalleri M, Sanna PP: **The metabotropic glutamate receptor 5 is necessary for late-phase long-term potentiation in the hippocampal CA1 region.** *Brain Res* 2004, **1022**:12-18.
77. Antar LN, Afroz R, Dichtenberg JB, Carroll RC, Bassell GJ: **Metabotropic glutamate receptor activation regulates fragile x mental retardation protein and FMR1 mRNA localization differentially in dendrites and at synapses.** *J Neurosci* 2004, **24**:2648-2655.
78. Kislauskis EH, Zhu X, Singer RH: **beta-Actin messenger RNA localization and protein synthesis augment cell motility.** *J Cell Biol* 1997, **136**:1263-1270.
79. Mingle LA, Okuhama NN, Shi J, Singer RH, Condeelis J, Liu G: **Localization of all seven messenger RNAs for the actin-polymerization nucleator Arp2/3 complex in the protrusions of fibroblasts.** *Journal of Cell Science* 2005, **118**:2425-2433.

APPENDICE

PUBLICATION 6

La région N-terminale de FMRP est impliquée dans l'interaction avec plusieurs partenaires protéiques. Récemment, sa structure a été caractérisée par l'équipe du Pr. Annalisa Pastore. L'organisation tridimensionnelle de la région N-terminale repose sur la répétition de deux motifs de type Tudor suivis d'une courte hélice alpha.

La résolution de la structure de la partie N-terminale de FMRP a également permis de mettre en évidence l'existence d'un signal de localisation nucléolaire tridimensionnel. J'ai participé à cette étude en analysant la localisation d'isoformes de FMRP mutées au niveau de cette région.

[Signalement bibliographique ajouté par : ULP – SCD – Service des thèses électroniques]

The Structure of the N-Terminal Domain of the Fragile X Mental Retardation Protein: A Platform for Protein-Protein Interaction

Andres Ramos, David Hollingworth, Salvatore Adinolfi, **Marie Castets**, Geoff Kelly, Thomas A. Frenkiel, Barbara Bardoni and Annalisa Pastore

Structure 2006, Vol 14, 21-31

Pages 21 à 31:

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Pour les utilisateurs ULP, il est possible de consulter cette publication sur le site de l'éditeur :
<http://dx.doi.org/10.1016/j.str.2005.09.018>

Il est également possible de consulter la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP: peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr

BIBLIOGRAPHIE

Bibliographie

- Abitbol, M., C. Menini, et al. (1993). "Nucleus basalis magnocellularis and hippocampus are the major sites of FMR-1 expression in the human fetal brain." Nature Genetics **4**: 147-153.
- Adinolfi, S., C. Bagni, et al. (1999). "Dissecting FMR1, the protein responsible for fragile X syndrome, in its structural and functional domains." RNA **5**: 1248-1258.
- Agulhon, C., P. Blanchet, et al. (1999). "Expression of FMR1, FXR1 and FXR2 genes in human prenatal tissues." Journal of Neuropathology and Experimental Neurology **58**: 867-880.
- Aiba, A., C. Chen, et al. (1994). "Reduced hippocampal long-term potentiation and context-specific deficit in associative learning in mGluR1 mutant mice." Cell **79**(2): 365-75.
- Aiba, A., M. Kano, et al. (1994). "Deficient cerebellar long-term depression and impaired motor learning in mGluR1 mutant mice." Cell **79**(2): 377-88.
- Allen, K. M., J. G. Gleeson, et al. (1998). "PAK3 mutation in nonsyndromic X-linked mental retardation." Nat Genet **20**(1): 25-30.
- Ambach, A., J. Saunus, et al. (2000). "The serine phosphatases PP1 and PP2A associate with and activate the actin binding protein cofilin in human T lymphocytes." Eur J Immunol. **30**: 3422-3431.
- Andersen, J. K. (2004). "Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence?" Nat Med **10 Suppl**: S18-25.
- Andersen, J. S., C. E. Lyon, et al. (2002). "Directed proteomic analysis of the human nucleolus." Curr Biol **12**(1): 1-11.
- Andjelkovic, N., S. Zolnierowicz, et al. (1996). "The catalytic subunit of protein phosphatase 2A associates with the translation termination factor eRF1." Embo J **15**(24): 7156-67.
- Andrade, L. E., E. K. Chan, et al. (1991). "Human autoantibody to a novel protein of the nuclear coiled body: immunological characterization and cDNA cloning of p80-coilin." J Exp Med **173**(6): 1407-19.
- Antar, L. N., R. Afroz, et al. (2004). "Metabotropic glutamate receptor activation regulates fragile x mental retardation protein and FMR1 mRNA localization differentially in dendrites and at synapses." J Neurosci **24**(11): 2648-55.

- Ashley, C. T., Jr., K. D. Wilkinson, et al. (1993). "FMR1 protein: conserved RNP family domains and selective RNA binding." Science **262**: 563-566.
- Ashley, C. T., J. S. Sutcliffe, et al. (1993). "Human and murine FMR-1: alternative splicing and translational initiation downstream of the CGG-repeat." Nature Genetics **4**: 244-251.
- Atkinson, R. C. and R. M. Shiffrin (1968). Human memory: A proposed system and its control processes. New York, Academic Press.
- Bading, H. and M. E. Greenberg (1991). "Stimulation of protein tyrosine phosphorylation by NMDA receptor activation." Science **253**(5022): 912-4.
- Baharians, Z. and A. H. Schönthal (1998). "Autoregulation of Protein Phosphatase type 2A expression." J Biol Chem **273**: 19019-19024.
- Bakker, C. E., Y. de Diego Otero, et al. (2000). "Immunocytochemical and biochemical characterization of FMRP, FXR1P, and FXR2P in the mouse." Exp Cell Res **258**(1): 162-70.
- Bamburg, J. R. (1999). "Proteins of the ADF/cofilin family: essential regulators of actin dynamics." Annu Rev Cell Dev Biol **15**: 185-230.
- Bardoni, B., M. Castets, et al. (2003). "82-FIP, a novel FMRP (fragile X mental retardation protein) interacting protein, shows a cell cycle-dependent intracellular localization." Hum Mol Genet **12**(14): 1689-98.
- Bardoni, B. and J. L. Mandel (2002). "Advances in understanding of fragile X pathogenesis and FMRP function, and in identification of X linked mental retardation genes." Curr Opin Genet Dev **12**(3): 284-93.
- Bardoni, B., A. Schenck, et al. (1999). "A novel RNA-binding nuclear protein that interacts with the fragile X mental retardation (FMR1) protein." Human Molecular Genetics **8**: 2557-2566.
- Bardoni, B., A. Sittler, et al. (1997). "Analysis of domains affecting intracellular localization of the FMRP protein." Neurobiology of Disease **4**: 329-336.
- Bardoni, B., R. Willemsen, et al. (2003). "NUFIP1 (Nuclear FMRP Interacting Protein 1) is a nucleocytoplasmic shuttling protein associated with active synaptoneuroosomes." Ex. Cell. Res. **289**: 95-107.
- Barnea-Goraly, N., S. Eliez, et al. (2003). "White matter tract alterations in fragile X syndrome: preliminary evidence from diffusion tensor imaging." Am. J. Med. Genet. **118B**: 81-88.

- Barria, A., D. Muller, et al. (1997). "Regulatory phosphorylation of AMPA-type glutamate receptors by CaM-KII during long-term potentiation." Science **276**(5321): 2042-5.
- Bashir, Z. I., D. E. Jane, et al. (1993). "Metabotropic glutamate receptors contribute to the induction of long-term depression in the CA1 region of the hippocampus." Eur J Pharmacol **239**(1-3): 265-6.
- Bassell, G. J., Y. Oleynikov, et al. (1999). "The travels of mRNAs through all cells large and small." Faseb J **13**(3): 447-54.
- Bear, M. F. and A. Kirkwood (1993). "Neocortical long-term potentiation." Curr Opin Neurobiol **3**(2): 197-202.
- Bear, M. F. and R. C. Malenka (1994). "Synaptic plasticity: LTP and LTD." Curr Opin Neurobiol **4**(3): 389-99.
- Berger, S. L. (2002). "Histone modifications in transcriptional regulation." Curr Opin Genet Dev **12**(2): 142-8.
- Biasini, F., L. Grupe, et al. (1999). Mental Retardation: A Symptom and a Syndrom. New York, Oxford University Press.
- Bliss, T. V. and G. L. Collingridge (1993). "A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus." Nature **361**(6407): 31-9.
- Boettner, B. and L. Van Aelst (2002). "The role of Rho GTPases in disease development." Gene **286**(2): 155-74.
- Bonhoeffer, T. and R. Yuste (2002). "Spine motility. Phenomenology, mechanisms, and function." Neuron **35**(6): 1019-27.
- Bonini, N. M. and M. E. Fortini (2003). "Human neurodegenerative disease modeling using *Drosophila*." Annu Rev Neurosci **26**: 627-56.
- Brown, V., P. Jin, et al. (2001). "Microarray identification of FMRP-associated brain mRNAs and altered mRNA translational profiles in fragile X syndrome." Cell **107**: 12-20.
- Brown, V., K. Small, et al. (1998). "Purified recombinant Fmrp exhibits selective RNA binding as an intrinsic property of the fragile X mental retardation protein." J.Biol.Chem. **273**: 15521-15527.
- Brunberg, J. A., S. Jacquemont, et al. (2002). "Fragile X premutation carriers: characteristic MR imaging findings of adult male patients with progressive cerebellar and cognitive dysfunction." AJNR Am J Neuroradiol **23**(10): 1757-66.
- Buccione, R., J. D. Orth, et al. (2004). "Foot and mouth: podosomes, invadopodia and circular dorsal ruffles." Nat Rev Mol Cell Biol **5**(8): 647-57.

- Burd, C. G. and G. Dreyfuss (1994). "Conserved structures and diversity of functions of RNA-binding proteins." Science **265**(5172): 615-21.
- Cammalleri, M., R. Lutfens, et al. (2003). "Time-restricted role for dendritic activation of the mTOR-p70S6K pathway in the induction of late-phase long-term potentiation in the CA1." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(24): 14368-73.
- Carroll, R. C., E. C. Beattie, et al. (2001). "Role of AMPA receptor endocytosis in synaptic plasticity." Nat Rev Neurosci **2**(5): 315-24.
- Carroll, R. C., E. C. Beattie, et al. (1999). "Dynamin-dependent endocytosis of ionotropic glutamate receptors." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(24): 14112-7.
- Carvalho, T., F. Almeida, et al. (1999). "The spinal muscular atrophy disease gene product, SMN: A link between snRNP biogenesis and the Cajal (coiled) body." J Cell Biol **147**(4): 715-28.
- Caudy, A. A., M. Myers, et al. (2002). "Fragile X-related protein and VIG associate with the RNA interference machinery." Genes Dev **16**(19): 2491-6.
- Ceman, S., V. Brown, et al. (1999). "Isolation of an FMRP-associated messenger ribonucleoprotein particle and identification of nucleolin and the fragile X related proteins as components of the complex." Molecular and Cellular Biology **19**: 7925-7932.
- Ceman, S., R. Nelson, et al. (2000). "Identification of mouse YB1/p50 as a component of the FMRP -associated mRNP particles." B.B.R.C. **279**: 904-908.
- Ceman, S., W. T. O'Donnell, et al. (2003). "Phosphorylation influences the translation state of FMRP-associated polyribosomes." Hum Mol Genet **12**(24): 3295-305.
- Chelly, J. (2000). "Retards mentaux liés au chromosome X." medecine/sciences **16**: 363-372.
- Chelly, J. and J. L. Mandel (2001). "Monogenic causes of X-linked mental retardation." Nature Review **2**: 669-679.
- Chen, L. and M. Toth (2001). "Fragile X mice develop sensory hyperreactivity to auditory stimuli." Neuroscience **103**(4): 1043-50.
- Chiurazzi, P., M. G. Pomponi, et al. (1999). "Synergistic effect of histone hyperacetylation and DNA demethylation in the reactivation of the FMR1 gene." Hum Mol Genet **8**(12): 2317-23.
- Chiurazzi, P., M. G. Pomponi, et al. (1998). "In vitro reactivation of the FMR1 gene involved in fragile X syndrome." Human Molecular Genetics **7**: 109-113.

- Chuang, S. C., W. Zhao, et al. (2005). "Prolonged epileptiform discharges induced by altered group I metabotropic glutamate receptor-mediated synaptic responses in hippocampal slices of a fragile X mouse model." J Neurosci **25**(35): 8048-55.
- Coffee, B., F. Zhang, et al. (2002). "Histone modifications depict an aberrantly heterochromatinized FMR1 gene in fragile x syndrome." Am J Hum Genet **71**(4): 923-32.
- Coffee, B., F. Zhang, et al. (1999). "Acetylated histones are associated with FMR1 in normal but not fragile X-syndrome cells." Nat Genet **22**(1): 98-101.
- Colicos, M. A., B. E. Collins, et al. (2001). "Remodeling of synaptic actin induced by photoconductive stimulation." Cell **107**(5): 605-16.
- Collingridge, G. (1987). "Synaptic plasticity. The role of NMDA receptors in learning and memory." Nature **330**(6149): 604-5.
- Comery, T. A., J. B. Harris, et al. (1997). "Abnormal dendritic spines in fragile X knockout mice: maturation and pruning deficits." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **94**: 5401-5404.
- Committee on Genetics of American Academy of Pediatrics (1996). "Health supervision for children with fragile X syndrome." Pediatrics **98**: 297-300.
- Consortium, D.-B. F. X. (1994). "FMR1 knock-out mice: a model to study fragile X mental retardation." Cell **78**: 7101-7106.
- Cooley, L., E. Verheyen, et al. (1992). "chickadee encodes a profilin required for intercellular cytoplasm transport during Drosophila oogenesis." Cell **69**(1): 173-84.
- Cooper, J. A. and D. A. Schafer (2000). "Control of actin assembly and disassembly at filament ends." Curr Opin Cell Biol **12**(1): 97-103.
- Corbin, F., M. Bouillon, et al. (1997). "The fragile X mental retardation protein is associated with poly(A)⁺ mRNA in actively translating polyribosomes." Human Molecular Genetics **6**: 1465-1472.
- Cox, R. D. and S. D. Brown (2003). "Rodent models of genetic disease." Curr Opin Genet Dev **13**(3): 278-83.
- Cristofanilli, M., A. Iacoangeli, et al. (2006). "Neuronal BC1 RNA: microtubule-dependent dendritic delivery." J Mol Biol **356**(5): 1118-23.
- Cummings, C. J. and H. Y. Zoghbi (2000). "Trinucleotide repeats: mechanisms and pathophysiology." Annu Rev Genomics Hum Genet **1**: 281-328.

- Darnell, J. C., C. E. Fraser, et al. (2005). "Kissing complex RNAs mediate interaction between the Fragile-X mental retardation protein KH2 domain and brain polyribosomes." Genes Dev **19**(8): 903-18.
- Darnell, J. C., K. B. Jensen, et al. (2001). "Fragile X Mental retardation Protein targets G quartet mRNAs important for neuronal function." Cell **107**: 1-11.
- Davidovic, L., E. Bechara, et al. (2006). "The nuclear MicroSpherule protein 58 is a novel RNA-binding protein that interacts with fragile X mental retardation protein in polyribosomal mRNPs from neurons." Hum Mol Genet **15**(9): 1525-38.
- Dawe, H. R., L. S. Minamide, et al. (2003). "ADF/Cofilin controls cell polarity during fibroblast migration." Curr. Biol. **13**: 252-257.
- De Boulle, K., A. J. M. H. Verkerk, et al. (1993). "A point mutation in the FMR-1 gene associated with fragile X mental retardation." Nature Genet. **3**: 31-35.
- De Diego Otero, Y., C. E. Bakker, et al. (2000). "Immunocytochemical characterization of FMRP, FXR1P and FXR2P during embryonic development in the mouse." Gene Funct. Dis. **1**: 28-37.
- De Diego Otero, Y., L.-A. Severijnen, et al. (2002). "Transport of Fragile X Mental Retardation Protein via granules in neurites of PC12 cells." Mol.Cell.Biol. **22**: 8332-8341.
- Denman, R. B. (2002). "Methylation of the arginine-glycine-rich region in the fragile X mental retardation protein FMRP differentially affects RNA binding." Cell Mol Biol Lett **7**(3): 877-83.
- Devys, D., V. Biancalana, et al. (1992). "Analysis of full fragile X mutations in fetal tissues and monozygotic twins indicate that abnormal methylation and somatic heterogeneity are established early in development." Am J Med Genet **43**(1-2): 208-16.
- Devys, D., Y. Lutz, et al. (1993). "The FMR-1 protein is cytoplasmic, most abundant in neurons and appears normal in carriers of a fragile X premutation." Nature Genetics **4**: 335-340.
- Dharmawardhane, S., L. C. Sanders, et al. (1997). "Localization of p21-activated kinase 1 (PAK1) to pinocytic vesicles and cortical actin structures in stimulated cells." J Cell Biol **138**(6): 1265-78.
- Dharmawardhane, S., A. Schürmann, et al. (2000). "Regulation of macropinocytosis by p21-activated kinase-1." Mol. Biol. Cell. **11**: 3341-3352.
- Didry, D., M. F. Carlier, et al. (1998). "Synergy between actin depolymerizing factor/cofilin and profilin in increasing actin filament turnover." J Biol Chem **273**(40): 25602-11.

- Dobkin, C., A. Rabe, et al. (2000). "Fmr1 knockout mouse has a distinctive strain-specific learning impairment." Neuroscience **100**(2): 423-429.
- Dockendorff, T. C., H. S. Su, et al. (2002). "Drosophila lacking dfmr1 activity show defects in circadian output and fail to maintain courtship interest." Neuron **34**(6): 973-84.
- Dolzanskaya, N., G. Merz, et al. (2006). "Methylation regulates the intracellular protein-protein and protein-RNA interactions of FMRP." J Cell Sci **119**(Pt 9): 1933-46.
- Dreyfuss, G., V. N. Kim, et al. (2002). "Messenger-RNA-binding proteins and the messages they carry." Nat Rev Mol Cell Biol **3**(3): 195-205.
- Dudek, S. M. and M. F. Bear (1993). "Bidirectional long-term modification of synaptic effectiveness in the adult and immature hippocampus." J Neurosci **13**(7): 2910-8.
- Dunaevsky, A., A. Tashiro, et al. (1999). "Developmental regulation of spine motility in the mammalian central nervous system." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(23): 13438-43.
- Eberhart, D. E., Y. Feng, et al. (1995). "Identification of a cytoplasmic anchor domain responsible for the subcellular localization of the fragile X mental retardation protein, FMRP." American Journal of Human Genetics **57**: A39-196.
- Eberhart, D. E., H. E. Malter, et al. (1996). "The Fragile X mental retardation protein is a ribonucleoprotein containing both nuclear localization and nuclear export signals." Human Molecular Genetics **5**: 1083-1091.
- Eden, S., R. Rohatgi, et al. (2002). "Mechanism of regulation of WAVE1-induced actin nucleation by Rac1 and Nck." Nature **418**(6899): 790-3.
- Edwards, K. A., R. A. Montague, et al. (1994). "Identification of Drosophila cytoskeletal proteins by induction of abnormal cell shape in fission yeast." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(10): 4589-93.
- Egger, G., G. Liang, et al. (2004). "Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy." Nature **429**(6990): 457-63.
- Eichler, E. E., S. Richards, et al. (1993). "Fine structure of the human FMR1 gene." Hum. Mol. Genet. **2**: 1147-1153.
- Endo, M., K. Ohashi, et al. (2003). "Control of growth cone motility and morphology by LIM kinase and Slingshot via phosphorylation and dephosphorylation of cofilin." J Neurosci **23**(7): 2527-37.
- Endris, V., B. Wogatzky, et al. (2002). "The novel Rho-GTPase activating gene MEGAP/srGAP3 has a putative role in severe mental retardation." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(18): 11754-9.

- Engert, F. and T. Bonhoeffer (1999). "Dendritic spine changes associated with hippocampal long-term synaptic plasticity." Nature **399**(6731): 66-70.
- Etienne-Manneville, S. and A. Hall (2002). "Rho GTPases in cell biology." Nature **420**(6916): 629-35.
- Faucherre, A., P. Desbois, et al. (2005). "Lowe syndrome protein Ocr11 is translocated to membrane ruffles upon Rac GTPase activation: a new perspective on Lowe syndrome pathophysiology." Hum Mol Genet **14**(11): 1441-8.
- Faucherre, A., P. Desbois, et al. (2003). "Lowe syndrome protein OCRL1 interacts with Rac GTPase in the trans-Golgi network." Hum Mol Genet **12**(19): 2449-56.
- Feng, Y., D. Absher, et al. (1997). "FMRP associates with polyribosomes as an mRNP, and the I304N mutation of severe fragile X syndrome abolishes this association." Mol.Cell **1**: 109-118.
- Feng, Y., C. A. Gutekunst, et al. (1997). "Fragile X mental retardation protein: nucleocytoplasmic shuttling and association with somatodendritic ribosomes." Journal of Neuroscience **17**: 1539-1547.
- Fiala, J. C., M. Feinberg, et al. (1998). "Synaptogenesis via dendritic filopodia in developing hippocampal area CA1." J Neurosci **18**(21): 8900-11.
- Fields, S. and O. Song (1989). "A novel genetic system to detect protein-protein interactions." Nature **340**(6230): 245-6.
- Fischer, M., S. Kaech, et al. (1998). "Rapid actin-based plasticity in dendritic spines." Neuron **20**(5): 847-54.
- Fleming, I. N., C. M. Elliott, et al. (1996). "Differential translocation of rho family GTPases by lysophosphatidic acid, endothelin-1, and platelet-derived growth factor." J Biol Chem **271**(51): 33067-73.
- Fonnum, F. (1984). "Glutamate: a neurotransmitter in mammalian brain." J Neurochem **42**(1): 1-11.
- Fortini, M. E., M. P. Skupski, et al. (2000). "A survey of human disease gene counterparts in the Drosophila genome." J Cell Biol **150**(2): F23-30.
- Francesconi, W., M. Cammalleri, et al. (2004). "The metabotropic glutamate receptor 5 is necessary for late-phase long-term potentiation in the hippocampal CA1 region." Brain Res **1022**(1-2): 12-8.
- Freeman, J. L., A. Abo, et al. (1996). "Rac "insert region" is a novel effector region that is implicated in the activation of NADPH oxidase, but not PAK65." J Biol Chem **271**(33): 19794-801.

- Fu, Y. H., D. P. Kuhl, et al. (1991). "Variation of the CGG repeat at the fragile X site results in genetic instability: resolution of the Sherman paradox." Cell **67**(6): 1047-58.
- Fukazawa, Y., Y. Saitoh, et al. (2003). "Hippocampal LTP is accompanied by enhanced F-actin content within the dendritic spine that is essential for late LTP maintenance in vivo." Neuron **38**: 447-460.
- Garcia, M. L. and D. W. Cleveland (2001). "Going new places with an old MAP: tau, microtubules and human neurodegenerative disease." Current Opinion in Cell Biology **13**: 41-48.
- Gedeon, A. K., E. Baker, et al. (1992). "Fragile X syndrome without CCG amplification has an FMR1 deletion." Nat Genet **1**(5): 341-4.
- Godfraind, J. M., E. Reyniers, et al. (1996). "Long-term potentiation in the hippocampus of fragile X knockout mice." Am J Med Genet **64**(2): 246-51.
- Goldberg, Y. (1999). "Protein Phosphatase 2A: who shall regulate the regulator?" Biochem. Pharmacol. **57**: 321-328.
- Goldstein, L. S. and Z. Yang (2000). "Microtubule-based transport systems in neurons: the roles of kinesins and dyneins." Annu Rev Neurosci **23**: 39-71.
- Gordon-Weeks, P. R. and I. Fischer (2000). "MAP1B expression and microtubules stability in Growing and regenerating axons." Microscopy Research and Technique **48**: 63-74.
- Govek, E. E., S. E. Newey, et al. (2004). "The X-linked mental retardation protein oligophrenin-1 is required for dendritic spine morphogenesis." Nat Neurosci **7**(4): 364-72.
- Greco, C. M., R. J. Hagerman, et al. (2002). "Neuronal intranuclear inclusions in a new cerebellar tremor/ataxia syndrome among fragile X carriers." Brain **125**(Pt 8): 1760-71.
- Greengard, P., J. Jen, et al. (1991). "Enhancement of the glutamate response by cAMP-dependent protein kinase in hippocampal neurons." Science **253**(5024): 1135-8.
- Greenough, W. T., A. Y. Klintsova, et al. (2001). "Synaptic regulation of protein synthesis and the fragile X protein." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **98**: 7101-7106.
- Grossman, A. W., N. M. Elisseou, et al. (2006). "Hippocampal pyramidal cells in adult Fmr1 knockout mice exhibit an immature-appearing profile of dendritic spines." Brain Res.
- Guduric-Fuchs, J., F. Mohrlen, et al. (2004). "A fragile X mental retardation-like gene in a cnidarian." Gene **343**(2): 231-8.

- Gungabissoon, R. A. and J. R. Bamberg (2003). "Regulation of growth cone actin dynamics by ADF/cofilin." J. Histo. & Cytochem. **51**: 411-420.
- Gunsalus, K. C., S. Bonaccorsi, et al. (1995). "Mutations in twinstar, a Drosophila gene encoding a cofilin/ADF homologue, result in defects in centrosome migration and cytokinesis." J Cell Biol **131**(5): 1243-59.
- Hagerman, P. J. and R. J. Hagerman (2004). "Fragile X-associated tremor/ataxia syndrome (FXTAS)." Ment Retard Dev Disabil Res Rev **10**(1): 25-30.
- Hagerman, R. J. (1987). "Fragile X syndrome." Curr Probl Pediatr **17**(11): 621-74.
- Hagerman, R. J. and A. Cronister (1996). Fragile X Syndrome: Diagnosis, Treatment and Research. Baltimore, Johns Hopkins University Press.
- Hagerman, R. J. and P. J. Hagerman (2002). Fragile X Syndrome: Diagnosis, Treatment, and Research. Baltimore, John Hopkins University Press.
- Hall, A. (1994). "Small GTP-binding proteins and the regulation of the actin cytoskeleton." Annu Rev Cell Biol **10**: 31-54.
- Hall, A. (1998). "Rho GTPase and actin cytoskeleton." Science **279**: 509-514.
- Hedberg, K. M., T. Bengtsson, et al. (1993). "PDGF and neomycin induce similar changes in the actin cytoskeleton in human fibroblasts." Cell Motil Cytoskeleton **24**: 139-149.
- Heriche, J. K., F. Lebrin, et al. (1997). "Regulation of protein phosphatase 2A by direct interaction with casein kinase 2alpha." Science **276**(5314): 952-5.
- Hering, H. and M. Sheng (2001). "Dendritic spines: structure, dynamics and regulation." Nat Rev Neurosci **2**(12): 880-8.
- Hernandez-Verdun, D., P. Roussel, et al. (2002). "Emerging concepts of nucleolar assembly." J Cell Sci **115**(Pt 11): 2265-70.
- Hill, M. A., L. Schedlich, et al. (1994). "Serum-induced signal transduction determines the peripheral location of beta-actin mRNA within the cell." J Cell Biol **126**(5): 1221-9.
- Hinton, V. J., W. T. Brown, et al. (1991). "Analysis of neocortex in three males with the fragile X syndrome." American Journal of Medical Genetics **41**: 289-294.
- Hoogenraad, C. C., A. Akhmanova, et al. (2004). "LIMK1 and CLIP-115: linking cytoskeletal defects to Williams syndrome." Bioessays **26**(2): 141-50.
- Hu, C. D., Y. Chinenov, et al. (2002). "Visualization of interactions among bZIP and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation." Mol Cell **9**(4): 789-98.
- Huang, E. P. (1997). "Synaptic plasticity: a role for nitric oxide in LTP." Curr Biol **7**(3): R141-3.

- Huang, S. (2000). "Review: perinucleolar structures." J Struct Biol **129**(2-3): 233-40.
- Huber, K. M., S. Gallagher, et al. (2002). "Altered synaptic plasticity in a mouse model of fragile X mental retardation." Proc Natl Acad Sci USA **99**: 7746-7750.
- Huber, K. M., M. S. Kayser, et al. (2000). "Role for rapid dendritic protein synthesis in hippocampal mGluR-dependent long-term depression." Science **288**(5469): 1254-7.
- Huot, M. E., R. Mazroui, et al. (2001). "Developmental expression of the fragile X-related 1 proteins in mouse testis: association with microtubule elements." Hum Mol Genet **10**(24): 2803-11.
- Imbert, G., Y. Feng, et al. (1998). FMR1 and mutations in Fragile X syndrome: molecular biology, biochemistry, and genetics. Genetic Instabilities and Hereditary Neurological Diseases. S. T. Warren and R. D. Wells, Academic Press: 27-53.
- Irwin, S. A., M. Idupulapati, et al. (2002). "Dendritic spine and dendritic field characteristics of layer V pyramidal neurons in the visual cortex of fragile-X knockout mice." Am J Med Genet **111**(2): 140-6.
- Ishizuka, A., M. C. Siomi, et al. (2002). "A Drosophila fragile X protein interacts with components of RNAi and ribosomal proteins." Genes Dev **16**(19): 2497-508.
- Ito, M. (2001). "Cerebellar long-term depression: characterization, signal transduction, and functional roles." Physiol Rev **81**(3): 1143-95.
- Ito, M., M. Sakurai, et al. (1982). "Climbing fibre induced depression of both mossy fibre responsiveness and glutamate sensitivity of cerebellar Purkinje cells." J Physiol **324**: 113-34.
- Iwahashi, C. K., D. H. Yasui, et al. (2006). "Protein composition of the intranuclear inclusions of FXTAS." Brain **129**(Pt 1): 256-71.
- Janssens, V. and J. Goris (2001). "Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling." Biochem J **353**(Pt 3): 417-39.
- Jaramillo-Babb, V. L., J. L. Sugarmans, et al. (1996). "Positive regulation of cdc2 gene activity by protein phosphatase type 2A." J Biol Chem **271**(11): 5988-92.
- Jin, P., R. S. Alisch, et al. (2004). "RNA and microRNAs in fragile X mental retardation." Nat Cell Biol **6**(11): 1048-53.
- Jin, P., D. C. Zarnescu, et al. (2004). "Biochemical and genetic interaction between the fragile X mental retardation protein and the microRNA pathway." Nat. Neurosci. **7**: 113-117.
- Joneson, T. and D. Bar-Sagi (1998). "A Rac1 effector site controlling mitogenesis through superoxide production." J Biol Chem **273**(29): 17991-4.

- Kalil, K. and E. W. Dent (2005). "Touch and go: guidance cues signal to the growth cone cytoskeleton." Curr Opin Neurobiol **15**(5): 521-6.
- Kandel, E., J. Schwartz, et al. (2000). Principles of Neural Science. New York.
- Kandel, E. R. (2001). "The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses." Science **294**(5544): 1030-8.
- Kaufmann, W. E. and H. W. Moser (2000). "Dendritic anomalies in disorders associated with mental retardation." Cereb Cortex **10**(10): 981-91.
- Khandjian, E. W., F. Corbin, et al. (1996). "The fragile X mental retardation protein is associated with ribosomes." Nature Genetics **12**: 91-93.
- Khandjian, E. W., A. Fortin, et al. (1995). "A heterogeneous set of FMR1 proteins is widely distributed in mouse tissues and is modulated in cell culture." Human Molecular Genetics **4**: 783-789.
- Kiledjian, M. and G. Dreyfuss (1992). "Primary structure and binding activity of the hnRNP U protein: binding RNA through RGG box." EMBO Journal **11**: 2655-2664.
- Kirkwood, A. and M. F. Bear (1994). "Homosynaptic long-term depression in the visual cortex." J Neurosci **14**(5 Pt 2): 3404-12.
- Kirkwood, A., S. M. Dudek, et al. (1993). "Common forms of synaptic plasticity in the hippocampus and neocortex in vitro." Science **260**(5113): 1518-21.
- Kislauskis, E. H., Z. Li, et al. (1993). "Isoform-specific 3'-untranslated sequences sort alpha-cardiac and beta-cytoplasmic actin messenger RNAs to different cytoplasmic compartments." J Cell Biol **123**(1): 165-72.
- Kislauskis, E. H., X. Zhu, et al. (1997). "beta-Actin messenger RNA localization and protein synthesis augment cell motility." J Cell Biol **136**(6): 1263-70.
- Klumpp, S., A. Maurer, et al. (2004). "Protein kinase CK2 phosphorylates BAD at threonine-117." Neurochem Int **45**(5): 747-52.
- Kobayashi, K., S. Kuroda, et al. (1998). "p140Sra-1 (specifically Rac1-associated protein) is a novel specific target for Rac1 small GTPase." J. Biol. Chem. **273**: 291-295.
- Koberna, K., J. Malinsky, et al. (2002). "Ribosomal genes in focus: new transcripts label the dense fibrillar components and form clusters indicative of "Christmas trees" in situ." J Cell Biol **157**(5): 743-8.
- Kooy, R. F., R. D'Hooge, et al. (1996). "Transgenic mouse model for the fragile X syndrome." Am J Med Genet **64**(2): 241-5.

- Kooy, R. F., E. Reyniers, et al. (1999). "Neuroanatomy of the fragile X knockout mouse brain studied using in vivo high resolution magnetic resonance imaging." Eur J Hum Genet **7**(5): 526-32.
- Kozma, R., S. Ahmed, et al. (1995). "The Ras-related protein Cdc42Hs and bradykinin promote formation of peripheral actin microspikes and filopodia in Swiss 3T3 fibroblasts." Mol Cell Biol **15**(4): 1942-52.
- Krawczun, M. S., E. C. Jenkins, et al. (1985). "Analysis of the fragile-X chromosome: localization and detection of the fragile site in high resolution preparations." Hum Genet **69**(3): 209-11.
- Kraynov, V. S., C. Chamberlain, et al. (2000). "Localized Rac activation dynamics visualized in living cells." Science **290**: 333-337.
- Kremer, E. J., M. Pritchard, et al. (1991). "Mapping of DNA instability at the fragile X to a trinucleotide repeat sequence p(CCG)n." Science **252**(5013): 1711-4.
- Krucker, T., G. R. Siggins, et al. (2000). "Dynamic actin filaments are required for stable long-term potentiation (LTP) in area CA1 of the hippocampus." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(12): 6856-61.
- Krayer, H., M. Mila, et al. (1994). "Fragile X syndrome and the (CGG)n mutation: two families with discordant MZ twins." Am J Hum Genet **54**(3): 437-42.
- Kunda, P., G. Craig, et al. (2003). "Abi, Sra, and Kette control the stability and localization of SCAR/WAVE to regulate the formation of actin-based protrusions." Curr Biol **13**: 1867-1875.
- Kunst, C. B. and S. T. Warren (1994). "Cryptic and polar variation of the fragile X repeat could result in predisposing normal alleles." Cell **77**(6): 853-61.
- Kutsche, K., H. Yntema, et al. (2000). "Mutations in ARHGEF6, encoding a guanine nucleotide exchange factor for Rho GTPases, in patients with X-linked mental retardation." Nat Genet **26**(2): 247-50.
- Laggerbauer, B., D. Ostareck, et al. (2001). "Evidence that fragile X mental retardation protein is a negative regulator of translation." Hum.Mol.Genet. **10**: 329-338.
- Lawrence, J. B. and R. H. Singer (1986). "Intracellular localization of messenger RNAs for cytoskeletal proteins." Cell **45**(3): 407-15.
- Lebel, R. R., M. May, et al. (2002). "Non-syndromic X-linked mental retardation associated with a missense mutation (P312L) in the FGD1 gene." Clin Genet **61**(2): 139-45.

- Lebrin, F., L. Bianchini, et al. (1999). "CK2alpha-protein phosphatase 2A molecular complex: possible interaction with the MAP kinase pathway." Mol Cell Biochem **191**(1-2): 207-12.
- Lechward, K., O. S. Awotunde, et al. (2001). "Protein phosphatase 2A: variety of forms and diversity of functions." Acta Biochim Pol **48**(4): 921-33.
- LeVay, S., T. N. Wiesel, et al. (1980). "The development of ocular dominance columns in normal and visually deprived monkeys." J Comp Neurol **191**(1): 1-51.
- Li, J., M. R. Pelletier, et al. (2002). "Reduced cortical synaptic plasticity and GluR1 expression associated with Fragile X Mental Retardation Protein deficiency." Mol. Cell. Neurosci. **19**: 138-151.
- Li, Z., L. Van Aelst, et al. (2000). "Rho GTPases regulate distinct aspects of dendritic arbor growth in *Xenopus* central neurons in vivo." Nat Neurosci **3**(3): 217-25.
- Li, Z., Y. Zhang, et al. (2001). "The fragile X mental retardation protein inhibits translation via interacting with mRNA." Nucleic Acids Research **29**(11): 2276-83.
- Lim, J. H., A. B. Booker, et al. (2005). Towards an understanding of fragile X gene regulation in the brain, Research Signpost.
- Linden, D. J., M. H. Dickinson, et al. (1991). "A long-term depression of AMPA currents in cultured cerebellar Purkinje neurons." Neuron **7**(1): 81-9.
- Liu, Q. and G. Dreyfuss (1996). "A novel nuclear structure containing the survival of motor neurons protein." Embo J **15**(14): 3555-65.
- Lu, R., H. Wang, et al. (2004). "The fragile X protein controls microtubules-associated protein 1B translation and microtubule stability in brain neuron development." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **101**: 15201-15206.
- Lu, Y. M., Z. Jia, et al. (1997). "Mice lacking metabotropic glutamate receptor 5 show impaired learning and reduced CA1 long-term potentiation (LTP) but normal CA3 LTP." J Neurosci **17**(13): 5196-205.
- Lugenbeel, K. A., A. M. Peier, et al. (1995). "Intragenic loss of function mutations demonstrate the primary role of FMR1 in fragile X syndrome." Nat Genet **10**(4): 483-5.
- Lugli, G., J. Larson, et al. (2005). "Dicer and eIF2c are enriched at postsynaptic densities in adult mouse brain and are modified by neuronal activity in a calpain-dependent manner." J Neurochem **94**(4): 896-905.
- Luo, L. (2000). "Rho GTPases in neuronal morphogenesis." Nat Rev Neurosci **1**(3): 173-80.

- Luo, L. (2002). "Actin Cytoskeleton Regulation in Neuronal Morphogenesis and Structural Plasticity." Annu Rev Cell Dev Biol **3**: 3.
- Luo, L., T. K. Hensch, et al. (1996). "Differential effects of the Rac GTPase on Purkinje cell axons and dendritic trunks and spines." Nature **379**: 837-840.
- Lynch, G., J. Larson, et al. (1983). "Intracellular injections of EGTA block induction of hippocampal long-term potentiation." Nature **305**(5936): 719-21.
- Malenka, R. C. (1994). "Synaptic plasticity in the hippocampus: LTP and LTD." Cell **78**(4): 535-8.
- Martin, J. P. and J. Bell (1943). "A pedigree of mental defect showing sex linkage." J Neurol Psychiatrie **6**: 154-157.
- Matera, A. G. and M. R. Frey (1998). "Coiled bodies and gems: Janus or gemini?" Am J Hum Genet **63**(2): 317-21.
- Matus, A. (2000). "Actin-based plasticity in dendritic spines." Science **290**(5492): 754-8.
- Maul, G. G., D. Negorev, et al. (2000). "Review: properties and assembly mechanisms of ND10, PML bodies, or PODs." J Struct Biol **129**(2-3): 278-87.
- Mazroui, R., M. E. Huot, et al. (2003). "Fragile X Mental Retardation protein determinants required for its association with polyribosomal mRNPs." Hum Mol Genet **12**(23): 3087-96.
- Mazroui, R., M. E. Huot, et al. (2002). "Trapping of messenger RNA by Fragile X Mental Retardation protein into cytoplasmic granules induces translation repression." Hum Mol Genet **11**(24): 3007-17.
- McBride, S. M., C. H. Choi, et al. (2005). "Pharmacological rescue of synaptic plasticity, courtship behavior, and mushroom body defects in a Drosophila model of fragile X syndrome." Neuron **45**(5): 753-64.
- Meberg, P. J. and J. R. Bamberg (2000). "Increase in neurite outgrowth mediated by overexpression of actin depolymerizing factor." J. Neurosci. **20**: 2459-2469.
- Meng, Y., Y. Zhang, et al. (2002). "Abnormal spine morphology and enhanced LTP in LIMK-1 knockout mice." Neuron **35**(1): 121-33.
- Mientjes, E. J., I. Nieuwenhuizen, et al. (2006). "The generation of a conditional Fmr1 knock out mouse model to study Fmrp function in vivo." Neurobiol Dis **21**(3): 549-55.
- Mingle, L. A., N. N. Okuhama, et al. (2005). "Localization of all seven messenger RNAs for the actin-polymerization nucleator Arp2/3 complex in the protrusions of fibroblasts." Journal of Cell Science **118**: 2425-2433.

- Miyashiro, K. Y., A. Beckel-Mitchener, et al. (2003). "RNA Cargoes Associating with FMRP Reveal Deficits in Cellular Functioning in Fmr1 Null Mice." Neuron **37**(3): 417-31.
- Morales, J., P. R. Hiesinger, et al. (2002). "Drosophila fragile X protein, DFXR, regulates neuronal morphology and function in the brain." Neuron **34**(6): 961-72.
- Moric-Petrovic, S. and Z. Laca (1983). "A father and daughter with fragile X chromosome." J Med Genet **20**(6): 476.
- Morris, R. G., E. Anderson, et al. (1986). "Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5." Nature **319**(6056): 774-6.
- Moss, S. J., C. D. Blackstone, et al. (1993). "Phosphorylation of recombinant non-NMDA glutamate receptors on serine and tyrosine residues." Neurochem Res **18**(1): 105-10.
- Moutou, C., M.-C. Vincent, et al. (1997). "Transition from premutation to full mutation in fragile X syndrome is likely to be prezygotic." Human Molecular Genetics **6**: 971-979.
- Mueller, B. K. (1999). "Growth cone guidance: first steps towards a deeper understanding." Annu Rev Neurosci **22**: 351-88.
- Mulkey RM, H. C., Malenka RC. (1993). "An essential role for protein phosphatases in hippocampal long-term depression." Science. **261**(5124): 1051-5.
- Mulkey, R. M. and R. C. Malenka (1992). "Mechanisms underlying induction of homosynaptic long-term depression in area CA1 of the hippocampus." Neuron **9**(5): 967-75.
- Murray, A., S. Youings, et al. (1996). "Population screening at the FRAXA and FRAXE loci: molecular analyses of boys with learning difficulties and their mothers." Hum Mol Genet **5**(6): 727-35.
- Musco, G., S. Stier, et al. (1996). "Three-dimensional structure and stability of the KH domain: Molecular insights into the fragile X syndrome." Cell **85**: 237-245.
- Musumeci, S. A., P. Bosco, et al. (2000). "Audiogenic seizures susceptibility in transgenic mice with fragile X syndrome." Epilepsia **41**(1): 19-23.
- Nakayama, A. Y., M. B. Harms, et al. (2000). "Small GTPases Rac and Rho in the maintenance of dendritic spines and branches in hippocampal pyramidal neurons." J Neurosci **20**(14): 5329-38.
- Neri, G. and J. M. Opitz (2000). "Sixty years of X-linked mental retardation: a historical footnote." Am J Med Genet **97**(3): 228-33.
- Nimnual, A. S., L. J. Taylor, et al. (2003). "Redox-dependent downregulation of Rho by Rac." Nat Cell Biol **5**(3): 236-41.

- Niwa, R., K. Nagata-Ohashi, et al. (2002). "Control of actin reorganization by Slingshot, a family of phosphatases that dephosphorylate ADF/cofilin." Cell **108**(2): 233-46.
- Oberlé, I., F. Rousseau, et al. (1991). "Instability of a 550-base pair DNA segment and abnormal methylation in fragile X syndrome." Science **252**: 1097-1102.
- Ogg, S. C. and A. I. Lamond (2002). "Cajal bodies and coilin--moving towards function." J Cell Biol **159**(1): 17-21.
- Ohashi, S., K. Koike, et al. (2002). "Identification of mRNA/protein (mRNP) complexes containing Puralpha, mStaufen, fragile X protein, and myosin Va and their association with rough endoplasmic reticulum equipped with a kinesin motor." J Biol Chem **277**(40): 37804-10.
- Ohta, Y., K. Kousaka, et al. (2003). "Differential activities, subcellular distribution and tissue expression patterns of three members of Slingshot family phosphatases that dephosphorylate cofilin." Genes Cells **8**(10): 811-24.
- O'Keefe, J. and J. Dostrovsky (1971). "The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat." Brain Res **34**(1): 171-5.
- Oostra, B. and P. J. Willems (1998). Murine Model of fragile X syndrome.
- Overton, J. (1967). "The fine structure of developing bristles in wild type and mutant *Drosophila melanogaster*." J Morphol **122**(4): 367-79.
- Ozawa, S., H. Kamiya, et al. (1998). "Glutamate receptors in the mammalian central nervous system." Prog Neurobiol **54**(5): 581-618.
- Papez, J. (1937). "A proposed mechanism of emotion." J Neuropsychiatry Clin Neurosci. **7**: 103-112.
- Paradee, W., H. E. Melikian, et al. (1999). "Fragile X mouse: strain effects of knockout phenotype and evidence suggesting deficient amygdala function." Neuroscience **94**(1): 185-92.
- Parnass, Z., A. Tashiro, et al. (2000). "Analysis of spine morphological plasticity in developing hippocampal pyramidal neurons." Hippocampus **10**(5): 561-8.
- Pieretti, M., F. P. Zhang, et al. (1991). "Absence of expression of the FMR-1 gene in fragile X syndrome." Cell **66**(4): 817-22.
- Pollard, T. D. (2002). "Cellular motility powered by actin filament assembly and disassembly." Harvey Lect **98**: 1-17.
- Pollard, T. D. and C. C. Beltzner (2002). "Structure and function of the Arp2/3 complex." Curr Opin Struct Biol **12**(6): 768-74.

- Pombo, A., P. Cuello, et al. (1998). "Regional and temporal specialization in the nucleus: a transcriptionally-active nuclear domain rich in PTF, Oct1 and PIKA antigens associates with specific chromosomes early in the cell cycle." Embo J **17**(6): 1768-78.
- Price, D., F. Zhang, et al. (1996). "The FMR1 gene of chicken is highly conserved and binds RNA in vitro." Genomics.
- Qin, M., J. Kang, et al. (2005). "Postadolescent changes in regional cerebral protein synthesis: an in vivo study in the FMR1 null mouse." J Neurosci **25**(20): 5087-95.
- Rackham, O. and C. M. Brown (2004). "Visualization of RNA-protein interactions in living cells: FMRP and IMP1 interact on mRNAs." Embo J **23**(16): 3346-55.
- Ramakers, G. J. (2002). "Rho proteins, mental retardation and the cellular basis of cognition." Trends Neurosci **25**(4): 191-9.
- Raska, I., L. E. Andrade, et al. (1991). "Immunological and ultrastructural studies of the nuclear coiled body with autoimmune antibodies." Exp Cell Res **195**(1): 27-37.
- Raymond, L. A., C. D. Blackstone, et al. (1993). "Phosphorylation and modulation of recombinant GluR6 glutamate receptors by cAMP-dependent protein kinase." Nature **361**(6413): 637-41.
- Reiss, A. L., L. Freund, et al. (1991). "Neuroanatomy in fragile X females: the posterior fossa." Am J Hum Genet **49**(2): 279-88.
- Reiss, A. L., J. Lee, et al. (1994). "Neuroanatomy of fragile X syndrome: the temporal lobe." Neurology **44**(7): 1317-24.
- Reiter, L. T., L. Potocki, et al. (2001). "A systematic analysis of human disease-associated gene sequences in Drosophila melanogaster." Genome Res **11**(6): 1114-25.
- Reyniers, E., L. Vits, et al. (1993). "The full mutation in the FMR-1 gene of male fragile X patients is absent in their sperm." Nat Genet **4**(2): 143-6.
- Ridley, A. J. (2001). "Rho GTPases and cell migration." J Cell Sci **114**(Pt 15): 2713-22.
- Ridley, A. J. (2001). "Rho proteins: linking signaling with membrane trafficking." Traffic **2**(5): 303-10.
- Ridley, A. J. and A. Hall (1992). "The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors." Cell **70**(3): 389-99.
- Ridley, A. J., H. F. Paterson, et al. (1992). "The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling." Cell **70**: 401-410.
- Ropers, H. H. and B. C. Hamel (2005). "X-linked mental retardation." Nat Rev Genet **6**(1): 46-57.

- Ross, A. F., Y. Oleynikov, et al. (1997). "Characterization of a beta-actin mRNA zipcode-binding protein." Mol Cell Biol **17**(4): 2158-65.
- Rousseau, F., D. Heitz, et al. (1991). "Selection in blood cells from female carriers of the fragile X syndrome: inverse correlation between age and proportion of active X chromosomes carrying the full mutation." J Med Genet **28**(12): 830-6.
- Samstag, Y. and G. Nebl (2003). "Interaction of cofilin with serinephosphatases PP1 and PP2A in normal and neoplastic human T lymphocytes." Adv.Enzyme Regul. **43**: 197-211.
- Schaeffer, C., B. Bardoni, et al. (2001). "The Fragile X mental retardation protein interacts specifically with its own mRNA via a purine-quartet structure." EMBO J. **20**: 4803-4813.
- Schaeffer, C., M. Beaulande, et al. (2003.). "The RNA binding protein FMRP: new connections and missing links." Biol. Cell **95**: 221-228.
- Schafer, D. A. (2002). "Coupling actin dynamics and membrane dynamics during endocytosis." Curr Opin Cell Biol **14**(1): 76-81.
- Schenck, A., B. Bardoni, et al. (2003). "CYFIP/Sra-1 Controls Neuronal Connectivity in Drosophila and Links the Rac1 GTPase Pathway to the Fragile X Protein." Neuron **38**(6): 887-98.
- Schenck, A., B. Bardoni, et al. (2001). "A highly conserved protein family interacting with the fragile X Mental Retardation Protein and displaying selective Interactions with the FMRP related proteins FXR1P and FXR2P." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **98**(15): 8844-9.
- Schenck, A., Qurashi A., et al. (2004). "WAVE/SCAR, a multifunctional complex coordinating different aspects of neuronal connectivity." Developmental Biology **in press**.
- Schenck, A., V. Van de Bor, et al. (2002). "Novel features of dFMR1, the Drosophila orthologue of Fragile X Mental Retardation Protein." Neurobiology of Disease **11**(1): 53-63.
- Serge, A., L. Furgeaud, et al. (2003). "Active surface transport of metabotropic glutamate receptors through binding to microtubules and actin flow." J Cell Sci **116**(Pt 24): 5015-22.
- Shaw, P. J. and E. G. Jordan (1995). "The nucleolus." Annu Rev Cell Dev Biol **11**: 93-121.
- Sheng, M. and S. H. Lee (2001). "AMPA receptor trafficking and the control of synaptic transmission." Cell **105**(7): 825-8.

- Sherman, S. (2000). "Premature ovarian failure among fragile X premutation carriers: parent-of-origin effect?" Am. J. Hum. Genet. **67**: 11-13.
- Sherman, S. L., P. A. Jacobs, et al. (1985). "Further segregation analysis of the fragile X syndrome with special reference to transmitting males." Hum Genet **69**(4): 289-99.
- Shestakova, E. A., R. H. Singer, et al. (2001). "The physiological significance of b-actin mRNA localization in determining cell polarity and directional motility." Proc Natl Acad Sci USA **98**: 7045-7050.
- Shtang, S., M. D. Perry, et al. (1999). "Search for a *Caenorhabditis elegans* FMR1 homologue: identification of a new putative RNA-binding protein (PRP-1) that hybridizes to the mouse FMR1 double K homology domain." Am J Med Genet **84**(3): 283-5.
- Siomi, H., M. Choi, et al. (1994). "Essential role for KH domains in RNA binding: impaired RNA binding by a mutation in the KH domain of FMR1 that causes fragile X syndrome." Cell **77**: 33-39.
- Siomi, H., M. J. Matunis, et al. (1993). "The pre-mRNA binding K protein contains a novel evolutionarily conserved motif." Nucleic Acids Res **21**(5): 1193-8.
- Siomi, H., M. C. Siomi, et al. (1993). "The protein product of the fragile X gene, FMR1, has characteristics of an RNA-binding protein." Cell **74**: 291-298.
- Siomi, M. C., K. Higashijima, et al. (2002). "Casein Kinase II phosphorylates the fragile X mental retardation protein and modulates its biological properties." Mol. Cell Biol. **22**: 8438-8447.
- Siomi, M. C., H. Siomi, et al. (1995). "FXR1, an autosomal homolog of the fragile X mental retardation gene." EMBO J. **14**: 2401-2408.
- Sittler, A., D. Devys, et al. (1996). "Alternative splicing of exon 14 determines nuclear or cytoplasmic localisation of fmr1 protein isoforms." Human Molecular Genetics **5**: 95-102.
- Slegtenhorst-Eegdeman, K. E., D. G. de Rooij, et al. (1998). "Macroorchidism in FMR1 knockout mice is caused by increased sertoli cell proliferation during testicular development." Endocrinology **139**: 156-163.
- Small, J. V. (1988). "The actin cytoskeleton." Electron Microsc Rev **1**(1): 155-74.
- Small, J. V. and G. P. Resch (2005). "The comings and goings of actin: coupling protrusion and retraction in cell motility." Curr Opin Cell Biol **17**(5): 517-23.
- Smeets, H. J., A. P. Smits, et al. (1995). "Normal phenotype in two brothers with a full FMR1 mutation." Hum Mol Genet **4**(11): 2103-8.

- Soosairajah, J., S. Maiti, et al. (2005). "Interplay between components of a novel LIM kinase-slingshot phosphatase complex regulates cofilin." Embo J **24**(3): 473-86.
- Spector, D. L. (2001). "Nuclear domains." J Cell Sci **114**(Pt 16): 2891-3.
- Spector, D. L., X. D. Fu, et al. (1991). "Associations between distinct pre-mRNA splicing components and the cell nucleus." Embo J **10**(11): 3467-81.
- Spencer, C. M., E. Serysheva, et al. (2006). "Exaggerated behavioral phenotypes in Fmr1/Fxr2 double knockout mice reveal a functional genetic interaction between Fragile X-related proteins." Hum Mol Genet.
- Steffen, A., K. Rottner, et al. (2004). "sra-1 and Nap1 link Rac to actin assembly driving lamellipodia formation." EMBO J. **23**: 749-759.
- Stoyanova, V. and A. T. Hoogeveen (2005). Fragile X syndrome : an epigenetic disease, Research Signpost.
- Sullivan, A. K., D. C. Crawford, et al. (2002). "Paternally transmitted FMR1 alleles are less stable than maternally transmitted alleles in the common and intermediate size range." Am J Hum Genet **70**(6): 1532-44.
- Sung, Y.-J., J. Conti, et al. (2000). "RNAs that interact with the fragile-X syndrome RNA binding protein FMRP." BBRC **275**: 973-980.
- Sung, Y. J., N. Dolzhanskaya, et al. (2003). "The fragile X mental retardation protein FMRP binds elongation factor 1A mRNA and negatively regulates its translation in vivo." J Biol Chem **278**(18): 15669-78.
- Sutherland, G. R. and E. Baker (1992). "Characterisation of a new rare fragile site easily confused with the fragile X." Hum Mol Genet **1**(2): 111-3.
- Suzukawa, K., K. Miura, et al. (2000). "Nerve growth factor-induced neuronal differentiation requires generation of Rac1-regulated reactive oxygen species." J Biol Chem **275**(18): 13175-8.
- Svitkina, T. M. and G. G. Borisy (1999). "Arp2/3 complex and actin depolymerizing factor/cofilin in dendritic organization and treadmilling of actin filament array in lamellipodia." J Cell Biol **145**(5): 1009-26.
- Tamanini, F., C. Bontekoe, et al. (1999). "Different targets for the fragile X related proteins revealed by distinct nuclear localization." Hum. Mol. Genet. **8**: 863-869.
- Tamanini, F., L. Kirkpatrick, et al. (2000). "The fragile X-related proteins FXR1P and FXR2P contain a functional nucleolar-targeting signal equivalent to the HIV-1 regulatory proteins." Hum.Mol.Genet. **9**(10): 1487-1493.

- Tamanini, F., R. Willemsen, et al. (1997). "Differential expression of FMR1, FXR1 and FXR2 proteins in human brain and testis." Human Molecular Genetics **6**: 1315-1322.
- Tan, S. E., R. J. Wenthold, et al. (1994). "Phosphorylation of AMPA-type glutamate receptors by calcium/calmodulin-dependent protein kinase II and protein kinase C in cultured hippocampal neurons." J Neurosci **14**(3 Pt 1): 1123-9.
- Tashiro, A. and R. Yuste (2003). "Structure and molecular organization of dendritic spines." Histol Histopathol **18**(2): 617-34.
- Tashiro, A. and R. Yuste (2004). "Regulation of dendritic spine motility and stability by Rac1 and Rho kinase: evidence for two forms of spine motility." Mol Cell Neurosci **26**(3): 429-40.
- Tassone, F., R. J. Hagerman, et al. (2000). "Fragile X males with unmethylated, full mutation trinucleotide repeat expansions have elevated levels of FMR1 messenger RNA." Am J Med Genet **94**(3): 232-6.
- Tassone, F., R. J. Hagerman, et al. (2000). "Elevated levels of FMR1 mRNA in carrier males: a new mechanism of involvement in the fragile-X syndrome." Am J Hum Genet **66**(1): 6-15.
- Tassone, F., R. J. Hagerman, et al. (2001). "A majority of fragile X males with methylated, full mutation alleles have significant levels of FMR1 messenger RNA." J Med Genet **38**(7): 453-6.
- Theriot, J. A. and T. J. Mitchison (1993). "The three faces of profilin." Cell **75**(5): 835-8.
- Tilney, L. G., P. S. Connelly, et al. (2003). "Actin filament turnover regulated by cross-linking accounts for the size, shape, location, and number of actin bundles in *Drosophila* bristles." Mol Biol Cell **14**(10): 3953-66.
- Tilney, L. G., P. S. Connelly, et al. (2004). "The role actin filaments play in providing the characteristic curved form of *Drosophila* bristles." Mol Biol Cell **15**(12): 5481-91.
- Tilney, L. G., P. S. Connelly, et al. (2000). "Actin filaments and microtubules play different roles during bristle elongation in *Drosophila*." J Cell Sci **113** (Pt 7): 1255-65.
- Tilney, L. G., P. S. Connelly, et al. (2000). "Regulation of actin filament cross-linking and bundle shape in *Drosophila* bristles." J Cell Biol **148**(1): 87-100.
- Tilney, L. G. and D. J. DeRosier (2005). "How to make a curved *Drosophila* bristle using straight actin bundles." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(52): 18785-92.
- Todd, P. K., K. J. Mack, et al. (2003). "The fragile X mental retardation protein is required for type-I metabotropic glutamate receptor-dependent translation of PSD-95." Proc Natl Acad Sci USA **100**: 14374-14378.

- Todd, P. K., J. S. Malter, et al. (2003). "Whisker stimulation-dependent translation of FMRP in the barrel cortex requires activation of type I metabotropic glutamate receptors." Brain Res Mol Brain Res **110**(2): 267-78.
- Toni, N., P. A. Buchs, et al. (1999). "LTP promotes formation of multiple spine synapses between a single axon terminal and a dendrite." Nature **402**(6760): 421-5.
- Trottier, Y., G. Imbert, et al. (1994). "Male with typical fragile X phenotype is deleted for part of the FMR1 gene and for about 100 kb of upstream region." Am J Med Genet **51**(4): 454-7.
- Turner, G., A. Daniel, et al. (1980). "X-linked mental retardation, macro-orchidism, and the Xq27 fragile site." J.Pediatr. **96**: 837-841.
- Turner, G., T. Webb, et al. (1996). "Prevalence of fragile X syndrome." Am J Med Genet **64**(1): 196-7.
- Turowski, P., T. Myles, et al. (1999). "Vimentin dephosphorylation by protein phosphatase 2A is modulated by the targeting subunit B55." Mol Biol Cell **10**(6): 1997-2015.
- Ulloa, L., V. Dombradi, et al. (1993). "Dephosphorylation of distinct sites on microtubule-associated protein MAP1B by protein phosphatases 1, 2A and 2B." FEBS Lett **330**(1): 85-9.
- Van Dam, D., R. D'Hooge, et al. (2000). "Spatial learning, contextual fear conditioning and conditioned emotional response in Fmr1 knockout mice." Behav Brain Res **117**(1-2): 127-36.
- van't Padje, S., B. Engels, et al. (2005). "Characterisation of Fmrp in zebrafish: evolutionary dynamics of the fmr1 gene." Dev Genes Evol **215**(4): 198-206.
- Verheyen, E. M. and L. Cooley (1994). "Profilin mutations disrupt multiple actin-dependent processes during Drosophila development." Development **120**(4): 717-28.
- Verkerk, A. J., E. de Graaff, et al. (1993). "Alternative splicing in the fragile X gene FMR1." Human Molecular Genetics **2**: 399-404.
- Verkerk, A. J. M. H., M. Pieretti, et al. (1991). "Identification of a gene (FMR-1) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome." Cell **65**: 905-914.
- Wadzinski, B. E., W. H. Wheat, et al. (1993). "Nuclear protein phosphatase 2A dephosphorylates protein kinase A-phosphorylated CREB and regulates CREB transcriptional stimulation." Mol Cell Biol **13**(5): 2822-34.

- Wan, L., T. C. Dockendorff, et al. (2000). "Characterization of dFMR1, a *Drosophila* *Melanogaster* homolog of the fragile X mental retardation protein." *MCB* **20**: 8536-8547.
- Wang, L. Y., B. A. Orser, et al. (1994). "Regulation of NMDA receptors in cultured hippocampal neurons by protein phosphatases 1 and 2A." *Nature* **369**(6477): 230-2.
- Wang, Y., W. Guo, et al. (1999). "Phosphorylation of CD45 by casein kinase 2. Modulation of activity and mutational analysis." *J Biol Chem* **274**(11): 7454-61.
- Warren, S. T., F. Zhang, et al. (1987). "The fragile X site in somatic cell hybrids: an approach for molecular cloning of fragile sites." *Science* **237**(4813): 420-3.
- Waterman-Storer, C. M., R. A. Worthyake, et al. (1999). "Microtubule growth activates Rac1 to promote lamellipodial protrusion in fibroblasts." *Nat Cell Biol* **1**(1): 45-50.
- Weiler, I. J., S. A. Irwin, et al. (1997). "Fragile X mental retardation protein is translated near synapses in response to neurotransmitter activation." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**: 5395-5400.
- Werner, E. (2004). "GTPases and reactive oxygen species: switches for killing and signaling." *J Cell Sci* **117**(Pt 2): 143-53.
- Willemsen, R., C. Bontekoe, et al. (1996). "Association of FMRP with ribosomal precursor particles in the nucleolus." *Biochem Biophys Res Commun* **225**(1): 27-33.
- Wolff, D. J., K. M. Gustashaw, et al. (1997). "Deletions in Xq26.3-q27.3 including FMR1 result in a severe phenotype in a male and variable phenotypes in females depending upon the X inactivation pattern." *Hum Genet* **100**(2): 256-61.
- Yakel, J. L., P. Vissavajhala, et al. (1995). "Identification of a Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II regulatory phosphorylation site in non-N-methyl-D-aspartate glutamate receptors." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(5): 1376-80.
- Yang, N., O. Higuchi, et al. (1998). "Cofilin phosphorylation by LIM-kinase 1 and its role in Rac-mediated actin reorganization." *Nature* **393**(6687): 809-12.
- Young, P. J., T. T. Le, et al. (2000). "The relationship between SMN, the spinal muscular atrophy protein, and nuclear coiled bodies in differentiated tissues and cultured cells." *Exp Cell Res* **256**(2): 365-74.
- Yu, S., M. Pritchard, et al. (1991). "Fragile X genotype characterized by an unstable region of DNA." *Science* **252**(5010): 1179-81.
- Zalfa, F., M. Giorgi, et al. (2003). "The fragile X syndrome protein FMRP associates with BC1 RNA and regulates the translation of specific mRNAs at synapses." *Cell* **112**(3): 317-27.

- Zemni, R., T. Bienvenu, et al. (2000). "A new gene involved in X-linked mental retardation identified by analysis of an X;2 balanced translocation." Nat Genet **24**(2): 167-70.
- Zhang, Y., J. P. O'Connor, et al. (1995). "The fragile X mental retardation syndrome protein interacts with novel homologs FXR1 and FXR2." EMBO J. **14**: 5358-5366.
- Zhang, Y. Q., A. M. Bailey, et al. (2001). "Drosophila Fragile X-related gene regulates MAP1B homolog Futsch to control synaptic structure and function." Cell **107**: 591-603.
- Zhang, Y. Q., H. J. G. Matthies, et al. (2004). "The Drosophila fragile X-related gene regulates axoneme differentiation during spermatogenesis." Developmental Biology **2004**: 290-307.
- Zhao, M. G., H. Toyoda, et al. (2005). "Deficits in trace fear memory and long-term potentiation in a mouse model for fragile X syndrome." J Neurosci **25**(32): 7385-92.
- Zhao, Z. S., E. Manser, et al. (1998). "A conserved negative regulatory region in alphaPAK: inhibition of PAK kinases reveals their morphological roles downstream of Cdc42 and Rac1." Mol Cell Biol **18**(4): 2153-63.
- Zheng, Y., D. J. Fischer, et al. (1996). "The faciogenital dysplasia gene product FGD1 functions as a Cdc42Hs-specific guanine-nucleotide exchange factor." J Biol Chem **271**(52): 33169-72.
- Zhou, Q., K. J. Homma, et al. (2004). "Shrinkage of dendritic spines associated with long-term depression of hippocampal synapses." Neuron **44**(5): 749-57.
- Zolnierowicz, S. (2000). "Type 2A Protein Phosphatase, the complex regulator of numerous signaling pathways." Biochem. Pharmacol. **60**: 1225-1235.

Listes des sites web

American Association on Mental Retardation :

http://www.aamr.org/Policies/faq_mental_retardation.shtml

Association Nationale du syndrome de l’X fragile :

http://www.xfra.org/article.php3?id_article=9

OMS :

<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs265/fr/>

The National Fragile X Foundation :

<http://www.fragilex.org/html/characteristics.htm>

Images :

Borisy Lab group :

<http://www.borisylab.northwestern.edu/>

Freshman Seminar :

<http://nook.cs.ucdavis.edu:8080/~koehl/Classes/Fresman/>

Kalil Lab :

<http://kalil.anatomy.wisc.edu/research.html>

Le cerveau à tous les niveaux :

<http://www.lecerveau.mcgill.ca/>

NCBI Homologene :

<http://www.ncbi.nih.gov/>

Synapse web :

<http://synapses.mcg.edu/>

Autres :

<http://www.tmd.ac.jpg/artsci.biol/textbook/cellmove.htm>

<http://micro.magnet.fsu.edu/cells/microfilaments.htm>

http://personalpages.manchester.ac.uk/staff/j.gough/lectures/the_cell/cytoskeleton/filopodia.jpg