



# **Enrichissement environnemental, performances cognitives et neurogenèse hippocampique adulte chez un modèle murin du syndrome de Coffin-Lowry**

Steeve Lunion

## **► To cite this version:**

Steeve Lunion. Enrichissement environnemental, performances cognitives et neurogenèse hippocampique adulte chez un modèle murin du syndrome de Coffin-Lowry. Neurosciences [q-bio.NC]. Université Paris Sud - Paris XI, 2014. Français. ⟨NNT : 2014PA11T034⟩. ⟨tel-02003618⟩

**HAL Id: tel-02003618**

**<https://theses.hal.science/tel-02003618v1>**

Submitted on 1 Feb 2019

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

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



HAL Authorization

FACULTE DE MEDECINE PARIS-SUD

UNIVERSITE PARIS 11

THESE DE DOCTORAT EN NEUROSCIENCES

Présentée par

Steeve LUNION

Le 09//07/2014

**Enrichissement environnemental, performances cognitives  
et neurogenèse hippocampique adulte chez un modèle  
murin du syndrome de Coffin-Lowry**

*Composition du jury:*

Rapporteurs : André Hanauer  
Pascal Rouillet

Examitatrice : Stéphanie Daumas

Président de jury : Hervé Daniel

Co-directeur de thèse : Serge Laroche

Co-directrice de thèse : Roseline Poirier

Préparée au

Centre de Neurosciences de Paris Sud, UMR CNRS 8195

Université Paris Sud 91405 ORSAY Cedex

Equipe « Mécanismes Cellulaires et Moléculaires de la Plasticité et de la Mémoire ».

"Nous estimons trop peu ce que nous obtenons trop aisément"  
**Thomas Paine**

"Les vrais savent, les novices apprendront"  
**Pilou**

"Si c'était à refaire, je me ferai plombier"  
**Albert Einsten**

"GRRRR"  
**Moi**

## REMERCIEMENTS

Je remercie le docteur Roseline Poirier, pour la disponibilité dont elle a fait preuve durant toute cette période malgré son emploi du temps chargé. Je la remercie tout particulièrement pour la ténacité dont elle a fait preuve pour mener à bien ce projet.

Je remercie le docteur Serge Laroche, en tant que directeur du CNPS qui m'a permis de réaliser ces travaux de recherches au sein de son laboratoire. En tant que directeur de thèse pour sa participation dans l'élaboration des différentes étapes du projet ainsi que pour sa diplomatie exceptionnelle que j'ai beaucoup appréciée.

Je remercie les membres du jury d'avoir accepté d'évaluer mes travaux de thèse.

Je remercie les docteurs André Hanauer et Solange Pannetier pour l'envoi des souris transgéniques au cours de mon M2 et au début de ma thèse.

Je remercie Nathalie et Calette pour la gestion de la reproduction et les génotypages des animaux ainsi que Nathalie pour son soutien technique et tous ces cerveaux coupés avec beaucoup de professionnalisme.

Je remercie l'équipe de l'animalerie pour les soins apportés aux animaux.

Je remercie également tous les stagiaires qui se sont succédés et ont permis de faire avancer le projet, Mathilde, Noémie, Julie, Matthias, et Charlotte.

Je remercie également Frédéric Chauveau pour les analyses de la corticostérone.

Je remercie également Alexandra Veyrac, Cyrille Vaillend, Elice Morice et Caroline Perronnet pour les quelques discussions et conseils que nous avons partagés.

De façon générale je remercie l'ensemble du personnel du CNPS et tout particulièrement Véronique Véron et Annie Le Gal de l'équipe de gestion.

Je remercie également la fondation Jérôme Lejeune pour le financement qu'elle nous a accordé.

Je remercie l'ensemble de l'équipe d'enseignement de biologie.

Je remercie Amina pour sa présence, les discussions en tout genre, le soutien moral et les conseils pertinents. "Merci, tu m'as vraiment aidé à traverser des périodes difficiles".

Je remercie Quentin Gaucher (le droitier), pour tous les moments agréables qu'on a pu passer au NAMC puis au CNPS. Tu as également fait découvrir au monde que j'avais des cheveux.

Je remercie Alexandra Gros, pour toutes les discussions et repas partagés. Tu m'as confirmé que l'utilisation d'un ordinateur n'était surement pas quelque chose d'inné (disparition d'Excel...).



Je remercie Benoit, le combatif. Ton séjour au CNPS a été court, mais suffisamment long pour partager toutes ces passionnantes discussions philosophiques sur le pourquoi du comment... J'espère qu'on pourra un jour commencer cette partie d'échecs.

Je remercie Rémi, le bouddhiste de feu qui veut révolutionner le monde. Tu avais toujours deux secondes à m'accorder pour mes problèmes ou mes questionnements concernant l'univers de la pomme.

Je remercie Daniel avec lequel j'ai beaucoup partagé autant scientifiquement que personnellement.

Je remercie Florian pour les conversations que l'on a échangées. Même si je ne sais pas si je peux te porter sur mon dos, sache que je te porte dans mon estime.

I want to thank Mario Udinotti, I know now that you gotballs! I agree to know unfortunately there not enough beer, but those one was good.

Je remercie Heather McLean pour sa bonne humeur et son encadrement plus que chaleureux au cours de ces années d'enseignement.

Je remercie Michaela Galante pour son humeur rendant très agréables les sessions de cours.

Je remercie Laurence Merry pour sa gentillesse faisant d'elle l'un des meilleurs professeurs que j'ai eu durant mes études.

Je remercie Florence, la Hussain Bolt féminine qui ne cesse de courir dans les couloirs, eh oui même en recherche le temps c'est de l'argent.

Je remercie Romain, pour la joie dans les TP, les délires et les quelques poids poussés ensemble.

Spécial remerciement à ma partenaire de galère, pour tous ces fous rires par SMS, j'ai nommé Amel.

Et Pilou parce que si je ne le fais pas il ne sera pas content.

Je remercie Marianne pour tous ces bons moments passés et à venir j'espère. J'attends toujours ton récitation. "Je trouve qu'ils étaient mieux frisés".

Je remercie Madly qui n'a jamais cessé de croire en moi... même quand je n'y croyais plus trop.

Et pour finir, une très forte pensée pour mes parents qui n'ont jamais cessé de me soutenir et de m'encourager malgré la distance nous séparant.

## SOMMAIRE

<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>10</b>
<b>1. La Déficience Intellectuelle (DI).....</b>	<b>10</b>
1.1 Prévalence.....	10
1.2 Définition.....	10
1.3 Causes.....	11
<b>2. La DI liée au chromosome X.....</b>	<b>12</b>
2.1 Généralités.....	12
2.2 Gènes impliqués dans la DILX.....	13
2.3 Fonctions des protéines impliquées dans les DILX.....	14
<b>3. La Neurogenèse Adulte.....</b>	<b>16</b>
3.1 Historique.....	16
3.2 Généralités .....	17
3.3 Formation hippocampique et para-hippocampique : description anatomique.....	18
3.4 Déroulement de la neurogenèse adulte hippocampique.....	19
3.5 Facteurs influençant la neurogenèse adulte hippocampique.....	24
3.6 Rôle de la neurogenèse adulte dans les fonctions cognitives.....	29
3.7 Notion de période critique.....	34
<b>4. Le Syndrome de Coffin-Lowry.....</b>	<b>36</b>
4.1 Historique .....	36
4.2 Prévalence .....	36
4.3 Signes cliniques .....	36
4.4 Causes .....	38
4.5 Diagnostic .....	39
4.6 Traitements et espérance de vie.....	39
<b>5. Les protéines RSKs .....</b>	<b>40</b>
5.1 Famille des RSKs .....	40
5.2 Expression tissulaire .....	41
5.3 Signalisation cellulaire des RSKs.....	42
5.4 Activation .....	43
5.5 Fonctions cellulaires des RSK2.....	44
<b>6. Modèles murins du SCL.....</b>	<b>47</b>
<b>OBJECTIFS DE LA THÈSE.....</b>	<b>53</b>
<b>MATÉRIELS ET MÉTHODES.....</b>	<b>56</b>
<b>7. Animaux .....</b>	<b>56</b>
<b>8. Contitions d'élevage .....</b>	<b>57</b>
8.1 Conditions standards.....	57
8.2 Conditions enrichies.....	57
<b>9. Études comportementales.....</b>	<b>58</b>
<b>10. Tâche d'apprentissage et de mémoire spatiale en piscine de Morris.....</b>	<b>58</b>
<b>11. Tâche de non-appariement retardé (Séparation de patterns) .....</b>	<b>60</b>
<b>12. Études de la neurogenèse hippocampique.....</b>	<b>63</b>
12.1 Injections de BrdU.....	63
12.2 Perfusion intracardiaque.....	66
12.3 Immunohistochimie .....	66

12.4 Comptage cellulaire .....	68
<b>13. Analyses statistiques.....</b>	<b>68</b>
<b>RÉSULTATS .....</b>	<b>70</b>
<b>14. Conséquences morphologiques de l'absence de RSK2.....</b>	<b>70</b>
<b>15. Rôle de RSK2 dans la prolifération cellulaire hippocampique.....</b>	<b>71</b>
<b>16. Rôle de RSK2 dans l'évolution de la survie des neurones néoformés.....</b>	<b>72</b>
<b>17. Effet de l'enrichissement sur la survie des neurones néoformés.....</b>	<b>74</b>
<b>18. Apprentissage spatial, survie neuronale et enrichissement environnemental.....</b>	<b>77</b>
18.1 Effet de l'enrichissement sur l'apprentissage spatial.....	77
18.2 Effet de l'enrichissement sur la mémoire spatiale.....	80
<b>19. Effet de l'enrichissement, de l'apprentissage spatial et de la nage sur la survie neuronale .....</b>	<b>83</b>
19.1 Effet de l'enrichissement sur la survie neuronale.....	83
19.2 Effet de l'apprentissage et de l'enrichissement sur la survie neuronale.....	84
19.3 Effet de l'absence d'apprentissage sur la maturation neuronale.....	84
19.4 Effet de la nage, de l'apprentissage et de l'absence d'apprentissage sur la survie neuronale .....	86
19.5 Effet de l'enrichissement sur la maturation neuronale.....	86
19.6 Effet de l'apprentissage et de l'enrichissement sur la maturation neuronale .....	87
19.7 Effet de l'enrichissement et de la nage seule sur la maturation neuronale.....	87
19.8 Effet de la nage, de l'apprentissage et de l'absence d'apprentissage sur la maturation neuronale.....	87
<b>20. Survie neuronale avant apprentissage.....</b>	<b>88</b>
<b>21. Effet de l'apprentissage spatial sur la survie neuronale de neurones plus âgés.....</b>	<b>90</b>
<b>22. Apprentissage dans la tâche de séparation de patterns.....</b>	<b>92</b>
<b>23. Survie neuronale après séparation de patterns.....</b>	<b>95</b>
<b>DISCUSSION .....</b>	<b>98</b>
<b>24. Le volume hippocampique des souris <i>Rsk2</i>-KO .....</b>	<b>99</b>
24.1 L'absence de RSK2 n'altère pas le volume hippocampique.....	99
24.2 L'enrichissement augmente le volume de l'hippocampe.....	100
<b>25. L'absence de RSK2 n'affecte pas la neurogenèse adulte hippocampique basale....</b>	<b>100</b>
25.1 Prolifération cellulaire.....	100
25.2 Survie et maturation neuronale.....	101
<b>26. RSK2 est impliquée dans l'apprentissage et la mémoire spatiale.....</b>	<b>104</b>
26.1 Apprentissage et mémoire spatiale dans la piscine de Morris .....	104
26.2 Thigmotaxie des souris <i>Rsk2</i> -KO.....	105
26.3 Apprentissage dans la séparation de patterns .....	106
<b>27. L'enrichissement restaure les performances cognitives des souris <i>Rsk2</i>-KO.....</b>	<b>107</b>
27.1 L'enrichissement améliore les performances dans la piscine de Morris.....	107
27.2 L'enrichissement améliore les performances de séparation de patterns.....	109
<b>28. Influence de l'apprentissage sur la neurogenèse adulte hippocampique des souris <i>Rsk2</i>-KO .....</b>	<b>110</b>
<b>29. L'enrichissement augmente la neurogenèse adulte hippocampique chez les souris <i>Rsk2</i>-KO .....</b>	<b>113</b>
<b>30. L'enrichissement compense la diminution de neurogenèse adulte hippocampique chez les souris <i>Rsk2</i>-KO après apprentissage.....</b>	<b>113</b>

<b>31. L'absence de RSK2 ne modifie pas l'activation neuronale.....</b>	<b>114</b>
<b>CONCLUSION .....</b>	<b>116</b>
<b>RÉFÉRENCE BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>119</b>

## ABRÉVIATIONS

**ADN** : Acide DésoxyriboNucléique  
**ARN** : Acide RiboNucléique  
**AGC** : Protéine A, G et C  
**ANOVA** : Analysis of variance  
**Arc** : Activity-regulated cytoskeleton  
**ATF4** : Activating Transcription Factor 4  
**BAD** : Bcl-2 Associated Death promoter  
**Bcl2** : B-Cell Lymphoma 2  
**BrdU** : 5-Bromo-2-deoxyUridine  
**CA1, 2, 3** : Champs Ammoniens 1, 2, 3  
**CAMK** : Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent Kinase  
**CDK2** : Cyclin-Dependent Kinase 2  
**CREB** : C-AMP Response Element-Binding protein  
**DAB** : Di-Amino-Benzidine  
**DAPK** : Death Associated Protein Kinase  
**DCTK** : Domaine C-Terminal Kinase  
**DCX** : Doublecortine lié au chromosome X  
**DI** : Déficience Intellectuelle  
**DILX** : Déficience Intellectuelle liée au chromosome X  
**DNTK** : Domaine N-Terminal Kinase  
**DSM-V** : Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders  
**EC** : Cortex entorhinal  
**ERK1** : Extracellular signal-Regulated Kinase-1  
**FOXG1** : Forkhead box protein G1  
**FMR1** : Fragile X Mental Retardation 1  
**PaS** : Parasubiculum  
**PER** : Cortex périrhinal Présubiculum  
**PHR** : Formation Para hippocampique  
**POR** : Cortex postrhinal  
**PrS** : Présubiculum  
**FMRP** : Fragile X Mental Retardation Protein  
**GABA** : Gamma-Aminobutyric Acid  
**GD** : Gyrus Denté  
**GFAP** : Glial Fibrillary Acidic Protein  
**GSK3 $\beta$**  : Glycogen Synthase Kinase 3 Beta  
**H3** : Histone 3  
**HCl** : Acide Chlorhydrique  
**HF** : Formation hippocampique  
**IRM** : Imagerie par Résonance Magnétique  
**LEA** : Cortex entorhinal lateral  
**MAM** : Methyl-Azoxy-Methanol  
**MAPK** : Mitogen-Activated Protein Kinase  
**MAPKAPK** : MAPK-activated protein kinase  
**MAPKK** : Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase  
**MAPKKK** : Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase  
**MEA** : Cortex entorhinal median

**MeCp2** : Methyl CpG binding protein 2  
**MSK** : Mitogen and Stress activated Kinase  
**NeuN** : Neuronal Nuclei  
**NeuroD** : Neurogenic Differentiation  
**NMDAR** : Acide N-méthyl-D-Aspartique  
**PBS** : Phosphate Buffer Saline  
**PCR** : Polymerase Chain Reaction  
**PDK1** : Phosphoinositide-Dependent Kinase-1  
**PFA** : Paraformaldehyde  
**PHR** : Formation Para hippocampique  
**PSA-NCAM** : Polysialic Acid-Neural Cell Adhesion Molecule  
**QI** : Quotient Intellectuel  
**RPS6KA3** : Ribosomal Protein S6 Kinase, 90kDa polypeptide 3  
**RSK2** : Ribosomal S6 Kinase-2  
**SCL** : Syndrome de Coffin-Lowry  
**Sox2** : Sex determining region Y-box 2  
**Sub** : Subiculum  
**TMZ** : Temozolomide  
**WT** : Wild Type  
**ZSG** : Zone Sous Granulaire  
**ZSV** : Zone Sous Ventriculaire

## INTRODUCTION

### 1. La Déficience Intellectuelle (DI)

#### 1.1 Prévalence

D'après une méta-analyse de Maulik et son équipe, datant de 2011 et s'appuyant sur des études de cas de DI (ou retard mental) publiées entre 1980 et 2009, la prévalence de la DI est estimée à environ 1 à 3% dans la population mondiale, avec une fréquence plus importante chez les individus masculins. La prévalence des cas les plus sévères est d'environ 6 pour mille.

#### 1.2 Définition

Dans son manuel de recensement des troubles psychiatriques (DSM V), l'Association Américaine de Psychiatrie (2013) définit la DI par :

- L'apparition, durant la période développementale, de déficits du fonctionnement intellectuel tels que le raisonnement, la résolution de problèmes, la planification, la pensée abstraite, le jugement, l'apprentissage scolaire et l'apprentissage lié à l'expérience. Ces déficits sont détectés par des évaluations cliniques individuelles qui permettent de donner une valeur de Quotient Intellectuel (QI). Des échelles de mesure standardisées permettent d'obtenir une valeur numérique globale. Les échelles les plus utilisées sont celles de Wechsler, déclinées en 3 versions selon différentes tranches d'âges. La valeur du QI obtenue estime les capacités de compréhension générale, de raisonnement et de mémoire, en tenant compte de l'âge et du milieu social de l'individu évalué. Dans la population, la valeur du QI varie entre 85 et 115 sur l'échelle de Wechsler (figure 1). Les patients sont considérés comme ayant des déficits du fonctionnement intellectuel lorsque cette valeur est inférieure à 70.

- Aux déficits du fonctionnement intellectuel sont associées des limitations dans trois domaines du fonctionnement adaptatif quotidien :

- Le domaine conceptuel ou académique, qui prend en compte les compétences mnésiques, le langage, l'écriture, la lecture, le raisonnement mathématique ou encore la capacité à résoudre des problèmes.
- Le domaine social qui implique la conscience d'autrui, des émotions et des expériences, l'empathie, la capacité à établir des relations sociales et/ou amicales ainsi que la capacité à communiquer aisément avec les autres.

- Le domaine pratique, qui implique une certaine autonomie dans différents domaines de la vie quotidienne tels que les soins personnels, la gestion de l'argent, l'organisation du travail scolaire ou encore la capacité à assumer des responsabilités professionnelles.

L'évaluation du fonctionnement adaptatif permet de définir le niveau d'autonomie et de prise en charge d'un patient. Les déficits de fonctionnement adaptatif sont mis en évidence par l'évaluation clinique. De plus, des questionnaires remplis par les proches (famille / personnel éducatif) permettent de compléter le diagnostic et d'évaluer l'autonomie du patient.

En fonction de la sévérité des déficits du fonctionnement adaptatif, quatre niveaux de DI sont principalement diagnostiqués : la DI légère, modérée, sévère et profonde. Dans certains cas, un diagnostic de « DI indéterminée » est utilisé lors d'une forte présomption de DI, sans possibilité d'évaluation du patient (individus trop affaiblis, récalcitrants aux tests...).

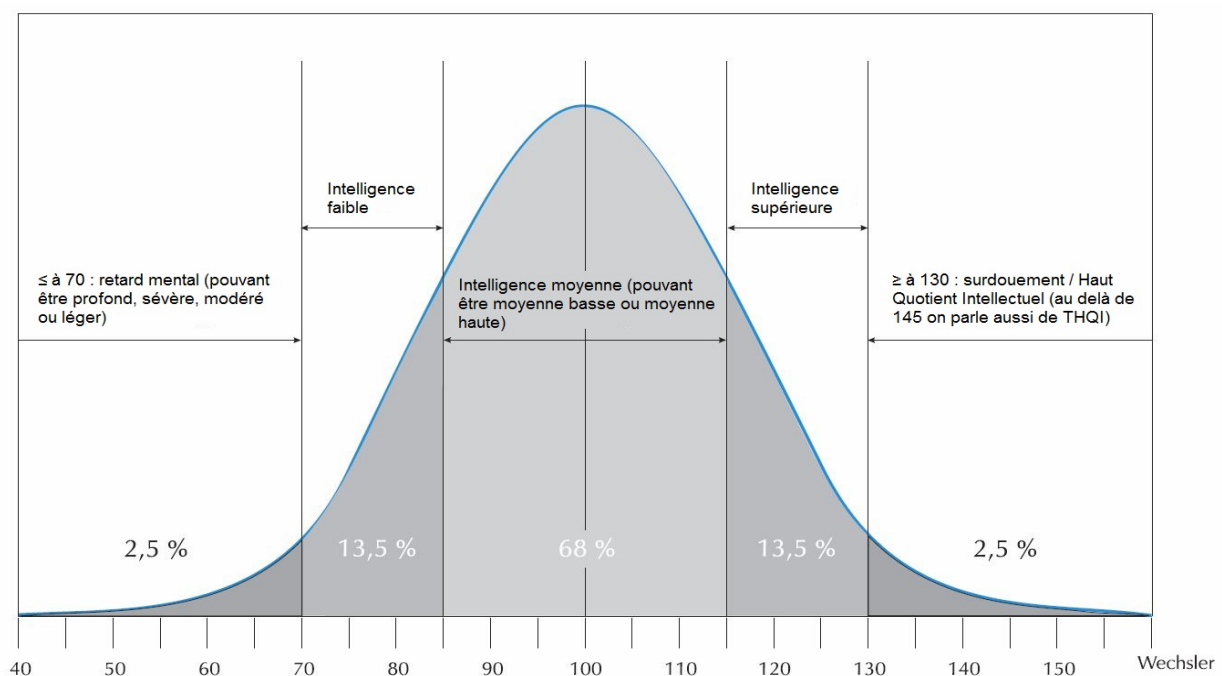


Figure 1. Répartition du QI dans la population, d'après <http://les-tribulations-dun-petit-zebre.com/>.

### 1.3 Causes

Les facteurs étiologiques de la DI sont nombreux et très hétérogènes. Dans environ 25% des cas, les causes de DI sont de nature génétique (Verpelli et Sala, 2012), telles que des erreurs de répartitions chromosomiques (trisomie 21 et 13), des microdélétions (syndrome d'Angelman, syndrome de Prader-Willi...) ou encore des mutations monogéniques (syndrome



de l’X fragile, syndrome de Coffin-Lowry...). Actuellement, des mutations sur plus de 450 gènes différents ont été impliquées dans la DI (Ellison *et al*, 2013).

Les causes de DI peuvent également être de nature environnementale et apparaître à différentes étapes de la vie des individus atteints. Dès la période prénatale, les anomalies métaboliques, les malformations cérébrales du fœtus, ainsi que certains comportements à risque de la mère durant la grossesse, comme la consommation de drogue, peuvent provoquer une DI chez l’enfant. Certaines infections (listéria, méningite) au cours de cette même période peuvent également entraîner une DI. Au cours de la période périnatale, des complications pouvant avoir lieu pendant le travail d’accouchement telles qu’une asphyxie ou des traumatismes peuvent aboutir à une encéphalopathie néonatale et induire une DI. Parmi les causes périnatales, il y a également les hémorragies intracrâniennes, l’hypoglycémie ainsi que l’hyperbilirubinémie. Enfin, la période postnatale regroupe également des facteurs de risque environnementaux comme les problèmes psychosociaux dont le manque d’affection durant les premières années de vie, l’absence de stimulations sociales ou encore la malnutrition. D’autres causes telles que des traumatismes crâniens graves, des infections (bactériennes ou virales), des tumeurs cérébrales ou encore la quasi-noyade peuvent également entraîner une DI (DSM V, 2013). Cependant, malgré ces nombreux facteurs, il est important de noter que plus de la moitié des cas de DI ont des causes non identifiées (pour revue, voir Ellison *et al*, 2013).

## **2. La DI liée au chromosome X**

### **2.1 Généralités**

Chez l’homme, environ 5 à 10% des DI sont dues à des mutations de gènes du chromosome X, appelées DI liées au chromosome X (DILX). Actuellement, plus de 210 formes différentes de DILX sont dénombrées (Chiurazzi *et al*, 2008 ; Lubs *et al*, 2012). Parmi les patients, on distingue les patients dont le seul signe clinique est la DI, on parle de DI non syndromique, et les patients présentant une DI associée à d’autres signes cliniques (morphologiques et/ou physiologiques), on parle alors de DI syndromique. Deux tiers des DILX sont considérés comme non syndromiques contre un tiers de DILX syndromiques (Ropers et Hamel, 2005). Avec l’avancée des méthodes de diagnostic (examen physique plus détaillé), il semblerait qu’il y ait une tendance à la diminution des DILX non syndromiques en faveur des DILX syndromiques.

## 2.2 Gènes impliqués dans la DILX

Les deux principales catégories de gènes dont l'altération aboutit à une DI sont les gènes impliqués dans les programmes neurodéveloppementaux et les malformations cérébrales, et les gènes impliqués dans les mécanismes moléculaires importants pour l'organisation et la plasticité des synapses (pour revue, voir Vaillend *et al*, 2008). Les mutations de gènes du chromosome X responsables des DILX sont réparties sur la totalité du chromosome (figure 2). En 2012, 102 gènes différents ont été identifiés comme étant impliqués dans des DILX syndromiques et non syndromiques (pour revue, voir Lubs *et al*, 2012). Parmi ces gènes, on note le gène *rsk2*, qui est impliqué dans le syndrome de Coffin-Lowry que nous détaillerons plus loin dans ce manuscrit, localisé sur le bras court du chromosome X (figure 2).

Nous pouvons également mentionner le gène *FMRI* localisé sur le bras long du chromosome X (figure 2), dont les mutations sont responsables du syndrome de l'X Fragile, la DILX la plus répandue avec une prévalence estimée à environ 1 garçon sur 5000 et 1 fille sur 9000. Les mutations à l'origine de ce syndrome aboutissent à l'absence de la synthèse de la protéine FMRP. Brièvement, les individus atteints montrent principalement une DI de sévérité variable pouvant être associée à des problèmes d'attention, des troubles du comportement et des troubles autistiques. Les signes cliniques sont moindres chez les femmes, où la majorité d'entre elles ne présentent d'ailleurs pas de DI. Actuellement, il n'existe aucun traitement pour soigner cette pathologie, seuls des traitements symptomatiques (accompagnement adapté pour les troubles intellectuels, du langage...) sont disponibles (Document ORPHANET (portail des maladies rares et des médicaments orphelins), 2012).

Pour finir, nous citerons également le gène *MeCP2* localisé sur le bras long du chromosome X (figure 2), dont les mutations sont responsables du syndrome de Rett. Ce syndrome est aussi une DILX qui se caractérise, chez les filles, par un trouble grave et global du développement du système nerveux central. La prévalence en Europe est d'environ 1/15000 filles. Les filles atteintes montrent une DI sévère. Il n'existe actuellement aucun traitement curatif, mais des traitements symptomatiques (antiépileptiques, prise en charge spécifique) sont disponibles (Document ORPHANET, 2006).

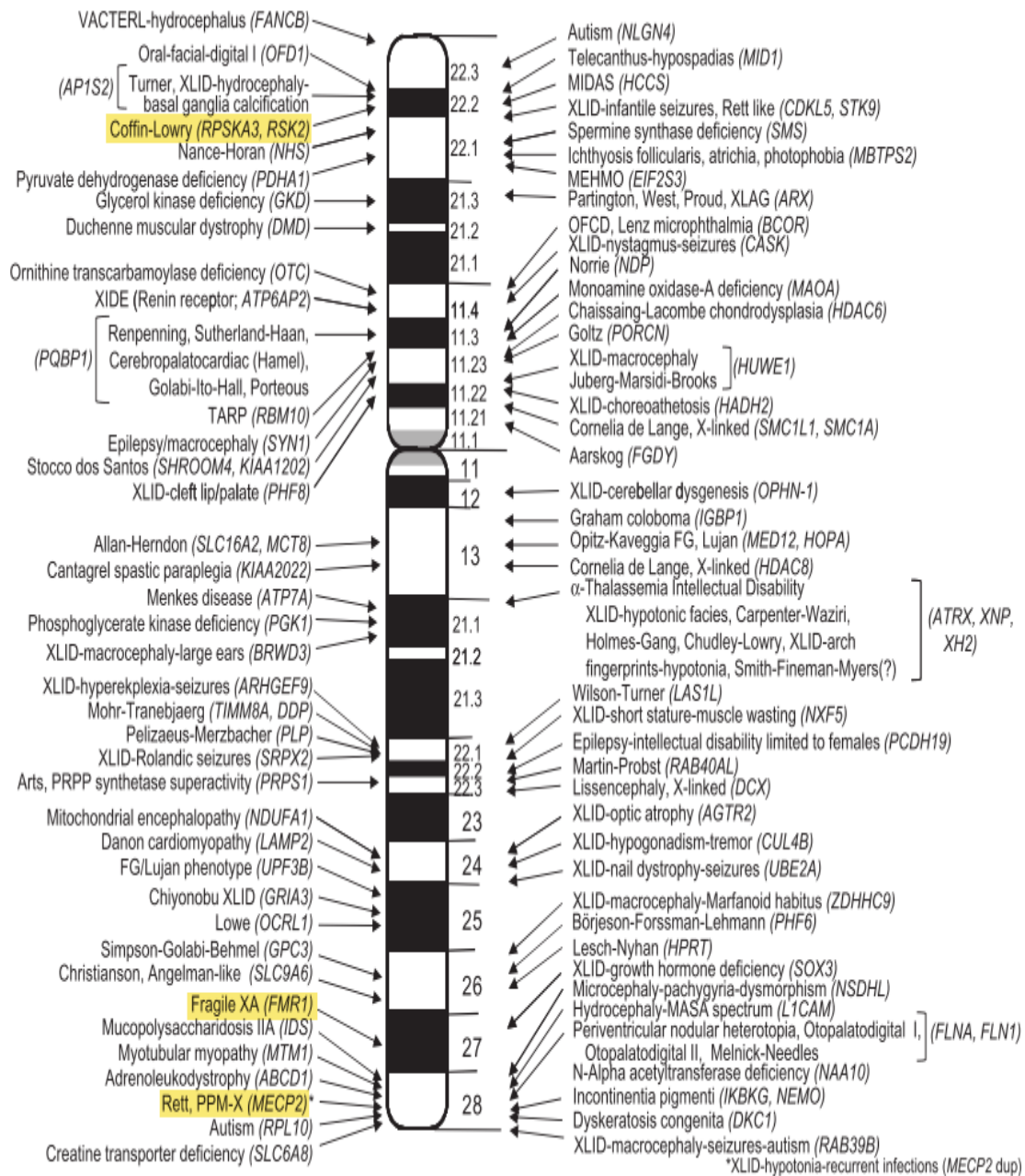


Figure 2. Gènes du chromosome X connus comme étant impliqués dans les DILX, d'après Lubs *et al*, 2012.

### 2.3 Fonctions des protéines impliquées dans les DILX

La recherche a montré que les gènes impliqués dans les DILX codent des protéines ayant des localisations et fonctions variées (figure 3 ; pour revue, voir Chiurazzi *et al*, 2008 ; Vaillend *et al*, 2008 ; Verpelli et Sala, 2012). Cette grande variabilité montre la difficulté que représentent l'identification et la compréhension des mécanismes impliqués dans la DI. Ainsi, ces protéines sont retrouvées à tous les niveaux cellulaires, allant de la membrane plasmique au noyau en passant par les organites cytoplasmiques (figure 3A). Elles interviennent dans de

nombreuses étapes importantes du fonctionnement cellulaire (figure 3B).

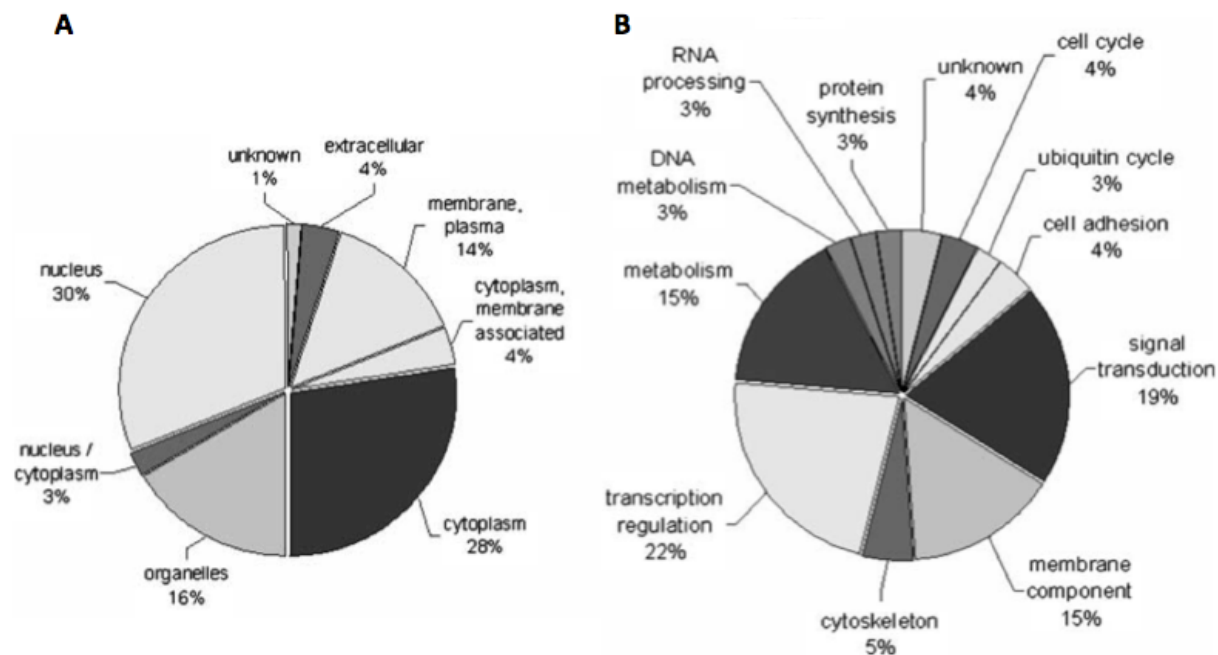


Figure 3. Localisations (A) et fonctions des protéines (B) codées par des gènes impliqués dans les DILX. Les pourcentages représentent la proportion des protéines localisées dans un compartiment cellulaire donné (A) ou la proportion de cellules ayant une fonction donnée (B), d'après Chiurazzi *et al*, 2008.

En effet, ces protéines peuvent assurer des fonctions architecturales (composant membranaire, cytosquelette), être impliquées dans la régulation de l'expression génique, mais aussi dans l'adhésion cellulaire ou encore dans la synthèse protéique (pour revue, voir Chiurazzi *et al*, 2008). Beaucoup de protéines sont également retrouvées dans des voies de signalisation impliquées dans les étapes clés de la communication synaptique, par exemple la libération des vésicules présynaptiques ou encore l'organisation des complexes protéiques de la membrane postsynaptique (pour revue, voir Vaillend *et al*, 2008 ; Verpelli et Sala, 2012). Enfin, au cours des dernières années, plusieurs études utilisant des modèles animaux de DI ont montré que la formation de nouveaux neurones dans l'hippocampe adulte pouvait également être altérée à différentes étapes (pour revue, voir Pons-Espinal *et al*, 2013). Le chapitre suivant exposera donc les données actuelles concernant la neurogenèse adulte.

### 3. La Neurogenèse Adulte

#### 3.1 Historique

Durant de nombreuses années, il avait été admis qu'il ne pouvait plus y avoir formation de nouveaux neurones dans le cerveau adulte d'un organisme. Au cours des années 60, l'utilisation de la thymidine tritiée (révélée par autoradiographie, figure 4A) a permis à Altman d'être le premier à mettre en évidence la formation de nouveaux neurones dans le cerveau de rats adultes préalablement lésés (Altman, 1962), puis par la suite dans le cerveau de rats et de chats adultes sains (Altman et Das, 1965 ; Altman, 1963). À la suite de ces travaux, d'autres auteurs tels que Kaplan, ont confirmé l'existence de la formation de nouveaux neurones dans le cerveau adulte de rongeurs. Cependant, même s'il est vrai que certains auteurs ont montré que les nouvelles cellules observées montraient des caractéristiques neuronales telles que la présence de dendrites et la capacité à former des synapses, la formation de nouveaux neurones dans le cerveau adulte ne fut pas acceptée par la communauté scientifique de l'époque, car il était impossible avec les techniques d'investigation utilisées de démontrer avec certitude qu'il s'agissait de nouveaux neurones et non de cellules astrocytaires. C'est dans les années 90 que l'utilisation de la 5-Bromo-2-deoxyUridine (BrdU), un analogue de la thymidine s'intégrant aux cellules en division, a permis le couplage du marquage des nouvelles cellules (révélées par immunohistochimie / immunofluorescence, figure 4B) à des marqueurs neuronaux, et ainsi de les identifier formellement comme des neurones (pour revue, voir Gross, 2000 ; Taupin, 2007).

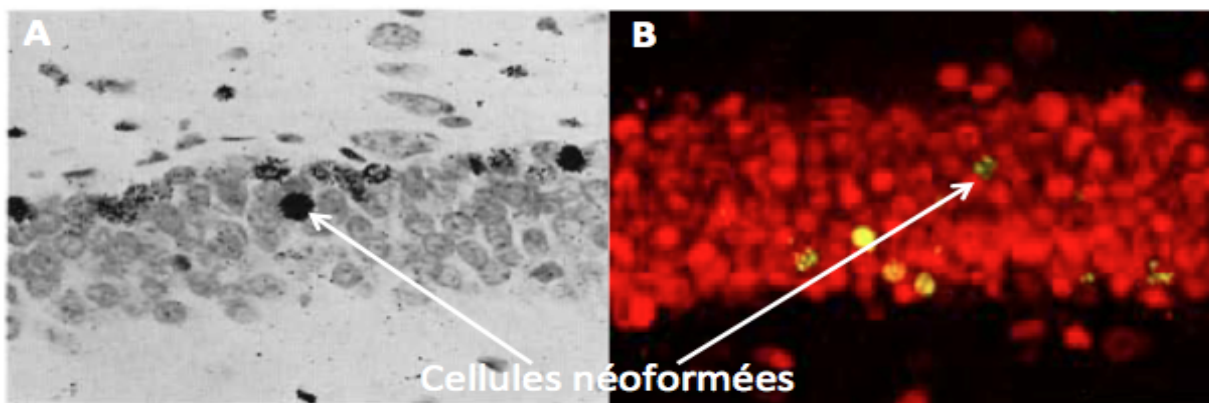


Figure 4. Cellules néo-formées marquées dans le gyrus denté. (A) Marquage autoradiographique à la thymidine tritiée, d'après Altman et Das, 1965. (B) Marquage immunofluorescent à la BrdU (vert) et au NeuN (rouge) d'après Mandoñal *et al*, 2010.



Depuis ces études pionnières, la formation de nouveaux neurones dans le cerveau adulte a été mise en évidence chez de nombreuses espèces mammifères (pour revue, voir Dupret et Abrous, 2010), dont l'homme (Eriksson *et al*, 1998 ; Spalding *et al*, 2013).

### 3.2 Généralités

La formation de nouveaux neurones dans le cerveau adulte ou neurogenèse adulte a été observée à l'état basal, dans deux régions principales du cerveau adulte de rongeur (figure 5):

- la zone sous ventriculaire (ZSV) des ventricules latéraux
- la zone sous granulaire (ZSG) du gyrus denté (GD) de l'hippocampe

Concernant la ZSV, les nouvelles cellules issues de cette zone se différencient en neurones au cours de leur migration jusqu'au bulbe olfactif (figure 5A, pour revue, voir Abrous *et al*, 2005). Au niveau de l'hippocampe, les cellules issues de la ZSG migrent sur une courte distance au sein même de la couche granulaire pour se différencier en neurones (figure 5B).

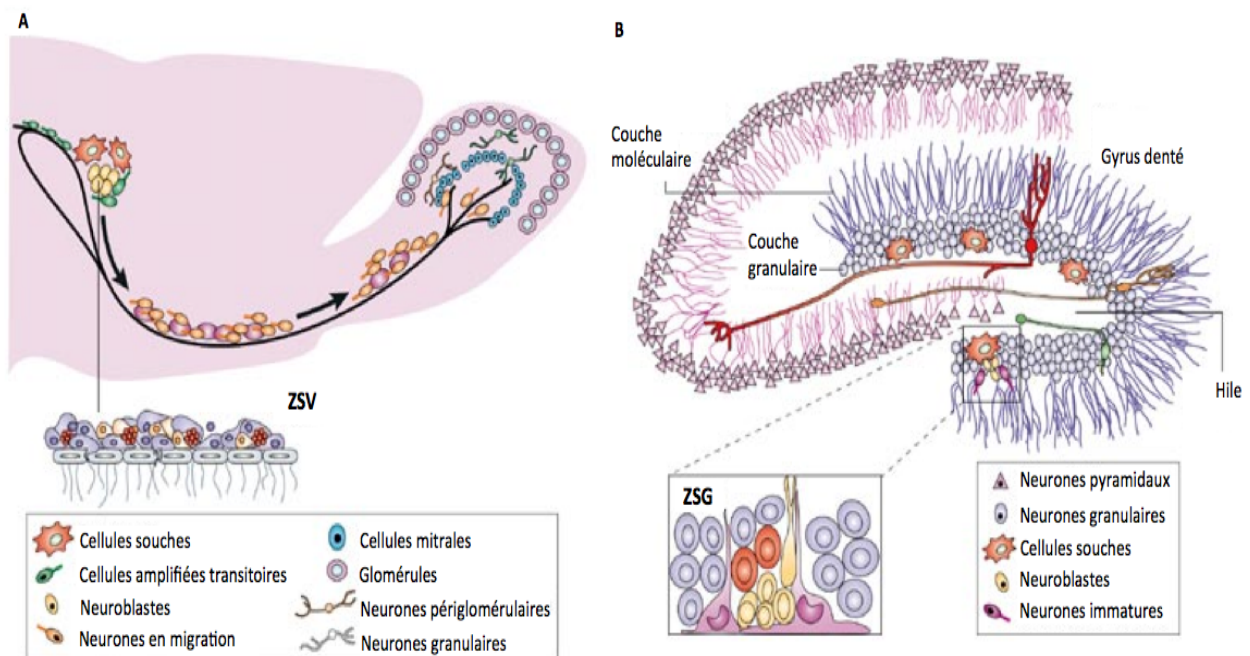


Figure 5. (A) Neurogenèse adulte dans la ZSV et (B) ZSG chez le rongeur, d'après Vescovi *et al*, 2006.

En dehors de ces deux structures, quelques études montrent que la formation de nouveaux neurones chez l'adulte peut avoir lieu dans d'autres régions cérébrales telles que le cortex, le striatum, l'amygdale, le cortex piriforme, le tubercule olfactif, l'hypothalamus, la substance noire ou encore le tronc cérébral (figure 6). Ces études sont, à l'heure actuelle, encore controversées (pour revue, voir Gould, 2007).

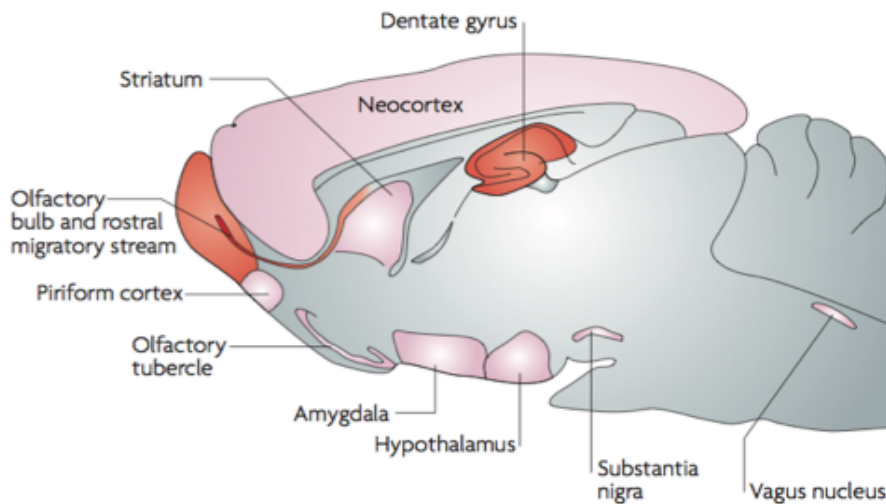


Figure 6. Régions neurogéniques confirmées (rouge) et controversées (rose), d'après Gould, 2007.

Au cours de cette thèse, nous nous sommes principalement intéressés à la neurogenèse adulte hippocampique.

### 3.3 Formation hippocampique et para-hippocampique : description anatomique

La formation hippocampique est composée du subiculum, de l'hippocampe proprement dit (composé des régions CA1, CA2 et CA3) et du gyrus denté. Accolée au subiculum, la formation para-hippocampique se compose de 5 régions : presubiculum, parasubiculum, cortex entorhinal, cortex périrhinal et cortex postrhinal. La formation hippocampique et la formation para-hippocampique communiquent par l'intermédiaire de différentes projections (figure 7).

Le gyrus denté est composé d'une couche périphérique appelée couche moléculaire, d'une couche centrale de cellules granulaires et d'une couche interne polymorphique appelée hile (figure 5B ; pour revue, voir Van strien *et al*, 2009). Les cellules granulaires du GD envoient des prolongements cytoplasmiques, appelés fibres moussues vers les neurones pyramidaux de CA3. Ces neurones de CA3 projettent sur les cellules pyramidales de CA1 via les collatérales de Schaffer, celles-ci envoyant à leur tour des projections sur le subiculum. Le

subiculum émet ensuite des projections sur la formation para-hippocampique. La plupart des projections entre ces structures sont réciproques.

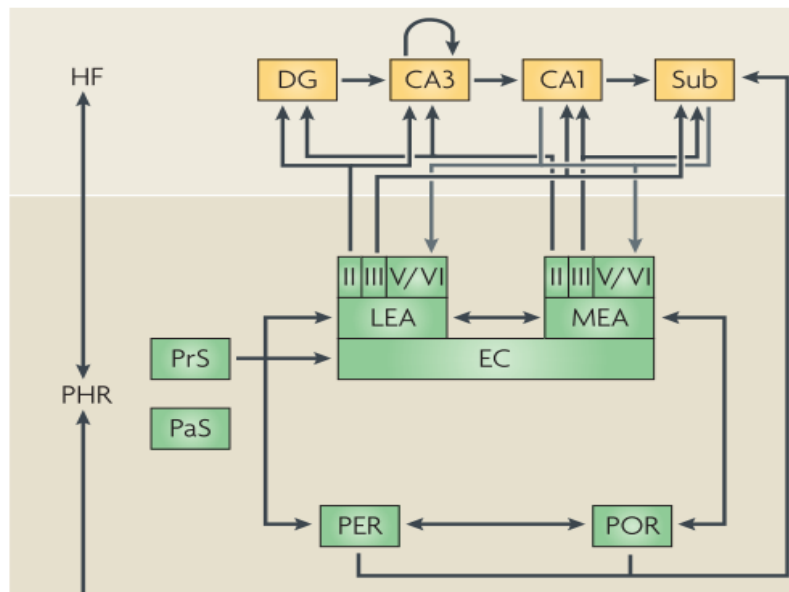


Figure 7. Schéma simplifié des connexions entre la formation hippocampique (HF) et la formation para hippocampique (PHR). Gyrus denté (GD), Champs ammoniens 1 et 3 (CA1, CA3), Subiculum (Sub), Cortex postrhinal (POR), Cortex périrhinal (PER), Présubiculum (PrS), Parasubiculum (PaS), Cortex entorhinal (EC), Cortex entorhinal latéral (LEA), Cortex entorhinal médian (MEA), d'après Van Strien *et al*, 2009.

### 3.4 Déroulement de la neurogenèse adulte hippocampique

Pour observer la formation de nouveaux neurones à l'état basal dans l'hippocampe adulte, deux conditions indissociables doivent être réunies :

- la présence de cellules souches, dites cellules de type 1,
- au sein d'un environnement particulier appelé niche neurogénique. Cette niche neurogénique correspond à un environnement composé de différents types cellulaires (microglie, astrocytes, oligodendrocytes), sécrétant dans le milieu extracellulaire des facteurs de croissance et des nutriments. Ce sont ces différents éléments qui permettront la différenciation des cellules de type 1 ainsi que leur maturation en neurones ou en cellules gliales (Zhao *et al*, 2008).

Les cellules de type 1 sont considérées dans la littérature comme étant des cellules souches se divisant en cellules progénitrices, capables de s'auto-renouveler et de se différencier en neurones ou en cellules gliales (figure 8 ; pour revue, voir Duan *et al*, 2008 ; Zhao *et al*, 2008). Différentes études *in vitro* et *in vivo* mettent en évidence leurs capacités de prolifération et de différenciation. *In vivo*, des expériences de greffe de cellules de type 1 de la



ZSG adulte dans la ZSV adulte aboutissent à la formation de neurones du bulbe olfactif, ce qui montre à la fois le caractère multipotent des cellules de type 1 mais également l'importance et la spécificité de la niche neurogénique (pour revue, voir Gage, 2000 ; Zhao *et al*, 2008 ; Bonaguidi *et al*, 2012).

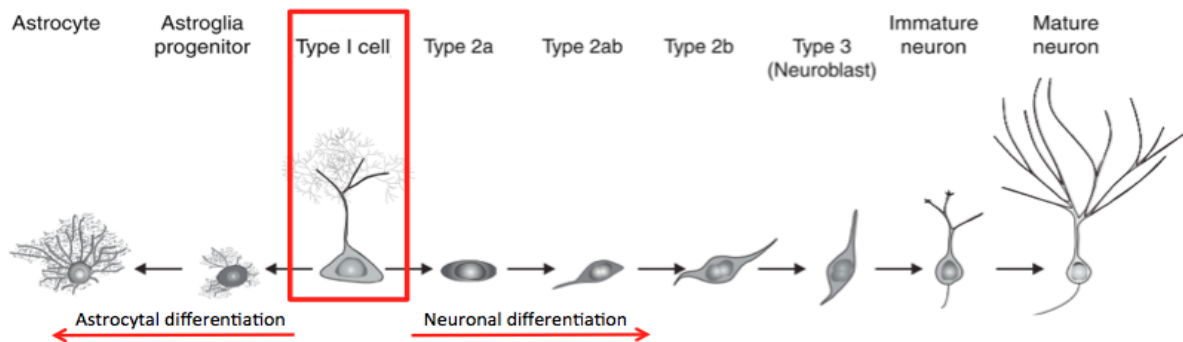


Figure 8. A partir de la cellule de type 1, différenciation d'une cellule souche de la ZSG en neurone mature ou en cellule gliale, d'après Bonaguidi *et al*, 2012.

Seule la formation des nouveaux neurones sera développée dans ce manuscrit. Avant de devenir des neurones post-mitotiques (ayant perdu leur capacité de divisions), les cellules de type 1 transitent par différents stades mitotiques affectant leur morphologie ainsi que leur physiologie (profil d'expression protéique, propriétés électrophysiologiques). Ainsi, il est possible de distinguer les cellules de type 1, type 2a, type 2b et type 3 (figure 8).

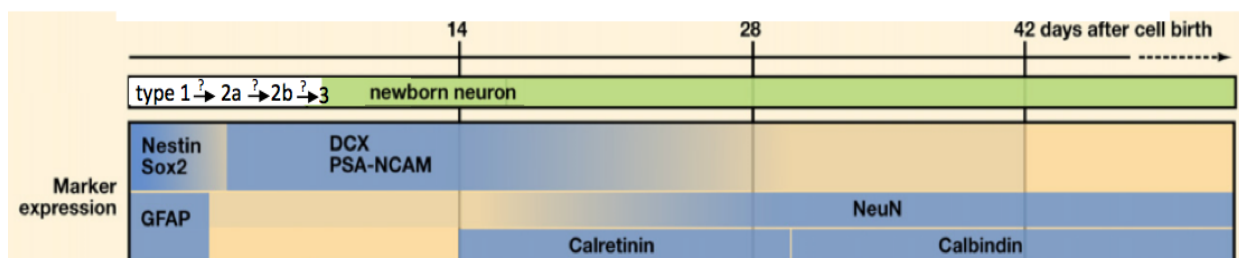


Figure 9. Différents profils d'expression protéique des cellules de la ZSG au cours des 42 jours suivant le début de la division des cellules précurseurs, d'après Zhao *et al*, 2008 ; Kempermann *et al*, 2004.

Au niveau du GD, les cellules de type 1 sont localisées dans la ZSG et possèdent une longue extension cytoplasmique et un noyau triangulaire (figure 8). Elles expriment la Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP), la protéine Nestin ainsi que le facteur de transcription Sox2 (indispensable pour la capacité d'auto-renouvellement cellulaire ; Suh *et al*, 2008). Ces

cellules de type 1 montrent une faible capacité de prolifération cellulaire et présentent certaines des caractéristiques morphologiques et fonctionnelles de cellules gliales.

Les cellules de type 1 vont ensuite, par division asymétrique, donner les cellules de type 2 (figure 8). Ces cellules de type 2 ne présentent plus d'extension cytoplasmique, leur noyau est irrégulier et elles sont capables de migration tangentielle (Kempermann *et al*, 2004). La migration de ces nouvelles cellules au sein même de la couche granulaire a lieu simultanément à la maturation. La majorité des neurones s'intègre dans le premier tiers de la couche granulaire du gyrus denté. Une quantité moins importante s'intègre dans le deuxième tiers et beaucoup plus rarement dans le troisième tiers (Zhao *et al*, 2006). Comme les cellules de type 1, les cellules de type 2 expriment Sox2, elles expriment également une protéine d'adhésion, la PSA-NCAM, mais cessent d'exprimer la GFAP. Elles sont divisées en deux sous-groupes, celles qui continuent à exprimer la nestin, appelées cellules de type 2a et celles qui n'expriment plus la nestin et expriment la doublecortine associée au chromosome X (DCX), appelées cellules de type 2b (figure 9 ; Kempermann *et al*, 2004). Les cellules de type 2b seraient issues des cellules 2a. Contrairement à celles de type 1, les cellules de type 2a et 2b possèdent un fort taux de prolifération.

Les cellules de type 2b vont ensuite donner des cellules de type 3, également appelées neuroblastes (figure 8). Leur noyau est arrondi, se rapprochant ainsi de la forme des noyaux des cellules granulaires (Kempermann *et al*, 2004). Elles expriment la DCX ainsi que la PSA-NCAM. Le stade cellule de type 3 est une étape charnière entre la période mitotique et post-mitotique. En effet, après ce stade les cellules commencent à exprimer la calrétinine et sont considérées comme étant des neurones immatures.

À l'âge de 2 semaines environ, les neurones immatures continuent à exprimer la DCX, mais commencent également à exprimer en quantité moins importante la protéine NeuN, utilisée pour identifier les neurones matures (figure 9). Un peu avant cet âge, les cellules néoformées présentent une activité GABAergique excitatrice (figure 10A). En effet, ces nouvelles cellules ont une concentration intracellulaire élevée en ions chlorures, ce qui a pour conséquence d'inverser l'action du neuromédiateur GABA. Entre 2 et 4 semaines, l'activité GABAergique des nouvelles cellules devient inhibitrice et c'est également à cette période que débute la formation de l'arborisation dendritique (figure 10A ; pour revue, voir Zhao *et al*, 2008). Les nouveaux neurones granulaires commencent alors à projeter leurs axones sur les neurones pyramidaux de la couche CA3. C'est également à cette période que ces nouvelles

cellules commencent à exprimer des gènes immédiats précoces tels que *c-Fos* et *Zif268* (Snyder *et al*, 2009a ; Veyrac *et al*, 2013). À environ 2 semaines, des épines dendritiques commencent à apparaître sur les nouveaux neurones. Enfin, le passage de neurone immature à neurone mature est marqué par l'expression de la calbindine au lieu de la calrétinine tout en continuant à exprimer la protéine NeuN (figure 9).

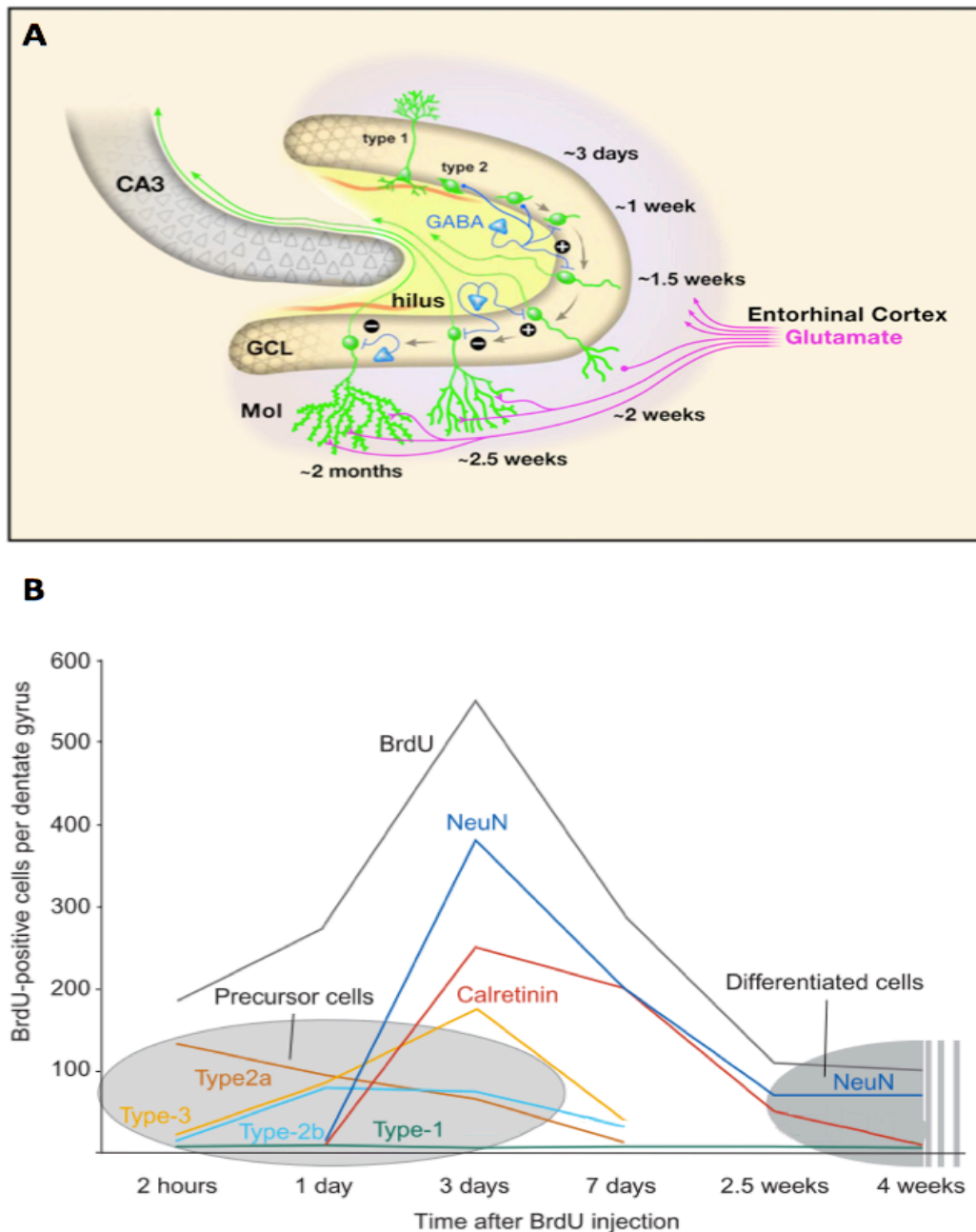


Figure 10. (A) Maturation et migration des cellules néo-formées partant de la ZSG au sein de la couche granulaire, d'après Zhao *et al*, 2008. (B) Nombre de cellules BrdU positives exprimant certains marqueurs au cours des 4 premières semaines de la neurogenèse adulte hippocampique, d'après Kempermann *et al*, 2004.

Les premiers neurones matures sont observés environ 4 semaines après les premières divisions des cellules de type 1 (Duan *et al*, 2008 ; Zhao *et al*, 2008). Il a été reporté que l'arborisation dendritique de ces nouveaux neurones continue à se développer jusqu'à 2 mois après la phase proliférative, les rendant ainsi non distinguables des autres neurones granulaires matures (Zhao *et al*, 2008). C'est également au bout de 4 semaines que les projections des neurones vers le CA3 deviennent stables (Gu *et al*, 2012). Les neurones néoformés matures reçoivent des afférences GABAergiques et glutamatergiques similaires à celles reçues par les neurones matures initialement présents.

Enfin, il est très important de noter qu'au cours de la neurogenèse adulte hippocampique, une grande partie des cellules néoformées disparaît par un mécanisme de mort cellulaire programmée, dès leurs premiers jours de vie (figure 10B ; figure 11A ; Kempermann *et al*, 2004). Cette mortalité cellulaire très importante (environ 70% des nouvelles cellules) se stabilise à environ 4 semaines. Comme nous le verrons ultérieurement, la survie de ces cellules néoformées est dépendante de plusieurs facteurs (stress, conditions environnementales, apprentissage, vieillissement ...). Ainsi, sur l'ensemble des cellules nouvellement générées, seules 25 à 30 % d'entre elles survivent 4 semaines après la fin de la phase mitotique dite proliférative et s'intègrent aux réseaux neuronaux (pour revue, voir Zhao *et al*, 2008). Un des éléments permettant de mettre en évidence l'intégration fonctionnelle de ces nouveaux neurones est l'analyse de l'activation neuronale. Cette activation peut être observée par des méthodes électrophysiologiques, mais également par des techniques immuno-histochimiques *via* l'observation du produit de gènes immédiats précoces tels que *c-Fos*, *Arc* ou encore *Zif268*. Les gènes immédiats sont utilisés car ils sont exprimés rapidement et de façon transitoire en réponse à l'activité neuronale.

La neurogenèse adulte hippocampique chez la souris et le rat partage de nombreuses similitudes. Cependant Snyder *et al* (2009a) ont montré que la quantité de nouveaux neurones générés et la chronologie de leur maturation variaient entre ces deux espèces. Ainsi, le nombre de nouvelles cellules générées quotidiennement est plus important chez le rat (environ 9000 nouvelles cellules) que chez la souris (environ 3000 nouvelles cellules ; figure 11A). Cependant, lorsque ce nombre de nouvelles cellules est exprimé par rapport au volume de la couche granulaire, la densité obtenue est similaire 1 semaine après injections de BrdU chez les deux espèces, mais ne l'est plus après 4 semaines (figure 11B). Ceci montre que le taux de

nouvelles cellules générées est équivalent chez les deux espèces, mais qu'il y a moins de cellules qui survivent chez la souris que chez le rat.

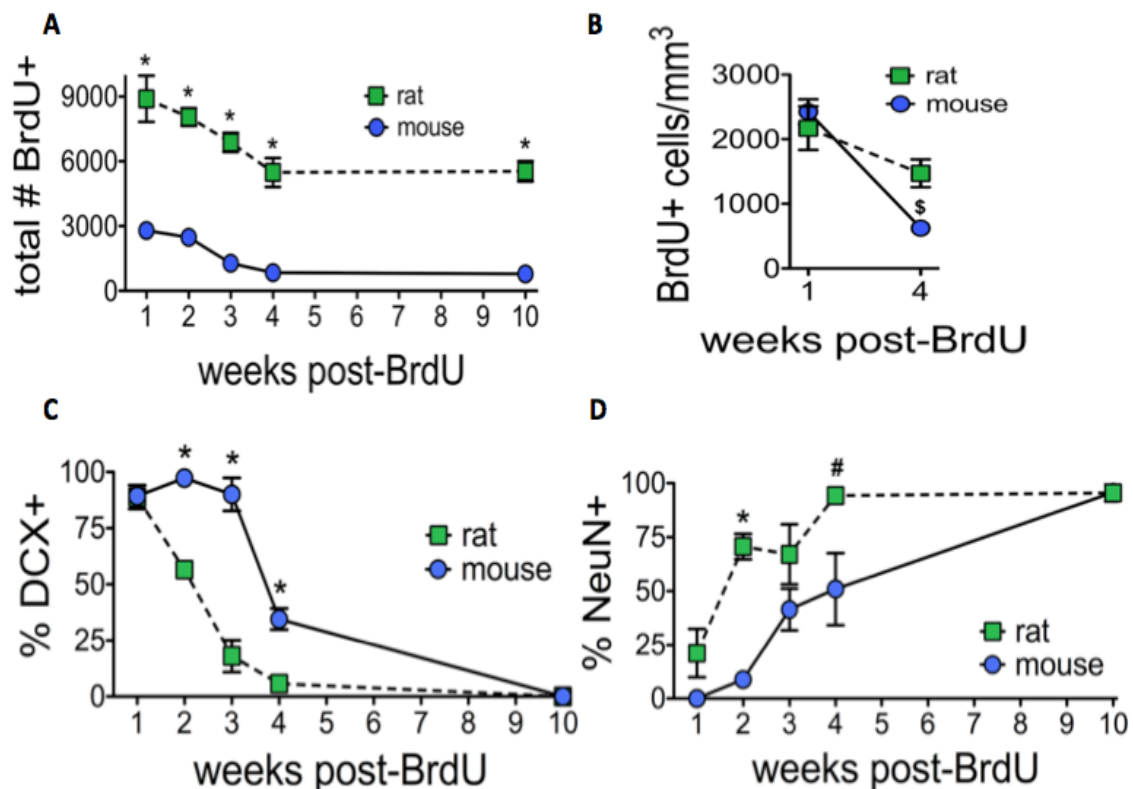


Figure 11. Comparaisons de la neurogenèse adulte hippocampique entre souris et rats. (A) Comparaison du nombre total de cellules marquées positivement à la BrdU en fonction des semaines post-injections de BrdU. (B) Comparaison de densités de cellules BrdU<sup>+</sup>/mm<sup>3</sup> à 1 et 4 semaines post-injections de BrdU. (C) et (D) Comparaison du pourcentage de cellules BrdU<sup>+</sup>/DCX<sup>+</sup> et BrdU<sup>+</sup>/NeuN<sup>+</sup> en fonction des jours post injection de BrdU, d'après Snyder *et al*, 2009a.

Cette étude montre également que la chronologie d'expression des marqueurs utilisés pour suivre la maturation neuronale varie en fonction de l'espèce. En effet le pourcentage de neurones exprimant la DCX diminue plus rapidement chez le rat par rapport à la souris (figure 11C), et l'expression de NeuN augmente plus rapidement chez le rat par rapport à la souris (figure 11D). Cette étude montre ainsi que la maturation neuronale chez le rat est plus rapide que chez la souris.

### 3.5 Facteurs influençant la neurogenèse adulte hippocampique

La neurogenèse adulte hippocampique est une forme de plasticité cérébrale qui est influencée par de nombreux facteurs externes. Ces facteurs peuvent agir positivement et/ou négativement sur les différentes étapes de la neurogenèse adulte hippocampique : prolifération, migration, différenciation, survie. Parmi les facteurs positifs, il y a l'exercice physique, l'enrichissement environnemental ou encore la potentialisation à long terme. Parmi

les facteurs négatifs, il y a notamment le vieillissement, le stress, la privation de sommeil. La littérature montre que certains facteurs peuvent être positifs ou négatifs en fonction des conditions expérimentales. C'est le cas du stress, de l'apprentissage et des facteurs de croissance (figure 12 ; pour revue, voir Lafenetre *et al*, 2011). Seuls, certains de ces facteurs seront développés dans la suite de ce manuscrit.

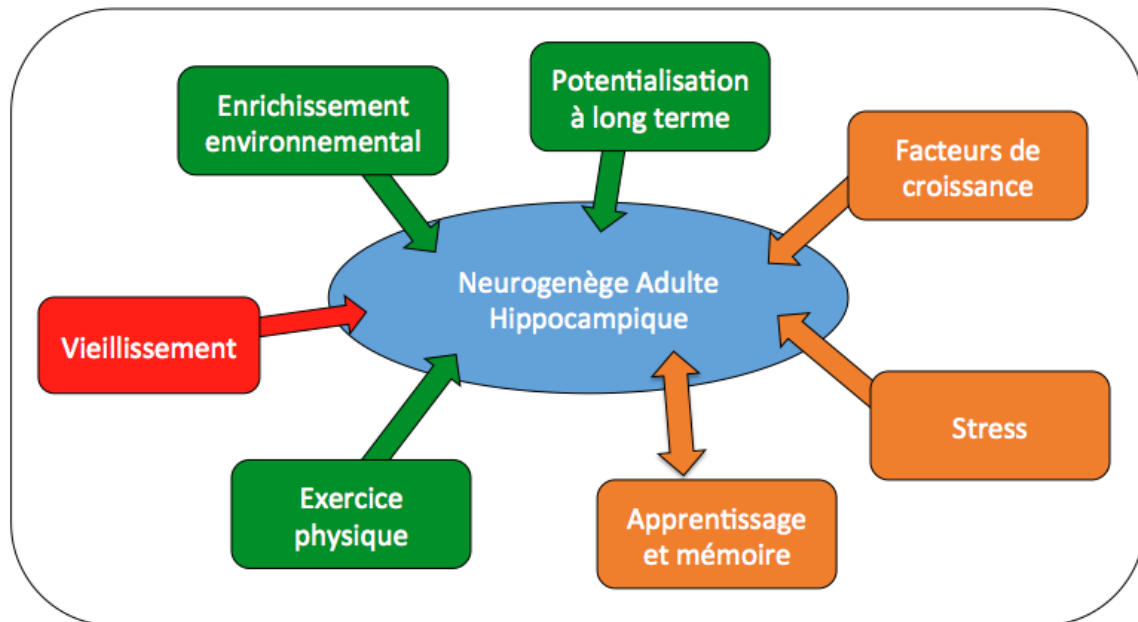


Figure 12. Relations entre stimuli externes et neurogenèse adulte hippocampique. Vert : action positive, rouge : action négative, orange : action positive ou négative, d'après Lafenetre *et al*, 2011.

L'enrichissement environnemental correspond à des conditions d'élevage permettant l'augmentation des stimulations sensorielles, motrices, cognitives, sociales, olfactives et auditives des animaux (figure 13). Les effets bénéfiques de l'enrichissement environnemental ont été décrits pour la première fois par Donald Hebb en 1947, lorsqu'il comparât, de façon anecdotique, des rats élevés à son domicile de manière domestique aux rats élevés en laboratoire, et constatât que les rats domestiques montraient de meilleures performances cognitives que ceux de laboratoire. Depuis ces observations pionnières, les effets bénéfiques de l'enrichissement ont été largement démontrés, tant au niveau cérébral que cognitif. Ainsi, il a été montré que l'enrichissement était capable de stimuler différentes structures cérébrales (figure 13) et, entre autres, de provoquer un épaississement du cortex cérébral, d'augmenter l'arborisation et la longueur des dendrites, le nombre d'épines dendritiques, la taille des synapses sur certains neurones ou encore de modifier l'expression de certains gènes (pour revue, voir Van Praag *et al*, 2000 ; Nithianantharajah et Hannan, 2006 ; Sale *et al*, 2014).

Dans le cadre de la neurogenèse adulte hippocampique, l'enrichissement environnemental augmente la survie neuronale mais pas la prolifération cellulaire chez la souris de souche C57BL/6 (Kempermann *et al*, 1997). En revanche, l'enrichissement augmente à la fois la prolifération cellulaire et la survie neuronale chez les souris d'une autre souche, les 129SvJ (Kempermann *et al*, 1998). Une autre étude montre également que l'enrichissement est capable d'augmenter la survie cellulaire chez des souris transgéniques exprimant la GFP sous le contrôle de la nestin (Kronenberg *et al*, 2003). Cette même étude montre que l'enrichissement affecte également la différenciation cellulaire en augmentant le nombre de cellules exprimant Prox1 qui est un marqueur neuronal (Kronenberg *et al*, 2003). Une étude a montré qu'un enrichissement d'une seule semaine sur des cellules âgées de 1 à 2 semaines était capable d'augmenter leur survie cellulaire (Tashiro *et al*, 2007). Cette même étude a montré que l'effet bénéfique de l'enrichissement sur la survie dépendait de l'âge des cellules néoformées. En effet, l'action serait plus forte si les neurones sont relativement immatures (âgés de 1 à 3 semaines) au moment de l'enrichissement. Sur les neurones âgés de plus de 3 semaines, l'enrichissement n'a aucun effet (Tashiro *et al*, 2007).

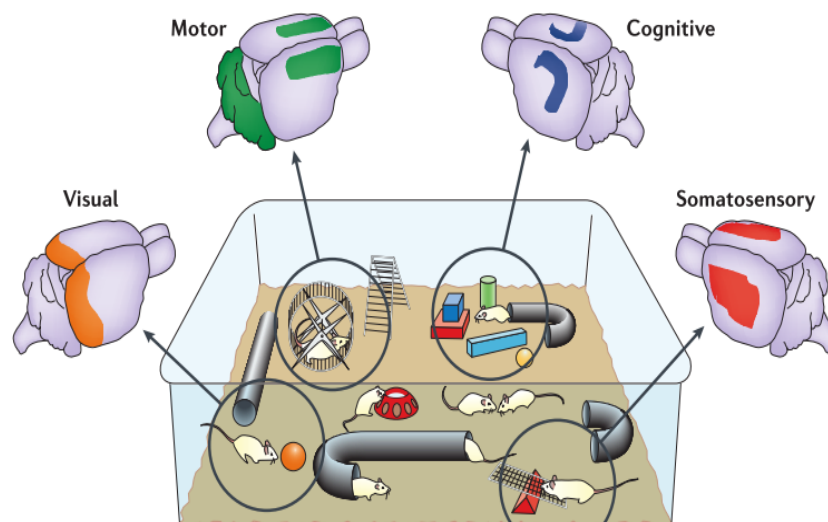


Figure 13. Illustration d'un enrichissement environnemental et des régions cérébrales pouvant être stimulées suite aux interactions avec les objets de cet enrichissement, d'après Nithianantharajah et Hannan, 2006.

Chez les rongeurs, l'exercice physique volontaire en roue d'activité a des effets bénéfiques sur la neurogenèse adulte hippocampique. En effet, des souris ayant accès à une roue d'activité montrent une augmentation de la prolifération cellulaire, de la survie neuronale et une accélération de la maturation neuronale, *via* une augmentation du nombre d'épines dendritiques (Van Praag *et al*, 1999 ; Zhao *et al*, 2006 ; Snyder *et al*, 2009b). De même, des

souris ayant accès pendant 8 à 12 heures par jour à une roue d'activité, montrent des modifications de la maturation et de la différenciation neuronale, en exprimant plus de neurones matures et moins de cellules astrocytaires (Wong-Goodrich *et al*, 2010). L'augmentation de la survie des nouveaux neurones générés dans le gyrus denté lors de l'exercice met en jeu l'activation de la voie anti-apoptotique PI3K-Akt (Bruehl-Jungerman *et al*, 2009). Enfin, il a été montré par l'équipe de Fabel en 2009, qu'une combinaison d'exercice physique et d'enrichissement (10 jours de roue d'activité suivie de 35 jours d'enrichissement) augmentait de façon plus importante la survie cellulaire et la formation de nouveaux neurones (augmentation de nombre de cellules BrdU<sup>+</sup>/NeuN<sup>+</sup>) par rapport aux deux conditions individuellement (pour revue, voir Lafenetre *et al*, 2011).

Le vieillissement a pour effet de diminuer certaines étapes de la neurogenèse adulte hippocampique. D'une façon générale, les animaux âgés présentent une quantité de cellules souches, une prolifération cellulaire ainsi qu'une survie neuronale moins importante que les animaux plus jeunes (Driscoll *et al*, 2006 ; pour revue, voir Lee *et al*, 2012). Dans une étude détaillée, Ben Abdallah *et al* (2010) montrent que la diminution de la prolifération débute très tôt chez la souris. En effet, il a été observé une diminution exponentielle de la prolifération cellulaire (d'environ 30-40% chaque mois) entre l'âge de 1 mois et 4 mois. Puis cette diminution se poursuit de façon moins drastique jusqu'à 9 mois. La survie cellulaire subit également une diminution avec le vieillissement et plus de cellules se différencient en astrocytes qu'en neurones chez les souris âgées par rapport aux plus jeunes (pour revue, voir Lee *et al*, 2012). Il a également été montré que la diminution de la neurogenèse observée au cours du vieillissement était en partie due à des facteurs présents dans le sang (Villeda *et al*, 2011).

Les résultats des études sur le stress montrent des effets très variés sur les différentes étapes de la neurogenèse adulte hippocampique en fonction des espèces (rat, souris) ainsi que des types de stress appliqués (pour revue, voir Schoenfeld et Gould, 2012). En effet, un stress ponctuel tel que la défaite sociale n'a aucun effet sur la prolifération cellulaire alors qu'il diminue la survie neuronale chez le rat (Thomas *et al*, 2007). En revanche, chez le rat comme chez la souris, une série de plusieurs défaites sociales entraîne une diminution de la prolifération cellulaire (Yap *et al*, 2006, Czéh *et al*, 2007). Une étude comparative montre que la contention ponctuelle augmente la prolifération cellulaire chez la souris mais la diminue chez le rat (Bain *et al*, 2004). Cependant, d'autres études montrent qu'une contention



ponctuelle (2 ou 6 heures par jour) n'a aucun effet sur la prolifération cellulaire chez le rat bien qu'une contention répétée pendant 3 semaines (6 heures par jour) entraîne une diminution de la prolifération cellulaire (Pham *et al*, 2003). Il a également été montré que le stress pouvait augmenter la survie cellulaire de façon transitoire chez la souris. En effet, un stress de contention de 2h/jour, répété durant 12 jours, provoque une augmentation de la survie cellulaire des cellules âgées de 14 jours, ce qui n'est pas retrouvé pour des cellules âgées de 21 jours (Snyder *et al*, 2009b).

De nombreuses études montrent qu'il y a un lien entre l'apprentissage hippocampo-dépendant et la neurogenèse adulte hippocampique (pour revue, voir Epp *et al*, 2013). Certaines études montrent que des tâches comportementales telles que la piscine de Morris (Snyder *et al*, 2009b ; Sandoval *et al*, 2011), ou encore l'exploration spatiale (Ramirez-Amaya *et al*, 2006) stimulent le recrutement des nouveaux neurones. Dans un premier exemple, il a été montré, après l'apprentissage du clignement palpébral, une augmentation de la survie de nouveaux neurones âgés d'une semaine chez le rat qui persiste jusqu'à 2 mois après la fin de l'apprentissage (Gould *et al*, 1999 ; Leuner *et al*, 2004). Il semblerait que cet effet positif de l'apprentissage sur la survie neuronale soit dépendant de l'implication de l'hippocampe dans la tâche, en effet dans la version hippocampo-indépendante de la tâche, l'acquisition du réflexe palpébral ne modifie pas la survie neuronale. La vitesse d'acquisition d'une tâche de conditionnement du clignement palpébral influencerait également sur la survie neuronale. En effet, une acquisition lente est liée à une augmentation de la survie de neurones âgés d'une semaine alors qu'une acquisition plus rapide ne modifie pas cette survie (Waddell *et al*, 2011). De même, dans la version hippocampo-indépendante de la piscine de Morris aucune modification de la survie cellulaire n'est observée suite à un apprentissage, alors que l'apprentissage dans la version hippocampo-dépendante, peut entraîner une augmentation de la survie des nouveaux neurones âgés de 1 et 2 semaines (Gould *et al*, 1999 ; Hairston *et al*, 2005 ; Epp *et al*, 2007 ; Trouche *et al*, 2009 ; Veyrac *et al*, 2013), qui est encore plus importante lorsque la tâche est maîtrisée c'est-à-dire lorsque les animaux trouvent la plateforme très rapidement (Sisti *et al*, 2007). En revanche, d'autres études montrent que l'apprentissage hippocampo-dépendant peut entraîner, soit une diminution de la neurogenèse adulte hippocampique, soit une absence d'effets (pour revue, voir Leuner *et al*, 2006 ; Epp *et al*, 2013). Enfin, Xu *et al* (2011) ont montré qu'une version spatiale de mémoire de travail entraîne une diminution de la survie neuronale par rapport à une version plus facile de la tâche dans la piscine de Morris chez la souris. De même, chez le rat, il a été montré qu'un protocole

de mémoire de travail dans la piscine de Morris provoquait une diminution de la prolifération cellulaire (Aztiria *et al*, 2007) ainsi que de la survie cellulaire (Mohapel *et al*, 2006).

Sur cette question de l'influence de l'apprentissage en piscine de Morris sur la survie des nouveaux neurones, Dupret *et al* (2008) ont émis l'hypothèse selon laquelle l'apprentissage agirait de manière distincte sur les différentes étapes de la neurogenèse adulte et que cette action dépendrait des performances de l'animal dans la tâche et de l'âge des neurones observés (Dupret *et al*, 2008). Selon cette hypothèse, l'apprentissage serait optimisé par la perte de neurones de certains âges.

### 3.6 Rôle de la neurogenèse adulte dans les fonctions cognitives

L'hippocampe est une structure cérébrale fortement impliquée dans les processus mnésiques, mais également dans des mécanismes de régulation de l'humeur ainsi que dans différents processus cognitifs (pour revue, voir Treves *et al*, 2008). Certaines lésions hippocampiques peuvent entraîner des déficits dans des tâches d'apprentissage et de mémoire spatiale telles que la tâche en piscine de Morris. L'hippocampe dorsal serait plus impliqué dans l'apprentissage et la mémoire spatiale alors que l'hippocampe ventral serait plus impliqué dans des fonctions de mémoire émotionnelle (pour revue, voir Moser et Moser, 1998 ; Fanselow et Dong, 2010).

La neurogenèse adulte hippocampique se déroulant au sein du GD de l'hippocampe, la question de son implication dans des processus mnésiques a donc fait l'objet de nombreuses études, principalement chez les rongeurs (rat et souris), en utilisant des tâches comportementales nécessitant les fonctions hippocampiques (pour revue, voir Leuner *et al*, 2006 ; Epp *et al*, 2013). Ces études sont principalement basées sur des approches corrélatives qui vont consister à analyser les effets des variations de la neurogenèse adulte hippocampique sur la mémoire. Différentes méthodes, d'efficacités variables, permettent de réduire, voire bloquer la neurogenèse adulte hippocampique : l'utilisation d'agents pharmacologiques (MAM, TMZ, 5-fluorouracile), l'irradiation, l'inactivation de gènes impliqués dans la neurogenèse par injection de vecteurs rétroviraux ou encore l'utilisation d'animaux transgéniques. Les résultats de certaines de ces études sont regroupés dans le tableau 1 à l'exception de celles analysant le rôle de la neurogenèse adulte dans l'apprentissage et la mémoire spatiale dans la piscine de Morris et dans la séparation de patterns qui seront développés dans la suite de ce manuscrit. De façon générale, dans des tâches

comportementales telles que le conditionnement de la peur ou encore la reconnaissance d'objets, les études bloquant la neurogenèse adulte hippocampique montrent soit des déficits comportementaux, soit une absence d'effets sur le comportement (tableau 1).

Pour étudier l'implication des neurones adultes néoformés dans la mémoire spatiale, la tâche comportementale d'apprentissage et de mémoire spatiale en piscine de Morris est souvent utilisée.

Ainsi, de nombreuses études corrélatives montrent que les modifications de la neurogenèse adulte hippocampique peuvent avoir des effets sur les performances mnésiques des animaux. Par exemple, des études montrent, chez la souris et le rat, qu'une augmentation de la survie neuronale, provoquée par un séjour en environnement enrichi ou par l'exercice physique volontaire en roue d'activité, améliore les performances dans la piscine de Morris (Kempermann *et al*, 1997 ; Van Praag *et al*, 1999 ; Nilsson *et al*, 1999 ; Iso *et al*, 2007).

A l'opposé, le blocage ou la diminution de la neurogenèse hippocampique adulte par irradiation ou chez des modèles de souris transgéniques peut entraîner des déficits d'apprentissage et/ou de rétention à long terme dans le test de la piscine de Morris (pour revue, voir Dupret *et al*, 2010). Par exemple, en utilisant le témozolomide (TMZ), Garthe *et al* (2009) ont montré que la diminution de la neurogenèse hippocampique adulte a pour conséquence d'altérer la précision de la navigation spatiale dans la piscine de Morris chez la souris. Cependant, une autre étude montre que ces déficits de performances d'apprentissage sont observés chez de jeunes souris âgées de 1 à 2 mois, mais pas chez des souris âgées de 2 à 3 mois ou de plus de 11 mois (Martinez-Canabal *et al*, 2012). Snyder *et al* (2005) ont quant à eux montré que le blocage de la neurogenèse de neurones âgés de 4 à 28 jours par irradiation n'influçait pas l'apprentissage mais par contre entraînait des déficits de mémoire spatiale, 2 et 4 semaines après un apprentissage semi massé dans la piscine de Morris. D'autre part, en utilisant une technique d'inactivation sélective de nouveaux neurones de différents âges par manipulation optogénétique post-apprentissage en piscine de Morris (protocole distribué), Gu *et al* (2012) ont montré que l'inactivation de neurones âgés de 4 semaines, mais pas ceux âgés de 2 ou 8 semaines, entraîne une perte du souvenir préalablement acquis. De même en utilisant une souris transgénique permettant de tuer sélectivement les nouveaux neurones après un apprentissage spatial, Arruda-Carvalho *et al* (2011) ont montré une perte du souvenir préalablement acquis en piscine de Morris dans un protocole distribué.

Outre les expériences de diminution ou d'ablation de la neurogenèse, il a également été montré que des modifications de la chronologie de la neurogenèse adulte pouvaient affecter la cognition. Ainsi, des souris transgéniques dont l'expression conditionnelle du gène pro différenciation *PC3* (*Tis21/BTG2*), modifie la chronologie développementale des nouvelles cellules néoformées montrent également des déficits d'apprentissage et de mémoire spatiale dans la piscine de Morris (Farioli-Vecchioli *et al*, 2008, 2009). Dans ces études, l'accélération de la différenciation des cellules progénitrices induite par l'expression de PC3 a provoqué une réduction de l'arborisation dendritique et des épines dendritiques des nouvelles cellules, probablement à l'origine des déficits observés.

Paradoxalement, d'autres études utilisant le blocage de la neurogenèse hippocampique adulte par le MAM ou par irradiation n'ont pas montré d'effet sur les performances d'apprentissage et de mémoire en piscine de Morris. Par exemple, le blocage par le MAM des nouveaux neurones (âgés de 0 à 14 jours) avant l'apprentissage n'a aucun effet sur les performances des rats dans un protocole distribué de piscine de Morris (Shors *et al*, 2002). De même le blocage par irradiation des nouveaux neurones avant apprentissage dans un protocole distribué de piscine de Morris n'a pas montré d'effet sur les performances de souris (Raber *et al*, 2004). Snyder *et al*, 2005 montrent également que le blocage de la neurogenèse par irradiation juste avant (4 jours avant l'apprentissage) ou après (1 jour après l'apprentissage) l'apprentissage n'a aucun effet sur les performances de rats dans un protocole de piscine de Morris semi-massé. Enfin, dans une autre étude où un modèle transgénique de rat exprimant la thymidine kinase à partir d'un promoteur de GFAP a été utilisé, une diminution de 98% des nouveaux neurones après traitement au ganciclovir est obtenue. Le traitement chronique de ces rats par cette drogue n'entraîne aucun déficit dans un protocole distribué de piscine de Morris (Groves *et al*, 2013).

Méthode de blocage	Espèces	Effets comportementaux	Référence
MAM	Rat	➡ Clignement palpébrale (hippocampo dépendant) Ø Clignement palpébrale (hippocampo indépendant)	Shors <i>et al</i> , 2001
MAM	Rat	➡ Peur contextuelle (trace) Ø Conditionnement de peur contextuelle, plus maze	Shors <i>et al</i> , 2002
MAM	Rat	Ø Reconnaissance d'objet	Brue-jungermann <i>et al</i> , 2005
5-fluorouracile	Rat	➡ Reconnaissance spatiale d'objet	Mustafa <i>et al</i> , 2008
Irradiation	Souris	➡ Labyrinthe de Barnes	Raber <i>et al</i> , 2004
Irradiation	Rat (Wistar)	➡ Reconnaissance de place (labyrinthe en T)	Madsen <i>et al</i> , 2003
Irradiation	Souris (129Sv/Ev)	➡ Conditionnement de peur contextuelle Ø Y maze	Saxe <i>et al</i> , 2006
Transgénique	Souris (GFAP-TK)	➡ Conditionnement de peur contextuelle Ø Y maze	
Transgénique	Souris	➡ Conditionnement de peur contextuelle	Farioli-Vecchioli <i>et al</i> , 2008
Transgénique	Souris (NSE-DTA)	➡ Labyrinthe de Barnes	Imayoshi <i>et al</i> , 2008
Irradiation	Rat (long Evans)	➡ Mémoire de travail, labyrinthe en T	Hernández-Rabaza <i>et al</i> , 2009
Transgénique	Souris (cycline D2 KO)	Ø Reconnaissance d'objet, Conditionnement de peur contextuelle	Jaholkowski <i>et al</i> , 2009
Irradiation	Souris (C57BL/6)	➡ Reconnaissance d'objet, Conditionnement de peur contextuelle	Yang <i>et al</i> , 2012
Irradiation	Rat (Spague-Dawley)	➡ Mémoire de travail, labyrinthe radial	Iwata <i>et al</i> . 2008
Transgénique	Rat	Ø Conditionnement de peur contextuelle	Groves <i>et al</i> , 2013
Transgénique	Souris (Tlx/f;CreER)	Ø Conditionnement de peur contextuelle	Zhang <i>et al</i> , 2008
Irradiation	Rat (Spague-Dawley)	➡ Conditionnement de peur contextuelle	Warner-Schmidt <i>et al</i> , 2008
Irradiation	Rat (long Evans)	➡ Conditionnement de peur contextuelle	Wojtowicz <i>et al</i> , 2008

Tableau 1. Effets du blocage de la neurogenèse adulte hippocampique sur la cognition, d'après Marín-Burgin et Schinder, 2012.

Récemment, il est apparu quelques données intéressantes montrant que la neurogenèse hippocampique adulte était fortement impliquée dans la fonction de séparation de patterns (pour revue, voir Sahay *et al*, 2011a). La séparation de patterns consiste, lors de l'encodage d'une information, à distinguer des patrons d'informations présentant un degré de similitude important, de sorte qu'ils puissent être restitués indépendamment les uns des autres sans interférence. Chez la souris, cette fonction peut être évaluée par différents tests comportementaux, notamment en utilisant un test de non-appariement retardé effectué en labyrinthe radial (Clelland *et al*, 2009), mais aussi à l'aide de protocole de conditionnement de peur ou encore de reconnaissance d'objets (Sahay *et al*, 2011b). Il a tout d'abord été montré que l'hippocampe est la structure particulièrement sollicitée dans cette fonction. Par exemple, il a été montré que des souris portant une délétion pour la sous-unité GluN2A du récepteur NMDA dans l'hippocampe présentent des déficits de la fonction de séparation de patterns évaluée dans un protocole de reconnaissance d'objets (Kannangara *et al*, 2014). De plus, certaines études d'inactivation sélective des récepteurs NMDA dans le gyrus denté ont mis en évidence le rôle de gyrus denté dans la séparation de patterns. En effet, chez une souris n'exprimant plus le gène codant la sous unité NR1 du récepteur NMDA spécifiquement dans les cellules du gyrus denté, des déficits sont observés dans la fonction de séparation de patterns évaluée dans un dispositif de peur contextuelle (McHugh *et al*, 2007). Enfin, des études complémentaires d'imagerie et d'électrophysiologie montrent que c'est plus précisément le gyrus denté et le champ CA3 de l'hippocampe qui seraient impliqués dans la fonction de séparation de patterns, même si certaines divergences subsistent dans la littérature quant au rôle de CA3 qui semble plus particulièrement impliqué dans la fonction de complétion de patterns (pour revue, voir Yassa et Stark, 2011 ; Neunuebel et Knierim, 2014).

Comme mentionné précédemment, il a été montré que la neurogenèse adulte hippocampique était impliquée dans la fonction de séparation de patterns (pour revue, voir Sahay *et al*, 2011a). En effet, des déficits dans des dispositifs de discrimination permettant l'évaluation de la séparation de patterns tels que le labyrinthe à huit bras ou encore le « mouse touchscreen » ont été observés chez les souris dont la prolifération cellulaire et la survie des nouveaux neurones générés chez l'adulte ont été bloquées (Clelland *et al*, 2009). Cette étude montre que le blocage par irradiation des nouveaux neurones altère la fonction de séparation de patterns lorsque les stimuli sont présentés avec une relativement faible séparation spatiale

mais pas lorsque la séparation spatiale est plus grande (discrimination plus aisée). Une autre étude de Nakashiba *et al* (2012) montre que seuls les jeunes neurones (après quelques jours d'intégration dans les réseaux neuronaux) interviennent dans les fonctions de séparation de patterns. En effet la suppression par irradiation de ces jeunes neurones (3 à 4 semaines) provoque des déficits de discrimination dans la fonction de séparation de patterns évaluée dans le labyrinthe radial à huit bras. En revanche, sur un modèle transgénique de rat, il a été montré que la diminution de la prolifération cellulaire ne générât aucun déficit en séparation de patterns évalué dans un labyrinthe radial à huit bras (Groves *et al*, 2013). Cependant, l'augmentation de la survie neuronale *via* l'exercice physique volontaire en roue d'activité permet également d'améliorer la séparation spatiale de patterns chez des souris âgées de 3 mois, mais pas chez des souris de 22 mois (Créer *et al*, 2010). De même, l'augmentation de la survie neuronale chez un modèle de souris transgénique, provoquée par la diminution de l'apoptose des nouvelles cellules, entraîne une amélioration des performances en séparation de patterns dans un dispositif de discrimination de contexte (Sahay *et al*, 2011b).

L'ensemble de ces résultats, malgré quelques divergences, montre que la neurogenèse adulte hippocampique est impliquée dans certaines fonctions cognitives. Les nouveaux neurones générés dans le gyrus denté joueraient en particulier un rôle dans l'acquisition et la consolidation d'informations mnésiques impliquant les fonctions hippocampiques. A l'appui de cette hypothèse, c'est durant des apprentissages basés sur des informations spatiales comme dans la tâche de la piscine de Morris, ainsi que lors du rappel, que les jeunes neurones vont exprimer des marqueurs d'activation neuronale, signe de leur recrutement dans les réseaux neuronaux participant à l'acquisition au cours de l'apprentissage et à la rétention de l'information (Kee *et al*, 2007 ; Veyrac *et al*, 2013). Actuellement, à ma connaissance il n'existe aucune donnée dans la littérature concernant un éventuel rôle de la neurogenèse adulte hippocampique dans la reconsolidation post apprentissage.

### 3.7 Notion de période critique

L'ensemble de ces études liant la neurogenèse adulte hippocampique et la mémoire ont permis de faire émerger la notion de période critique qui correspond à une période au cours de laquelle les nouveaux neurones sont plus sensibles aux stimuli externes et influencent les performances cognitives des animaux pendant les tâches comportementales hippocampo-

dépendantes (pour revue, voir Aasebo *et al*, 2011). Durant cette période critique, les neurones présentent des caractéristiques physiologiques particulières comme une hyperexcitabilité, leur permettant d'être plus facilement activés par l'apprentissage (Tashiro *et al*, 2007 ; Ge *et al*, 2007 ; Bruel-Jungerman *et al*, 2006 ; Zhao *et al*, 2006). Il a été montré que les nouveaux neurones pouvaient être intégrés de façon durable aux réseaux impliqués dans la mémoire spatiale (Trouche *et al*, 2009). Kee *et al* (2007) ont montré, en analysant l'expression de *c-Fos* et *Arc*, que les neurones âgés de moins de 4 semaines étaient plus susceptibles d'être intégrés aux réseaux neuronaux impliqués dans l'apprentissage spatial que les neurones plus âgés. Au laboratoire il a également été montré que l'expression par les nouveaux neurones du produit de *Zif268* entre 2 et 3 semaines était indispensable à la maturation et au recrutement des jeunes nouveaux neurones lors d'un apprentissage spatial (Veyrac *et al*, 2013). La détermination de la période critique se base sur différentes études aux protocoles variés, il est donc difficile de la délimiter avec précision. Néanmoins le recoupement de ces études permet de situer la période critique entre l'âge de 1 et 3 semaines (figure 14).

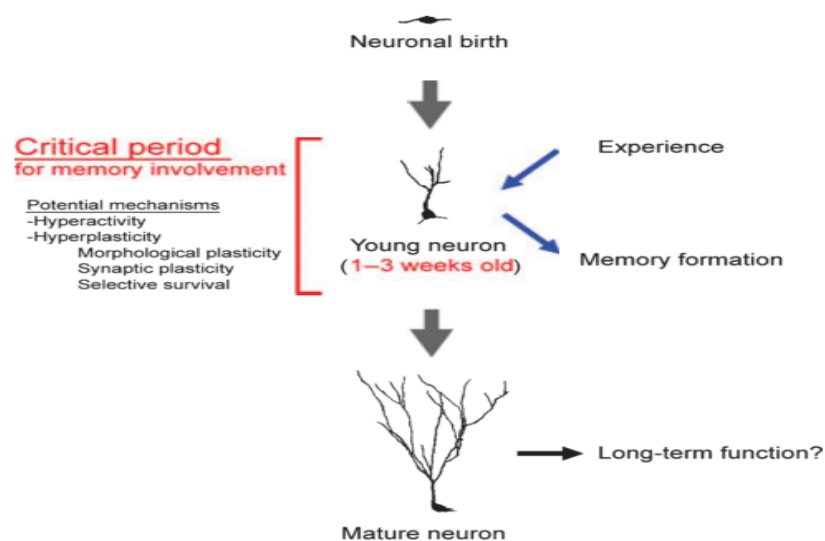


Figure 14. Période critique des nouveaux neurones pour leurs implications dans les processus mnésiques, d'après Aasebo *et al*, 2011.



## 4. Le Syndrome de Coffin-Lowry

### 4.1 Historique

Le Syndrome de Coffin-Lowry (SCL) a été décrit pour la première fois en 1966 par le docteur Coffin, puis indépendamment en 1971 par le docteur Lowry, dans deux familles différentes. C'est en étudiant trois familles supplémentaires en 1975 que le docteur Temtamy montra que toutes les familles étudiées souffraient de la même pathologie qu'il nomma Syndrome de Coffin-Lowry en référence aux deux docteurs.

### 4.2 Prévalence

Le SCL est une maladie génétique rare, et le nombre d'enfants naissant dans le monde avec ce syndrome est estimé à environ 1/50000-1/100000 cas (Document Orphanet, 2007 ; Pereira *et al*, 2010).

### 4.3 Signes cliniques

Les signes cliniques du SCL sont multiples, variés et répertoriés dans le tableau 2.

Signes physiques	Signes cognitifs	Signes neurologiques
<b>Malformations squelettiques :</b> Cyphose vertébrale / scoliose <b>Faciès caractéristique (figure 15):</b> Large front Hypertélorisme orbital Protrusion des lèvres Bosses frontales Oreilles larges Narines antéversées Hypodontie Position anormale des dents <b>Doigts mous, larges à la base et étroits aux extrémités (figure 15)</b> <b>Malformations cardiaques</b> <b>Hypotonie</b> <b>Hyperlaxie articulaire</b> <b>Cataracte</b> <b>Cataplexie</b> <b>Myélopathie</b> <b>Pectus caritum/excavatum (déformation du buste)</b> <b>Hernie</b>	<b>Déficit intellectuel:</b> Plus sévère chez les garçons que chez les filles (QI entre 15 et 60 chez les garçons) <b>Comportement psychotique</b> <b>Dépression</b> <b>Comportement amical, paisible et souriant</b>	<b>Déficits psychomoteurs :</b> Retard d'acquisition de la marche <b>Microcéphalie</b> <b>Déficits auditifs neurosensoriels d'intensité variable</b> <b>Crises convulsives</b> <b>Retard du développement cérébral</b> <b>Volume cérébral total réduit (IRM)</b> <b>Dilatations des ventricules latéraux</b>

Tableau 2- Signes cliniques du SCL d'après Hanauer et Young, 2002 ; Hunter *et al*, 2002 ; Kesler *et al*, 2007 ; Pereira *et al*, 2010.

De façon générale, les signes cliniques sont moins sévères chez les filles, vraisemblablement grâce à la compensation permise par le second chromosome X. Certains signes cliniques du SCL peuvent être détectés dès la naissance et se développent au cours des premières années de vie, c'est le cas de certaines malformations faciales observées chez tous les garçons (figure 15).

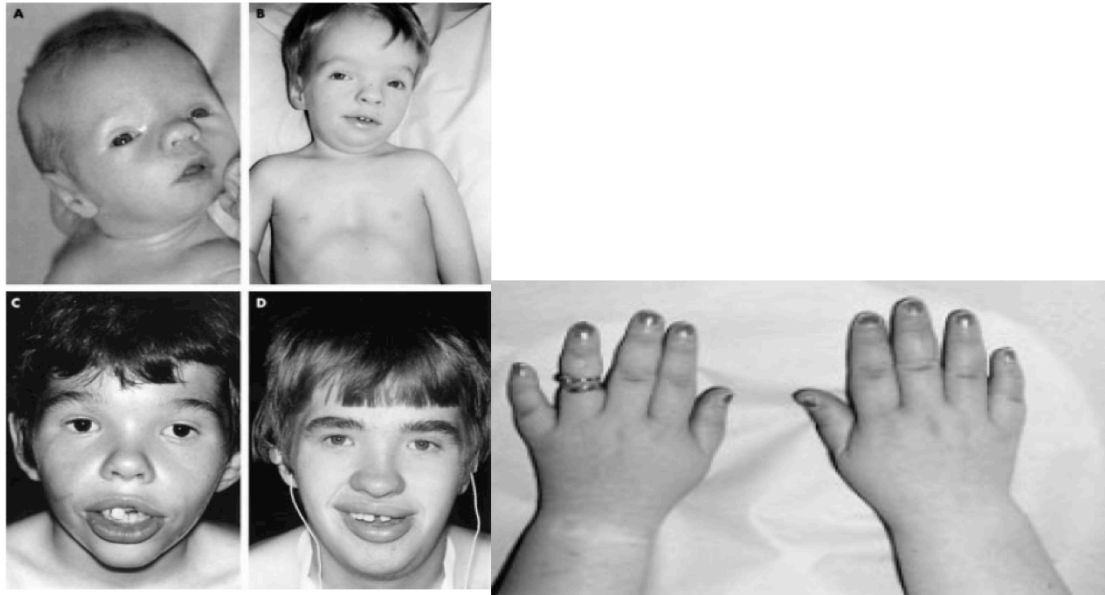


Figure 15. Gauche : Faciès caractéristique de 4 garçons atteints du SCL à différents âges. Droite : doigts d'un enfant atteint du SCL, d'après Hanauer et Young, 2002.

L'ensemble des signes cliniques répertoriés n'est pas systématiquement observé chez tous les patients (Hanauer et Young, 2002 ; Hunter *et al*, 2002 ; Pereira *et al*, 2010). Les malformations physiques telles que le *pectus excavatum* ou encore la scoliose sont observées chez 80% des garçons. Les patients atteints du SCL montrent également un retard de croissance qui se met en place dès les premières années (Pereira *et al*, 2010). D'autres malformations plus rares comme des malformations du coeur peuvent également être observées (15% des patients). Au niveau neurologique, des études d'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) portant sur quelques patients ont permis de mettre en évidence une diminution générale du volume cérébral (Kesler *et al*, 2007) ainsi qu'une dilatation des ventricules latéraux (Kondoh *et al*, 1998). Des cas de déficits auditifs neurosensoriels ont été répertoriés chez 30% des patients ainsi que des crises convulsives (5% des patients) et des crises avec chutes (20%). Au niveau cognitif, la DI sévère est diagnostiquée chez tous les garçons atteints du SCL à l'exception de quelques cas de DI légère (Manouvrier-Hanu *et al*, 1999). Comme mentionné dans le tableau 2, le QI des patients SCL est évalué entre 15 et 60,

ce qui suggère des déficits cognitifs relativement importants. Cependant, excepté ces valeurs de QI, nous ne disposons pas de données détaillées quant à la nature de ces déficits. Les patients montrent d'une façon générale un comportement paisible, bien qu'il ait été recensé chez certaines femmes atteintes, quelques rares cas de schizophrénie, de dépression ou encore de comportement psychotique et de repli sur soi. Dans les cas les plus sévèrement atteints, les enfants ne sont pas capables d'acquérir le langage. Enfin, des difficultés de navigation spatiale ont été rapportées chez quelques enfants. Par exemple, un enfant atteint du SCL serait capable d'effectuer seul le trajet le menant de sa maison à son école (et l'inverse), mais pourrait avoir des difficultés à atteindre un de ces deux lieux si on le place quelque part sur le trajet (Drs Hanauer et Touraine, communication personnelle). Excepté ces quelques cas, l'analyse de la cognition chez les patients atteints du SCL est difficile, car le nombre de patients répertoriés et étudiés reste faible. Cependant, il serait intéressant de connaître quelles sont les différentes formes de mémoires affectées dans le SCL.

#### 4.4 Causes

La majorité des cas de SCL sont sporadiques, seuls 20 à 30% des patients présentent des antécédents familiaux. En 1996, des études génétiques, menées à l'IGBMC (Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, CNRS UMR 7104, Inserm U964) d'Illkirch, ont montré que ce sont des mutations du gène *RPS6KA3* (ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypeptide 3) aussi appelé *rsk2*, qui sont à l'origine du SCL (Trivier *et al*, 1996). Ce gène code la protéine kinase RSK2. Actuellement, plus de 140 mutations distinctes de ce gène ont été mises en évidence dans le SCL (Abidi *et al*, 1999 ; Jurkiewicz *et al*, 2010 ; Pereira *et al*, 2010). Ces mutations sont de différents types (tableau 3) et aucune corrélation entre un type de mutation et les signes cliniques observés chez les personnes atteintes du SCL n'a pu être clairement mise en évidence (Nakamura *et al*, 2005). Quel que soit le type, toutes ces mutations entraînent la synthèse d'une protéine peu ou pas fonctionnelle.

Type de mutation	Fréquence des mutations
Faux-sens	30 %
Non-sens	15 %
Erreur d'épissage	20 %
Délétion/Insertion (courte)	30 %
Délétion/Insertion (grande)	3 cas

Tableau 3. Types et fréquences des mutations retrouvées chez les personnes atteintes du SCL, d'après Hahn *et al*, 2012.

#### 4.5 Diagnostic

Le diagnostic du SCL est principalement basé sur l'observation des signes cliniques. Ceux-ci apparaissant progressivement, le diagnostic peut être compliqué, notamment chez les nouveau-nés. Il existe également des risques de confusions avec d'autres syndromes présentant des signes cliniques similaires, tels que l'alpha thalassémie avec déficience intellectuelle liée à l'X. Compte tenu de ces difficultés, un diagnostic moléculaire qui consiste à mettre en évidence la présence de mutations du gène *rsk2*, par des méthodes de PCR ou indirectement par western blot (via l'analyse de la protéine RSK2), peut être effectué. Dans le cas des familles présentant un risque, un diagnostic prénatal est possible par biopsie du trophoblaste ou amniocentèse (Hanauer et Young, 2002 ; Touraine, 2002 ; Orphanet, 2007 ; Pereira *et al*, 2010).

#### 4.6 Traitements et espérance de vie

Il n'existe actuellement aucun traitement curatif pour le SCL. Cependant, des traitements symptomatiques ciblant certains signes cliniques sont mis en place afin d'améliorer le quotidien des personnes atteintes. C'est par exemple le cas pour les malformations de la colonne vertébrale qui sont corrigées par des méthodes chirurgicales. Dans le cas de patients présentant des crises convulsives, des médicaments pour lutter contre ces crises sont utilisés.

L'espérance de vie des personnes atteintes du SCL est variable, car elle dépend de la sévérité des symptômes. D'une façon générale, les femmes atteintes vivent plus longtemps que les hommes (Partington, 1988). Selon les quelques cas répertoriés, des patients sont décédés suite à des infections telles que la pneumonie ou la myocardite (infection du cœur).

Plusieurs garçons atteints du SCL sont également morts suite à des complications dues à l'anesthésie générale au cours des opérations nécessaires pour les corrections orthopédiques ou dentaires (Hanauer et Young, 2002).

## 5. Les protéines RSKs

### 5.1 Famille des RSKs

Chez l'homme la famille des protéines kinases RSKs comprend 4 isoformes : RSK1, RSK2, RSK3 et RSK4 (figure 16). Ces quatre protéines sont codées par des gènes distincts localisés sur les chromosomes 1 (*RSK1*), X (*RSK2* et *RSK4*) et 6 (*RSK3*). Les 4 protéines RSK partagent une très forte homologie de séquence (73 à 80 % d'acides aminés identiques) et divergent souvent au niveau de leurs extrémités C et N terminales. Elles possèdent aussi des homologies de structure avec une autre famille de protéines kinases : les « Mitogen and Stress activated Kinases » (MSK). Les homologues des RSKs ont été mis en évidence chez certains rongeurs (rat et souris), le xénope ou encore le poulet (pour revue, voir Romeo *et al*, 2012). Les protéines RSKs sont composées d'environ 800 acides aminés et sont caractérisées par la présence de deux domaines fonctionnels kinase distincts (Jones *et al*, 1998) : le domaine C-terminal kinase (DCTK) et le domaine N-terminal kinase (DNTK) (figure 16). La présence de ces deux domaines kinases au sein de la même protéine est peu courante et confère aux protéines RSK des caractéristiques de deux familles de protéines kinases distinctes, la famille des «  $\text{Ca}^{2+}$ /calmoduline-dependent protein kinase (CAMK) » pour le DCTK et la famille des « protein kinase A, G et C » (AGC) pour le DNTK. En plus de ces 2 domaines, les protéines possèdent également une région linker reliant les deux domaines kinase, et un domaine D permettant de lier certaines des protéines activatrices des RSK (figure 16).

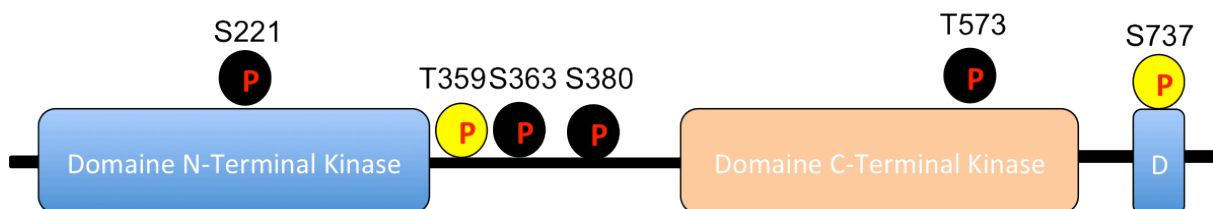


Figure 16. Schéma simplifié représentant la structure générale des protéines RSKs. La région séparant le DCTK et le DNTK représente la région du linker. Les cercles représentent les sites de phosphorylation conservés dans les 4 protéines RSK. Les cercles noirs correspondent aux sites de phosphorylation indispensables à l'activation de la protéine (Dalby, 1998).

## 5.2 Expression tissulaire

Des études se sont intéressées à l'expression tissulaire des ARN messager (ARNm) des RSKs chez l'humain et la souris. Au niveau périphérique, chez l'homme et la souris, les 4 RSKs sont exprimées dans tous les tissus (Zeniou *et al*, 2002 ; Kohn *et al*, 2003 ; bioGPS.org (base de données)) avec une plus faible expression générale de RSK4 chez l'adulte.

Plus spécifiquement, chez l'embryon humain, on détecte un signal de l'ARNm de RSK2 à partir de 9 semaines de développement, mais plus à 13 semaines. L'ARNm de RSK2 est principalement retrouvé dans les régions cérébrales en développement tel que le télencéphale, le cervelet et l'hippocampe (Guimiot *et al*, 2004).

Dans le cerveau humain adulte, les ARNms de RSK1, 2 et 3 ont été détectés dans plusieurs structures cérébrales (Zeniou *et al*, 2002). Cependant, l'ARNm de RSK1 est plus fortement exprimé dans la couche granulaire du cervelet. L'ARNm de RSK2 est également fortement exprimé dans l'hippocampe, le cervelet mais aussi dans le pôle occipital et le lobe frontal. Enfin, l'ARNm de RSK3 est, lui, fortement exprimé dans la medulla.

Chez la souris, l'expression des RSKs présente un caractère variable et transitoire entre la période embryonnaire et l'âge adulte. L'ARNm de RSK1 est fortement exprimé au début de l'embryogenèse au niveau du neuro-épithélium et plus faiblement dans les autres régions. Au stade E16.5, son expression diminue fortement dans le système nerveux en développement (Zeniou *et al*, 2002). Dans le cerveau adulte, son expression est très faible de façon globale, excepté dans la couche granulaire du cervelet. L'ARNm de RSK2 est, quant à lui, faiblement exprimé chez l'embryon murin. Par contre, son expression est très forte dans l'hippocampe, le cervelet et le cortex cérébral du cerveau murin adulte, mais reste faible dans les autres structures cérébrales (Zeniou *et al*, 2002). Concernant RSK3, son ARNm est fortement exprimé dans les systèmes nerveux, centraux et périphériques chez la souris au stade embryonnaire. Dans le cerveau adulte il est fortement exprimé dans le noyau accumbens, le noyau de l'amygdale latéral et également dans la couche granulaire du GD au niveau de l'hippocampe. Enfin, chez la souris en développement, l'ARNm de RSK4 est fortement exprimé dans les systèmes nerveux centraux et périphériques et beaucoup plus faiblement dans les autres tissus. A ma connaissance, l'expression détaillée de RSK4 n'a pas été étudiée chez la souris adulte.

### 5.3 Signalisation cellulaire des RSKs

Les protéines RSK, sous leur forme inactive, sont majoritairement cytosoliques. Une fois activées, elles sont non seulement retrouvées dans le cytosol, mais également dans le noyau (Chen *et al*, 1993). Les protéines RSKs sont situées à l'extrémité « effectrice » de la voie de signalisation cellulaire des Mitogen Activated Protein kinases (MAPK). De par cet emplacement, elles font partie d'un groupe de protéines kinases appelées les MAPKAPK pour MAPK-activated protein kinase qui regroupe des protéines kinases activées par les MAPK. Les MAPKs sont les principales composantes de voies de signalisation impliquées dans de grandes fonctions cellulaires telles que la survie, la prolifération, la migration, ou la croissance cellulaire. Elles forment une famille de protéines kinases vaste et très conservée qui vont être activées par des facteurs de croissance, des chimiokines, le stress et d'autres stimuli (pour revue, Cargnello et Roux, 2011). La signalisation cellulaire de la voie des MAPK débute par l'activation cellulaire qui va entraîner l'activation d'une MAPK kinase kinase (MAPKKK). Cette MAPKKK va phosphoryler à son tour une MAPK Kinase (MAPKK) qui elle-même va phosphoryler une MAP kinase. Pour terminer la transduction du signal, la MAPK va activer les MAPKAPKs qui activeront leurs cibles, générant ainsi une réponse cellulaire au stimulus (figure 17). L'activation des MAPKAPK peut nécessiter l'intervention de protéines extérieures à la voie des MAP kinases. Il existe plusieurs voies (aussi appelées modules) de MAPK qui vont se différencier par leurs stimuli activateurs, les protéines qui les composent, ainsi que par leurs cibles. De par leur structure conservée, il est possible de retrouver des modules de MAPK qui partagent les mêmes cibles (figure 17).

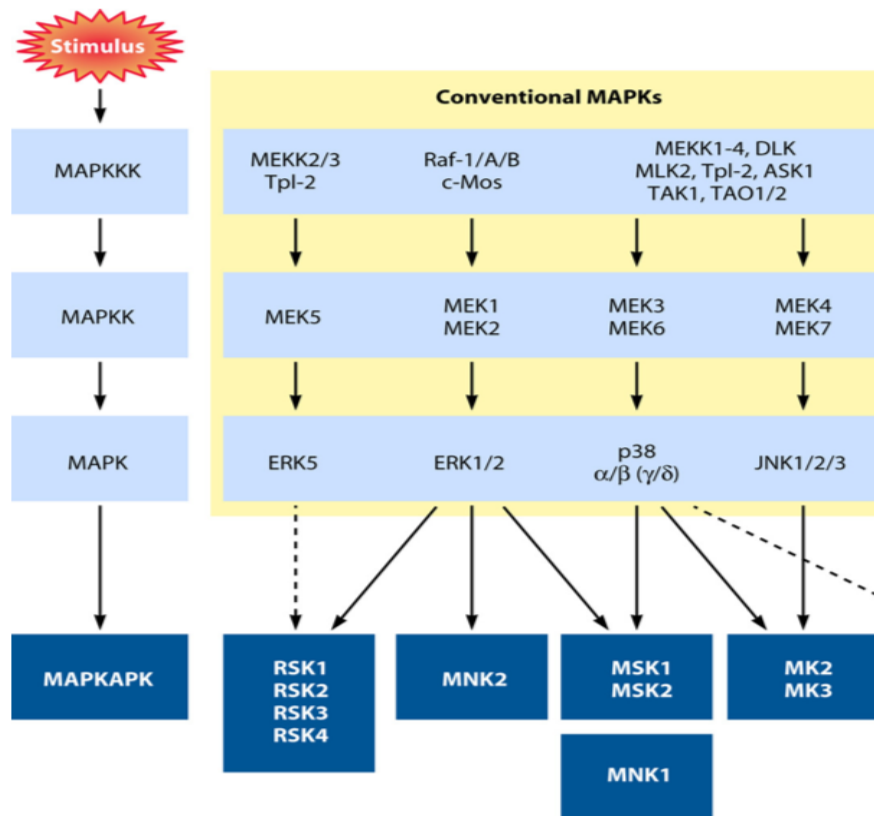


Figure 17. Schéma représentant l'ordre d'activation des MAP kinases, d'après Cargnello et Roux, 2011.

#### 5.4 Activation

Les études menées sur les protéines RSKs ont permis d'établir un modèle de leur activation. De manière constitutive les RSKs sont inactives sauf RSK4 chez la souris qui présente *in vitro* une activité basale équivalente à 50 % de son activation totale, due à des phosphorylations constitutives (Dümmeler *et al*, 2005). Les RSKs sont activées suite à la phosphorylation de certains de leurs résidus sérine et thréonine. Ces sites de phosphorylations sont très conservés, il en existe 6 dont 4 sont indispensables à l'activation des protéines (figures 16 et 18). L'activation des RSK (RSK1, 2 et 3) nécessite à la fois la MAPK sérine/thréonine ERK1/2 (Extracellular signal-Regulated Kinases) ainsi que la sérine/thréonine kinase 3-Phosphoinositide-Dependent protein Kinase 1 (PDK1) (Jensen, 1999) constitutivement active et présente dans le cytosol (figure 18). L'activation débute par la fixation de ERK1/2 sur le domaine D. ERK1/2 va ensuite phosphoryler la thréonine 573 qui va entraîner l'activation du DCTK. ERK phosphoryle par la suite la thréonine 359 et la sérine 363 au niveau de la région linker. En parallèle, le domaine C-terminal va phosphoryler la sérine 380 permettant de créer un site de liaison pour PDK1. PDK1 va alors activer le



domaine N-terminal kinase par phosphorylation de la sérine 221 (figure 18). Enfin, le domaine N-terminal kinase va phosphoryler les différentes cibles de la protéine qui peuvent être cytosoliques ou nucléaires.

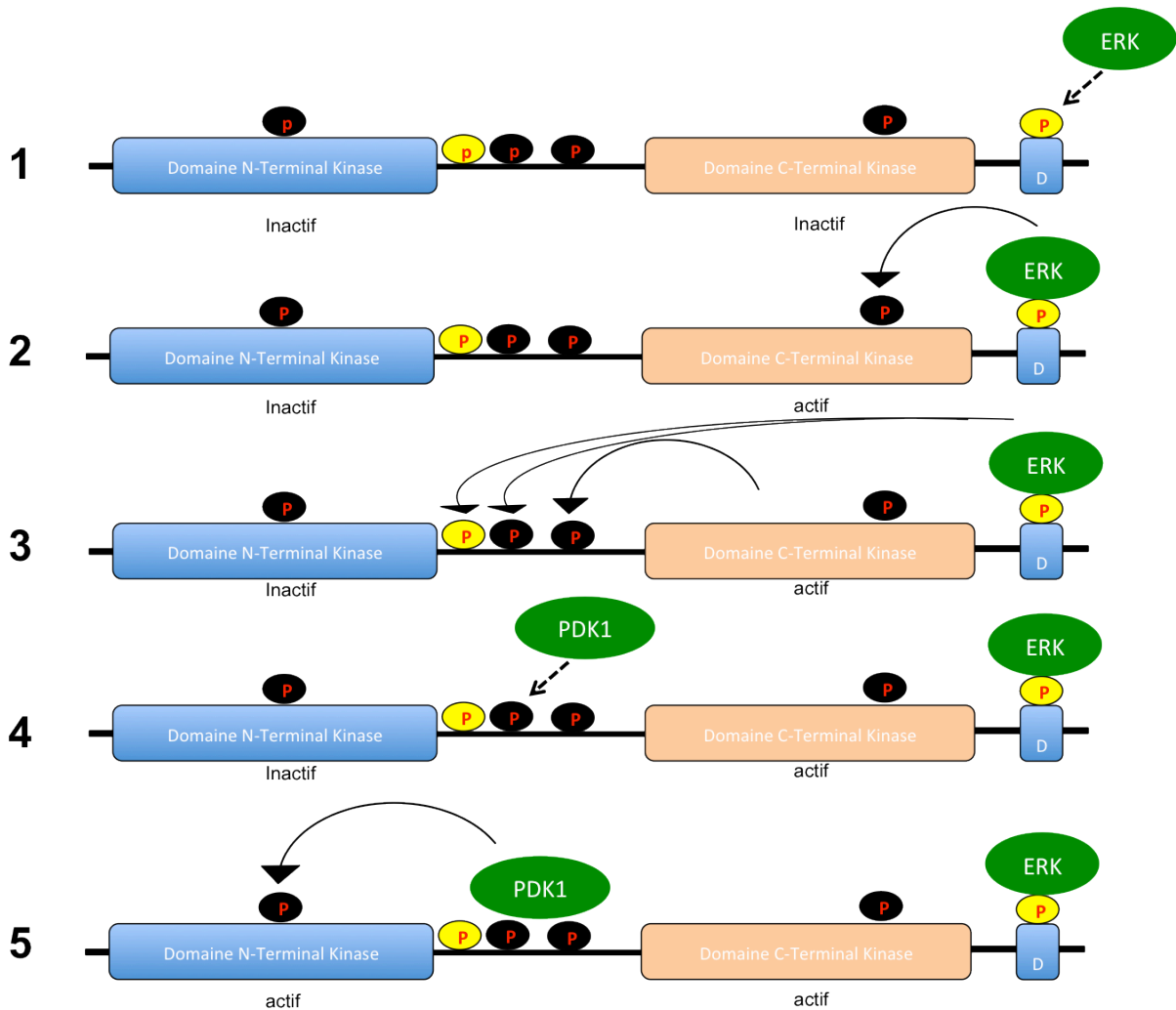


Figure 18. Schéma simplifié d'activation des protéines RSKs. Les flèches pleines correspondent aux phosphorylations activatrices. Les flèches en pointillé correspondent au déplacement des protéines. Les chiffres allant de 1 à 5 représentent la chronologie de l'activation, d'après Romeo *et al*, 2012.

### 5.5 Fonctions cellulaires des RSK2

Les fonctions des RSKs se traduisent par l'action de leurs cibles. De par leurs fortes homologies de séquences, il est possible que les différents membres de la famille RSK aient des cibles communes. À ma connaissance, il est difficile de déterminer avec certitude s'il existe des cibles spécifiques à un seul des homologues de la famille RSK. Cependant, parmi les différentes protéines RSKs, certaines possèdent des caractéristiques particulières laissant

supposer l'existence de cibles plus spécifiques. C'est le cas de RSK3, qui est la seule des RSKs à posséder un signal de localisation nucléaire (Zhao *et al*, 1995). Pour la suite de ce manuscrit, je vais me focaliser uniquement sur les fonctions de la protéine RSK2.

La protéine RSK2, à travers ses différentes cibles est impliquée dans plusieurs fonctions :

L'apoptose : Il est montré dans la littérature que RSK2 est impliquée dans les mécanismes de survie cellulaire via ses cibles anti-apoptotiques. En effet, elle phosphoryle la protéine BCL2-Associated Death promoter (BAD) (Tan *et al*, 1999), qui, lorsqu'elle est phosphorylée, a une action anti-apoptotique. Cependant, selon Clark *et al* (2007), la phosphorylation de BAD ne serait pas principalement liée à RSK2, mais à MSK1. Parmi les cibles pro-apoptotiques on compte aussi la protéine DAPK dont la phosphorylation par RSK2 supprime son action pro-apoptotique (Anjum *et al*, 2005). RSK2 phosphoryle également le facteur de transcription p53 qui est indispensable au maintien de l'intégrité cellulaire, car il va pouvoir, dans des conditions de stress, déclencher la réparation de l'ADN ou l'apoptose (Cho *et al*, 2005). Fisher *et al* (2009), ont montré que, malgré ses cibles pro-apoptotiques, RSK2 n'a aucune influence sur la survie des motoneurones. En revanche, elle a un rôle de régulation de la croissance axonale des motoneurones. En effet, les motoneurones n'exprimant pas RSK2 ont des axones plus développés que ceux qui l'expriment.

RSK2 serait également impliquée dans le fonctionnement du cycle cellulaire. En effet des traitements avec des inhibiteurs de RSK2 sont capables d'arrêter la prolifération cellulaire de cellules humaines tumorales en culture (Tan *et al*, 1999). RSK2 inhibe l'activité de la protéine GSK3 $\beta$  qui compte, parmi ses fonctions, la phosphorylation de facteurs de transcription (Sutherland *et al*, 1993) pouvant être impliqués dans des fonctions cellulaires telles que la migration ou encore la prolifération cellulaire. L'action de la protéine RSK2 dans la prolifération cellulaire a également été suspectée de par sa fonction activatrice de la protéine p53. En effet la protéine p53 est fortement impliquée dans la prolifération anarchique des cellules tumorales (Cho *et al*, 2005). Des études ont également montré que l'absence de RSK2 entraîne une augmentation de la neurogenèse embryonnaire corticale. En effet, à partir des cellules prélevées au stade embryonnaire et n'exprimant plus la protéine RSK2, il a été observé, *in vitro*, une augmentation de la prolifération des cellules précurseurs qui normalement se différencient en neurones corticaux (Dugani *et al*, 2010). La protéine est également impliquée dans la progression de la phase G1 du cycle cellulaire, *via* le contrôle de

CDK2 (Fujita *et al*, 2003). Différentes études effectuées sur RSK2 montrent qu'elle agit comme un régulateur essentiel de la tumorigénèse (pour revue, voir Romeo *et al*, 2012).

La différenciation cellulaire : RSK2 active l'Activating Transcription Factor-4 (ATF4) qui est une protéine impliquée dans la différenciation et la fonction des ostéoblastes. Les ostéoblastes sont des cellules responsables de la synthèse du collagène de type 1, qui est un composant essentiel de l'os (Yang *et al*, 2004). Cette fonction de RSK2 est probablement liée aux problèmes osseux observés chez les patients atteints du SCL. Il a aussi été montré chez la souris au stade embryonnaire que RSK2 était impliquée dans la neurogenèse. En effet, en l'absence de RSK2 il y a une augmentation de la quantité de cellules précurseurs radiales (Dugani *et al*, 2010). Cette étude suggère que la protéine RSK2 serait impliquée dans la différenciation des précurseurs en neurones corticaux. Cependant, à notre connaissance aucune étude n'a analysé le rôle de la protéine RSK2 dans la neurogenèse hippocampique adulte.

RSK2 possède aussi des cibles dont les fonctions sont variées telles que la protéine Histone H3 qui est une protéine du nucléosome (complexe protéique autour duquel s'enroule l'ADN afin de réguler la transcription). En 1999, Sassone-Corsi et son équipe ont montré que RSK2 phosphorylait H3. Si Soloaga *et al* (2003) ont suggéré qu'il s'agissait de MSK 1 et 2 qui phosphorylait cette protéine, Cho *et al* (2005) ont confirmé que RSK2 phosphorylait l'histone H3 par l'intermédiaire d'un complexe formé entre RSK2 et la protéine p53. Des observations similaires ont été faites pour le facteur de transcription CREB impliqué dans la survie cellulaire et dans les mécanismes de plasticité et de mémoire. La phosphorylation de CREB a d'abord été montrée comme étant réalisée par RSK2 (De Cesare *et al*, 1998), mais ensuite par MSK1 et MSK2 (Wiggin *et al*, 2002). Ces observations controversées sont dues à la complexité de la voie de signalisation à laquelle appartient RSK2. Elles rendent difficile la détermination de certaines cibles de la protéine et par conséquent la détermination avec précision de certaines de ses fonctions. RSK2 est également impliquée dans la régulation du gène immédiat précoce *c-fos* (figure 19 ; Chen *et al*, 1993).

Au niveau neuronal, plusieurs conséquences de l'absence de RSK2 ont été décrites. En effet, les souris *Rsk2*-KO montrent un déficit de la transmission synaptique et de l'excitabilité dans le gyrus denté et l'analyse en microscopie électronique montre que les souris *Rsk2*-KO présentent des anomalies des épines dendritiques (Morice *et al*, 2013). *In vitro*, il a été montré que RSK2 jouait un rôle important dans la croissance neuritique des neurones corticaux embryonnaire (Ammar *et al*, 2013).

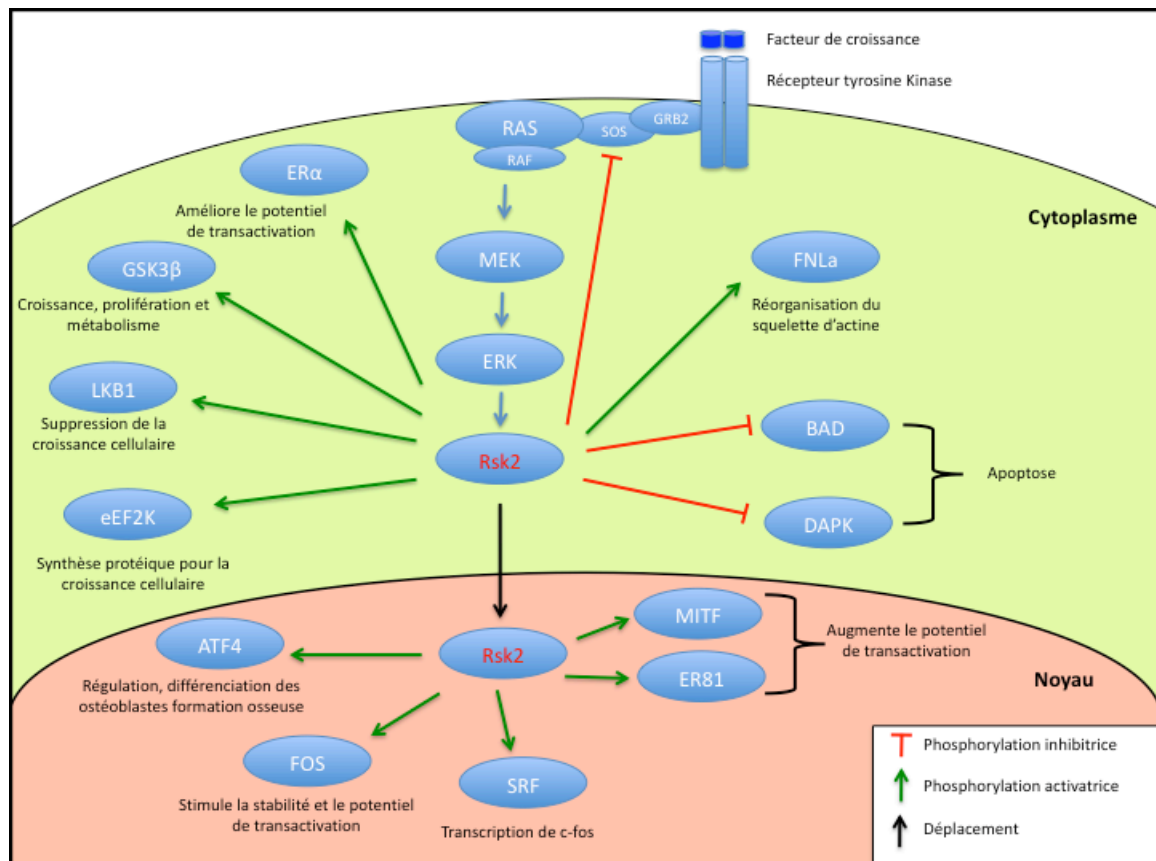


Figure 19. Exemple général de cibles cytosoliques et nucléaires de la protéine RSK2, d'après Hauge et Frödin, 2006.

## 6. Modèles murins du SCL

Dans le but d'étudier le rôle physiopathologique de la protéine RSK2, deux modèles de souris *Rsk2*-KO de construction différente ont été générés (Dufresne *et al*, 2001 ; Yang *et al*, 2004).

La première souris *Rsk2*-KO de Dufresne *et al* (2001) présente des caractéristiques phénotypiques particulières, elle est plus légère (10 %) et de plus petite taille (14 %) que les souris WT. Il a été montré que la différence de poids est due à une quantité moins importante

de tissus adipeux blancs qui s'installe à partir de 10 semaines après la naissance (El-haschimi *et al*, 2003). Au niveau tissulaire, l'étude de Dufresne *et al* (2001) s'est principalement intéressée aux muscles, et n'a montré aucune augmentation des autres isoformes de RSKs, dans l'hypothèse d'une éventuelle compensation. Au niveau comportemental, cette souris présente un déficit de coordination dans une tâche de rotarod. Cette souris présente également des déficits d'apprentissage spatial dans la tâche de piscine de Morris évaluant l'apprentissage spatial. Dans cette étude malheureusement peu détaillée d'un point de vue comportemental, il est montré que les souris *Rsk2*-KO ont mis 7 fois plus de temps pour atteindre la plateforme que les souris WT (Dufresne *et al*, 2001).

La deuxième souris générée est celle qui a été utilisée au cours de cette thèse. Elle présente aussi une diminution de poids et de taille due à une diminution de la masse osseuse (Yang *et al*, 2004). En 2007, à l'aide d'une batterie de tests comportementaux, une caractérisation comportementale détaillée de cette souris *Rsk2*-KO, effectuée au CNRS d'Orsay et à l'institut d'anatomie de Zurich, a permis de valider cette souris comme modèle d'étude de la DI du SCL (Poirier *et al*, 2007). Selon cette étude, les souris *Rsk2*-KO ne montrent aucun déficit de force musculaire et de coordination motrice dans les tâches de la grille inversée et du réflexe de traction. Elles présentent une activité locomotrice normale dans la tâche de locomotion / exploration dans l'open field. Cependant, dans un test d'émergence où l'animal, placé dans un openfield, peut accéder à une petite boîte familière pour se cacher, il est apparu que les souris *Rsk2*-KO sont plus actives et passent moins de temps que les souris WT dans la petite boîte. Quand, après 30 minutes, un nouvel objet est placé dans ce contexte, les souris *Rsk2*-KO mettent moins de temps à s'approcher de cet objet que les souris WT. Ceci suggère que les souris *Rsk2*-KO montrent, dans ce contexte, de légers signes de desinhibition dans l'activité exploratoire. Ce type de comportement a été retrouvé lors de la 1<sup>ère</sup> phase d'acquisition dans la tâche de reconnaissance d'objets où les souris *Rsk2*-KO explorent significativement plus les objets que les souris WT. Ces temps d'exploration redeviennent comparables à ceux des souris WT lors de la 2<sup>ème</sup> phase d'acquisition.

Au cours de cette même étude, un ensemble de tâches d'apprentissage et de mémoire a été effectué. Ainsi, les souris *Rsk2*-KO ne montrent aucun déficit par rapport aux souris WT dans le test d'aversion gustative conditionnée évaluant une mémoire associative à long terme (association sucrose / chlorure de lithium). Dans la tâche de reconnaissance d'objets, lors des tests de mémoire de reconnaissance des objets et de l'emplacement spatial des objets, les

souris *Rsk2*-KO, comme les souris WT, explorent significativement plus le nouvel objet ou l'objet déplacé 24 heures après l'acquisition. D'ailleurs, une autre étude effectuée plus récemment au laboratoire a confirmé que la présence de RSK2 n'est pas nécessaire pour la consolidation de la mémoire de reconnaissance spatiale (testée 48 heures après l'acquisition). Par contre, si une phase de ré-exposition au contexte (quelques minutes) est effectuée 24 heures après l'acquisition, les souris *Rsk2*-KO, contrairement aux souris WT, présentent alors un déficit de mémoire de l'emplacement spatial des objets, suggérant une implication de RSK2 dans la reconsolidation (Davis *et al*, 2010).

Au cours de l'étude publiée en 2007, plusieurs tâches impliquant l'apprentissage et la mémoire spatiale ont été effectuées. Ainsi, dans une tâche spatiale en labyrinthe radial où tous les bras du labyrinthe sont appâtés, les souris *Rsk2*-KO montrent un léger déficit de mémoire de travail. En effet, le nombre moyen d'erreurs de mémoire de travail effectué par les souris *Rsk2*-KO est significativement plus important que celui des souris WT bien qu'il diminue au cours de l'apprentissage (figure 20A). Cependant, une analyse plus détaillée montre qu'au sein d'un même essai, les souris *Rsk2*-KO font autant d'erreurs de mémoire de travail que les souris WT lorsqu'elles recherchent les 7 premières récompenses. La différence globale n'est, en fait, due qu'à la recherche du 8<sup>ème</sup> et dernier bras appâté, ce qui signifie que leur probabilité d'erreurs augmente en fonction de la quantité d'information spatiale à retenir (figure 20B). Évaluées dans un test d'alternance spontanée dans un labyrinthe en croix, les performances des souris *Rsk2*-KO diffèrent significativement de la chance et sont similaires à celles des souris WT en ce qui concerne l'alternance (ordre d'enchaînement des bras visités). Cependant, lors de ce test, les souris *Rsk2*-KO visitent significativement plus de bras que les souris WT, révélant une légère hyperactivité. Dans d'autres tâches impliquant une composante spatiale, les souris *Rsk2*-KO présentent des difficultés. Ainsi, dans une étude récente, Darcq *et al* (2011) ont montré, dans une tâche de conditionnement de place, que les souris *Rsk2*-KO ne présentent aucun évitement du lieu préalablement rendu aversif (par association avec du chlorure de lithium) contrairement aux souris WT. Au laboratoire, il a également été montré que les souris *Rsk2*-KO présentaient des déficits de mémoire dans une tâche de conditionnement de peur contextuelle (protocole de trace où un délai de 15 secondes est inséré entre le son et le choc électrique). Cette étude a également montré que les souris *Rsk2*-KO ne présentent aucun déficit de consolidation dans une tâche de conditionnement de peur au contexte, mais présentent un déficit de reconsolidation dans cette

même tâche (Morice *et al*, 2013). Enfin, c'est dans la tâche de la piscine de Morris que les déficits les plus importants ont été observés. Plusieurs protocoles de piscine de Morris ont été effectués, et quel que soit le protocole utilisé, les souris *Rsk2*-KO parviennent à acquérir l'emplacement de la plateforme, mais montrent un retard d'apprentissage par rapport aux souris WT (figure 20B). C'est dans le protocole de 11 jours de forme semi-massé (2 blocs de 4 essais par jour) que le retard d'apprentissage le plus important pour les souris *Rsk2*-KO a été observé, bien qu'au bout de 11 jours, les performances des souris *Rsk2*-KO rejoignent celles des souris WT (figure 20C). Concernant les tests de mémoire spatiale, elles ne montrent aucun déficit de mémorisation de l'emplacement de la plateforme lors de la phase de rétention de la tâche 24 heures après la fin de l'apprentissage par rapport au WT (figure 20D). En revanche, elles montrent un déficit de mémoire pour ce même emplacement 9 jours après la fin de l'apprentissage par rapport aux souris WT (figure 20E). Dans cette même étude, en utilisant deux autres protocoles : 6 essais par jour pendant 5 jours et 2 essais par jour pendant 14 jours, les auteurs ont également montré un retard d'apprentissage chez les souris *Rsk2*-KO. Cependant, lorsqu'elles ont été testées dans un protocole de piscine de Morris en « *reversal* » c'est-à-dire quand la plateforme est déplacée au cours de l'apprentissage, les souris *Rsk2*-KO montrent une flexibilité quasiment équivalente à celles des souris WT (Poirier *et al*, 2007).

L'ensemble de ces données a permis de mettre en évidence certains déficits cognitifs et en particulier dans des tâches impliquant une composante spatiale et plaçant une forte demande sur le traitement hippocampique de l'information.

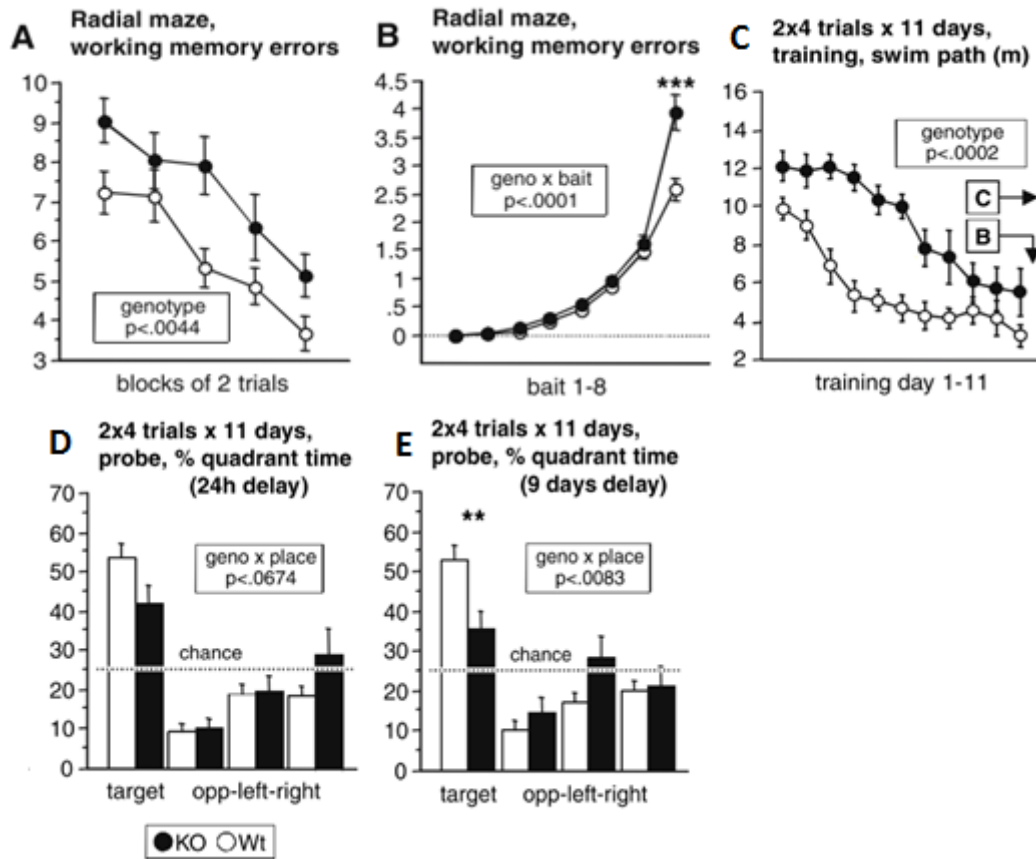


Figure 20. (A) et (B) Nombre d'erreurs de mémoire de travail dans le labyrinthe radial à 8 bras. (C) Dans la tâche de la piscine de Morris, distance parcourue pour atteindre la plateforme en fonction des jours d'apprentissage. Les souris *Rsk2*-KO montrent un retard d'apprentissage spatial par rapport au WT. (D) et (E) Test de rétention respectivement 24 heures et 9 jours après le dernier jour d'apprentissage dans la piscine de Morris. À 24 heures il n'y a pas de déficit de mémoire de l'emplacement de la plateforme chez les souris *Rsk2*-KO par rapport aux WT alors qu'après 9 jours les souris *Rsk2*-KO montrent des déficits par rapport au WT, d'après Poirier *et al*, 2007.





## OBJECTIFS DE LA THÈSE

Comme nous l'avons mentionné précédemment, plusieurs études se sont focalisées sur la relation qu'il peut y avoir entre des altérations de la neurogenèse adulte hippocampique et la DI (Pons-Espinal *et al*, 2013). Ces études sont principalement menées chez des souris modèles de DI :

- Modèle du syndrome de l'X fragile : ce modèle souris *FMRI*-KO n'exprimant plus la protéine FMRP présente des déficits d'apprentissage dans des tâches hippocampo-dépendantes telles que le conditionnement de trace et la tâche d'apprentissage et de mémoire spatiale en piscine de Morris (Zhao *et al*, 2005). L'étude de ce modèle a permis de mettre en évidence diverses altérations de la neurogenèse hippocampique adulte. En effet, ces souris montrent, au niveau de l'hippocampe, une augmentation ou une diminution de la prolifération des cellules progénitrices, une diminution de la survie cellulaire ainsi qu'une augmentation de la différenciation des nouvelles cellules en cellules gliales (Luo *et al*, 2010 ; Lazarov *et al*, 2012).

- Modèle du syndrome de RETT : Cette souris KO pour la protéine MECP2 présente des déficits dans des tâches spatiales et émotionnelles (Abel *et al*, 2008). Elle présente une diminution de la complexité de l'arborisation dendritique des neurones hippocampiques (Kishi et Macklis, 2004). Contrairement au modèle du syndrome de l'X fragile, aucun déficit de prolifération, de survie ou de différenciation cellulaire dans le gyrus denté n'a été observé. Cependant, dans la même étude il a été observé chez ces souris une diminution du nombre d'épines dendritiques des nouveaux neurones du gyrus denté (Smrt *et al*, 2007).

Dans le cadre de cette thèse, nous disposons d'un modèle montrant des déficits évidents d'apprentissage et de mémoire spatiale dans la piscine de Morris qui sont clairement liés à l'hippocampe. En se basant sur la littérature existante chez les autres modèles de DI et sur le rôle de la neurogenèse hippocampique adulte dans la mémoire, ces déficits cognitifs observés chez les souris *Rsk2*-KO pourraient être en partie dus à une altération de la neurogenèse hippocampique adulte. C'est pourquoi, dans un premier temps, nous avons analysé l'état basal de la neurogenèse hippocampique adulte. Nous avons étudié la prolifération des nouvelles cellules, leur survie ainsi que leur maturation neuronale. Enfin, nous avons déterminé l'impact de l'apprentissage spatial sur la survie et la maturation des neurones néoformés.

D'autre part, compte tenu des déficits liés à l'hippocampe chez notre souris modèle, nous avons également cherché à mettre en évidence des déficits dans une autre fonction cognitive faisant intervenir l'hippocampe et plus précisément la neurogenèse adulte, il s'agit de la séparation de patterns. Comme mentionné dans l'introduction, un protocole expérimental basé sur une tâche de non-appariement retardé dans un labyrinthe radial a permis de mettre en évidence pour la première fois une implication de la neurogenèse adulte hippocampique dans la fonction de séparation de patterns (Clelland *et al*, 2009). De plus, ce protocole comprend une composante spatiale et s'effectue dans des conditions potentiellement moins stressantes que sont celles de la piscine de Morris, c'est pourquoi il nous a paru intéressant de l'utiliser pour étudier la fonction de séparation de patterns chez les souris *Rsk2*-KO.

L'enrichissement environnemental est un paradigme souvent utilisé pour améliorer les performances cognitives d'une façon générale. En effet, il a été largement montré que l'enrichissement environnemental avait des effets bénéfiques sur la morphologie et la physiologie cérébrale, incluant la neurogenèse adulte, ainsi que sur la cognition (pour revue, voir Nithianantharajah et Hannan, 2006 ; Pang et Hannan, 2013).

Les effets de l'enrichissement environnemental ont également été mis en évidence chez des modèles de DI. En effet, il a été montré que l'enrichissement pouvait restaurer les déficits cognitifs chez les modèles du syndrome de l'X fragile et du syndrome de Rett. Par exemple, un enrichissement permanent de 60 jours restaure un déficit d'exploration dans l'open field ainsi qu'un déficit d'exploration d'objets dans la tâche de reconnaissance d'objets chez un modèle de l'X fragile (Restivo *et al*, 2005). Concernant le syndrome de Rett, un enrichissement permanent de 50 jours entraîne une restauration des déficits d'apprentissage spatiaux dans la piscine de Morris chez la souris modèle (Lonetti *et al*, 2010).

Ainsi, à l'aide d'un paradigme d'enrichissement environnemental de courte durée (3h/jour pendant 24 jours), nous avons cherché à restaurer les déficits d'apprentissage et de mémoire spatiale chez les souris *Rsk2*-KO dans la tâche d'apprentissage et de mémoire spatiale en piscine de Morris. Nous avons également étudié les effets de l'enrichissement chez les souris *Rsk2*-KO dans la tâche de non-appariement retardé en labyrinthe radial qui nous a permis d'étudier la fonction de séparation de patterns. Enfin, nous avons également étudié les effets de cet enrichissement sur la neurogenèse adulte hippocampique, sans, avant et après apprentissage.



## MATÉRIELS ET MÉTHODES

### 7. Animaux

Les différentes expériences ont été menées sur des souris sauvages mâles (Wild Type, WT) C57BL/6 et des souris déficientes pour le gène *Rsk2* (souris *Rsk2*-KO) générées par la méthode de recombinaison homologue (Yang *et al*, 2004). Dans cette construction, un vecteur possédant une cassette de résistance à la néomycine et ayant, à ses extrémités 5' et 3', une séquence loxP (suivie de 3 codons stop) s'intégrant dans l'exon 2 du gène *Rsk2* (figure 21), a été linéarisé et injecté par électroporation dans des cellules souches embryonnaires de souris 129SvJ. Les cellules souches ayant intégré le vecteur ont ensuite été injectées dans des blastocytes de souris C57BL/6J. La résistance à la néomycine a ensuite été éliminée en effectuant des croisements avec des souris transgéniques CMV-Cre. Les souris issues d'une vingtaine de croisements sont des souris RSK2 null n'exprimant plus la protéine RSK2.

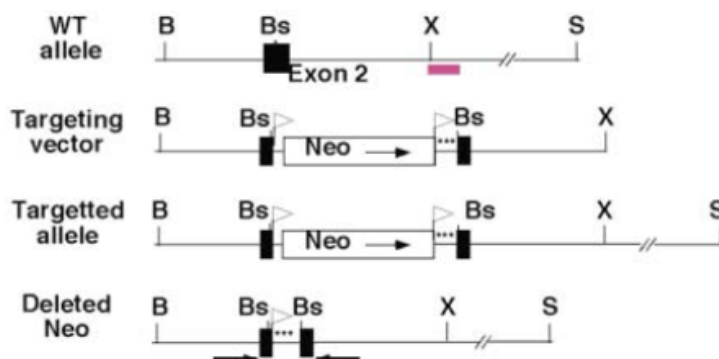


Figure 21. Vecteur permettant la génération des souris *Rsk2*-KO, d'après Yang *et al*, 2004.

Les souris utilisées pour les premières expériences ont été fournies par l'IGBMC (Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, CNRS UMR 7104, Inserm U 964) d'Illkirch. Depuis 2012, elles sont générées au sein de l'unité de reproduction de l'animalerie transgénique de l'IBAIC (numéro d'agrément : B 91 471 104). Les expériences ont été réalisées en accord avec la directive européenne du 24 novembre 1996 (86/609/EEC) sur l'expérimentation animale et les règles en vigueur en France (87/848) EU Directive 2010/63/EU. Les expériences ont été faites selon les procédures validées par le Comité Régional d'Ethique. Au début des expérimentations, l'âge des souris varie entre 3 et 5 mois. Un total de 209 souris a été utilisé pour l'ensemble des expériences de cette thèse.

## 8. Conditions d'élevage

### 8.1 Conditions standards

Les souris « standards » étaient placées (âges variables) par fratrie de 2 à 5, WT et *Rsk2*-KO confondus, dans des cages standards (32 cm x 20,4 cm x 14 cm de hauteur) avec de la nourriture et de l'eau *ad libitum* (figure 22A).

### 8.2 Conditions enrichies

Nous avons utilisé le paradigme de l'enrichissement comportemental pour ses nombreux effets positifs sur le système nerveux (pour revue, voir Nithianantharajah et Hannan, 2006). Nous avons opté pour un enrichissement partiel quotidien de 3 heures par jour durant 24 jours. Les souris « enrichies » étaient placées par groupe de 7 à 13 dans une large cage d'enrichissement (MARLAU<sup>®</sup>, 80 cm x 60 cm x 51 cm de haut) possédant deux niveaux (figure 22B, C, D). Au niveau inférieur, il y a deux compartiments où sont disposés de manière aléatoire des objets divers de formes et de couleurs variées (briques lego<sup>®</sup>, jouets en bois, jouets en plastique, bocal vides...) ainsi que 3 roues d'activité et 2 abris rectangulaires (figure 22B, D). Au niveau supérieur, il y a un labyrinthe, de forme carrée (35 cm de côté x 10cm de hauteur) noir, en métal (figure 22C). Le labyrinthe est changé 3 fois par semaine (choisi parmi un jeu de 12 labyrinthes différents).

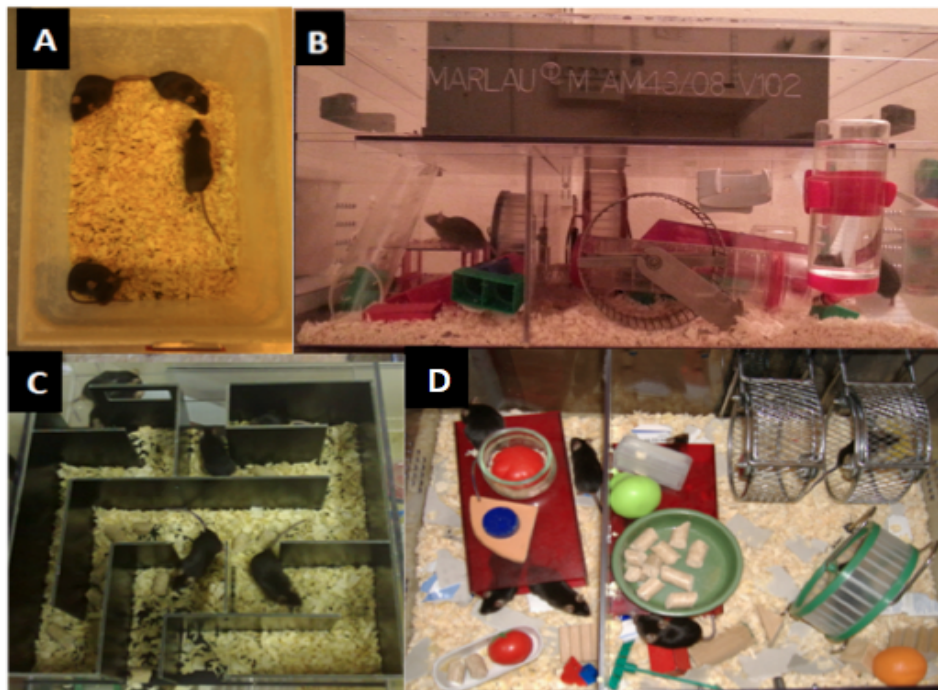


Figure 22. Conditions d'élevage. (A) Conditions standards. (B) Vue latérale de la cage d'enrichissement. (C) Labyrinthe au niveau supérieur de la cage d'enrichissement. (D) Partie inférieure de la cage d'enrichissement.

## 9. Études comportementales

Deux à 3 jours avant les tâches comportementales, les souris sont manipulées environ 10 minutes par jour par l'expérimentateur. Toutes les tâches comportementales ont été effectuées avec un bruit de fond (bruit blanc : 64 décibels) dans le but de couvrir d'éventuels bruits extérieurs perturbateurs. Pour chaque tâche, une caméra reliée à un système de videotracking est placée au-dessus des dispositifs afin d'enregistrer toutes les séquences comportementales. Au début de chaque jour de test, les souris sont individualisées dans des cages puis replacées dans leurs cages communes à la fin de la journée. Les tâches se déroulent entre 8h30 et 19h00 et sont effectuées sans connaissance du génotype des souris lors de leur passage. Toutes les tâches comportementales ont été effectuées avec des souris WT et *Rsk2*-KO, soit maintenues en conditions standard, soit placées sur une courte période en conditions enrichies.

### 10. Tâche d'apprentissage et de mémoire spatiale en piscine de Morris

Au cours de ce test, les souris placées dans la piscine de Morris doivent apprendre à localiser et mémoriser l'emplacement d'une plateforme dissimulée sous le niveau de l'eau rendue opaque, en utilisant des indices visuels de l'environnement. Les souris perçoivent la plateforme comme un renforcement positif, car elle leur permet d'échapper à l'eau. Nous avons choisi de suivre le protocole utilisé par Poirier *et al* (2007), afin de reproduire les conditions dans lesquelles ont été obtenus les déficits d'apprentissage et de mémoire spatiale les plus importants observés chez les souris *Rsk2*-KO (figure 20A). Nous avons choisi de réduire la durée initiale de l'apprentissage (11 jours), car nous nous sommes intéressés précisément à la période où est observé le retard d'apprentissage qui s'étend de 1 à 8 jours.

Le dispositif est constitué d'un bac circulaire de 150 cm de diamètre et de 39 cm de hauteur, adapté pour une utilisation aussi bien chez la souris que chez le rat. Cette piscine est remplie d'eau (température : 22-23 °C) jusqu'à environ 15 cm du bord supérieur. L'eau est rendue opaque grâce à l'utilisation d'un colorant blanc non toxique. La salle dans laquelle se trouve la piscine contient des indices disposés sur les murs qui ne seront pas déplacés durant la tâche comportementale. Une caméra reliée à un système d'acquisition permet de visualiser l'ensemble de la piscine. La piscine est virtuellement séparée en 4 quadrants (figure 23) et dans chaque quadrant est défini un point de départ au niveau de la paroi de la piscine. Une plateforme (10 cm de diamètre) est placée au milieu d'un des quadrants, à environ 1 cm sous la surface de l'eau. Le quadrant où se situe la plateforme est appelé « quadrant cible » et reste

le même pour chaque souris pendant toute la durée de la tâche. Le protocole de piscine de Morris se compose de 3 parties : l'habituation, l'acquisition et la rétention.

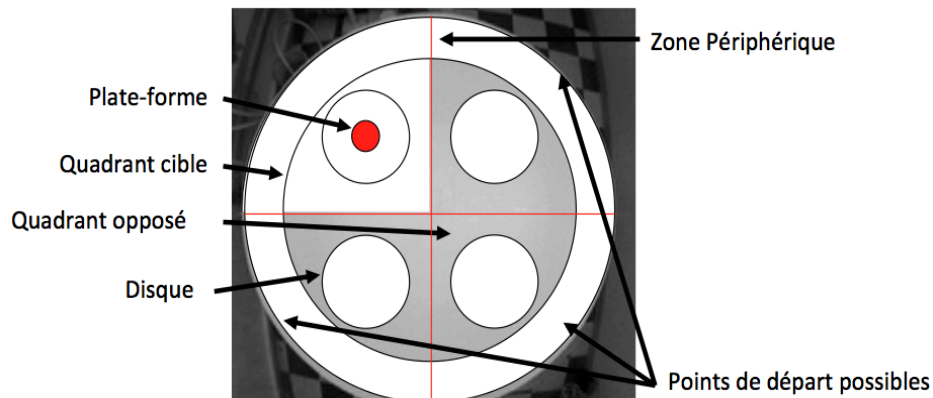


Figure 23. Piscine de Morris séparée virtuellement en 4 quadrants équivalents.

**Habituation :** Elle dure 1 journée et comprend 9 essais. La plateforme est placée au milieu de la piscine. Au cours de l'essai 1, la souris est déposée dessus et doit y rester pendant 60 secondes avant de réaliser l'essai suivant. Pour les essais 2, 3, 4 et 5, la souris est placée à différents points de départ, puis est guidée par l'expérimentateur jusqu'à la plateforme sur laquelle elle devra à nouveau rester 60 secondes. À la fin du dernier essai, la souris est séchée et replacée dans sa cage. Quatre heures plus tard, les essais 2, 3, 4 et 5 sont réitérés.

**Acquisition :** Elle débute le lendemain de la phase d'habituation, elle dure 7 jours composés de 8 essais (2 blocs de 4 essais) par jour. Durant l'acquisition, un quadrant cible est attribué à chaque souris. Au cours de l'essai 1, la souris, placée à un point de départ choisi aléatoirement, doit nager jusqu'à la plateforme. Si elle trouve la plateforme, elle peut rester dessus 60 secondes. La durée maximale de l'essai est de 90 secondes. Si, à l'issue de ce temps, la souris n'a pas trouvé la plateforme, l'expérimentateur la guide vers son emplacement et la souris doit rester dessus 60 secondes avant d'être replacée à un autre point de départ pour réaliser l'essai suivant. À la fin de l'essai 4, la souris est séchée et replacée dans sa cage. Quatre heures plus tard, 4 autres essais sont effectués de la même façon que les 4 premiers. L'ordre des points de départ est aléatoire et change entre chaque essai (tous peuvent être choisis sauf celui du quadrant cible, figure 23).



Rétention : elle se déroule le lendemain de l'acquisition, elle ne comprend qu'un seul essai, pendant lequel la plateforme est retirée de la piscine. La souris est placée à un des points de départ et doit chercher la plateforme pendant 90 secondes.

Pour chaque souris, les paramètres suivants ont été enregistrés lors de chaque essai : la latence d'atteinte de la plateforme, la vitesse de nage, la distance parcourue, le temps de nage effectué dans les différents quadrants et disques (12 cm de diamètre), la thigmotaxie (temps de nage effectué dans un corridor circulaire virtuel de 20 cm de large, en périphérie de la piscine (figure 23)), le nombre de passages de la souris sur l'emplacement de la plateforme au cours de la rétention, à l'aide du logiciel de vidéo tracking ANY-Maze Stoelting®.

### 11. Tâche de non-appariement retardé (Séparation de patterns)

Le protocole de séparation de patterns que nous avons utilisé est dérivé de Clelland *et al.* (2009). Au cours de ce test, les souris doivent apprendre à faire la distinction entre deux configurations spatiales très semblables dans un labyrinthe radial. Ces configurations proches sont matérialisées par l'écart que l'on fait varier entre 2 bras du labyrinthe.

Le labyrinthe radial (Ugo Basile, Italie) est composé d'une plateforme centrale (diamètre : 16 cm) entourée de 8 bras (35 cm de long, 5,5 cm de large) aux extrémités desquels sont fixées des coupelles (diamètre : 1,5 cm) permettant d'y déposer une récompense faisant office de renforcement positif (figure 24). Des portes à l'entrée de chaque bras peuvent être individuellement actionnées à partir d'une interface manuelle. Les bras sont ouverts sur



l'extérieur et permettent à la souris d'avoir une vision complète de la salle d'expérimentation et des indices visuels disposés aux murs.

Figure 24. Labyrinthe radial à 8 bras utilisé pour la tâche de séparation de patterns.

Le protocole est composé d'une restriction hydrique, d'une habitude et d'un apprentissage.

**Restriction hydrique :** Ce type de restriction a été préféré à la restriction alimentaire, car l'expérience de l'équipe montre que le maintien du poids des souris entre 85% et 90% de leur poids initial est plus facile avec la restriction hydrique qu'avec la restriction alimentaire. De plus, la restriction alimentaire nécessite un isolement temporaire des souris (afin de leur donner une ration précise) ce qui peut être source de stress et influencer négativement la neurogenèse adulte. La restriction s'est déroulée de la façon suivante : 4 jours avant le début de l'expérience, chaque souris est pesée et les biberons d'eau sont retirés des cages. À partir de ce jour, les souris n'auront accès à l'eau de boisson qu'une fois par jour pendant 10 à 15 minutes. Tout au long de cette expérimentation, l'évolution du poids des souris est suivie par pesée quotidienne et leur état général est contrôlé.

**Habitude :** Les souris sont renforcées par une goutte de solution de lait concentré diluée (40  $\mu$ L). Le matin, les souris sont déposées pendant 5 minutes, par fratrie, sur le labyrinthe radial où tous les bras sont ouverts. Durant ces 5 minutes, les bras sont tous renforcés et maintenus dans cet état au fur et à mesure du passage des souris dans les bras. Pendant cette habitude l'expérimentateur doit s'assurer que chaque souris a exploré les 8 bras du dispositif. L'après-midi les souris sont déposées de manière individuelle, les unes après les autres pendant 5 minutes chacune. Le labyrinthe est brièvement nettoyé à l'alcool absolu après chaque souris.

**Apprentissage :** Il dure 10 jours et est composé de 4 essais par jour, séparés d'une trentaine de minutes. Pour chaque essai, la souris part de l'extrémité d'un bras (le bras de départ). Chaque essai comprend 2 phases séparées d'une trentaine de secondes :

**Une phase imposée :** 2 bras sur 8 sont ouverts. Un de ces bras est le bras de départ et l'autre un bras renforcé (figure 25). La souris, déposée à l'extrémité du bras de départ, doit aller chercher la récompense à l'extrémité de l'autre bras. Une fois cette récompense récupérée, la souris est enlevée du labyrinthe, puis le labyrinthe est nettoyé à l'alcool avant la deuxième phase. Si au bout de 3 minutes la souris ne va pas dans le bras renforcé, elle est retirée du labyrinthe.

**Test de choix :** Les deux bras ouverts lors de la phase imposée restent ouverts, et un troisième est ouvert. Seul ce nouveau bras ouvert sera renforcé. Ce bras renforcé est soit

proche de l'ancien bras renforcé et espacé par un seul bras (séparation 2), soit éloigné et espacé de l'ancien par 3 bras (séparation 4, figure 25). Qu'elle que soit la distance entre les 2 bras, le bras nouvellement renforcé est aléatoirement choisi à la droite ou à la gauche du bras précédemment appâté. Au cours de ce test de choix, la souris est à nouveau placée dans le bras de départ et doit aller récupérer la récompense dans le nouveau bras ouvert. Si la souris va directement chercher la récompense dans le nouveau bras, l'essai est considéré comme réussi et la souris est ramenée dans sa cage. Une erreur est comptabilisée si la souris va directement dans l'ancien bras renforcé ou si au bout de 3 minutes elle ne va pas dans le bras nouvellement renforcé.

Au cours des 2 premiers jours de l'expérience, la souris a la possibilité de rectifier son erreur en allant récupérer la récompense dans le nouveau bras. À partir du 3<sup>e</sup> jour d'expérience, les souris n'ont plus la possibilité de s'auto-corriger. En cas d'erreur, elles sont directement retirées du labyrinthe. Chaque jour, les souris ont été soumises à 2 essais en séparation 2 et 2 essais en séparation 4 alternés de manière aléatoire. De même, le bras de départ de l'animal est changé à chaque essai.

Pour chaque souris, des enregistrements vidéo de tous les essais ont été effectués.

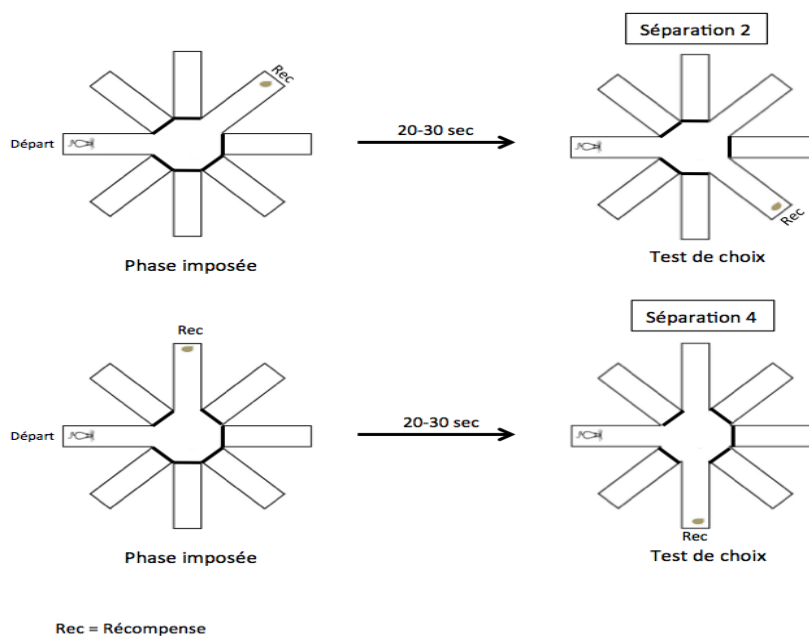


Figure 25. Séparation de patterns dans un labyrinthe radial à 8 bras.

## 12. Études de la neurogenèse hippocampique

### 12.1 Injections de BrdU

Nous avons utilisé la méthode d'intégration de la 5-Bromo-2-deoxyUridine (BrdU), un analogue de la thymidine, qui va s'intégrer à l'ADN durant la phase S du cycle cellulaire des cellules en division. La BrdU (Sigma B9285-1G) est diluée dans une solution de NaCl (10mg/ml) et NaOH (0,07N). Une fois intégrée à l'ADN, la BrdU pourra être détectée via des techniques d'immunohistochimie qui permettront de mettre en évidence les cellules néoformées au moment de l'injection. Plusieurs étapes de la neurogenèse adulte ont été étudiées à l'aide de différents protocoles d'injection.

Pour suivre la prolifération cellulaire, les souris WT et *Rsk2*-KO standards ont reçu une seule injection intra-péritonéale (IP) à une concentration de BrdU de 150 mg/kg selon le protocole de Mandyam *et al* (2007). Les souris ont ensuite été sacrifiées 2 heures après l'injection.

Pour étudier l'évolution de la survie cellulaire au cours des 6 semaines post prolifération, une cinétique à l'état basal de la survie cellulaire a été effectuée. Les souris WT et *Rsk2*-KO standards ont, pour cela, reçu 2 injections IP de BrdU par jour séparées de 2 heures durant 3 jours, à la concentration de 50 mg/kg. Elles ont ensuite été sacrifiées à 14, 28 et 42 jours après les injections.

Pour étudier la survie cellulaire chez des souris standards ou enrichies, ayant été soumises à une tâche comportementale, plusieurs protocoles ont été utilisés (figure 26). Pour tous ces protocoles, les souris ont reçu 2 injections IP de BrdU par jour, séparées de 2 heures durant 3 jours, à la concentration de 50 mg/kg.

Dans un premier groupe, les souris ont été injectées aux jours 13, 14 et 15 après le début du protocole afin de marquer une population neuronale qui se trouve dans la période critique au début de l'apprentissage et qui sera alors âgée de 10-12 jours. Ces souris ont été perfusées au jour 25, ce qui a permis d'évaluer la survie cellulaire avant les tâches comportementales (figure 26.1).

Pour étudier l'influence d'un apprentissage sur la survie cellulaire, nous avons utilisé des souris standards ou enrichies, injectées également aux jours 13, 14 et 15 puis soumises à une tâche comportementale (apprentissage et mémoire spatiale en piscine de Morris ou

séparation de pattern en labyrinthe radial). Ces souris ont été perfusées à la fin de ces tâches (J33 ou J37 selon la tâche, figure 26.2 et 26.5).

Un groupe contrôle sans tâche comportementale a été injecté aux jours 13, 14 et 15 puis perfusées à J33 (figure 26.3).

Pour contrôler l'effet de la nage sur la survie cellulaire, nous avons réalisé un groupe « nageurs » (figure 26.4). Ces souris standards ou enrichies ont, elles aussi, été injectées avec la BrdU aux jours 13, 14 et 15 puis soumises pendant 7 jours à une épreuve de nage dans la piscine de Morris. Pour ce groupe, aucune plateforme ne permet aux souris d'échapper à l'eau. Chaque souris « nageur » réalise 2 blocs de 4 essais par jour. Avant l'expérimentation, l'expérimentateur attribue à chaque animal des temps de nage qui correspondent aux temps de nage d'un animal de génotype et conditions d'élevage similaires, ayant été soumis au protocole d'apprentissage en piscine de Morris décrit ci-dessus.

Pour terminer, afin d'étudier la survie et l'activation cellulaire d'une population de nouveaux neurones plus âgés que ceux des protocoles ci-dessus, nous avons injecté des souris standards et enrichies aux 1<sup>er</sup>, 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> jours du protocole avant de les soumettre à la tâche d'apprentissage et de mémoire spatiale en piscine de Morris. Elles ont été perfusées à la fin de la tâche comportementale à J33 (figure 26.6).

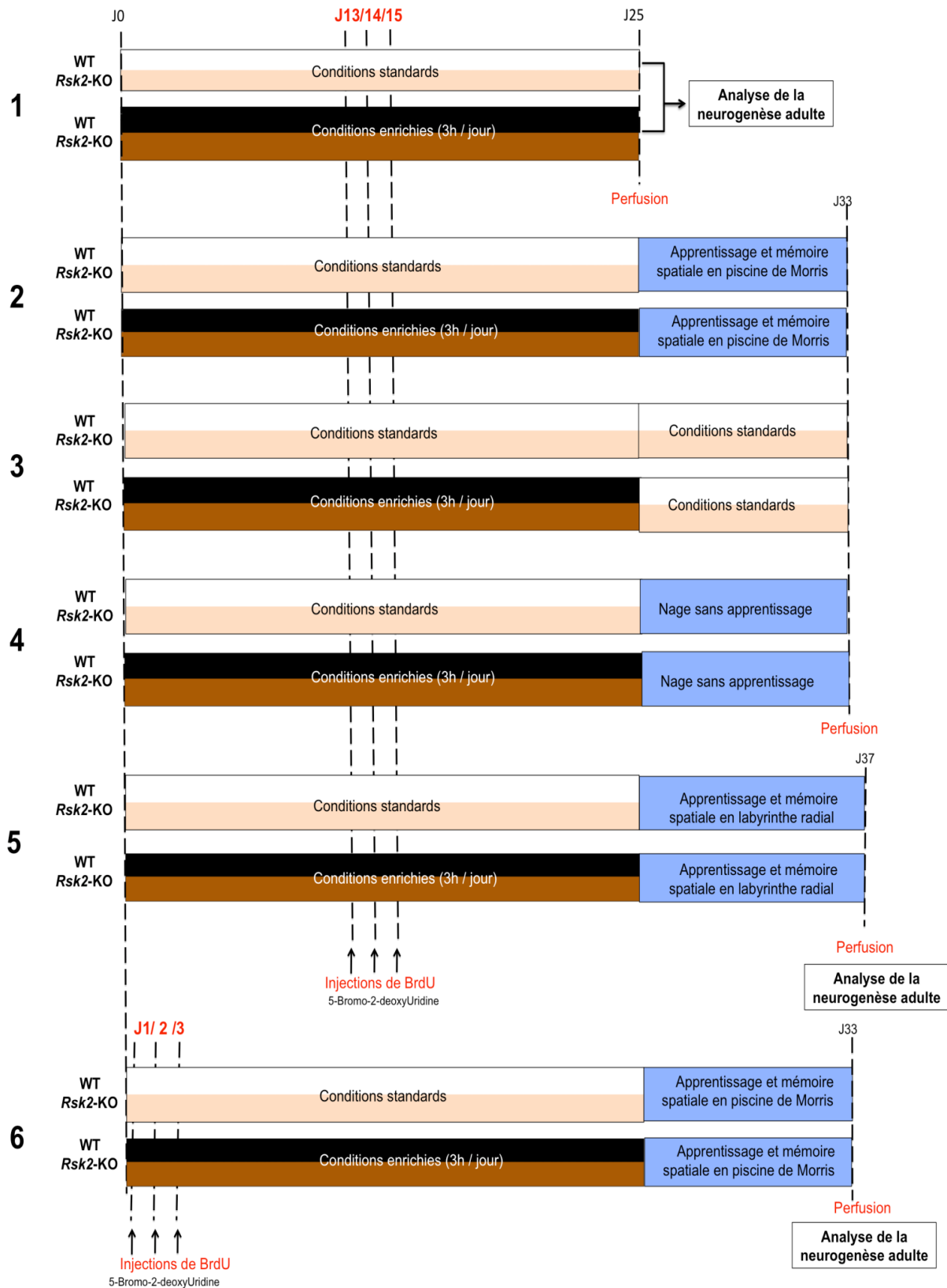


Figure 26. Protocoles utilisés pour étudier la survie cellulaire chez des souris WT et *Rsk2*-KO. (1) Survie avant tâche comportementale. (2) Survie après la tâche en piscine de Morris. (3) Survie sans tâche comportementale. (4) Survie après nage. (5) Survie après la tâche de séparation de patterns. (6) Survie d'une population de neurones plus âgés après la tâche en piscine de Morris.

## 12.2 Perfusion intracardiaque

Les souris sont profondément anesthésiées avec du pentobarbital, puis perfusées en intracardiaque d'abord avec du tampon phosphate salin (PBS) puis avec du tampon fixateur, le paraformaldéhyde (PFA) dilué à 4 % dans du tampon phosphate à 0,1M. Le cerveau est ensuite prélevé et subi une post-fixation dans du PFA 4% pendant 24 heures. Les cerveaux sont ensuite cryoprotégés par 3 bains successifs, d'environ 12 heures, de sucrose à concentrations croissantes 10, 20 et 30%. Ils sont ensuite congelés dans du 2-méthylbutane refroidi avec de la carboglace à une température comprise entre -20 et -30°C puis conservés à -20°C avant d'être coupés.

Le cerveau des souris a été coupé suivant le plan coronal à une épaisseur de 40µm au cryostat à -20°C. Les coupes d'hippocampes sont conservées à -20°C dans une solution cryoprotectante en attendant leur utilisation pour des marquages immunohistochimiques.

## 12.3 Immunohistochimie

La révélation des cellules ayant intégré la BrdU est effectuée par immunohistochimie sur des coupes flottantes. Après des bains de PBS x1, les coupes sont plongées dans une solution de méthanol (10%) et de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10%) afin d'inactiver la peroxydase endogène. Après plusieurs bains de PBS et PBS Triton X-100 (0,25%), les coupes sont mises dans un bain d'HCl (2N) à 37°C pendant 30 min, afin de dénaturer l'ADN. Le pH des coupes est ensuite ramené à une valeur plus neutre avec un bain d'acide borique (0,1M, pH8.5) de 15 min. Après blocage des sites antigéniques avec du sérum de chèvre (5%), les coupes sont incubées avec l'anticorps (anti BrdU de rat, 1/400, AbCys) pendant une nuit, à température ambiante. Après plusieurs rinçages, les coupes sont incubées dans l'anticorps secondaire (anti rat biotinylé de chèvre, 1/400, KPL), pendant 1h30 à température ambiante. Après une amplification grâce au VECTASTAIN® ABC kit (Avidin/Biotin Complex, Vector Laboratories) pendant 1h30 on effectue la révélation. Elle s'effectue par la technique de la DAB (Di-Amino-Benzidine) pendant environ 6 minutes, qui va permettre aux noyaux ayant intégré de la BrdU d'apparaître en noir. Après la révélation, les coupes sont montées sur lames. Une fois sèches, les lames sont contre-colorées avec une solution de Nuclear Fast Red (Vector) qui permet de mettre en évidence la couche granulaire du gyrus denté de l'hippocampe. Les lames sont ensuite déshydratées avec des bains successifs d'alcool de concentrations croissantes (70%, 90%,

100%) suivis de 2 bains de Xylène. Enfin, les lames sont montées sous lamelle avec le milieu de montage (Eukitt).

Des immunofluorescences ont aussi été effectuées sur coupes flottantes afin de mettre en évidence des marqueurs de maturation neuronale (DCX, NeuN) en plus de la BrdU. Le principe est le même que celui ci-dessus à la différence que l'on n'inactive pas la peroxydase endogène et que les anticorps secondaires sont couplés à un fluorochrome. Les différents anticorps utilisés et leurs dilutions optimales sont listés dans le tableau 4. Les coupes sont montées sur lames puis sous lamelles dans un milieu pour fluorescence (Vectashield + DAPI, Vector Laboratories).

Anticorps primaires				Anticorps secondaires			
Nom/cible	Espèce hôte	Dilution	Fournisseur	Nom/cible (secondaire)	Espèce hôte	Dilution	Fournisseur
BrdU	Rat	1/400	AbCys				
				Anti rat biotinylé	Chèvre	1/400	KPL
				Streptavidine 568		1/1000	Molecular probes
DCX	Cobaye	1/1000	Millipore				
				Anti cobaye biotinylé	Chèvre	1/400	KPL
				Alexa Fluor® Anti guinea pig 488	Chèvre	1/400	Molecular probes
NeuN	Souris	1/600	Eurobio				
				Alexa Fluor® Anti mouse 488	Chèvre	1/250	Molecular probes
				Alexa Fluor® Anti mouse 647	Chèvre	1/200	Molecular probes
c-Fos	Lapin	1/1000	Santa cruz				
				Anti rabbit biotinylé	Chèvre	1/400	Vector
				Alexa Fluor® Anti rabbit 488	Chèvre	1/500	Molecular Probes

Tableau 4. Liste des anticorps, dilutions et références utilisés pour les immunomarquages.



## 12.4 Comptage cellulaire

Le comptage des cellules ayant intégré de la BrdU (cellules BrdU<sup>+</sup>) s'effectue par la microscopie optique (microscope Olympus BX60) et l'utilisation du logiciel d'acquisition et d'analyses d'images Exploranova MERCATOR. Ce comptage est effectué sur un échantillon d'une coupe sur six (espacées de 240 µm, ce qui correspond à l'épaisseur de coupe de 40 µm multiplié par 6) sur la totalité de l'hippocampe dorsal (Franklin et Paxinos, 1997). À l'aide du logiciel, on trace le contour du gyrus denté et de la zone granulaire du gyrus denté à l'objectif X10 afin de mesurer automatiquement les surfaces. Les volumes du gyrus denté et de la couche granulaire sont estimés en multipliant la somme des surfaces délimitées par 240 (l'espace entre les coupes). Les cellules BrdU<sup>+</sup> présentes dans la couche granulaire du gyrus denté sont comptabilisées de manière exhaustive à l'objectif X40. On obtient une densité de cellules BrdU<sup>+</sup> en divisant le nombre total de cellules BrdU<sup>+</sup> par le volume de la couche granulaire du gyrus denté (BrdU<sup>+</sup>/mm<sup>3</sup>).

Le comptage des cellules marquées en fluorescence s'effectue à l'aide d'un microscope confocal (Zeiss LSM700) et du logiciel d'acquisition ZEN. Pour la maturation neuronale, nous avons comptabilisé sur 25 cellules BrdU<sup>+</sup> au minimum par souris, le nombre d'entre elles qui co-exprimaient les marqueurs de maturation DCX ou NeuN. Les résultats sont exprimés en pourcentage (DCX<sup>+</sup>/BrdU<sup>+</sup> ou NeuN<sup>+</sup>/BrdU<sup>+</sup>).

## 13. Analyses statistiques

Les tests statistiques sont effectués avec le logiciel STATVIEW (version 5.0). Pour analyser les données comportementales, des ANOVA factorielles et des ANOVA à mesures répétées ont été effectuées. Des tests t de Student ont également permis de traiter les données acquises au cours de la phase de rétention de la piscine de Morris. Ils ont été utilisés pour comparer les performances des souris à la chance. Des tests t de Student ont également été utilisés pour comparer les moyennes des 6 derniers essais des souris au cours de la tâche de séparation de patterns. Pour l'analyse des données de comptage cellulaire, les valeurs obtenues ont été comparées à l'aide d'ANOVA factorielles. Pour toutes ces analyses, le seuil de significativité a été fixé à 0,05.



## RÉSULTATS

### 14. Conséquences morphologiques de l'absence de RSK2

Avant chaque série d'injections de BrdU, toutes les souris ont été systématiquement pesées. La comparaison des poids a montré que les souris *Rsk2*-KO sont significativement plus légères que leurs contrôles WT (figure 27, ANOVA factorielle, WT n=41, *Rsk2*-KO n=48,  $F_{(1,87)}=10,409$ ,  $P=0,0018$ ). Ces données montrent que la protéine RSK2 a une action sur le poids corporel.

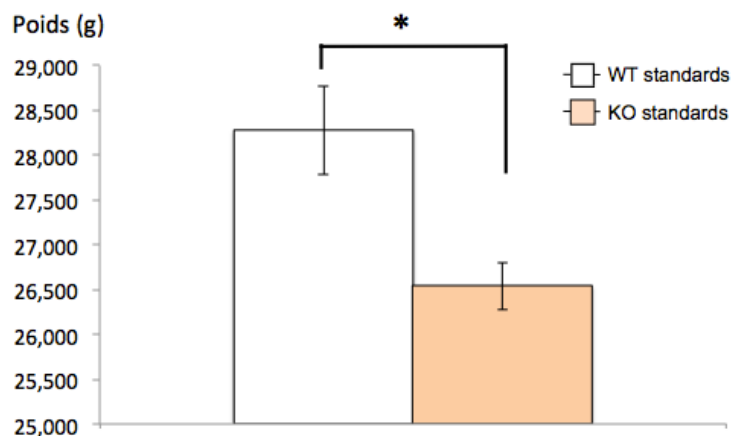


Figure 27. Poids moyens en grammes des souris WT (n=41) et *Rsk2*-KO (n=48). Les barres représentent les erreurs standards à la moyenne.

Au niveau cérébral, en mesurant les volumes de certaines structures cérébrales, nous n'avons observé aucune différence entre les souris WT et *Rsk2*-KO standards, que ce soit au niveau de l'hippocampe dorsal (figure 28A, ANOVA factorielle,  $F_{(1,38)}=2,034$ , ns) ou de celui du gyrus denté (figure 28B, WT= $0,267 \pm 0,013\text{mm}^3$  et *Rsk2*-KO= $0,299 \pm 0,010\text{mm}^3$  ( $F_{(1,38)}=2,286$ , ns). Suite à la période passée en conditions enrichies (24 jours), nous avons observé une augmentation significative du volume de l'hippocampe et du gyrus denté (figure 28A et B, ANOVA factorielle, volume hippocampique dorsal,  $F_{(1,38)}=8,025$ ,  $P=0,0073$  ; volume du gyrus denté,  $F_{(1,38)}=5,829$ ,  $P=0,0207$ ). Cependant, l'analyse approfondie de ces résultats a montré que le volume hippocampique augmente de façon significative seulement chez les souris *Rsk2*-KO enrichies par rapport aux souris *Rsk2*-KO standards (ANOVA factorielle, volume hippocampique dorsal, *Rsk2*-KO enrichies vs *Rsk2*-KO standards,  $F_{(1,18)}=4,433$ ,  $P=0,0496$ ). Chez les souris WT, l'augmentation ne franchit pas le seuil de significativité malgré une forte tendance (WT enrichies vs WT standards,  $F_{(1,20)}=4,295$ ,

$P=0,0514$ ). Enfin, concernant le volume du gyrus denté, il augmente significativement uniquement chez les souris WT (figure 28B, ANOVA factorielle, volume gyrus denté, WT enrichies vs WT standards,  $F_{(1,20)}=5,682$ ,  $P=0,0272$  ; *Rsk2*-KO enrichies vs *Rsk2*-KO standards,  $F_{(1,20)}=0,899$ , ns).

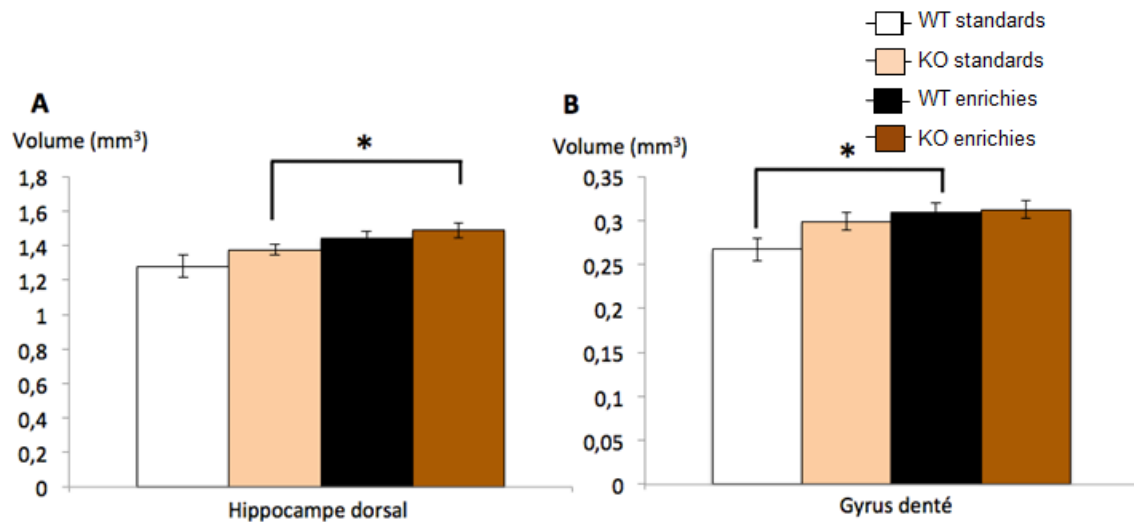


Figure 28. Volume en mm<sup>3</sup> de l'hippocampe dorsal (A) et du gyrus denté dorsal (B) (WT standards (n=12), *Rsk2*-KO standards (n=10), WT enrichies (n=11) et *Rsk2*-KO enrichies (n=10)). Les barres représentent les erreurs standards à la moyenne.

Ces résultats montrent que l'absence de la protéine RSK2 n'a pas d'effet sur le volume hippocampique dorsal. Ils montrent également que la période passée en conditions enrichies est capable d'augmenter le volume de certaines structures cérébrales impliquées dans des processus mnésiques.

### 15. Rôle de RSK2 dans la prolifération cellulaire hippocampique

Afin de comparer la prolifération cellulaire entre les souris WT et *Rsk2*-KO, nous avons analysé la densité de cellules BrdU<sup>+</sup>/mm<sup>3</sup> dans la couche granulaire du gyrus denté de l'hippocampe dorsal, 2 heures après une injection de 150 mg/kg de BrdU (figure 29).

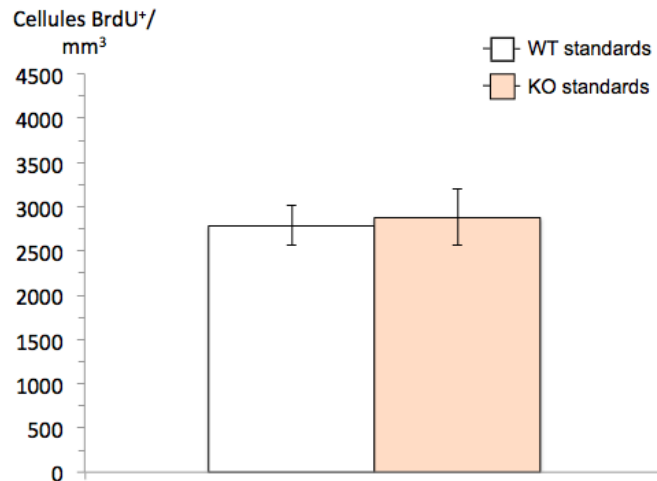


Figure 29. Moyennes des densités volumiques de cellules BrdU<sup>+</sup>/mm<sup>3</sup> dans la couche granulaire du gyrus denté de l'hippocampe dorsal, 2 heures après une injection de BrdU (WT n=4 et *Rsk2*-KO n=5). Les barres représentent les erreurs standards à la moyenne.

L'analyse statistique de la densité de cellules BrdU<sup>+</sup>/mm<sup>3</sup> n'a révélé aucune différence significative entre les souris WT et *Rsk2*-KO standards (figure 27, ANOVA factorielle,  $F_{(1,7)}=0,058$ , ns).

**Ces résultats montrent que, dans ces conditions expérimentales, la protéine RSK2 n'a aucun effet sur la prolifération cellulaire.**

## 16. Rôle de RSK2 dans l'évolution de la survie des neurones néoformés

Afin de suivre l'évolution de la survie des neurones néoformés au cours du temps, nous avons comptabilisé la densité de cellules BrdU<sup>+</sup>/mm<sup>3</sup> chez des souris standards, 2, 4 et 6 semaines après plusieurs injections de BrdU (figure 30A). Nous avons également analysé l'expression de marqueurs de maturation neuronale chez ces mêmes souris (figure 28B).

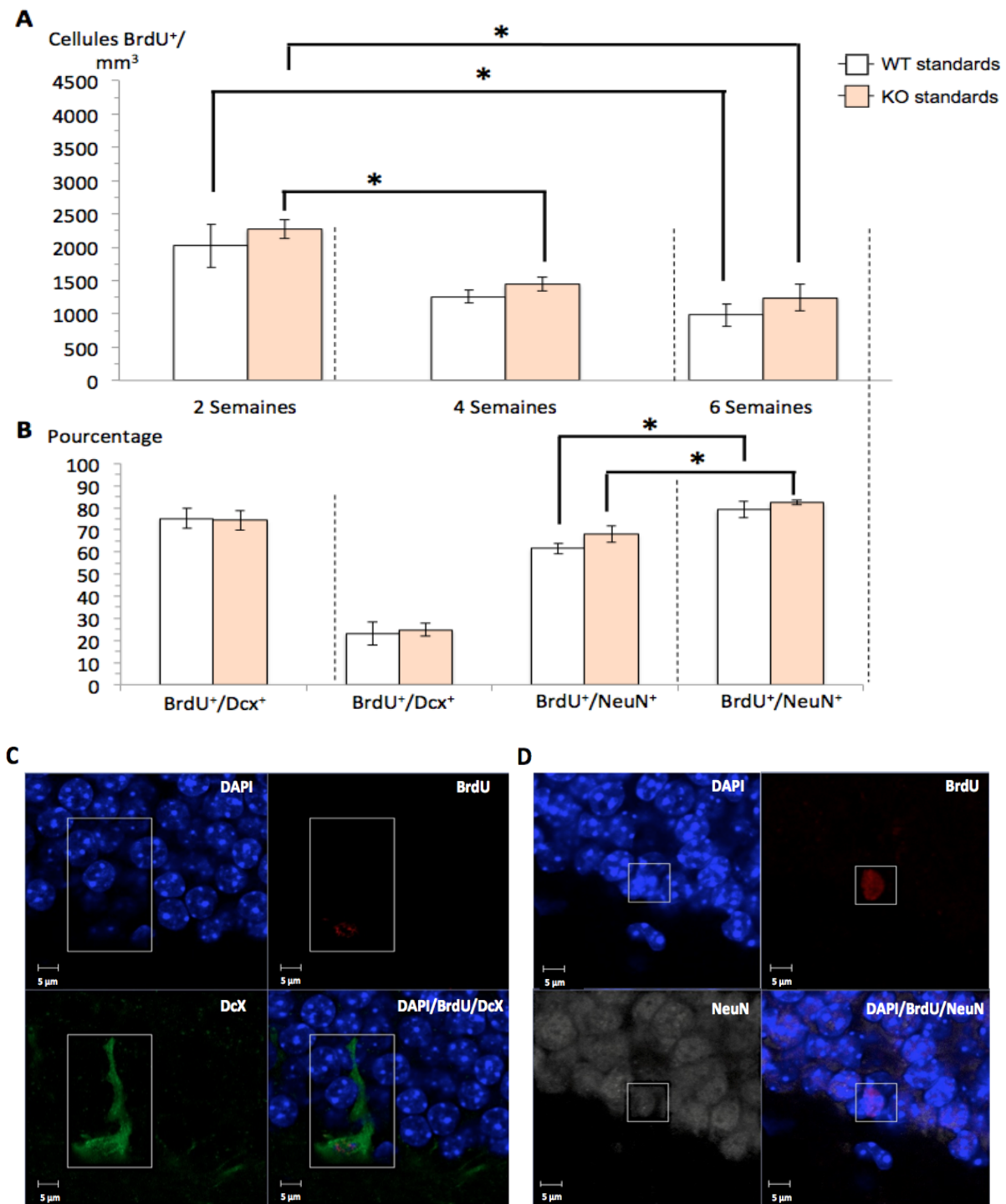


Figure 30. (A) Densités moyennes de cellules BrdU<sup>+</sup>/mm<sup>3</sup> observées dans la couche granulaire du gyrus denté de l'hippocampe dorsal, 2, 4 et 6 semaines après injections de BrdU chez des souris WT (n=5 par délai) et *Rsk2*-KO (n=5 par délai). (B) Pourcentage de cellules BrdU<sup>+</sup>/DCX<sup>+</sup> à 2 et 4 semaines et BrdU<sup>+</sup>/NeuN<sup>+</sup> à 4 et 6 semaines après injections de BrdU chez les souris WT (n=5 par délai) et *Rsk2*-KO (n=5 par délai). Les barres représentent les erreurs standards à la moyenne et les astérisques (\*) indiquent des différences significatives (P<0,05, ANOVA factorielle). (C) et (D) Photographies en microscopie confocale de cellules triplement marquées, respectivement DAPI<sup>+</sup>/BrdU<sup>+</sup>/DCX<sup>+</sup> et DAPI<sup>+</sup>/BrdU<sup>+</sup>/NeuN<sup>+</sup>.

Entre 2 et 6 semaines, la densité de cellules  $\text{BrdU}^+/\text{mm}^3$  diminue significativement d'environ 51% pour les souris WT (figure 30A, ANOVA factorielle, effet temps,  $F_{(2,12)}=6,050$ ,  $P=0,0152$ ) et d'environ 45% pour les souris *Rsk2*-KO (figure 30A, ANOVA factorielle, effet temps,  $F_{(2,12)}=13,158$ ,  $P=0,0009$ ). Cette diminution est similaire pour les 2 génotypes (figure 30A, ANOVA factorielle, effet génotype,  $F_{(1,24)}=2,301$ , ns ; interaction temps x génotype,  $F_{(2,24)}=0,021$ , ns). L'analyse plus détaillée de ces résultats montre que la densité de cellules  $\text{BrdU}^+/\text{mm}^3$  diminue fortement entre 2 et 4 semaines pour les souris WT (figure 30A, ANOVA factorielle, effet temps,  $F_{(1,8)}=5,126$ , ns) et les souris *Rsk2*-KO (figure 30A, ANOVA factorielle, effet temps,  $F_{(1,8)}=23,281$ ,  $P=0,0013$ ), mais se stabilise entre 4 et 6 semaines pour les 2 génotypes (figure 30A, ANOVA factorielle, WT, effet temps,  $F_{(1,8)}=1,933$ , ns ; *Rsk2*-KO, effet temps,  $F_{(1,8)}=0,844$ , ns).

L'analyse de la maturation neuronale montre qu'à 2 et 4 semaines, le pourcentage de cellules  $\text{BrdU}^+/\text{DCX}^+$  est quasi similaire entre les souris WT et *Rsk2*-KO. On observe une diminution significative de la quantité de cellules  $\text{BrdU}^+/\text{DCX}^+$  au cours de ces 2 semaines d'environ 67% pour les 2 génotypes (Figure 30B, ANOVA factorielle, effet temps,  $F_{(1,16)}=132,205$ ,  $P<0,0001$  ; effet génotype,  $F_{(1,16)}=0,008$ , ns ; interaction temps x génotype,  $F_{(1,16)}=7,2$ , ns).

Concernant les cellules  $\text{BrdU}^+/\text{NeuN}^+$ , leurs pourcentages ne diffèrent pas entre les 2 génotypes et ils augmentent significativement entre 4 et 6 semaines chez les souris WT et *Rsk2*-KO de façon équivalente (Figure 30B, ANOVA factorielle, effet temps,  $F_{(1,16)}=31,068$ ,  $P<0,0001$  ; effet génotype,  $F_{(1,16)}=2,796$ , ns ; interaction temps x génotype,  $F_{(1,16)}=0,311$ , ns).

**Ces résultats montrent une diminution identique de la survie neuronale entre 2 et 4 semaines qui se stabilise après 4 semaines pour les souris WT et *Rsk2*-KO. Ils montrent également que l'absence de RSK2 n'a pas d'effet sur l'évolution de la survie et la maturation des neurones néoformés au cours du temps.**

## 17. Effet de l'enrichissement sur la survie des neurones néoformés

Afin de déterminer l'effet de l'enrichissement sur la survie des neurones néoformés, nous avons analysé la densité de cellules  $\text{BrdU}^+/\text{mm}^3$  chez des souris WT et *Rsk2*-KO soit maintenues en conditions standards, soit placées 3h par jour pendant 24 jours en conditions enrichies (*cf* matériel et méthodes, figure 26.1). La BrdU a été injectée aux jours 13-15 de

l'enrichissement et les animaux ont été perfusés 10-12 jours après les injections, les neurones examinés ont donc 10-12 jours. Ces groupes permettent d'évaluer l'effet de l'enrichissement sur la neurogenèse hippocampique basale et de connaître l'état de la neurogenèse avant les tâches comportementales.

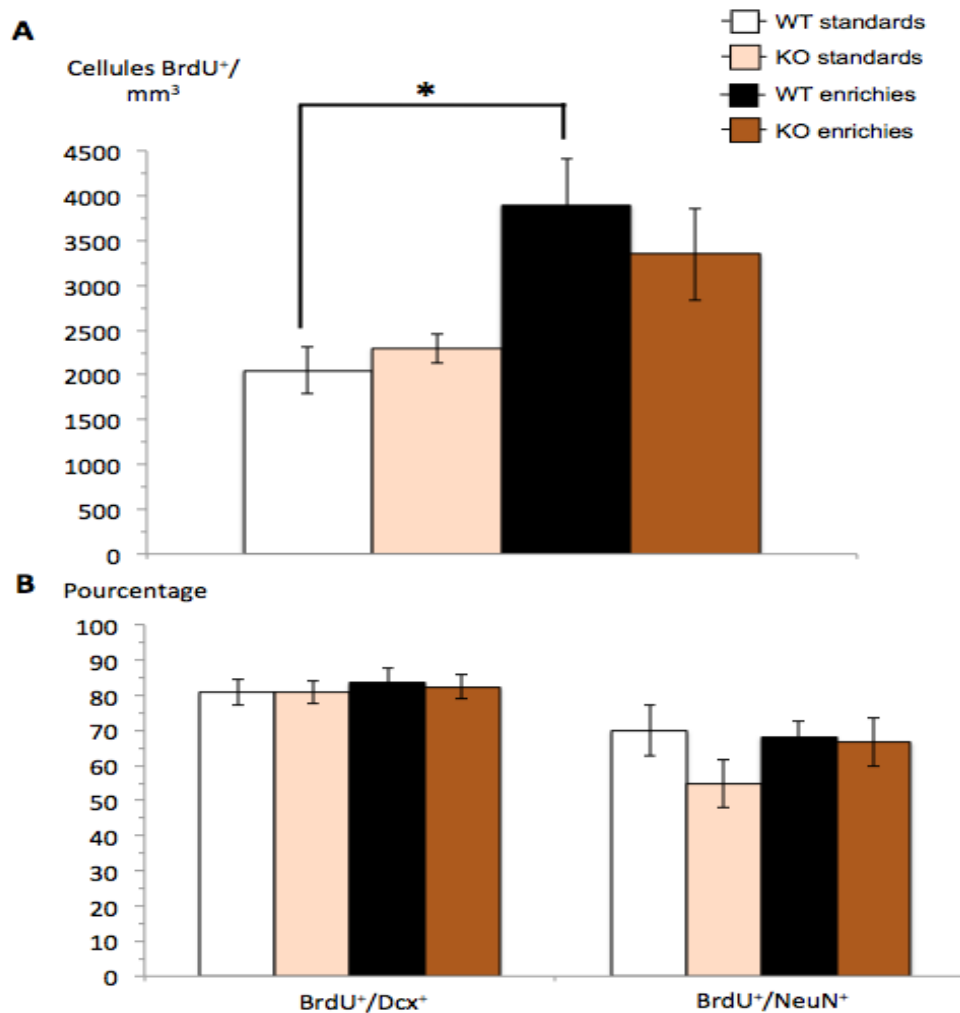


Figure 31. (A) Densité moyenne de cellules BrdU<sup>+</sup>/mm<sup>3</sup> observées dans la couche granulaire du gyrus denté de l'hippocampe dorsal de souris WT et *Rsk2*-KO standards et enrichies, 10-12 jours après injections de BrdU (WT standards (n=5), *Rsk2*-KO standards (n=5), WT enrichies (n=5) et *Rsk2*-KO enrichies (n=4)). Les barres représentent les erreurs standards à la moyenne. L'astérisque (\*) indique une différence significative (P < 0,05, ANOVA factorielle). (B) Pourcentage de cellules BrdU<sup>+</sup>/DCX<sup>+</sup> et BrdU<sup>+</sup>/NeuN<sup>+</sup> dans la couche granulaire du gyrus denté de l'hippocampe dorsal de souris WT et *Rsk2*-KO standards et enrichies, 10-12 jours après injections de BrdU (BrdU<sup>+</sup>/DCX<sup>+</sup>: WT standards (n=4), *Rsk2*-KO standards (n=4), WT enrichies (n=5) et *Rsk2*-KO enrichies (n=4) ; BrdU<sup>+</sup>/NeuN<sup>+</sup>: WT standards (n=3), *Rsk2*-KO standards (n=4), WT enrichies (n=5) et *Rsk2*-KO enrichies (n=3)).



Comme le montre la figure 31A, les densités de cellules  $\text{BrdU}^+/\text{mm}^3$  sont similaires entre les 2 génotypes, mais diffèrent significativement en fonction des conditions d'élevage (figure 31, ANOVA factorielle, effet conditions,  $F_{(1,15)}=14,150$ ,  $P=0,0019$  ; effet génotype,  $F_{(1,15)}=0,154$ , ns ; interaction conditions x génotype,  $F_{(1,15)}=1,048$ , ns). En effet, les souris WT enrichies possèdent 1,5 fois plus de cellules  $\text{BrdU}^+/\text{mm}^3$  que les souris WT standards (figure 31A, ANOVA factorielle,  $F_{(1,8)}=10,098$ ,  $P=0,0130$ ). Cette augmentation est également retrouvée chez les souris *Rsk2*-KO enrichies, qui possèdent 1,46 fois plus de cellules  $\text{BrdU}^+/\text{mm}^3$  que les souris *Rsk2*-KO standards, cependant, dans ce cas, cette augmentation n'atteint pas le seuil de significativité (figure 31A, ANOVA factorielle,  $F_{(1,7)}=4,621$ , ns).

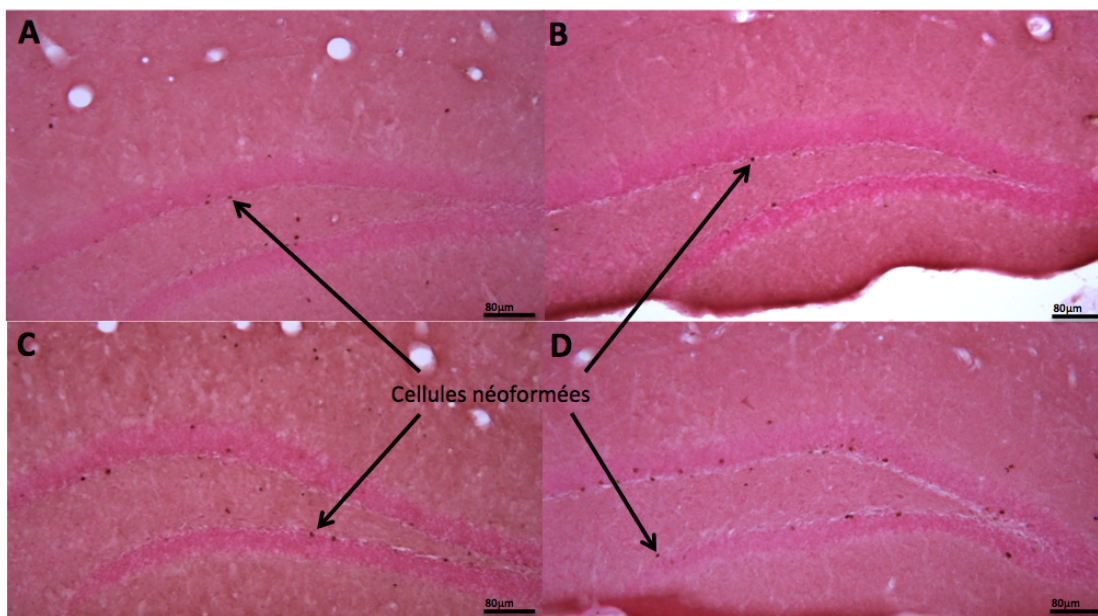


Figure 32. Cellules  $\text{BrdU}^+$  dans le gyrus denté de souris WT standards (A), *Rsk2*-KO standards (B), WT enrichies (C), *Rsk2*-KO enrichies (D).

Concernant la maturation neuronale, comme le montre la figure 32B, le pourcentage de cellules neuronales immatures et matures ne diffèrent pas entre les différents groupes (ANOVA factorielle,  $\text{BrdU}^+/\text{DCX}^+$ , effet génotype,  $F_{(1,13)}=0,025$ , ns ; effet conditions,  $F_{(1,13)}=0,275$ , ns ;  $\text{BrdU}^+/\text{NeuN}^+$ , effet génotype,  $F_{(1,11)}=0,2388$ , ns ; effet conditions,  $F_{(1,11)}=0,568$ , ns).

**Ces résultats confirment que l'absence de RSK2 n'a pas d'effet sur la survie cellulaire. Ils montrent également que l'enrichissement partiel est capable d'augmenter la survie neuronale chez les souris WT et que l'absence de RSK2 n'a pas d'effet majeur sur cette augmentation. De plus, dans ces conditions, l'enrichissement n'influence pas la**

maturation des nouveaux neurones, mesurée par l'expression des marqueurs DCX et NeuN.

## 18. Apprentissage spatial, survie neuronale et enrichissement environnemental

### 18.1 Effet de l'enrichissement sur l'apprentissage spatial

Afin d'analyser les effets de l'apprentissage spatial sur la survie neuronale (*cf* matériel et méthodes, figure 26.2), nous avons soumis les souris WT et *Rsk2*-KO standards et enrichies à une tâche d'apprentissage et de mémoire spatiale en piscine de Morris durant 7 jours (8 essais par jour).

Pour analyser les performances des souris, dans un premier temps, nous avons comparé les moyennes de temps d'atteintes de la plateforme de chaque groupe sur la totalité des essais pour les 7 jours (figure 33).

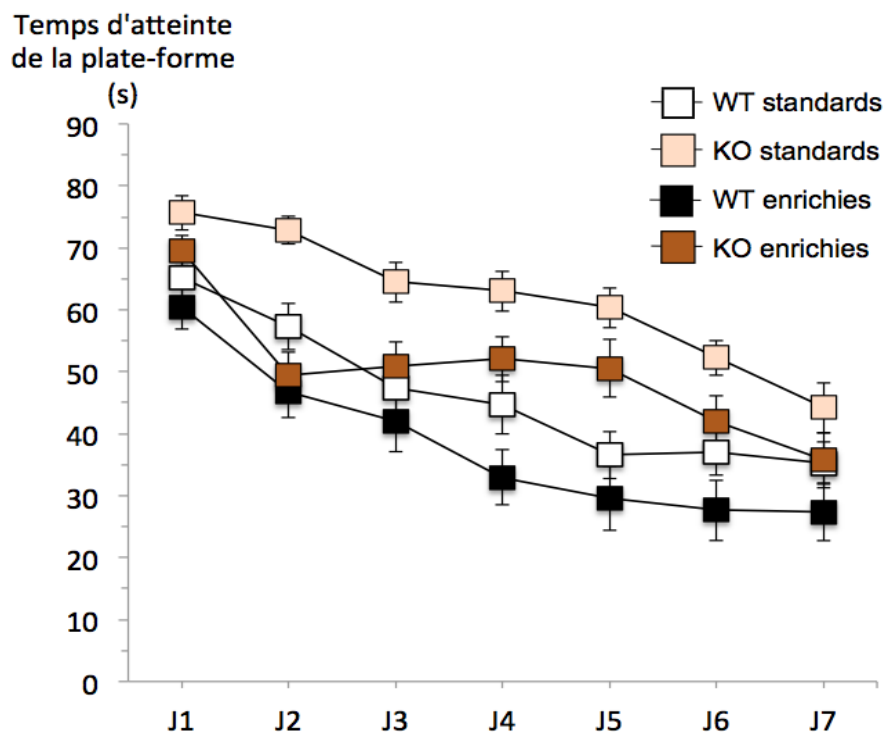


Figure 33. Temps d'atteinte de la plateforme pour chaque groupe en fonction des jours d'apprentissage pour les souris WT standards (n=22), *Rsk2*-KO standards (n=18), WT enrichies (n=19) et *Rsk2*-KO enrichies (n=19). Pour chaque groupe, un carré représente la moyenne des 8 essais quotidiens. Les barres représentent les erreurs standards à la moyenne.

Pour tous les groupes, le temps mis pour atteindre la plateforme diminue significativement au cours de l'apprentissage quels que soient le génotype et les conditions d'élevage (figure 33, ANOVA à mesures répétées, effet temps,  $F_{(6,444)}=52,350$ ,  $P<0,0001$  ; effet génotype,  $F_{(1,74)}=24,648$ ,  $P<0,0001$  ; effet conditions,  $F_{(1,74)}=12,804$ ,  $P=0,0006$  ; interaction génotype x conditions,  $F_{(1,74)}=0,434$ , ns ; interaction temps x génotype,  $F_{(6,444)}=3,022$ ,  $P=0,0066$  ; interaction temps x conditions,  $F_{(6,444)}=1,460$ , ns ; interaction temps x génotype,  $F_{(6,444)}=0,6562$ , ns).

Nous avons comparé la moyenne des vitesses de nage des différents groupes afin d'écarter un éventuel biais. De façon générale, les vitesses de nage ne diffèrent pas entre les groupes, quels que soient les génotypes ou les conditions d'élevage. Les vitesses de nage augmentent pour tous les groupes au cours de l'apprentissage, cependant, cette augmentation n'est pas similaire pour tous les groupes (ANOVA à mesures répétées, effet génotype,  $F_{(1,74)}=0,077$ , ns ; effet conditions,  $F_{(1,74)}=1,409$ , ns ; vitesse,  $F_{(6,444)}=33,181$ ,  $P<0,0001$  ; interaction vitesse x génotype,  $F_{(6,444)}=3,307$ ,  $P=0,0034$  ; interaction vitesse x conditions,  $F_{(6,444)}=6,225$ ,  $P<0,0001$ ). En effet, la vitesse de nage des souris WT standards augmente en fonction des jours, plus rapidement que celle des souris *Rsk2*-KO standards (ANOVA à mesures répétées, effet génotype,  $F_{(1,38)}=0,360$ , ns ; interaction vitesse x génotype,  $F_{(6,228)}=5,121$ ,  $P<0,0001$ ). En revanche, aucune différence d'évolution de la vitesse n'est observée entre les souris WT et *Rsk2*-KO enrichies (ANOVA à mesures répétées, effet génotype,  $F_{(1,38)}=0,072$ , ns ; interaction vitesse x génotype,  $F_{(36,216)}=0,522$ , ns).

La comparaison des différents groupes montre que les souris WT standards atteignent la plateforme significativement plus rapidement que les souris *Rsk2*-KO standards au cours de l'apprentissage (figure 33, ANOVA à mesures répétées, effet génotype  $F_{(1,38)}=21,330$ ,  $P<0,0001$ , interaction temps x génotype,  $F_{(6,228)}=1,457$ , ns). Cependant, au 7<sup>e</sup> et dernier jour, les performances des souris *Rsk2*-KO standards se rapprochent de celles des souris WT standards dont elles ne diffèrent plus significativement (figure 33, ANOVA factorielle,  $F_{(1,38)}=2,900$ , ns).

Concernant les effets de l'enrichissement, les performances des souris WT enrichies sont légèrement meilleures, mais ne diffèrent pas significativement de celles des souris WT standards (figure 33, ANOVA à mesures répétées, effet conditions,  $F_{(1,39)}=3,411$ , ns ; interaction temps x conditions,  $F_{(6,324)}=0,379$ , ns). En revanche, les souris *Rsk2*-KO enrichies atteignent significativement plus rapidement la plateforme que les souris *Rsk2*-KO standards

(figure 33, ANOVA à mesures répétées, effet conditions,  $F_{(1,35)}=13,156$ ,  $P=0,0009$  ; interaction temps x conditions,  $F_{(6,210)}=1,812$ , ns). Enfin, bien que les temps d'atteinte de la plateforme des souris WT standards et *Rsk2*-KO enrichies ne diffèrent pas significativement, les cinétiques des courbes d'apprentissage ne sont pas similaires (figure 33, ANOVA à mesures répétées, effet groupe :  $F_{(1,39)}=1,014$ , ns, interaction temps x génotype,  $F_{(6,324)}=2,435$ ,  $P=0,0265$ ). En effet, chez les souris WT standards, du 1<sup>er</sup> au 5<sup>e</sup> jour d'apprentissage, les temps d'atteinte de la plateforme diminuent puis restent stables entre le 5<sup>e</sup> et le 7<sup>e</sup> jour. Chez les souris *Rsk2*-KO enrichies, les temps d'atteinte de la plateforme diminuent rapidement durant les deux premiers jours, puis se stabilisent entre le 2<sup>e</sup> et le 5<sup>e</sup> jour, pour à nouveau diminuer jusqu'au dernier jour.

**Ces résultats comportementaux confirment le retard d'apprentissage spatial des souris *Rsk2*-KO dans cette tâche. Ils montrent également que l'enrichissement environnemental partiel améliore légèrement les performances des souris WT, mais permet surtout une compensation du retard d'apprentissage spatial des souris n'exprimant plus la protéine RSK2.**

Afin de compléter nos analyses comportementales, nous avons analysé le temps passé par les souris à nager dans la zone périphérique de la piscine (figure 32).

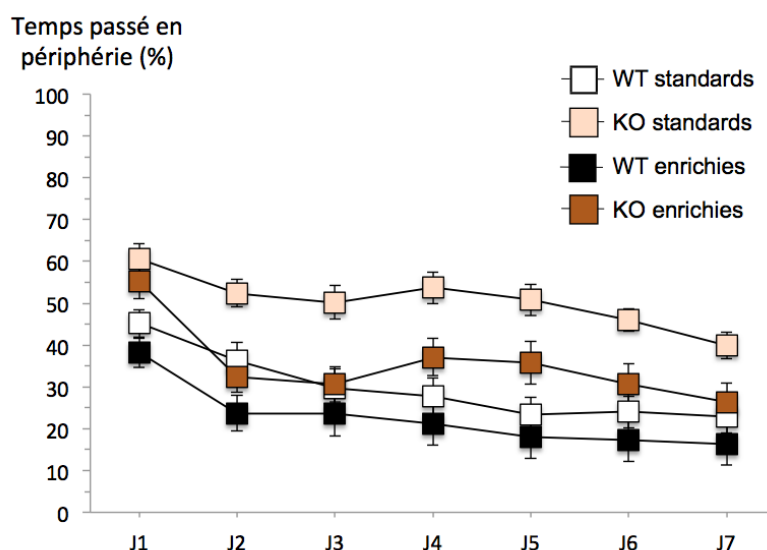


Figure 34. Pourcentage de temps passé dans la zone périphérique de la piscine de Morris pour les souris WT (n=22), *Rsk2*-KO (n=18) standards et WT (n=19), *Rsk2*-KO (n=19) enrichies. Pour chaque groupe, un carré représente la moyenne des 8 essais quotidiens. Les barres représentent les erreurs standards à la moyenne.

Pour tous les groupes, le pourcentage de temps passé en périphérie diminue au cours du temps, mais cette diminution varie en fonction des groupes (figure 34, ANOVA à mesures répétées, effet temps,  $F_{(6,444)}=36,543$ ,  $P<0,0001$  ; effet génotype,  $F_{(1,74)}=21,523$ ,  $P<0,0001$  ; effet conditions,  $F_{(1,74)}=9,566$ ,  $P=0,0028$  ; interaction temps x génotype,  $F_{(6,444)}=2,465$ ,  $P=0,235$  ; interaction temps x conditions,  $F_{(6,444)}=1,531$ , ns ; interaction temps x génotype x conditions,  $F_{(6,444)}=0,882$ , ns).

Les souris WT standards passent significativement moins de temps à nager en périphérie que les souris *Rsk2*-KO standards (figure 34, ANOVA à mesures répétées, effet génotype,  $F_{(1,38)}=20,235$ ,  $P<0,0001$  ; interaction temps x génotype,  $F_{(6,228)}=2,030$ , ns).

Concernant l'enrichissement, le temps passé en périphérie par les souris WT enrichies ne diffère pas de celui des souris WT standards (figure 34, ANOVA à mesures répétées, effet conditions,  $F_{(1,39)}=1,733$ , ns, interaction temps x conditions,  $F_{(6,324)}=0,545$ , ns). En revanche, les souris *Rsk2*-KO enrichies nagent significativement moins longtemps en périphérie que les souris *Rsk2*-KO standards (figure 34, ANOVA à mesures répétées, effet conditions,  $F_{(1,35)}=11,238$ ,  $P=0,019$  ; interaction temps x conditions,  $F_{(6,210)}=1,643$ , ns).

**Ces résultats montrent que les souris *Rsk2*-KO standards font plus de thigmotaxie que les contrôles WT, ce qui pourrait révéler une plus grande sensibilité au stress. L'enrichissement partiel a permis de compenser cet effet.**

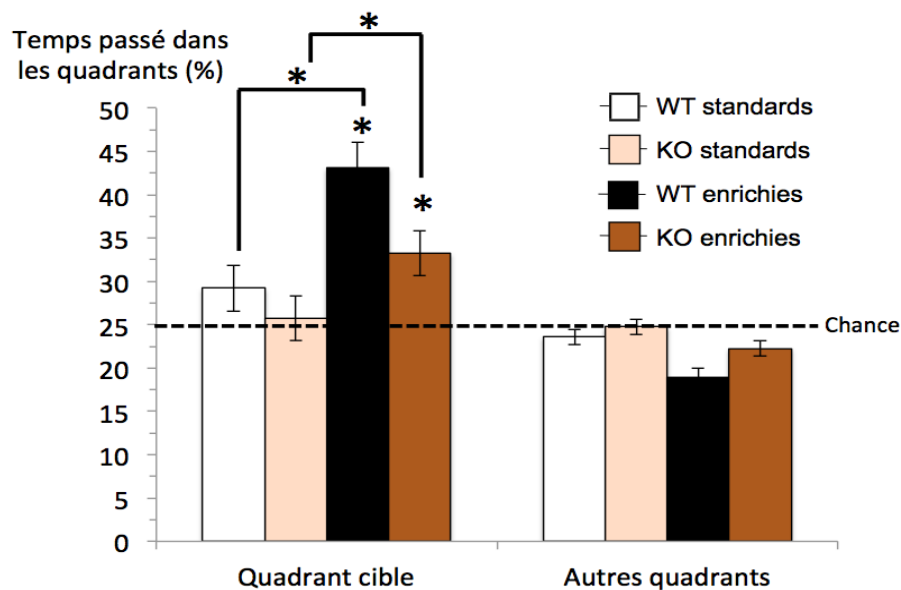
## 18.2 Effet de l'enrichissement sur la mémoire spatiale

Dans le but d'évaluer la mémoire spatiale des différents groupes, les souris ont été soumises à un test de rétention sans plateforme 24 heures après l'apprentissage. Nous avons analysé le pourcentage de temps passé à nager par les souris dans le quadrant cible ainsi que dans les autres quadrants de la piscine au cours de ce test de rétention (figure 35).

Le temps passé à nager dans les différents quadrants varie en fonction du génotype et des conditions d'élevage (figure 35, ANOVA factorielle, génotype,  $F_{(1,74)}=5,939$ ,  $P=0,0172$  ; conditions,  $F_{(1,74)}=15,333$ ,  $P=0,0002$  ; interaction génotype x conditions,  $F_{(1,74)}=1,388$ , ns). D'après nos analyses, les souris WT et *Rsk2*-KO standards ne nagent pas significativement plus de 25% du temps dans le quadrant cible (figure 35, Test t de Student, WT,  $t=1,581$ , ns ; *Rsk2*-KO,  $t=0,299$ , ns), et ce, même au cours des premières 30 secondes (Test t de Student, WT,  $t=0,705$ , ns ; *Rsk2*-KO,  $t=0,248$ , ns). Entre les souris WT et *Rsk2*-KO standards, aucune

différence significative n'a été observée (figure 35, ANOVA factorielle,  $F_{(1,38)}=0,829$  ns). En revanche, les groupes de souris WT et *Rsk2*-KO enrichies nagent significativement plus de 25% du temps de l'essai dans le quadrant cible (figure 35, Test t de Student, WT,  $t=6,088$ ,  $P<0,0001$  ; *Rsk2*-KO,  $t=3,180$ ,  $P=0,0052$ ), et ceci, dès les 30 premières secondes du test de rétention (Test t de Student, WT enrichies,  $t=5,883$ ,  $P<0,0001$  ; *Rsk2*-KO enrichies,  $t=2,798$ ,  $P=0,0119$ ). De plus, elles nagent significativement plus de temps dans ce quadrant cible que les souris WT et *Rsk2*-KO standards (figure 35, ANOVA factorielle, WT standards vs WT enrichies,  $F_{(1,39)}=12,172$ ,  $P=0,0012$  ; *Rsk2*-KO standards vs *Rsk2*-KO enrichies,  $F_{(1,35)}=4,128$ ,  $P=0,0498$ ).

Figure 35. Pourcentage du temps passé dans les différents quadrants pour chaque groupe durant les 90 secondes



du test de rétention pour les souris WT ( $n=22$ ), *Rsk2*-KO ( $n=18$ ) standards et WT ( $n=19$ ), *Rsk2*-KO ( $n=19$ ) enrichies. Les autres quadrants correspondent à la moyenne du temps passé dans les quadrants gauche, droit et opposé par rapport à l'emplacement de la plateforme. Les barres représentent les erreurs standards à la moyenne. Les astérisques (\*) indiquent des différences significatives ( $P<0,05$ ) par rapport à 25% (chance) dans le test t de Student ainsi que les différences inter-groupes (ANOVA factorielle).

L'analyse de la latence d'arrivée à l'emplacement de la plateforme lors du test de rétention révèle une différence entre les souris en fonction des conditions d'élevage (ANOVA factorielle, effet génotype,  $F_{(1,74)}=0,027$ , ns ; effet conditions,  $F_{(1,74)}=5,443$ ,  $P=0,0224$  ; génotype x conditions,  $F_{(1,74)}=0,858$ , ns). En effet il n'y a pas de différence entre les souris WT et *Rsk2*-KO standards (ANOVA Factorielle,  $F_{(1,38)}=0,415$ , ns). Cependant concernant l'enrichissement, les souris WT enrichies arrivent plus rapidement à l'emplacement de la

plateforme que les souris WT standards (ANOVA Factorielle,  $F_{(1,39)}=5,408$ ,  $P=0,0253$ ). En revanche, les souris *Rsk2*-KO enrichies arrivent aussi rapidement à la plateforme que les souris *Rsk2*-KO standards (ANOVA Factorielle,  $F_{(1,35)}=0,979$ , ns).

Afin d'analyser la précision de recherche de la plateforme par les différents groupes, nous avons analysé le temps passé à nager dans le disque cible par rapport au temps passé dans les autres disques. Notre analyse montre que, sur la totalité du temps passé dans les disques, les souris WT standards passent significativement plus de 25% de leur temps dans le disque cible par rapport aux autres disques alors que ce n'est pas le cas des souris *Rsk2*-KO qui y passent moins de 25% du temps (Test t de Student, WT,  $t=2,344$ ,  $P=0,0290$  ; *Rsk2*-KO,  $t=1,227$ , ns). Les souris WT enrichies et *Rsk2*-KO enrichies passent également plus de 25 % de leur temps dans ce disque cible (Test t de Student, WT enrichies,  $t=7,070$ ,  $P<0,0001$  ; *Rsk2*-KO enrichies,  $t=3,657$ ,  $P=0,0018$ ). La comparaison du temps passé dans le disque cible pour les souris standards montre qu'il n'y a pas de différence significative entre les souris WT et *Rsk2*-KO standards (ANOVA Factorielle,  $F_{(1,38)}=0,385$ , ns).

Les souris WT enrichies passent significativement plus de temps que les souris WT standards dans le disque cible ce qui n'est pas le cas des souris *Rsk2*-KO enrichies par rapport aux souris *Rsk2*-KO standards (ANOVA Factorielle, WT enrichies vs WT standards,  $F_{(1,39)}=14,535$ ,  $P=0,0005$  ; KO enrichies vs KO standards,  $F_{(1,35)}=2,387$ , ns).

L'analyse générale de passages sur l'emplacement de la plateforme (nombre de « crossings ») effectués par les différents groupes révèle des différences (Tableau 5, ANOVA factorielle, effet génotype,  $F_{(1,74)}=3,065$ , ns ; effet conditions,  $F_{(1,74)}=6,422$ ,  $P=0,0134$  ; interaction génotype x conditions,  $F_{(1,74)}=5,473$ ,  $P=0,0220$ ).

	WT standards	<i>Rsk2</i> -KO Standards	WT Enrichies	<i>Rsk2</i> -KO Enrichies
Nombre de crossings	1,45±0,382 n=22	1,667±0,280 n=18	3,211±0,450 n=19	1,737±0,274 n=19

Tableau 5. Nombre moyen de crossings effectués par les souris WT et *Rsk2*-KO standards et enrichies, lors de la phase de rétention de la piscine de Morris.

Aucune différence du nombre moyen de crossings n'est observée entre les souris WT et *Rsk2*-KO standards (tableau 5, ANOVA factorielle,  $F_{(1,38)}=0,185$ , ns). En revanche, les souris WT enrichies effectuent significativement plus de crossings que les souris WT standards (tableau 5, ANOVA factorielle, effet conditions,  $F_{(1,39)}=8,974$ ,  $P=0,0047$ ). Enfin, la

comparaison du nombre de crossings entre les souris *Rsk2*-KO enrichies et *Rsk2*-KO standards n'a révélé aucune différence significative (tableau 5, ANOVA factorielle,  $F_{(1,35)}=0,032$ , ns).

**Ces résultats montrent que les souris standards, dans le cadre de ce protocole d'apprentissage, sont incapables de former une forte mémoire spatiale à long terme quel que soit leur génotype. Cependant, les souris WT montrent quand même des signes d'une mémoire spatiale même si elle semble faible. L'enrichissement environnemental partiel améliore les performances mnésiques chez les deux génotypes, mais améliore la précision de cette mémorisation uniquement chez les souris WT.**

## **19. Effet de l'enrichissement, de l'apprentissage spatial et de la nage sur la survie neuronale**

Dans le but de quantifier les effets de l'enrichissement sur la survie neuronale sans apprentissage, nous avons analysé la quantité de cellules BrdU<sup>+</sup>/mm<sup>3</sup> (18-20 jours après injection de BrdU) chez des souris standards et enrichies qui n'ont effectué aucune tâche comportementale entre le 25<sup>e</sup> et 33<sup>e</sup> jour (figure 36A) (*cf* matériel et méthodes, figure 26.3). Afin de déterminer les effets de l'apprentissage en piscine de Morris sur la survie neuronale, nous avons également analysé la densité de cellules BrdU<sup>+</sup>/mm<sup>3</sup> du même âge dans l'hippocampe des souris WT et *Rsk2*-KO standards et enrichies suite à la tâche comportementale en piscine de Morris (figure 36A) (*cf* matériel et méthodes, figure 26.2), ainsi qu'après une épreuve de nage dans la piscine de Morris (figure 36A) (*cf* matériel et méthodes, figure 26.4). Nous avons également analysé la maturation neuronale des cellules de ces 3 groupes (figure 36B et C).

### **19.1 Effet de l'enrichissement sur la survie neuronale**

De façon générale, la densité de cellules BrdU<sup>+</sup>/mm<sup>3</sup> varie significativement entre les différents groupes en fonction des conditions d'élevage, mais pas en fonction des génotypes (figure 36A, ANOVA factorielle, effet conditions,  $F_{(1,18)}=10,956$ ,  $P=0,0039$  ; effet génotype,  $F_{(1,18)}=2,803$ , ns ; interaction génotype x conditions,  $F_{(1,18)}=0,39$ , ns). Ainsi, les souris WT enrichies expriment 1,3 fois plus de cellules BrdU<sup>+</sup>/mm<sup>3</sup> que les souris WT standards (figure 36A, ANOVA factorielle,  $F_{(1,9)}=6,886$ ,  $P=0,0276$ ) et les souris *Rsk2*-KO enrichies 1,4 fois plus de cellules BrdU<sup>+</sup>/mm<sup>3</sup> que les souris *Rsk2*-KO standards, cependant cette dernière



différence n'apparaît pas statistiquement significative (figure 36A, ANOVA factorielle,  $F_{(1,9)}=4,377$ , ns).

### 19.2 Effet de l'apprentissage et de l'enrichissement sur la survie neuronale

L'analyse générale des résultats de densité de cellules BrdU<sup>+</sup>/mm<sup>3</sup> montre des différences significatives entre les groupes (figure 36A, ANOVA factorielle, effet génotype,  $F_{(1,12)}=2,409$ , ns ; effet conditions,  $F_{(1,12)}=7,965$ ,  $P=0,0154$  ; génotype x conditions,  $F_{(1,12)}=6,589$ ,  $P=0,0247$ ).

Les souris WT standards après apprentissage possèdent significativement plus de cellules BrdU<sup>+</sup>/mm<sup>3</sup> que les souris *Rsk2*-KO standards (figure 36A, ANOVA factorielle, effet génotype,  $F_{(1,8)}=7,534$ ,  $P=0,0254$ ).

Concernant l'enrichissement, les souris WT enrichies expriment significativement plus de cellules BrdU<sup>+</sup>/mm<sup>3</sup> que les souris WT standards (figure 36A, ANOVA factorielle, effet conditions,  $F_{(1,8)}=5,863$ ,  $P=0,0418$ ). De même, les souris *Rsk2*-KO enrichies possèdent significativement plus de cellules BrdU<sup>+</sup>/mm<sup>3</sup> que les souris *Rsk2*-KO standards (figure 36A, ANOVA factorielle,  $F_{(1,9)}=15,545$ ,  $P=0,0034$ ).

### 19.3 Effet de l'enrichissement et de la nage seule sur la survie neuronale

La densité de cellules BrdU<sup>+</sup>/mm<sup>3</sup> des contrôles nageurs varie en fonction des conditions d'élevage (figure 36A, ANOVA factorielle, effet conditions,  $F_{(1,16)}=45,205$ ,  $P<0,0001$  ; effet génotype,  $F_{(1,16)}=0,004$ , ns ; interaction conditions x génotype,  $F_{(1,16)}=5,175$ ,  $P=0,0370$ ). Les souris WT et *Rsk2*-KO standards ne diffèrent pas significativement quant à l'expression de cellules BrdU<sup>+</sup>/mm<sup>3</sup> (figure 36A, ANOVA factorielle,  $F_{(1,8)}=2,504$ , ns). Concernant l'enrichissement, les souris WT enrichies expriment environ 2 fois plus de cellules BrdU<sup>+</sup>/mm<sup>3</sup> que les souris WT standards (figure 36A, ANOVA factorielle,  $F_{(1,6)}=40,498$ ,  $P=0,0001$ ). Même observation chez les souris *Rsk2*-KO enrichies qui expriment environ 1,4 fois plus de cellules BrdU<sup>+</sup>/mm<sup>3</sup> que les souris *Rsk2*-KO standards (figure 36A, ANOVA factorielle,  $F_{(1,8)}=13,205$ ,  $P=0,0066$ ).

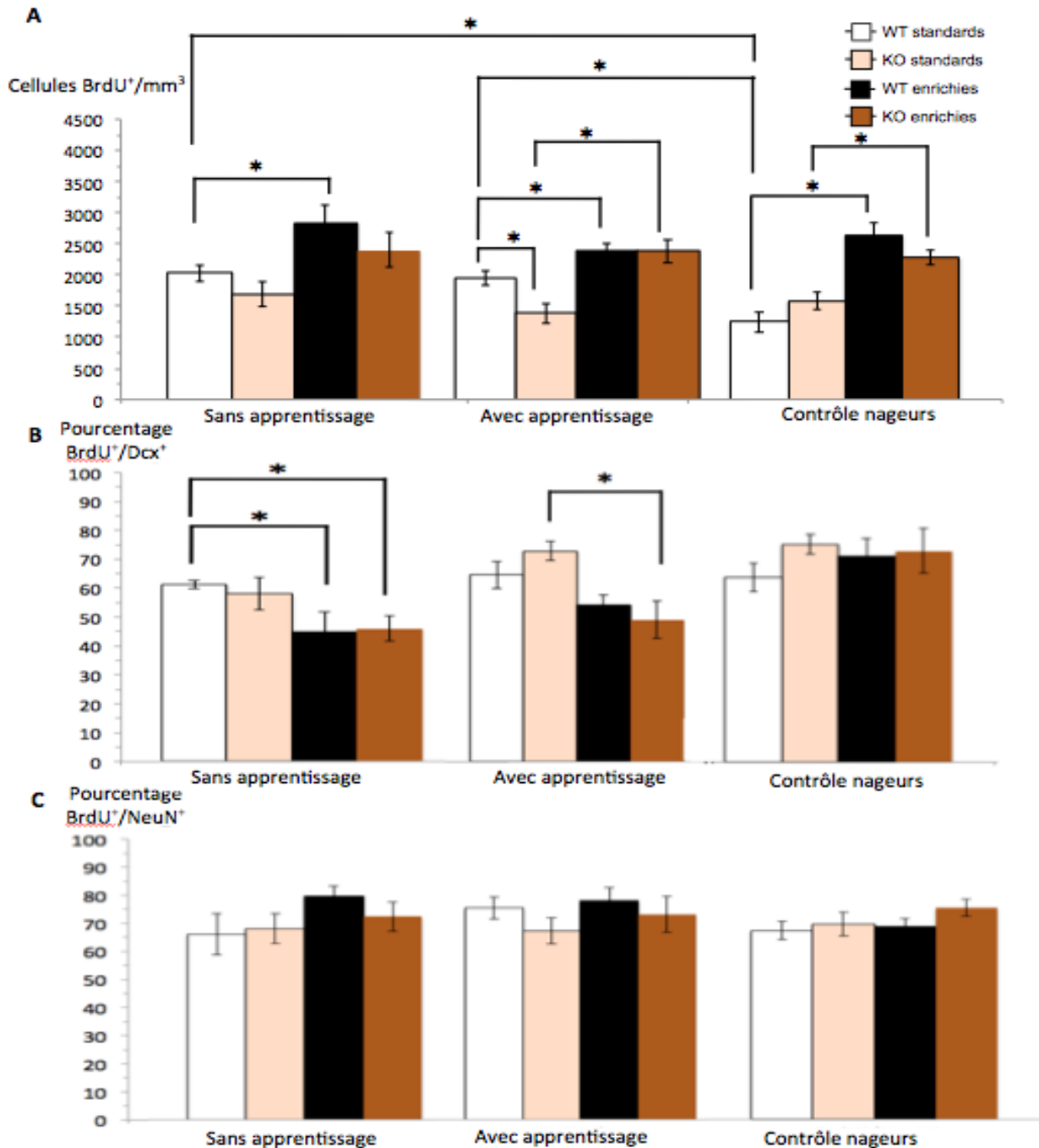


Figure 36. (A) Densité moyenne de cellules BrdU<sup>+</sup>/mm<sup>3</sup> observées dans la couche granulaire du gyrus denté de l'hippocampe dorsal 18-20 jours post injection chez des souris, sans apprentissage (WT standards (n=6), *Rsk2*-KO standards (n=6), WT enrichies (n=5), *Rsk2*-KO enrichies (n=5)), après apprentissage spatial (WT standards (n=6), *Rsk2*-KO standards (n=5) et WT enrichies (n=7), *Rsk2*-KO enrichies (n=6) enrichies) et post nage (B) (WT standards (n=5), *Rsk2*-KO standards (n=5) et WT enrichies (n=5), *Rsk2*-KO enrichies (n=5)). Les barres représentent les erreurs standards à la moyenne. Les astérisques (\*) indiquent des différences significatives (P<0,05, ANOVA factorielle). Pourcentage de cellules BrdU<sup>+</sup>/DCX<sup>+</sup> et BrdU<sup>+</sup>/NeuN<sup>+</sup> dans la couche granulaire du gyrus denté de l'hippocampe dorsal de souris WT et *Rsk2*-KO standards et enrichies sans apprentissage, post apprentissage spatial et post-nage.

#### 19.4 Effet de la nage, de l'apprentissage et de l'absence d'apprentissage sur la survie neuronale

La comparaison de la densité de cellules BrdU<sup>+</sup>/mm<sup>3</sup> des souris sans apprentissage par rapport aux souris après apprentissage ne révèle aucune différence. En revanche lorsque l'on compare la densité de cellules BrdU<sup>+</sup>/mm<sup>3</sup> des souris sans apprentissage avec celle des souris après la nage, il y a une différence significative entre les souris WT standards. En effet, les souris WT standards sans apprentissage ont une densité de cellules BrdU<sup>+</sup>/mm<sup>3</sup> significativement plus élevée que les souris WT standard ayant effectué la nage (figure 36A, ANOVA factorielle,  $F_{(1,9)}=13,855$ ,  $P=0,0048$ ).

La comparaison des densités de cellules BrdU<sup>+</sup>/mm<sup>3</sup> des contrôles nageurs et souris après apprentissage a permis de mettre en évidence une différence significative chez les souris WT standards. En effet, les souris WT standards contrôles nageurs possèdent significativement moins de cellules BrdU<sup>+</sup>/mm<sup>3</sup> que les souris WT standards après l'apprentissage (figure 36A, ANOVA factorielle,  $F_{(1,8)}=11,695$ ,  $P=0,0091$ ). En revanche, aucune différence n'a été observée entre les deux groupes de souris *Rsk2*-KO standards (figure 36A, ANOVA factorielle,  $F_{(1,8)}=0,847$ , ns). Cette comparaison pour les groupes enrichis WT et *Rsk2*-KO ne montre aucune différence significative (figure 36A, ANOVA factorielle, WT enrichies,  $F_{(1,8)}=1,123$ , ns ; *Rsk2*-KO enrichies,  $F_{(1,9)}=0,200$ , ns).

#### 19.5 Effet de l'enrichissement sur la maturation neuronale

Le pourcentage de cellules BrdU<sup>+</sup>/DCX<sup>+</sup> varie significativement en fonction des conditions d'élevage (Figure 36B, ANOVA factorielle, effet conditions,  $F_{(1,11)}=18,817$ ,  $P=0,0012$ , effet génotype,  $F_{(1,11)}=0,256$ , ns ; interaction génotype x conditions,  $F_{(1,11)}=1,723$ , ns), mais pas le pourcentage de cellules BrdU<sup>+</sup>/NeuN<sup>+</sup> (Figure 36C, ANOVA factorielle, effet conditions,  $F_{(1,11)}=1,095$ , ns, effet génotype,  $F_{(1,11)}=0,340$ , ns ; interaction génotype x conditions  $F_{(1,11)}=0,115$ , ns).

Ainsi, l'analyse de la maturation neuronale montre que les souris WT enrichies expriment environ 1,6 fois moins de cellules BrdU<sup>+</sup>/DCX<sup>+</sup> que les souris WT standards (figure 36B, ANOVA factorielle,  $F_{(1,5)}=79,187$ ,  $P=0,0003$ ). Entre les souris *Rsk2*-KO standards et enrichies, aucune différence n'a été observée concernant la maturation neuronale (figure 36B, ANOVA factorielle, BrdU<sup>+</sup>/DCX<sup>+</sup>,  $F_{(1,6)}=2,958$ , ns).

### 19.6 Effet de l'apprentissage et de l'enrichissement sur la maturation neuronale

Lorsque l'on analyse la maturation neuronale post apprentissage spatial, le pourcentage de cellules  $\text{BrdU}^+/\text{DCX}^+$  et  $\text{BrdU}^+/\text{NeuN}^+$  des souris WT standards ne diffère pas significativement de celui des *Rsk2*-KO standards (figure 36B, ANOVA factorielle,  $\text{BrdU}^+/\text{DCX}^+$ ,  $F_{(1,6)}=1,746$ , ns ; figure 36C,  $\text{BrdU}^+/\text{NeuN}^+$ ,  $F_{(1,6)}=7,743$ ). Les souris WT enrichies ne montrent aucune différence significative par rapport aux souris WT standards (figure 36B, ANOVA factorielle,  $\text{BrdU}^+/\text{DCX}^+$ ,  $F_{(1,6)}=1,728$ , ns ; figure 36C,  $\text{BrdU}^+/\text{NeuN}^+$ ,  $F_{(1,6)}=0,155$ , ns). En revanche, les souris *Rsk2*-KO enrichies possèdent significativement moins de cellules  $\text{BrdU}^+/\text{DCX}^+$  que les souris *Rsk2*-KO standards (figure 36B, ANOVA factorielle,  $F_{(1,6)}=9,173$ ,  $P=0,0231$ ), mais ne diffèrent pas sur le pourcentage de cellules  $\text{BrdU}^+/\text{NeuN}^+$  (figure 36C, ANOVA factorielle,  $F_{(1,6)}=2,619$ , ns).

### 19.7 Effet de l'enrichissement et de la nage seule sur la maturation neuronale

Aucune différence de maturation neuronale entre les groupes nageurs n'a été retrouvée au cours de l'analyse générale (figure 36B, ANOVA factorielle,  $\text{BrdU}^+/\text{DCX}^+$ , effet génotype,  $F_{(1,12)}=0,502$ , ns ; effet conditions,  $F_{(1,12)}=0,630$ , ns ; interaction génotype x conditions,  $F_{(1,12)}=1,341$ , ns ; figure 36C,  $\text{BrdU}^+/\text{NeuN}^+$ , effet génotype,  $F_{(1,12)}=0,661$ , ns, effet conditions,  $F_{(1,12)}=1,407$ , ns ; interaction génotype x conditions,  $F_{(1,12)}=0,060$ , ns).

### 19.8 Effet de la nage, de l'apprentissage et de l'absence d'apprentissage sur la maturation neuronale

La comparaison de la maturation neuronale des souris sans apprentissage par rapport aux souris après apprentissage ne révèle aucune différence significative que ce soit au niveau du pourcentage de cellule  $\text{BrdU}^+/\text{DCX}^+$  ou  $\text{BrdU}^+/\text{NeuN}^+$ . De même, lorsque l'on compare la maturation neuronale des souris sans apprentissage avec celle des souris après la nage, aucune différence n'est observée.

La comparaison de la maturation neuronale des contrôles nageurs et des souris après apprentissage n'a révélé aucune différence que ce soit entre les souris WT et *Rsk2*-KO standards ou entre les souris WT et *Rsk2*-KO enrichies. Ces observations ont été faites pour les cellules  $\text{BrdU}^+/\text{DCX}^+$  (figure 36B, ANOVA factorielle,  $\text{BrdU}^+/\text{DCX}^+$ , WT standards,  $F_{(1,7)}=0,024$ , ns ; *Rsk2*-KO standards,  $F_{(1,7)}=0,141$ , ns ; WT enrichies,  $F_{(1,4)}=3,945$ , ns ; *Rsk2*-KO enrichies,  $F_{(1,5)}=3,998$ , ns) et  $\text{BrdU}^+/\text{NeuN}^+$  (figure 36C, ANOVA factorielle,

BrdU<sup>+</sup>/NeuN<sup>+</sup>, WT standards,  $F_{(1,7)}=2,348$ , ns ; *Rsk2*-KO standards,  $F_{(1,8)}=0,152$ , ns ; WT enrichies,  $F_{(1,5)}=1,841$ , ns ; *Rsk2*-KO enrichies,  $F_{(1,6)}=0,146$ , ns).

**Nos résultats montrent dans un premier temps que l'apprentissage en piscine de Morris entraîne une diminution de la survie neuronale en l'absence de RSK2 et que cette diminution peut être compensée par l'enrichissement environnemental partiel. Ils montrent également que la nage sans apprentissage dans cette même piscine entraîne une diminution de la survie des neurones néoformés chez les souris WT. L'enrichissement environnemental facilite l'augmentation de la survie neuronale et compense les effets de la nage en maintenant le niveau de survie neuronale à une valeur normale. Cet enrichissement favorise également la diminution du nombre de neurones immatures notamment chez les souris WT, suggérant une maturation neuronale plus rapide.**

## **20. Persistance des effets de l'enrichissement sur la survie neuronale**

Afin d'examiner la persistance des effets de l'enrichissement partiel sur la survie cellulaire (figure 37A) ainsi que sur la maturation neuronale (figure 37B), nous avons comparé la densité de cellules BrdU<sup>+</sup>/mm<sup>3</sup> entre les groupes de souris soumises à 24 jours d'enrichissement et sacrifiées 24 heures après (*cf* matériel et méthodes, figure 26.1) à un groupe de souris sacrifiées 9 jours après, sans avoir été soumises à un apprentissage (*cf* matériel et méthodes, figure 26.3).

Chez les souris WT et *Rsk2*-KO standards, les densités de cellules néoformées âgées de 10-12 jours sont évaluées à environ 2000-2300 cellules BrdU<sup>+</sup>/mm<sup>3</sup>. Chez les souris WT standards, la survie de ces cellules ne varie pas 9 jours plus tard (figure 37A, ANOVA Factorielle, WT standards,  $F_{(1,10)}=0,858$ , ns). En revanche, elle diminue légèrement chez les souris *Rsk2*-KO standards, bien que cette diminution ne soit pas significative (figure 37A, ANOVA Factorielle, *Rsk2*-KO standards,  $F_{(1,9)}=4,889$ , ns). Chez les souris enrichies, quel que soit le génotype, la survie des cellules néoformées diminue également au cours de ces 9 jours post-enrichissement, mais sans atteindre le seuil de significativité (figure 37A, ANOVA Factorielle, WT enrichies,  $F_{(1,8)}=3,184$ , ns ; *Rsk2*-KO enrichies,  $F_{(1,7)}=2,892$ , ns).

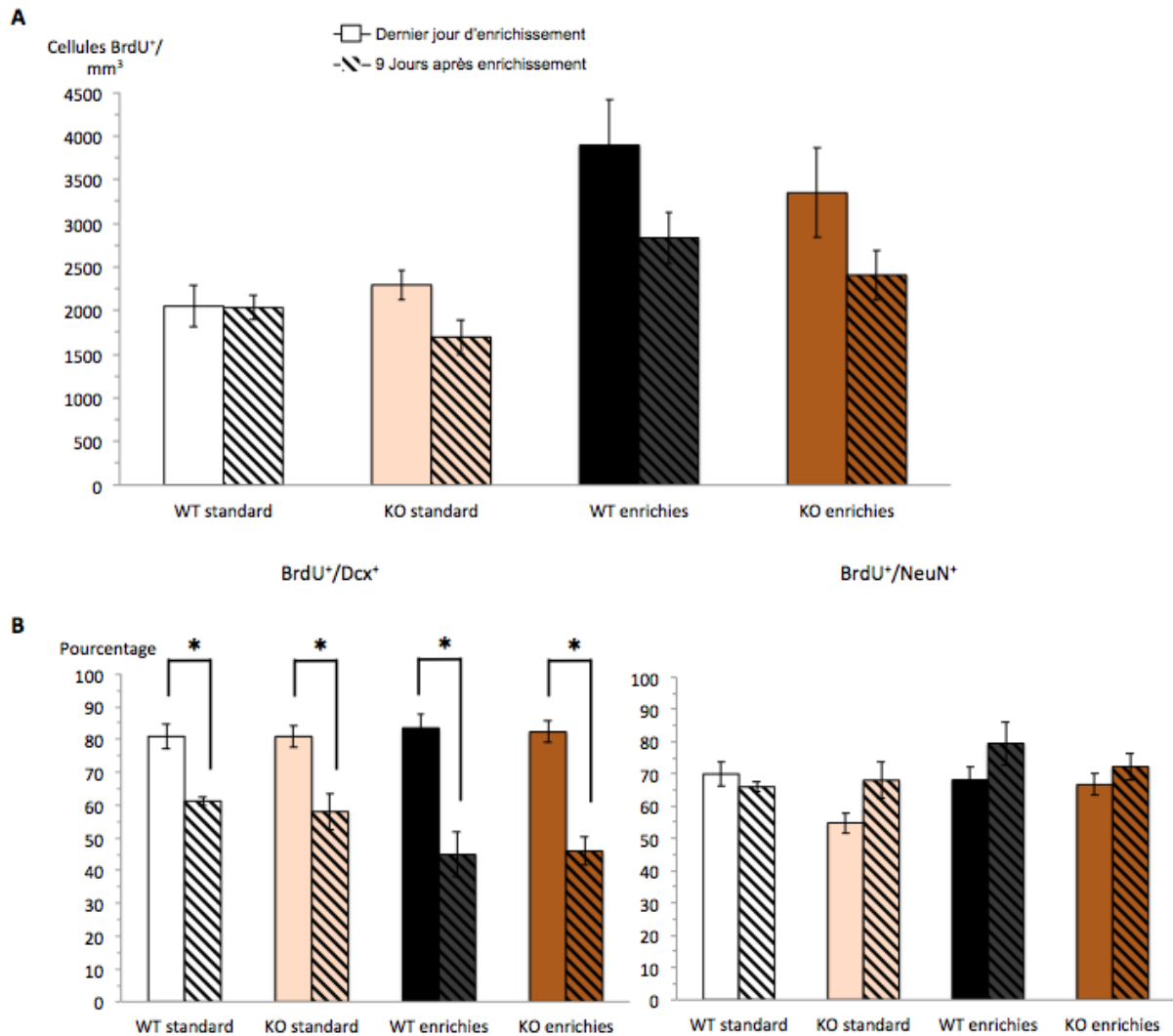


Figure 37. (A) Densité moyenne de cellules BrdU<sup>+</sup>/mm<sup>3</sup> âgées de 10-12 jours au dernier jour d'enrichissement (avant la tâche comportementale) et de 18-20 jours, 9 jours après enrichissement (sans tâche comportementale), observées dans la couche granulaire du gyrus denté de l'hippocampe dorsal de souris WT et *Rsk2*-KO standards et enrichies n'ayant effectuées aucun apprentissage. La période d'enrichissement se termine 10-12 jours après les injections de BrdU. Les barres représentent les erreurs standards à la moyenne. (B) Pourcentage de cellules BrdU<sup>+</sup>/DCX<sup>+</sup> et BrdU<sup>+</sup>/NeuN<sup>+</sup> dans la couche granulaire du gyrus denté de l'hippocampe dorsal de souris WT et *Rsk2*-KO standards et enrichies, 10-12 jours après injections de BrdU et de souris sans apprentissage. Les barres représentent les erreurs standards à la moyenne. Les astérisques (\*) indiquent des différences significatives ( $P < 0,05$ , ANOVA factorielle).

Concernant la maturation neuronale, au cours de ces 9 jours, le pourcentage de cellules BrdU<sup>+</sup>/DCX<sup>+</sup> diminue significativement d'environ 20% chez les souris WT et *Rsk2*-KO standards (figure 37B, ANOVA Factorielle, WT standards,  $F_{(1,6)}=24,690$ ,  $P=0,0025$  ; *Rsk2*-KO standards,  $F_{(1,6)}=12,819$ ,  $P=0,0116$ ). Au niveau du pourcentage de cellules BrdU<sup>+</sup>/NeuN<sup>+</sup>, aucune différence n'a été observée chez les souris WT et *Rsk2*-KO standards (figure 37B,

ANOVA Factorielle, WT standards,  $F_{(1,6)}=0,136$ , ns ; *Rsk2*-KO standards,  $F_{(1,6)}=2,315$ , ns).

Cette diminution significative du pourcentage de cellules BrdU<sup>+</sup>/DCX<sup>+</sup> est également observée chez les souris WT et *Rsk2*-KO enrichies, cependant elle est plus sévère (environ 40%) (figure 37B, ANOVA Factorielle, WT enrichies,  $F_{(1,7)}=79,750$ ,  $P<0,0001$  ; *Rsk2*-KO enrichies,  $F_{(1,6)}=43,992$ ,  $P=0,0006$ ). En revanche, aucune différence significative n'est observée concernant le pourcentage de cellules BrdU<sup>+</sup>/NeuN<sup>+</sup> (figure 37B, ANOVA Factorielle, WT enrichies,  $F_{(1,6)}=1,993$ , ns ; *Rsk2*-KO enrichies,  $F_{(1,5)}=0,367$ , ns).

**Comme nous l'avons vu précédemment (figure 29A), notre protocole d'enrichissement environnemental partiel permet d'améliorer la survie des cellules âgées de 10-12 jours. Ici, avec ce protocole sans apprentissage, nos résultats montrent que cette augmentation est maintenue lorsque les cellules ont atteint l'âge de 18-20 jours, même si la période d'enrichissement est suivie d'une période de conditions standard.**

## **21. Effet de l'apprentissage spatial sur la survie neuronale de neurones plus âgés**

En injectant des souris plus tôt au cours du protocole, nous avons analysé cette fois-ci une population de cellules BrdU<sup>+</sup> âgées de 31-33 jours après enrichissement et apprentissage spatial (*cf* matériel et méthodes, figure 26.6)

L'analyse générale des résultats de densité de cellules BrdU<sup>+</sup>/mm<sup>3</sup> montre des différences significatives entre les différents groupes en fonction des conditions d'élevage (figure 38A, ANOVA factorielle, effet génotype,  $F_{(1,13)}=1,847$ , ns ; effet conditions,  $F_{(1,13)}=18,455$ ,  $P=0,0009$  ; génotype x conditions,  $F_{(1,13)}=0,468$ , ns).

Le nombre de cellules BrdU<sup>+</sup>/mm<sup>3</sup> des souris WT standards ne diffère pas de celui des souris *Rsk2*-KO standards (figure 38A, ANOVA factorielle, effet génotype,  $F_{(1,7)}=1,463$ , ns).

Concernant l'enrichissement, les souris WT enrichies expriment significativement plus de cellules BrdU<sup>+</sup>/mm<sup>3</sup> que les souris WT standards (figure 38A, ANOVA factorielle, effet conditions,  $F_{(1,7)}=23,521$ ,  $P=0,019$ ). Les souris *Rsk2*-KO enrichies en revanche possèdent plus de cellules BrdU<sup>+</sup>/mm<sup>3</sup> que les souris *Rsk2*-KO standards, mais cette différence n'atteint pas le seuil de significativité (figure 38A, ANOVA factorielle,  $F_{(1,6)}=4,084$ , ns).

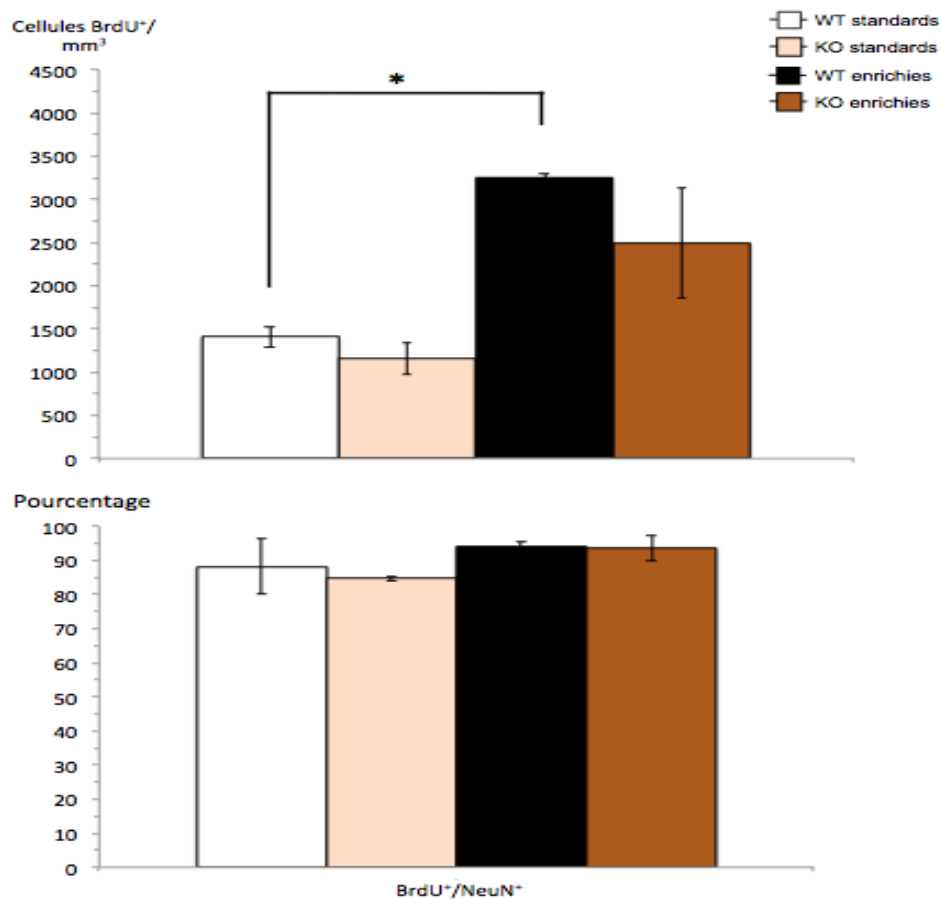


Figure 38. (A) Densité moyenne de cellules BrdU<sup>+</sup>/mm<sup>3</sup> observées dans la couche granulaire du gyrus denté de l'hippocampe dorsal 31-33 jours post injection chez des souris, post apprentissage spatial (WT standards (n=5), *Rsk2*-KO standards (n=4) et WT enrichies (n=4), *Rsk2*-KO enrichies (n=4) enrichies). Les barres représentent les erreurs standards à la moyenne. L'astérisque (\*) indique une différence significative (P<0,05, ANOVA factorielle). (B) Pourcentage de cellules BrdU<sup>+</sup>/NeuN<sup>+</sup> dans la couche granulaire du gyrus denté de l'hippocampe dorsal de souris WT et *Rsk2*-KO standards et enrichies post apprentissage spatial, 31-33 jours après les injections de BrdU.

L'analyse de la maturation neuronale montre qu'il n'y a pas de différence d'expression de cellules BrdU<sup>+</sup>/NeuN<sup>+</sup> entre les différents groupes quels que soient le génotype ou les conditions d'élevage (figure 38B, ANOVA factorielle, effet génotype,  $F_{(1,8)}=0,940$ , ns ; effet conditions,  $F_{(1,8)}=4,728$ , ns ; génotype x conditions,  $F_{(1,8)}=0,784$ , ns).

**Ces résultats montrent que la diminution de la survie neuronale précédemment observée après apprentissage en l'absence de RSK2 (figure 38A), n'est plus observée pour des neurones plus âgés.**



## 22. Apprentissage dans la tâche de séparation de patterns

Afin d'analyser les performances des animaux dans une autre tâche d'apprentissage spatial mettant en particulier en jeux la fonction de séparation de patterns et d'analyser l'effet de cet apprentissage sur la survie neuronale, nous avons soumis les souris WT et *Rsk2*-KO standards et enrichies à une tâche de séparation de patterns en labyrinthe radial avant d'étudier leur neurogenèse.

Nous avons, dans un premier temps, analysé les performances des souris afin de mettre en évidence d'éventuels déficits dans l'une des configurations de la tâche de séparation de patterns. Pour cela, nous avons analysé le pourcentage de réussite de chaque groupe au cours de 10 jours d'apprentissage dans la configuration 2 (2 bras espacés d'un bras) et dans la configuration 4 (2 bras espacés de 3 bras). Nous avons également analysé plus précisément la fin de l'apprentissage en nous focalisant sur le pourcentage de réussite au cours des 6 derniers essais (3 derniers jours). La restriction hydrique avant et pendant la tâche de séparation de patterns a eu le même effet chez les souris WT et *Rsk2*-KO. L'évolution de la diminution du poids est similaire chez les deux génotypes (ANOVA à mesures répétées,  $F_{(11,352)}=1,036$ , ns). En moyenne, durant toute la période de restriction, les souris n'ont pas perdu plus de 10% de leur poids de départ.

L'analyse globale de l'évolution du pourcentage d'essais corrects montre qu'il y a une augmentation significative des performances pour tous les groupes en séparation 4 mais pas en séparation 2 (figure 39A, ANOVA à mesures répétées, séparation 2, effet génotype  $F_{(1,48)}=0,509$ , ns, effet conditions  $F_{(1,48)}=0,281$ , ns, effet génotype x conditions  $F_{(1,48)}=0,696$ , ns, effet temps  $F_{(3,144)}=0,1856$ , ns, effet temps x génotype  $F_{(3,144)}=0,875$ , ns, effet temps x conditions  $F_{(3,144)}=0,613$ , ns ; séparation 4, effet génotype  $F_{(1,48)}=4,486$ ,  $P=0,0394$ , effet conditions  $F_{(1,48)}=3,234$ , ns, effet génotype x conditions  $F_{(1,48)}=0,374$ , ns, effet temps  $F_{(3,144)}=9,872$ ,  $P<0,0001$ , effet temps x génotype  $F_{(3,144)}=0,495$ , ns, effet temps x conditions  $F_{(3,144)}=2,226$ , ns).

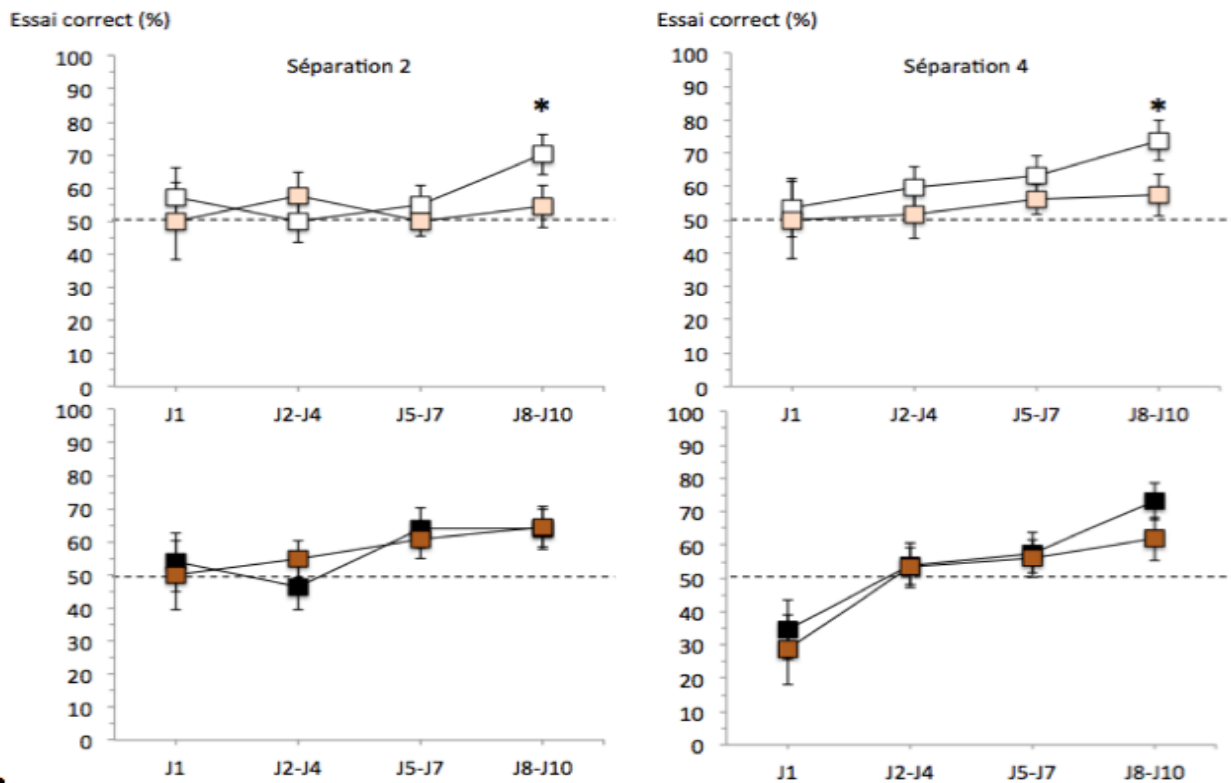
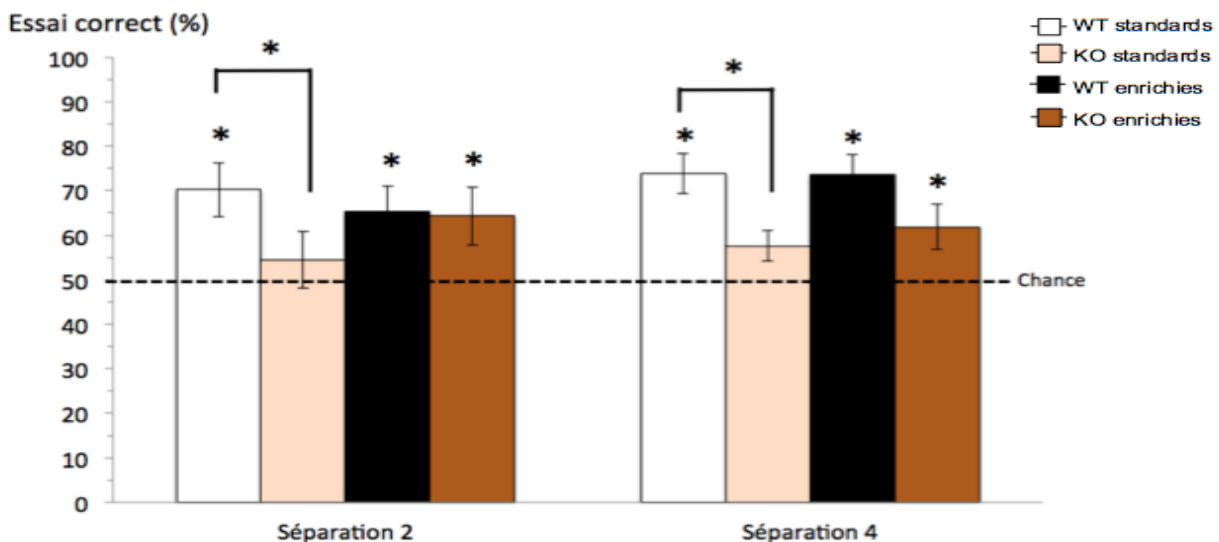
**A****B**

Figure 39. (A) Pourcentage d'essais corrects au cours des 10 jours d'apprentissage en séparation de patterns, configurations 2 et 4. Les barres représentent les erreurs standards à la moyenne. Les astérisques (\*) indiquent des différences significatives ( $P < 0,05$ , ANOVA factorielle). (B) Pourcentage d'essais corrects au cours des 6 derniers essais en séparation de patterns, configurations 2 et 4 (WT standards ( $n=14$ ), *Rsk2*-KO standards ( $n=11$ ) et WT enrichies ( $n=13$ ), *Rsk2*-KO enrichies ( $n=14$ )). Les barres représentent les erreurs standards à la moyenne. Les astérisques (\*) indiquent des différences significatives par rapport à 50% ainsi que la différence entre les groupes (tests t de Student).

Au cours des 7 premiers jours, que ce soit en séparation 2 ou en séparation 4, les performances des souris WT standards sont similaires à celles des souris *Rsk2*-KO standards. En revanche, au cours des 3 derniers jours, l'analyse statistique révèle que les souris WT

standards montrent significativement de meilleures performances que les souris *Rsk2*-KO standards dans les deux configurations (figures 39A et 39B, ANOVA factorielle, séparation 2,  $F_{(1,148)}=3,971$ ,  $P=0,0481$  ; séparation 4,  $F_{(1,148)}=4,455$ ,  $P=0,0365$ ). D'ailleurs, en séparation 2, les souris WT standards ont un pourcentage de réussite significativement supérieur à 50% (figure 39B, Test t de Student,  $t=4,033$ ,  $P=0,0001$ ) ce qui n'est pas le cas des souris *Rsk2*-KO standards qui ne montrent pas de différence significative par rapport à 50 % (figure 39B, Test t de Student,  $t=0,736$ , ns). De même, en séparation 4, les performances des 3 derniers jours des souris WT standards sont également significativement supérieures à 50% (figure 39B, Test t de Student,  $t=4,934$ ,  $P<0,0001$ ) alors que celles des souris *Rsk2*-KO ne diffèrent pas significativement de 50% de réussite (figure 39B, Test t de Student,  $t=1,236$ , ns).

Concernant l'enrichissement, sur les 10 jours d'apprentissage, on observe plus aucune différence entre les souris WT et *Rsk2*-KO enrichies dans les deux configurations (figure 39A, ANOVA à mesures répétées, effet génotype, séparation 2,  $F_{(1,25)}=0,008$ , ns ; séparation 4,  $F_{(1,25)}=1,021$ , ns). L'analyse des 3 derniers jours montre que les résultats obtenus sont similaires pour la séparation 2 et la séparation 4. En effet, quel que soit le génotype, les souris enrichies montrent un pourcentage de réussite significativement supérieur à 50 % (figure 39B, Test t de Student, séparation 2, WT enrichies,  $t=2,580$ ,  $P=0,0118$  ; *Rsk2*-KO enrichies,  $t=2,716$ ,  $P=0,0080$  ; séparation 4, WT enrichies,  $t=4,565$ ,  $P<0,0001$  et *Rsk2*-KO enrichies,  $t=2,368$ ,  $P=0,0202$ ).

En séparation 2 comme en séparation 4, les souris WT enrichies ne montrent pas de différence de réussite par rapport aux souris WT standards (figure 39B, ANOVA factorielle, séparation 2,  $F_{(1,160)}=0,686$ , ns ; séparation 4,  $F_{(1,160)}=0,011$ , ns). Si, de même, les performances des souris *Rsk2*-KO enrichies n'apparaissent pas statistiquement significativement différentes de celles des *Rsk2*-KO standards en séparation 2 et 4 (figure 39B, ANOVA factorielle, séparation 2 :  $F_{(1,148)}=1,456$ , ns ; séparation 4 :  $F_{(1,148)}=0,285$ , ns), dans les deux configurations, les performances des souris *Rsk2*-KO enrichies ne sont plus significativement différentes de celles des souris WT standards (figure 39B, ANOVA factorielle, séparation 2,  $F_{(1,166)}=0,670$ , ns ; séparation 4,  $F_{(1,166)}=2,741$ , ns).

**Ces résultats permettent de mettre en évidence un déficit d'apprentissage des souris *Rsk2*-KO dans les configurations 2 et 4 de notre protocole de séparation de patterns. Ils suggèrent aussi que l'enrichissement partiel compense le déficit de performances dans les deux configurations de la tâche.**

### 23. Survie neuronale après séparation de patterns

Afin de déterminer l'influence de l'apprentissage dans la tâche de séparation de patterns sur la survie neuronale, nous avons analysé la densité de cellules BrdU<sup>+</sup>/mm<sup>3</sup> pour tous les groupes (figure 40A). L'analyse de la maturation neuronale de ces souris a également été effectuée. Les cellules marquées sont âgées de 24-26 jours (figure 40B).

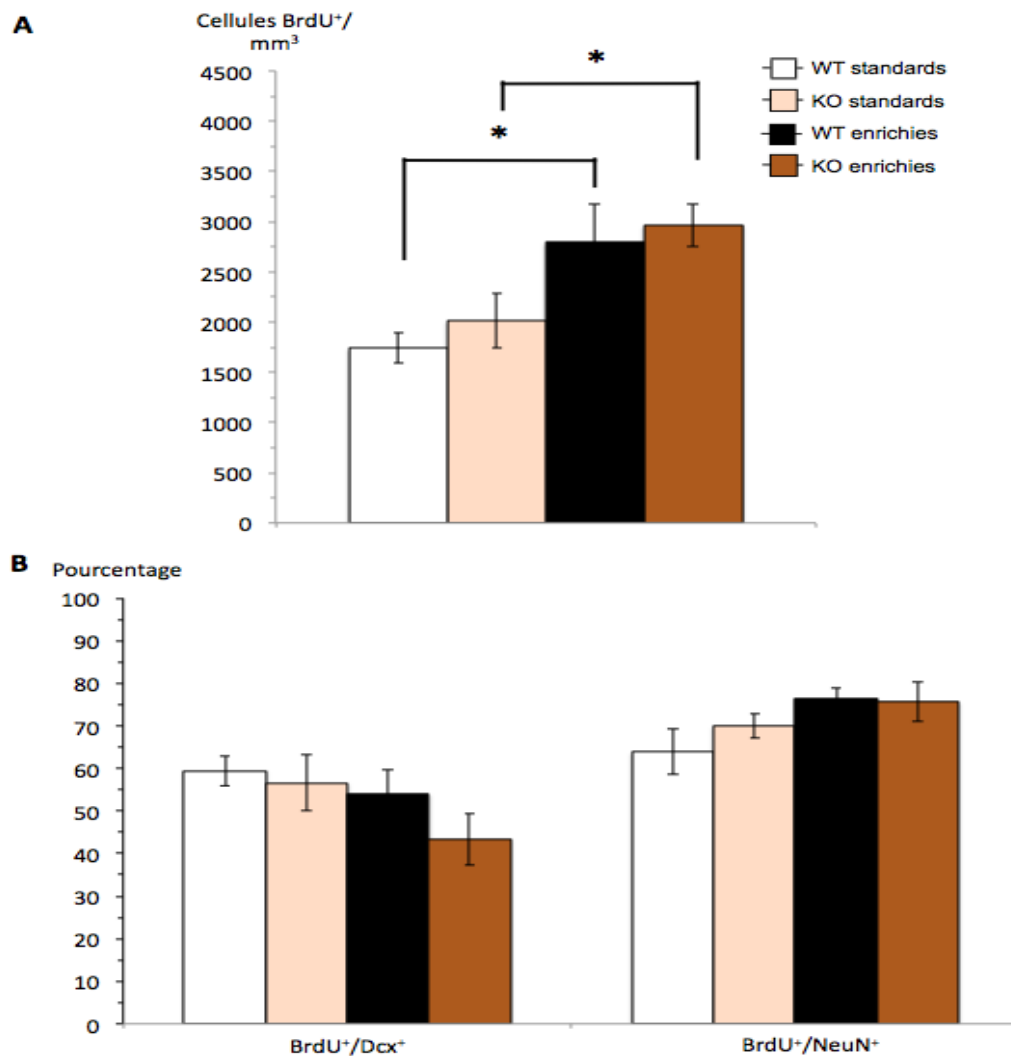


Figure 40. (A) Densité moyenne de cellules BrdU<sup>+</sup>/mm<sup>3</sup> observées dans la couche granulaire du gyrus denté de l'hippocampe dorsal à 22-24 jours post injection chez des souris évaluées dans la tâche de séparation de patterns (WT standards (n=5), *Rsk2*-KO standards (n=5) et WT enrichies (n=5), *Rsk2*-KO enrichies (n=5)). Les barres représentent les erreurs standards à la moyenne. Les astérisques (\*) indiquent des différences significatives ( $P < 0,05$ , ANOVA factorielle). (B) Pourcentage de cellules BrdU<sup>+</sup>/DCX<sup>+</sup> et BrdU<sup>+</sup>/NeuN<sup>+</sup> dans la couche granulaire du gyrus denté de l'hippocampe dorsal de souris WT et *Rsk2*-KO standards et enrichies après apprentissage spatial en séparation de patterns, 22-24 jours post injections de BrdU. Les barres représentent les

erreurs standards à la moyenne.

De manière générale, nous avons observé des différences de densité entre les groupes en fonction des conditions d'élevage mais pas en fonction des génotypes (figure 40A, ANOVA factorielle, effet conditions,  $F_{(1,16)}=14,209$ ,  $P=0,0017$  ; effet génotype,  $F_{(1,16)}=0,694$ , ns ; interaction conditions x génotype,  $F_{(1,16)}=0,038$ , ns). Concernant l'enrichissement, les souris WT et *Rsk2*-KO enrichies montrent respectivement une densité de cellules BrdU<sup>+</sup>/mm<sup>3</sup> 1,6 et 1,4 fois plus importante que les souris WT et *Rsk2*-KO standards (figure 40A, ANOVA factorielle, WT enrichies vs WT standards,  $F_{(1,8)}=6,718$ ,  $P=0,0320$  ; KO enrichies vs KO standards,  $F_{(1,8)}=7,695$ ,  $P=0,0242$ ). Les souris *Rsk2*-KO enrichies possèdent significativement plus de cellules BrdU<sup>+</sup>/mm<sup>3</sup> (1,7 fois) que les souris WT standards (figure 40A, ANOVA factorielle,  $F_{(1,8)}=22,437$ ,  $P=0,0015$ ).

L'analyse générale de l'expression du pourcentage de cellules BrdU<sup>+</sup>/DCX<sup>+</sup> et BrdU<sup>+</sup>/NeuN<sup>+</sup> n'a révélé aucune différence significative entre les différents groupes (figure 40B, ANOVA factorielle, BrdU<sup>+</sup>/DCX<sup>+</sup> : effet génotype,  $F_{(1,15)}=1,429$ , ns ; effet conditions,  $F_{(1,15)}=2,718$ , ns ; interaction génotype x conditions,  $F_{(1,15)}=0,472$ , ns ; BrdU<sup>+</sup>/NeuN<sup>+</sup> : effet génotype,  $F_{(1,15)}=0,391$ , ns ; effet conditions,  $F_{(1,15)}=4,874$ ,  $P=0,0433$  ; interaction génotype x conditions,  $F_{(1,15)}=0,692$ , ns).

**Ces résultats montrent que l'apprentissage en séparation de patterns n'exerce aucune influence sur la survie neuronale en l'absence de RSK2. L'enrichissement partiel précédant la séparation de patterns permet d'augmenter la survie neuronale chez les souris WT et *Rsk2*-KO, mais également de restaurer les performances des souris *Rsk2*-KO en séparation de patterns à un niveau comparable à celles des souris WT. Ces données permettent de suggérer qu'une augmentation de la survie neuronale est associée à une restauration des déficits en séparation de patterns. Aucun effet de cet apprentissage ou de l'enrichissement n'est observé sur la maturation neuronale.**



## DISCUSSION

Le SCL est une maladie génétique rare, causée par des mutations du gène *Rsk2* dont l'un des signes cliniques majeurs est la DI. En 2007, la caractérisation phénotypique d'une souris invalidée pour le gène *Rsk2*, a permis de mettre en évidence des déficits cognitifs en accord avec la DI et de valider cette souris comme modèle d'étude du SCL. Ces souris montrent en particulier des déficits d'apprentissage et de mémoire spatiale (Poirier *et al*, 2007). Des études récentes menées au laboratoire, ont montré que les souris *Rsk2*-KO présentent également des déficits dans d'autres tâches hippocampo-dépendantes. En effet, les souris *Rsk2*-KO présentent un déficit de reconsolidation post-rappel dans une tâche de mémoire de reconnaissance de localisation spatiale d'objets (Davis *et al*, 2010). Ces souris *Rsk2*-KO présentent aussi des déficits de mémoire de peur, dans une tâche de conditionnement de trace qui met en jeux les fonctions hippocampiques. Enfin, même si les souris *Rsk2*-KO n'ont aucun déficit de consolidation dans la tâche de conditionnement de peur contextuelle, elles présentent un déficit de reconsolidation dans cette tâche (Morice *et al*, 2013). Au cours de cette thèse, nous avons poursuivi l'étude de ce modèle murin n'exprimant plus la protéine RSK2, afin de comprendre le rôle joué par cette protéine dans certains mécanismes cognitifs. Compte tenu des déficits importants d'apprentissage et de mémoire spatiale observés chez les souris *Rsk2*-KO, nous nous sommes en particulier intéressés à l'hippocampe, connu pour sa forte implication dans ces processus.

Au cours de cette thèse, nous nous sommes focalisés sur la neurogenèse hippocampique adulte, un mécanisme de plasticité cérébrale qui joue un rôle crucial dans les fonctions cognitives et dont des altérations ont déjà été mentionnées chez plusieurs modèles de DI (pour revue, voir Pons-Espinal *et al*, 2013). De plus, des études montrent le rôle de RSK2 dans diverses fonctions telles que la prolifération, le cycle cellulaire ou encore l'apoptose (pour revue, voir Romeo *et al*, 2012) et, plus récemment, dans la neurogenèse embryonnaire (Dugani *et al*, 2010 ; Ammar *et al*, 2013). Cependant, aucune étude, à ce jour, n'a étudié le rôle potentiel de RSK2 dans la neurogenèse hippocampique adulte.

## 24. Le volume hippocampique des souris *Rsk2*-KO

### 24.1 L'absence de RSK2 n'altère pas le volume hippocampique

Lors des injections de BrdU, chaque souris a été pesée et comme dans l'étude de Poirier *et al* (2007), nous avons observé une diminution du poids corporel (d'environ 6 %) des souris *Rsk2*-KO par rapport aux souris WT. Cette diminution, qui n'affecte en rien les performances locomotrices des animaux, pourrait s'expliquer par une diminution de la masse osseuse des souris *Rsk2*-KO mise en évidence par Yang *et al* (2004). D'autre part, en étudiant l'autre modèle de souris *Rsk2*-KO (générée par Dufresne *et al* (2001), El-Haschimi *et al* (2003) ont montré que les souris mutantes naissent avec le même poids corporel que les souris WT, mais qu'une différence s'installe à partir de l'âge de 10 semaines où le poids des souris *Rsk2*-KO se stabilise alors que celui des souris WT continue à augmenter. Cette différence serait due à une perte spécifique de tissu adipeux blanc chez les souris *Rsk2*-KO.

Même si les souris *Rsk2*-KO présentent un poids plus faible, jusqu'à aujourd'hui aucune étude n'a montré d'altération morphologique cérébrale (Yang *et al*, 2004 ; Perreira *et al*, 2010). En revanche, chez l'homme, il a été montré par des études d'IRM que les patients atteints du SCL montraient des diminutions du volume cérébral ainsi que de certaines structures cérébrales (Kesler *et al*, 2007). Cette étude, menée sur 2 familles de 3 patients, montre qu'avec le cervelet et le cortex, l'hippocampe fait partie des structures les plus affectées par les mutations de la protéine RSK2. Cependant, les auteurs ont constaté que les volumes des structures analysées ne variaient pas de la même façon. En effet, dans l'une des familles étudiées, le volume de l'hippocampe était plus faible, alors que dans l'autre famille, il était plus important par rapport à l'hippocampe des individus contrôles. Cette étude qui renforce la variabilité constatée des signes cliniques du SCL, semble montrer une implication de la protéine RSK2 dans la morphologie de certaines structures cérébrales. Une autre étude cérébrale par IRM montre que des mutations du gène RSK2 ont entraîné des dilatations du ventricule latéral chez un patient atteint du CLS (Kondoh *et al*, 1998). Chez la souris modèle, nos analyses histologiques n'ont révélé aucun effet de l'absence de RSK2 sur les volumes de l'hippocampe et du gyrus denté. Au laboratoire, d'autres analyses, menées par la technique d'IRM, ont confirmé ce résultat en ne montrant aucune différence du volume cérébral total ou de l'hippocampe chez les souris *Rsk2*-KO par rapport aux souris WT (C. Vaillend, C. Sébrié, communication personnelle).



## 24.2 L'enrichissement augmente le volume de l'hippocampe

Dans l'optique de compenser les déficits mnésiques observés chez notre souris modèle, nous avons utilisé un paradigme d'enrichissement environnemental journalier ne s'étendant pas sur la totalité de la journée. Notre étude a permis de montrer que cet enrichissement de courte durée augmentait le volume de l'hippocampe chez les souris indépendamment de leur génotype. Cette observation est en accord avec les effets positifs de l'enrichissement sur l'anatomie cérébrale (Nithianantharajah et Hannan, 2006). Ces résultats soulèvent la question des mécanismes qui induisent cette augmentation, mais également si ces mécanismes sont les mêmes pour les deux génotypes. Une hypothèse pourrait être que cette augmentation de volume passe par une augmentation de l'arborisation dendritique des neurones dans les différentes structures hippocampiques, comme c'est le cas chez d'autres modèles de DI (Pons-Espinal *et al*, 2013). En se basant sur ces connaissances, il serait intéressant d'analyser la morphologie des nouveaux neurones granulaires (arborisation dendritique, longueurs des prolongements cytoplasmiques) chez les souris *Rsk2*-KO enrichies afin de déterminer si les effets de l'enrichissement sur le volume hippocampique sont médiés par les mêmes mécanismes que chez les souris sauvages.

## 25. L'absence de RSK2 n'affecte pas la neurogenèse adulte hippocampique basale

### 25.1 La Prolifération cellulaire

Selon nos résultats, l'absence de RSK2 n'affecte pas la prolifération cellulaire au sein du gyrus denté de l'hippocampe adulte. Compte tenu du fait que la protéine RSK2 compte parmi ses cibles des acteurs du cycle cellulaire tels que l'histone H3 (pour revue, voir Romeo *et al*, 2010), ce résultat était inattendu. De plus, une étude récente montrant un rôle de la protéine RSK2 dans la neurogenèse embryonnaire corticale chez la souris, présente RSK2 comme pouvant être un régulateur négatif de la prolifération cellulaire à l'état embryonnaire (Dugani *et al*, 2010). Une autre étude montre, toujours au stade embryonnaire, que la protéine RSK2 aurait une forte influence sur le développement des neurones corticaux, car la culture *in vitro* de neurones corticaux embryonnaires à 24, 48 et 72 heures montre, en l'absence de RSK2, un retard des stades de maturation neuronale (Ammar *et al*, 2013). Dans notre étude chez la souris adulte, l'absence d'effet de la protéine pourrait s'expliquer par certaines différences physiologiques existantes entre le cerveau embryonnaire et adulte. En effet, les mécanismes régulant la neurogenèse à l'état embryonnaire diffèrent pour certains de ceux qui régulent la neurogenèse adulte hippocampique (pour revue, voir Kintner, 2002). Nos résultats

sont renforcés par une autre analyse, effectuée au laboratoire, de la prolifération cellulaire chez les souris *Rsk2*-KO via l'analyse de l'expression de KI-67 qui n'a également révélé aucune différence entre les souris *Rsk2*-KO et WT. Il est donc possible que les mécanismes impliquant la protéine RSK2 dans la prolifération cellulaire au stade embryonnaire n'entraînent plus d'effet, ou soient compensés, chez l'adulte. L'impact de l'absence de RSK2 varie peut-être également en fonction des cellules ainsi que des structures cérébrales étudiées, car l'expression de la protéine est variable au niveau cérébral.

Dans le cadre de pathologies telles que les cancers de la prostate et du sein, un rôle des protéines RSKs dans la prolifération cellulaire a également été montré. En effet, une étude portant sur des échantillons de tissu issus d'un cancer de la prostate montre une augmentation de la quantité des protéines RSKs dans les cellules cancéreuses (Clark *et al*, 2005). Les protéines RSKs sont également surexprimées (50 % de surexpression) dans les cellules cancéreuses du sein, suggérant leur implication dans la prolifération anarchique des cellules (Smith *et al*, 2005). De plus, l'utilisation d'un inhibiteur spécifique des RSKs (SL0101) bloque la prolifération de ces mêmes cellules cancéreuses, ce qui montre qu'au moins un des membres de la famille des RSKs est impliqué dans la prolifération cellulaire (Smith *et al*, 2005). L'utilisation de ce même inhibiteur a permis de montrer *in vitro* que l'absence de RSK2 entraînait une diminution de la prolifération cellulaire, les cellules étant bloquées en phase G1 (Cho *et al*, 2007). Même si les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans cette prolifération pathologique sont probablement différents de la prolifération cellulaire constitutive qui a lieu au sein de l'hippocampe adulte, ces études apportent des informations importantes quant au rôle des protéines RSKs dans le cycle cellulaire. Enfin, ces études sur la prolifération des cellules corticales embryonnaires et celles sur la prolifération des cellules cancéreuses ciblent des types cellulaires différents des neurones granulaires que nous étudions, ce qui pourrait aussi expliquer l'absence de déficit de prolifération que nous avons montré au sein du gyrus denté des souris adultes *Rsk2*-KO.

## 25.2 Survie et maturation neuronale

Concernant la survie neuronale, nous avons montré une diminution de la densité des cellules marquées, qui se stabilise après 4 semaines. Ces résultats sont en accord avec la littérature (pour revue, voir Zhao *et al*, 2008). De plus, nos résultats montrent que sur une période de 6 semaines, les densités de cellules BrdU<sup>+</sup> des souris *Rsk2*-KO ne diffèrent pas de celles des souris WT et qu'il n'y a aucun effet de l'absence de RSK2 sur la maturation

neuronale estimée par l'expression de DCX et NeuN. Pourtant, des études ont mis en évidence une implication de RSK2 dans la différenciation cellulaire. Par exemple, l'étude de Dugani *et al* (2010) montre que la protéine RSK2 favorise la différenciation des nouvelles cellules en neurones dans le cortex embryonnaire. De même, Yang *et al* (2004) montrent que RSK2 est impliquée dans la différenciation des ostéoblastes via son action sur la protéine ATF4. Dans notre étude, nous avons analysé l'expression de DCX et NeuN respectivement à 2/4 semaines et à 4/6 semaines, mais la durée d'expression de ces deux protéines est plus large (quelques jours jusqu'à environ 4 semaines pour la DCX et à partir de 2 semaines pour le NeuN ; Snyder *et al*, 2009a). Donc il est possible qu'il existe un retard de maturation que notre protocole n'a pas mis en évidence à cause des périodes d'analyses choisies. Il serait intéressant d'élargir les périodes d'analyse de l'expression de ces deux protéines afin de confirmer nos résultats. Cette analyse pourrait être complétée par l'utilisation de marqueurs de la maturation neuronale autre que le DCX et le NeuN. En effet, d'autres marqueurs de maturation neuronale tels que la NeuroD, de calbindin ou encore de la calrétinine ont une chronologie d'expression différente de celle de la DCX et du NeuN et permettrait d'analyser la maturation neuronale de façon plus précise (von Bohlen Und Halbach, 2011).

Enfin, une autre hypothèse pour expliquer ces différences pourrait être le fait que notre modèle d'étude soit une souris transgénique n'exprimant plus le gène *Rsk2*. Nous pouvons donc supposer que, dès le stade embryonnaire, certains mécanismes de compensations se sont mis en place pour pallier l'absence de la protéine RSK2. Cette hypothèse est confortée par l'existence de protéines partageant des caractéristiques structurales avec la protéine RSK2 (pour revue, voir Cargnello et Roux, 2011). En effet, les 3 autres membres de la famille des RSKs (RSK1, RSK3 et RSK4) présentent près de 80 % d'homologie de séquence avec la protéine RSK2. De plus, RSK3, comme RSK2, est exprimée dans les neurones granulaires du gyrus denté (Zeniou *et al*, 2002). Selon des études récentes, l'expression des formes non phosphorylées de RSK1 et RSK3 chez les souris *Rsk2*-KO ne diffère pas par rapport aux souris WT (Schneider *et al*, 2011 ; Morice *et al*, 2013). Cependant, une augmentation de l'expression des formes phosphorylées des protéines RSKs *via* l'utilisation d'un anticorps ne permettant pas de distinguer les différentes protéines RSKs phosphorylées (P-RSK1, P-RSK2 et P-RSK3) est constatée en l'absence de RSK2. Ces résultats suggèrent que dans l'hypothèse où il y aurait une compensation via les protéines RSKs, elle se ferait non pas par une régulation de l'expression des protéines RSKs, mais par une régulation de leur phosphorylation (Schneider *et al*, 2011).

Les homologues structuraux tels que les protéines MSKs partagent également une forte homologie de séquences avec la protéine RSK2 (pour revue, voir Cargnello et Roux, 2011). Cela signifie que certaines cibles de RSK2 peuvent également être des cibles des protéines MSKs. De plus, il a été observé, chez les souris MSK1/2 null (n'exprimant pas les protéines MSK1 et 2), une diminution de la prolifération cellulaire ainsi que du nombre de jeunes neurones (DCX<sup>+</sup>) (Choi *et al*, 2012). Cette étude met en évidence l'implication des protéines MSK 1 et 2 dans la neurogenèse adulte. Il serait donc intéressant de quantifier les protéines de la famille des MSKs afin de mettre en évidence d'éventuelles variations de leur taux d'expression chez les souris *Rsk2*-KO.

Nos expérimentations ne nous ont pas permis de mettre en évidence des altérations de la neurogenèse adulte hippocampique, à l'état basal, chez notre modèle de DI. Selon la littérature, plusieurs modèles de DI présentent des altérations variées, et parfois contradictoires des différentes étapes de la neurogenèse adulte hippocampique.

Par exemple, le modèle du syndrome de l'X fragile (souris *FMRI*-KO) montre une augmentation de la prolifération cellulaire ainsi qu'une altération de la différenciation neuronale (Luo *et al*, 2010 ; Guo *et al*, 2011). Cependant, chez ce même modèle, il a été également observé une diminution de la prolifération cellulaire, de la survie neuronale, du nombre de cellules de type 2 et de la maturation neuronale (Lazarov *et al*, 2012). L'augmentation ou, à l'inverse, la diminution de la prolifération observée par ces deux études chez le même modèle sont probablement dues à l'âge des souris au cours de l'analyse. Dans l'étude de Luo *et al* (2010), les souris sont âgées d'environ 2 mois alors que dans l'étude de Lazarov *et al*, (2012) elles sont âgées d'environ 9 à 12 mois, ce qui montre que les rôles de FMRP évoluent avec l'âge. Ainsi, chez les jeunes souris *FMRI*-KO, la prolifération cellulaire est importante puis elle diminue avec l'âge.

Chez le modèle *MECP2*-KO du syndrome de Rett, un ralentissement de la maturation des nouveaux neurones du gyrus denté a été observé, mais aucune différence de prolifération cellulaire et de survie neuronale n'a été observée (Smrt *et al*, 2007). En revanche, chez la souris *FOXG1*-KO, également modèle du syndrome de Rett, il a été montré qu'il y avait une réduction de la prolifération cellulaire ainsi qu'une augmentation de l'apoptose des nouveaux neurones provoquant une diminution de la survie cellulaire (Tian *et al*, 2012). Cependant, une étude n'a révélé aucune différence de prolifération cellulaire entre les souris *FOXG1*-KO et les souris WT (Shen *et al*, 2006).

Chez la souris Ts65Dn, modèle du syndrome de Down, il n'a été observé aucune différence de survie neuronale chez des souris âgées de 10 à 12 mois (Llorens-Martín *et al*, 2010). En revanche chez ce même modèle, il a été montré une réduction de la prolifération cellulaire et de la survie neuronale chez les souris jeunes (2-3 mois) (Clark *et al*, 2006 ; Belichenko et Kleschevnikov, 2011) ainsi qu'une réduction de la prolifération cellulaire chez les plus âgées (13-15 mois) (Rueda *et al*, 2005). Chez un autre modèle du syndrome de Down, la souris Ts1Cje, des auteurs ont également montré qu'il y avait une réduction de la prolifération ainsi que de la différenciation des nouvelles cellules en neurones et par contre, une augmentation de la différenciation en astrocytes (Ishihara *et al*, 2010; Hewitt *et al*, 2010).

Enfin, contrairement aux études précédemment décrites, et comme dans le cas de notre étude, dans le cadre du syndrome d'Angelman (maladie neurogénétique caractérisée par un déficit intellectuel sévère et des traits dysmorphiques), des auteurs ont montré que les souris déficientes pour le gène responsable de la maladie ne présentent aucune différence de prolifération et de survie cellulaires (Mardirossian *et al*, 2009). Cependant, ces souris montrent une diminution du nombre de cellules BrdU<sup>+</sup>/NeuN<sup>+</sup>.

Toutes ces études montrent qu'il y a une relation certaine entre la neurogenèse adulte hippocampique et la déficience intellectuelle. Cependant tous les aspects de cette relation ne sont pas connus au regard des résultats de la recherche actuelle. D'une façon globale, cette difficulté provient du fait que les gènes à l'origine des DI étudiées, vont générer des protéines ayant un impact différent sur la neurogenèse. Ensuite, les protocoles expérimentaux utilisés pour étudier la neurogenèse adulte vont jouer un rôle majeur dans les variations des résultats obtenus chez un même modèle de DI. En effet, en fonction de leurs hypothèses, les auteurs ne vont pas étudier certaines étapes de la neurogenèse adulte de la même façon (nombre d'injections, âge des animaux...), ce qui a pour effet de complexifier l'interprétation du rôle de la neurogenèse d'un point de vue générale dans la DI.

## **26. RSK2 est impliquée dans l'apprentissage et la mémoire spatiale**

### **26.1 Apprentissage et mémoire spatiale dans la piscine de Morris**

Au cours de notre étude, nous avons confirmé que les souris modèles du SCL présentaient des déficits d'apprentissage spatial (Poirier *et al*, 2007). En nous basant sur les résultats de Poirier *et al* (2007), nous avons cherché à nous focaliser sur le retard d'apprentissage particulièrement important en début d'apprentissage, c'est pourquoi nous

avons choisi d'utiliser un protocole d'apprentissage ne durant que 7 jours contre 11 jours initialement. Par conséquent, nous nous sommes placés dans des conditions d'apprentissage partiel, ce qui explique en partie les mauvaises performances, de même que le faible nombre de crossings au test de mémoire chez les souris *Rsk2*-KO et WT. Outre le fait que le protocole utilisé a été réduit de plusieurs jours, les mauvaises performances en mémoire à long terme observées chez les souris WT peuvent aussi être dues à la relativement grande taille de la piscine utilisée pour des souris et qui renforce la difficulté des souris dans la tâche. De plus, dans notre pièce expérimentale, les indices de l'environnement restaient relativement peu saillants afin de se placer dans des conditions similaires à celles des études précédentes (Poirier *et al*, 2007). Comme pour le cas du SCL, d'autres modèles murins montrent des déficits cognitifs dans la piscine de Morris ainsi que dans d'autres tâches comportementales (Poirier *et al*, 2007). Par exemple, la souris Ts65Dn montre des déficits d'apprentissage spatial dans la piscine de Morris (Martinez-Cué *et al*, 2002). Ces déficits sont observés chez les souris mâles et femelles dans un protocole de piscine comprenant 8 essais par jour. Comme les souris *Rsk2*-KO, les souris Ts65Dn montrent un retard d'apprentissage ainsi qu'une thigmotaxie plus élevée que les souris WT. Concernant le syndrome de Rett, la souris modèle *MECP2*-KO, montre également un retard d'apprentissage spatial ainsi que des déficits de mémoire spatiale dans la piscine de Morris (Morreti *et al*, 2006). Dans d'autres cas, des déficits peuvent être mis en évidence en fonction des différentes versions de la tâche comportementale. C'est le cas du modèle *FMRI*-KO qui ne montre aucun déficit dans la version classique de la piscine de Morris lorsque la plateforme reste à la même position. En revanche, dans la version « reversal » lorsque la plateforme est déplacée, les souris *FMRI*-KO montrent des déficits (Bakker *et al*, 1994). Ces derniers résultats suggèrent davantage des déficits de flexibilité que des déficits d'apprentissage spatiaux.

## 26.2 Thigmotaxie des souris *Rsk2*-KO

La thigmotaxie, plus importante chez les souris *Rsk2*-KO par rapport aux souris WT, peut expliquer en partie leur retard d'apprentissage. En effet, un animal passant la majorité du temps de l'essai dans la périphérie de la piscine mettra plus de temps à trouver la plateforme que les autres souris. La thigmotaxie est parfois mentionnée dans la littérature de la piscine de Morris et de l'open field comme indicateur d'anxiété de l'animal. Dans l'étude de Poirier *et al* (2007), les auteurs ont utilisé divers tests comportementaux afin de mettre en évidence des réponses anxiogènes potentielles chez les souris *Rsk2*-KO. Les analyses n'ont révélé aucun

déficit chez les souris, que ce soit dans l'open field, le plus-maze ou le O-maze. Ces résultats ne favorisent pas une implication de l'anxiété dans l'explication de l'augmentation de la thigmotaxie que nous avons observée, bien que ce soient des tâches comportementales différentes dont l'impact sur l'anxiété des souris est probablement très variable.

La thigmotaxie peut également être le reflet d'une mauvaise stratégie de la part des animaux (Lipp et Wolfer, 1998). Dans la piscine de Morris, les souris utilisent différentes stratégies de navigation afin de diriger leur comportement vers l'emplacement de la plateforme. Au cours des premiers essais, voire des premiers jours, les souris ne montrant pas d'altérations de performance dans la tâche font de la thigmotaxie de manière naturelle. Lorsque les animaux réalisent qu'il n'y a pas d'échappatoire en périphérie, ils adoptent une autre stratégie qui consistera à nager plus au centre de la piscine, ce qui leur permettra d'atteindre la plateforme (Wolfer *et al*, 1998). En nous basant sur cette interprétation, nous pouvons supposer que les souris *Rsk2*-KO mettent plus de temps à adopter ce changement de stratégie que les souris WT.

### 26.3 Séparation de patterns

La séparation de patterns consiste, lors de l'encodage d'une information, à distinguer des patrons d'informations présentant un degré de similitude important, de sorte qu'ils puissent être restitués indépendamment les uns des autres sans interférence (pour revue, voir Yassa et Stark, 2011). La séparation de pattern peut être étudiée dans différentes tâches comportementales (Clelland *et al*, 2009 ; Creer *et al*, 2011 ; Sahay *et al*, 2011b). Ayant observé des déficits des souris *Rsk2*-KO dans la tâche hippocampo-dépendante en piscine de Morris, nous avons émis l'hypothèse selon laquelle les souris présenteraient également des déficits dans une autre tâche hippocampo-dépendante. En utilisant une tâche de non-appariement retardé dans un labyrinthe radial, nous avons montré que les souris *Rsk2*-KO présentent des déficits de séparation de patterns lorsque les 2 bras à discriminer sont proches (séparation 2, configuration difficile) mais également lorsqu'ils sont éloignés (séparation 4, configuration facile). Selon nos résultats, il semble que les souris *Rsk2*-KO sont incapables de distinguer des événements ressemblants qu'ils soient spatialement proches ou éloignés. D'après la littérature, des déficits en séparation de patterns ont été également observés chez d'autres modèles de DI. Par exemple, la souris modèle du syndrome de l'X fragile, montre des déficits en séparation 2 et en séparation 4 lorsqu'elle est évaluée dans un labyrinthe radial (avec un protocole également basé sur l'étude de Clelland *et al* 2009) (Guo *et al*, 2011). De

même, le modèle souris *CBP<sup>+/-</sup>*, du syndrome de Rubinstein-Taybi montre un déficit en séparation de patterns dans un dispositif combinant une piscine de Morris à un labyrinthe radial, que la séparation des bras soit faible ou plus élevée (Lopez-Atalaya *et al*, 2011). Nos résultats coïncident avec la littérature mais il est important de noter que nous avons évalué nos souris dans une tâche comportementale ayant une composante spatiale et faisant intervenir la mémoire de travail. Comme les souris *Rsk2*-KO présentent de légers déficits en mémoire de travail ainsi que des déficits d'apprentissage et de mémoire spatiale (Poirier *et al*, 2007), il serait nécessaire de déterminer si les résultats de cette étude sont dus à un déficit de mémoire spatiale ou de mémoire de travail, ou tout simplement à l'incapacité de ces souris *Rsk2*-KO à effectuer la séparation de patterns. Dans ce but, il serait intéressant de les évaluer dans une autre tâche de discrimination, pour laquelle, en absence de l'évaluation de la séparation de patterns, les souris *Rsk2*-KO ne présentent pas de déficits particuliers. Nous pourrions utiliser le conditionnement à la peur au contexte qui est une tâche permettant d'évaluer la capacité de séparation de patterns en faisant varier différents contextes. Dans la version standard de cette tâche, aucun déficit n'a été observé chez les souris *Rsk2*-KO par rapport aux souris WT (Morice *et al*, 2013).

## **27. L'enrichissement restaure les performances cognitives des souris *Rsk2*-KO**

### **27.1 L'enrichissement améliore les performances dans la piscine de Morris**

Avec notre protocole d'apprentissage en piscine de Morris relativement difficile (piscine de grandes dimensions, indices environnementaux peu saillants...), nous montrons qu'un enrichissement quotidien à durée limitée est capable de restaurer les performances d'apprentissage des souris *Rsk2*-KO et permet également, non seulement aux souris WT d'exprimer de bonnes performances de rétention, mais aussi aux souris *Rsk2*-KO de former une mémoire spatiale à long terme. Ce choix d'enrichissement quotidien limité dans le temps a été préféré au permanent afin de se placer dans les conditions proches des stimulations cognitives non permanentes utilisées chez l'homme.

Concernant les souris WT, s'il est clair que l'enrichissement leur a permis de former une mémoire à long-terme, cet enrichissement n'a pas eu d'effet significatif sur la courbe d'apprentissage malgré une légère tendance à l'amélioration de leurs performances. Pourtant, il a été montré dans la littérature que l'enrichissement environnemental était capable d'augmenter significativement les performances d'apprentissage des souris WT en piscine de Morris (Kempermann *et al*, 1997; Frick et Fernandez, 2003). De même, chez le rat, il a été



montré qu'un enrichissement court de 3 heures par jour pendant 14 jours améliore les performances de mémoire à long terme dans la tâche de reconnaissance d'objet (Bruehl-Jungerman *et al*, 2005). Une hypothèse pouvant expliquer le faible effet bénéfique de l'enrichissement sur les performances des souris WT en apprentissage serait que les performances sont déjà relativement bonnes dans nos conditions d'apprentissage partiel et par conséquent il serait difficile de les améliorer de façon significative. Une autre hypothèse qui peut être avancée serait la variabilité des effets bénéfiques de l'enrichissement en fonction des protocoles utilisés. Par exemple, les effets bénéfiques de l'enrichissement peuvent différer en fonction de l'âge des souris. Dans l'étude de Kempermann *et al* (1997), l'enrichissement améliore les performances de souris WT âgées de 21 jours au début de l'enrichissement alors que dans l'étude de Frick et Fernandez (2003) les effets de l'enrichissement ne sont observables que chez les souris WT âgées (environ 27 mois). De même, dans l'étude de Harburger *et al* (2007), les auteurs montrent que l'enrichissement environnemental permanent améliore les performances des souris âgées (supérieur à 21 mois) et non celle des souris plus jeunes (âgées de 3 mois). Enfin, la force des effets dépend aussi probablement de la durée quotidienne de l'enrichissement. En effet, Bennet *et al* (2006) ont montré, chez des souris âgées, que seul un enrichissement permanent de 10 semaines était capable d'améliorer les performances d'apprentissage en piscine de Morris en comparaison à un enrichissement quotidien de 3 heures par jour durant 10 semaines.

Concernant les souris *Rsk2*-KO, l'enrichissement a significativement amélioré leurs performances d'apprentissage. Cependant, ces performances n'atteignent pas celles des souris WT enrichies. En effet, la courbe de temps d'atteinte de la plateforme diminue chez les souris *Rsk2*-KO enrichies, mais avec une cinétique différente de celles des souris WT enrichies. Nous pouvons émettre l'hypothèse selon laquelle l'enrichissement court est suffisant pour observer une compensation du déficit d'apprentissage lié à l'absence de RSK2.

Concernant la mémoire spatiale, l'enrichissement améliore significativement les performances des deux génotypes. Cependant l'analyse approfondie révèle que les effets bénéfiques de l'enrichissement sont plus importants chez les souris WT que chez les souris *Rsk2*-KO. En effet, les souris WT enrichies montrent significativement 2 fois plus de précision dans la recherche de la plateforme que toutes les autres souris, tous groupes confondus.

Les effets bénéfiques de l'enrichissement environnemental ont également été observés chez le modèle murin du syndrome de Down, dont les performances d'apprentissage s'améliorent dans la piscine de Morris après un enrichissement permanent de 7 semaines, mais seulement chez les femelles et non chez les mâles (Martinez-Cué *et al*, 2002). Cependant, une amélioration des performances en piscine de Morris chez les mâles est mise en évidence suite à 7 semaines d'exercice physique volontaire en roue d'activité (Rueda et Tejeda, 2010). Chez les modèles du syndrome de l'X fragile et du syndrome de Rett, l'enrichissement a permis de restaurer également les déficits cognitifs. En effet, chez la souris modèle du fragile X, un enrichissement permanent de 60 jours entraîne une restauration du déficit d'exploration dans l'open field ainsi que du déficit d'exploration d'objets dans la tâche de reconnaissance d'objets (Restivo *et al*, 2005). Concernant le syndrome de Rett, un enrichissement permanent de 50 jours entraîne une restauration des performances d'apprentissage et de mémoire spatiale dans la piscine de Morris (Lonetti *et al*, 2010).

## 27.2 L'enrichissement améliore les performances de séparation de patterns

En ce qui concerne les effets de l'enrichissement sur la séparation de patterns, nous avons observé une amélioration des performances des souris *Rsk2*-KO en séparation 2 et 4, qui atteignent plus de 50 % des essais réussis en fin d'apprentissage. Cependant, ces performances ne sont pas significativement différentes de celles des souris *Rsk2*-KO standards. Ainsi, l'enrichissement court est capable d'améliorer les performances des souris *Rsk2*-KO, cependant, il n'est pas suffisamment efficace pour améliorer les performances au point de les dissocier de celles des standards. Il pourrait être intéressant de prolonger la phase d'apprentissage afin d'utiliser un critère de réussite plus important (par exemple plus de 75 % d'essais corrects). Si les souris *Rsk2*-KO sont moins performantes dans la tâche de séparation de patterns, elles mettront plus de temps à l'atteindre ou ne l'atteindront pas, et l'enrichissement pourrait être associé à un plus fort effet bénéfique.

En conclusion nous avons montré avec ces résultats que la protéine RSK2 joue un rôle important dans l'apprentissage et la mémoire spatiale et qu'un enrichissement environnemental de courte durée a la capacité de compenser certaines des fonctions cognitives affectées par l'absence de la protéine.

## 28. Influence de l'apprentissage sur la neurogenèse adulte hippocampique des souris *Rsk2*-KO

Au vu des résultats comportementaux obtenus, nous nous sommes intéressés aux éventuels mécanismes d'une part responsables des déficits cognitifs observés et d'autre part impliqués dans la restauration de ces déficits. Compte tenu du rôle important de la neurogenèse adulte hippocampique dans les processus mnésiques et des déficits d'apprentissage et de mémoire spatiale chez les souris *Rsk2*-KO, nous avons cherché à savoir si la restauration liée à l'enrichissement était associée à une facilitation des processus de neurogenèse adulte hippocampique.

Nous avons montré au cours de cette étude que l'apprentissage dans la tâche de la piscine de Morris diminuait la survie neuronale des neurones âgés de 19 à 21 jours chez les souris *Rsk2*-KO, par rapport aux souris WT. Cette diminution de la survie n'est pas observée pour des neurones plus âgés, de 31 à 33 jours. La population neuronale sur laquelle ont été observés les effets de l'apprentissage avait entre 12 et 20 jours au moment de l'apprentissage. Les effets observés ne sont donc pas surprenants, car à cette période les neurones nouvellement formés sont dans leur période critique et particulièrement sensibles (voir revue Aasebo *et al*, 2011). En revanche l'absence d'effet de l'apprentissage sur une population neuronale plus âgée peut s'expliquer par le fait que les neurones néoformés qui avaient entre 24 et 32 jours, devaient être plus matures se trouvant en fin de période critique au cours de l'apprentissage.

Dans la tâche de séparation de patterns, *a priori* moins stressante que la piscine de Morris, aucun déficit de survie neuronale n'a été observé chez les souris *Rsk2*-KO par rapport aux souris WT. C'est pourquoi, l'une des explications à la diminution de la survie induite par l'apprentissage en piscine pourrait être une plus grande susceptibilité au stress des souris *Rsk2*-KO. En effet, le test en piscine de Morris est une des tâches d'évaluation de l'apprentissage et de la mémoire spatiale qui peut s'avérer stressante, car elle est basée sur l'aversion des animaux pour l'eau (Vorhees *et al*, 2006). Selon certaines études un stress aigu ou chronique influence négativement la neurogenèse adulte hippocampique (pour revue, voir Schoenfeld et Gould, 2012) et pourrait affecter plus particulièrement les souris *Rsk2*-KO. Cependant, contrairement à nos résultats, une étude d'Ehninger et Kempermann (2006) montre qu'il n'y a aucune différence de survie des nouveaux neurones entre les souris qui apprennent dans la piscine de Morris et leurs contrôles nageurs. Cependant, dans cette étude

les nouvelles cellules observées sont très jeunes (âgées entre 4 et 6 jours) et par conséquent pas encore dans la période critique. Comme dans cette étude, d'autres auteurs ont également montré qu'il n'y avait pas de différence de survie neuronale entre des souris qui apprennent dans la piscine de Morris et leurs contrôles nageurs (Van Praag *et al*, 1999 ; Dupret *et al*, 2007). L'existence de différence entre les souris qui apprennent et les nageurs peut être liée à l'âge des neurones. En effet, aucune différence n'est observée chez des souris après apprentissage par rapport à leur contrôle nageur pour des neurones âgés de 10 jours, en revanche une plus faible survie neuronale est observée chez les souris nageurs pour les neurones âgés de 39 jours (Trouche *et al*, 2009). Ces résultats contradictoires peuvent être liés aux différences interespèces (utilisation de rats dans l'étude de Dupret) et/ou aux protocoles utilisés au cours des études. En effet, l'âge des populations cellulaires marquées diffère d'une étude à l'autre, donc le stress agirait sur des cellules à des stades de maturation différents ce qui peut expliquer son action variable. L'hypothèse des effets stressants de la tâche sur la survie neuronale de l'apprentissage dans la piscine de Morris est donc étayée par la diminution de la survie neuronale chez les souris WT après la nage en piscine sans plateforme comparée au niveau de survie chez les souris WT post-apprentissage et par les résultats obtenus en séparation de patterns.

Afin de vérifier si les souris *Rsk2*-KO sont plus stressées lors de l'apprentissage dans la piscine de Morris, il serait intéressant de corréler les performances lors de l'apprentissage en piscine de Morris à des analyses hormonales. L'analyse du taux de corticostérone (hormone dont l'augmentation est positivement corrélée à l'augmentation de l'anxiété) chez les souris *Rsk2*-KO au cours de l'apprentissage donnerait des informations quant au niveau de stress de ces souris durant la tâche comportementale. Une étude préliminaire, actuellement en cours au laboratoire, consiste à déterminer les concentrations circulantes en corticostérone chez les souris *Rsk2*-KO par rapport aux souris WT à l'état basal et après 1 minute de nage dans la piscine de Morris sans plateforme (figure 41).

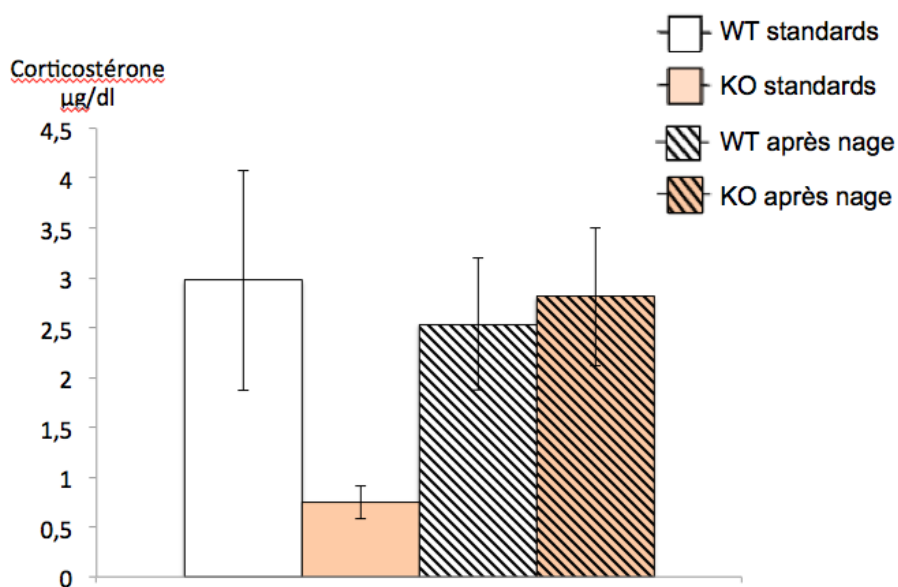


Figure 41. Concentration sanguine en corticostérone de souris WT et *Rsk2*-KO à l'état basal et après 1 minute de nage dans la piscine de Morris.

Les données préliminaires suggèrent qu'à l'état basal, les concentrations en corticostérone des souris *Rsk2*-KO seraient très faibles par rapport à celles des souris WT. Elles suggèrent également que la nage provoquerait une augmentation importante de la concentration en corticostérone des souris *Rsk2*-KO, ce qui n'est pas observé chez les souris WT. Ces données préliminaires doivent cependant être confirmées mais semblent suggérer que la protéine RSK2 pourrait être impliquée dans la capacité de résistance au stress.

Enfin, afin d'analyser plus finement les effets de l'apprentissage sur la survie neuronale chez notre modèle du SCL, il serait intéressant de suivre plusieurs populations neuronales à l'aide d'analogues nucléotidiques comme le CldU ou IdU (Dupret *et al*, 2007; Thomas *et al*, 2007). Cela permettrait par exemple d'analyser les effets de l'apprentissage dans la piscine de Morris sur des neurones d'âges différents chez les mêmes souris *Rsk2*-KO. Cependant, l'utilisation de ces analogues génère encore quelques difficultés d'analyse de résultats. Il a notamment été montré qu'il y avait de la reconnaissance non spécifique par les anticorps visant ces analogues et aussi que leur utilisation à des concentrations équivalentes n'entraînait pas un marquage cellulaire équivalent (Leuner *et al*, 2009).

### **29. L'enrichissement augmente la neurogenèse adulte hippocampique chez les souris *Rsk2*-KO**

Nous avons analysé différentes populations neuronales d'âges différents. Nous avons également analysé la survie neuronale, avant les tâches comportementales (neurones âgés de 10 à 12 jours), après l'apprentissage dans la piscine de Morris (neurones âgés de 19 à 21 jours et 31 à 33 jours) et après l'apprentissage en séparation de patterns (neurones âgés de 24 à 26 jours). Nous avons montré que l'enrichissement augmente la survie neuronale chez les souris indépendamment de leur génotype comme cela est décrit dans la littérature (Kempermann *et al*, 1997 ; pour revue, voir Van Praag, 2000 ; Bekinschtein *et al*, 2011). Cette augmentation du nombre de cellules BrdU<sup>+</sup> est maintenue après l'arrêt de l'enrichissement. Notre protocole d'enrichissement est suffisamment efficace pour améliorer la survie neuronale, et prolonger cet effet dans le temps. Ce résultat est intéressant car l'effet de l'enrichissement sur la population de cellules néo-formées ne durait que 10 à 12 jours, ce qui est faible en comparaison des périodes d'enrichissement souvent utilisées dans la littérature (par exemple, 3h/jour pendant 6 semaines, Rampon *et al*, 2000). Notre protocole d'enrichissement est également capable d'accélérer la maturation neuronale en diminuant l'expression de la DCX des nouveaux neurones. Cette diminution n'est observée que pour les neurones âgés de 19 à 21 jours mais pas pour les plus jeunes. Cela peut s'expliquer par le fait que les neurones âgés de 19 à 21 jours sont plus proches de la fin de la période d'expression de la DCX que des neurones plus jeunes.

### **30. L'enrichissement compense la diminution de neurogenèse adulte hippocampique chez les souris *Rsk2*-KO après apprentissage en piscine de Morris**

Notre protocole d'enrichissement court empêche la diminution de la survie neuronale après apprentissage spatial chez les souris *Rsk2*-KO en maintenant son taux au niveau de celui des souris WT. Ce niveau de survie neuronale est également observé chez les souris soumises à la séparation de patterns. Au vu de ces résultats et de l'amélioration des performances obtenue suite à l'enrichissement, nous avons cherché à mettre en évidence le lien existant entre les modifications de la neurogenèse adulte hippocampique et les performances comportementales observées. Pour cela, nous avons tenté de bloquer la neurogenèse adulte à l'aide d'un agent pharmacologique, le TMZ, selon le protocole de Garthe *et al* (2009). Le but

étant d'évaluer l'implication de neurogenèse adulte hippocampique sur les performances des souris *Rsk2*-KO et son implication dans les effets bénéfiques de l'enrichissement.

Malencontreusement, au cours d'expériences préliminaires, le protocole n'a pas fonctionné correctement et nous n'avons observé aucune diminution du nombre de cellules BrdU<sup>+</sup>. De plus, nous avons obtenu des valeurs de densités de cellules BrdU<sup>+</sup> anormalement faibles (500-1000 cellules BrdU<sup>+</sup>/mm<sup>3</sup>) que ce soit chez les animaux contrôles ou les animaux traités, probablement dus à des problèmes de BrdU injectés ou à un stress important des souris provoquant une chute de la neurogenèse adulte (qui pourrait être liée aux multiples injections du protocole). Faute de temps, nous n'avons pas pu réitérer l'expérience, mais il est évident qu'il est nécessaire de mener à bien ce blocage afin de déterminer le rôle de la neurogenèse adulte hippocampique dans l'amélioration des performances comportementales des souris *Rsk2*-KO après enrichissement.

### **31. L'absence de RSK2 ne modifie pas l'activation neuronale**

Nous avons également au cours de ces travaux tenté de mettre en évidence des défauts d'activation des neurones néoformés chez les souris *Rsk2*-KO, suite au test de mémoire spatiale en piscine. Ces défauts peuvent être mis en évidence en analysant la co-expression de marqueurs neuronaux avec l'expression de marqueurs de l'activation neuronale (*Fos*, *Zif268*, *Arc*). Selon l'étude de Kee *et al* (2007), le pourcentage de nouveaux neurones activés suite au test de mémoire spatiale est relativement faible (entre 0,5-2,5%). Au cours de cette thèse, sur toutes les souris analysées (n=12), nous n'avons observé qu'une seule cellule triplement marquée BrdU<sup>+</sup>/NeuN<sup>+</sup>/c-Fos<sup>+</sup> post rappel. La faible proportion de neurones triplement marqués obtenue lors de ces comptages est probablement due au jeune âge des cellules BrdU<sup>+</sup> observées. Compte tenu de cette observation, nous avons élargi notre analyse à toutes les cellules activées de la couche granulaire gyrus denté. Ainsi, nous avons comptabilisé toutes les cellules exprimant le marqueur c-Fos dans la couche granulaire du gyrus denté de l'hippocampe dorsal dans le but de mettre en évidence une éventuelle différence d'activation neuronale entre les souris WT et *Rsk2*-KO. Les données sont pour le moment préliminaires. L'analyse au niveau du gyrus denté n'a révélé aucune différence entre les deux génotypes, ce qui est assez surprenant, car la protéine RSK2 est connue pour son implication dans l'expression de la protéine c-Fos (Hauge et Frödin, 2006). L'une des explications pourrait être des compensations par d'autres protéines qui auraient un lien dans les voies de signalisation permettant l'activation de c-Fos.





## CONCLUSION

Au cours de cette thèse, nous avons mis en évidence des déficits cognitifs notamment dans la fonction de séparation de patterns chez une souris modèle de SCL, ce qui n'avait pas encore été montré. Ces résultats suggèrent que parmi les déficits cognitifs observés chez les patients atteints du SCL, pourraient s'ajouter des troubles de discrimination spatiale impliquant la fonction de séparation de patterns. Cependant comme pour les autres performances cognitives, l'évaluation de cette fonction chez les patients atteints pourrait s'avérer difficile, car le nombre de cas étudié est rare.

Nous avons également choisi d'analyser les effets de l'enrichissement sur les performances cognitives des souris *Rsk2*-KO en association avec la neurogenèse adulte hippocampique *via* l'analyse du nombre de nouvelles cellules générées et de leur maturation. Au vu de nos résultats, il semblerait que la neurogenèse adulte ne soit pas la forme de plasticité principalement impliquée dans les déficits cognitifs observés chez notre modèle de SCL. Cependant, notre étude s'est limitée à l'étude de la neurogenèse adulte dans l'hippocampe dorsal, car il a été montré qu'il était impliqué dans l'apprentissage spatial (Moser et Moser, 1998). Il serait intéressant d'analyser également l'hippocampe ventral qui a été montré comme étant impliqué dans les mécanismes émotionnels et l'anxiété (Moser et Moser, 1998). En effet, même si l'hippocampe ne montre pas clairement de discontinuité, il s'agit d'une structure montrant des caractéristiques fonctionnelles différentes en fonction de la zone étudiée. Dans le cadre de la neurogenèse adulte notamment, Snyder *et al* (2012) ont montré que la maturation neuronale était plus lente dans le gyrus denté ventral par rapport au dorsal. En se basant sur cette étude et notre hypothèse selon laquelle notre modèle présenterait une sensibilité particulière au stress, il est possible d'envisager que le fonctionnement de la neurogenèse adulte dans l'hippocampe ventral soit différent du gyrus denté dorsal. Il serait donc intéressant d'étendre les analyses effectuées sur l'hippocampe dorsal à l'hippocampe ventral.

Chez ce modèle murin, d'autres pistes restent aussi à explorer. En effet, des analyses électrophysiologiques et biochimiques ont permis de mettre en évidence un déficit de la transmission synaptique et de l'excitabilité dans le gyrus denté. À l'aide de la microscopie électronique, il a également été montré que les souris *Rsk2*-KO présentaient des anomalies des épines dendritiques (Morice *et al*, 2013). Cette étude effectuée au laboratoire montre clairement qu'au sein de l'hippocampe d'autres mécanismes de plasticité sont affectés chez

notre modèle et pourraient tout aussi bien être impliqués de façon synergique dans les déficits cognitifs du SCL.

Dans les deux tâches comportementales utilisées, suite à l'enrichissement nous avons observé une amélioration des performances, souvent accompagnée d'une augmentation de la neurogenèse adulte. Ces résultats nous permettent d'avancer l'hypothèse selon laquelle l'une des voies d'amélioration des performances cognitives des souris *Rsk2*-KO impliquerait la neurogenèse adulte hippocampique. Sachant que les nouveaux neurones du gyrus denté sont impliqués dans les fonctions de séparation de patterns, les données montrant que l'enrichissement améliore les performances en séparation de patterns viennent à l'appui de cette hypothèse. Cependant, il est important de garder à l'esprit que l'enrichissement peut avoir un champ d'action très large. En effet, il a été montré que l'enrichissement environnemental était capable d'agir à différents niveaux, par exemple en modulant l'arborisation des neurones, l'expression de protéines synaptiques ou encore en modifiant la sécrétion de certains facteurs de croissance (pour revue, voir Nithianantharajah et Hannan, 2006 ; Pang et Hannan, 2013). Il n'est pas toujours facile d'établir une relation directe entre l'action de l'enrichissement sur les fonctions cognitives et les modifications de la neurogenèse adulte hippocampique et/ou d'autres mécanismes neurobiologiques qui pourraient expliquer les effets cognitifs de l'enrichissement. Pour examiner précisément la contribution de la neurogenèse hippocampique aux effets facilitateurs de la mémoire chez les souris *Rsk2*-KO il serait nécessaire de bloquer la neurogenèse spécifiquement pendant l'enrichissement.

Quelques soient les mécanismes impliqués, l'enrichissement permet de compenser au moins en partie les déficits mnésiques et donc présente une voie intéressante pour évaluer chez les patients les effets de procédures telles que la stimulation cognitive.

Les travaux de cette thèse ont porté sur l'étude de modèle murin du SCL n'exprimant pas la protéine RSK2. Chez l'Homme, la protéine est présente sous une forme non fonctionnelle ou tronquée en fonction des mutations. Malgré cette différence et les éventuels phénomènes de compensation pouvant avoir lieu, ce modèle nous a permis d'accroître certaines connaissances sur le rôle de la protéine RSK2 et sur son implication dans la neurogenèse hippocampique adulte. Cependant le parallèle avec l'homme est difficile à établir car chez l'homme la neurogenèse adulte hippocampique reste peu étudiée (Eriksson *et al*, 1998 ; pour revue, Curtis *et al*, 2011). Même s'il existe des preuves de l'existence d'une

forme de neurogenèse adulte hippocampique chez l'homme, peu de choses sont connues sur son rôle.

Enfin, ces travaux montrent également que l'enrichissement est un paradigme intéressant pour améliorer les déficits cognitifs dans la maladie et ce même s'il est pratiqué pendant une période de temps relativement courte. Ces résultats sont en accord avec ce qui a été observé au niveau des stimulations cognitives chez l'homme. En effet, il a été rapporté notamment dans le cadre de la maladie d'Alzheimer que lorsque que les patients atteints passent des périodes de temps en groupes au lieu de rester seuls isolés, ils montrent une diminution de la détérioration de leurs symptômes ainsi qu'une amélioration dans certains cas de leurs performances cognitives. Dans le cadre du SCL, nos résultats chez le modèle souris montrent que l'enrichissement environnemental est capable de compenser des déficits résultant de l'altération de la protéine RSK2. Il semblerait donc intéressant d'utiliser des techniques de stimulation cognitive des patients atteints afin de tenter d'améliorer leurs performances cognitives.

## RÉFÉRENCE BIBLIOGRAPHIQUES

- Aasebø, I. E. J., Blankvoort, S., & Tashiro, A. (2011). Critical maturational period of new neurons in adult dentate gyrus for their involvement in memory formation. *The European journal of neuroscience*, 33(6):1094–100.
- Abel, T., & Zukin, R. S. (2008). Epigenetic targets of HDAC inhibition in neurodegenerative and psychiatric disorders. *Current opinion in pharmacology*, 8(1):57–64.
- Abidi, F., Jacquot, S., Lassiter, C., Trivier, E., Hanauer, A., & Schwartz, C. E. (1999). Novel mutations in Rsk-2, the gene for Coffin-Lowry syndrome (CLS). *European journal of human genetics : EJHG*, 7(1):20–6.
- Abrous, D. N., Koehl, M., & Le Moal, M. (2005). Adult neurogenesis: from precursors to network and physiology. *Physiological reviews*, 85(2):523–69.
- Alarcón, J. M., Malleret, G., Touzani, K., Vronskaya, S., Ishii, S., Kandel, E. R., & Barco, A. (2004). Chromatin acetylation, memory, and LTP are impaired in CBP+/- mice: a model for the cognitive deficit in Rubinstein-Taybi syndrome and its amelioration. *Neuron*, 42(6):947–59.
- Altman, J. (1962). Are New Neurons Formed in the Brains of Adult Mammals? *Science*, 135(3509):1127–1128.
- Altman, J. (1963). Autoradiographic Investigation of Cell Proliferation in the Brains of Rats and Cats. *The anatomical record*, 145(4).
- Altman, J., & Das, G. D. (1965). Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *The Journal of comparative neurology*, 124(3):319–35.
- Ambrogini, P., Cuppini, R., Cuppini, C., Ciaroni, S., Cecchini, T., Ferri, P., Sartini, S., & Del Grande, P. (2000). Spatial learning affects immature granule cell survival in adult rat dentate gyrus. *Neuroscience letters*, 286(1):21–4.
- American Psychiatric Association. (2013) Diagnostic and Statistical Manual of Mental disorders, fifth edition. *American Psychiatric Publishing*, Book.
- Ammar, M-R., Humeau, Y., Hanauer, A., Nieswandt, B., Bader, M.-F., & Vitale, N. (2013). The Coffin-Lowry Syndrome-Associated Protein RSK2 Regulates Neurite Outgrowth through Phosphorylation of Phospholipase D1 (PLD1) and Synthesis of Phosphatidic Acid. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 33(50):19470–9.
- Anjum, R., Roux, P. P., Ballif, B. A., Gygi, S. P., & Blenis, J. (2005). The tumor suppressor DAP kinase is a target of RSK-mediated survival signaling. *Current biology : CB*, 15(19):1762–7.
- Arruda-Carvalho, M., Sakaguchi, M., Akers, K. G., Josselyn, S. A., & Frankland, P. W. (2011). Posttraining ablation of adult-generated neurons degrades previously acquired memories. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 31(42):15113–27.

- Aztiria, E., Capodiecì, G., Arancio, L., & Leanza, G. (2007). Extensive training in a maze task reduces neurogenesis in the adult rat dentate gyrus probably as a result of stress. *Neuroscience letters*, 416(2):133–7.
- Bain, M. J., Dwyer, S. M., & Rusak, B. (2004). Restraint stress affects hippocampal cell proliferation differently in rats and mice. *Neuroscience letters*, 368(1):7–10.
- Barco, A. (2007). The Rubinstein-Taybi syndrome: modeling mental impairment in the mouse. *Genes, brain, and behavior*, 6 Suppl 1:32–9.
- Bekinschtein, P., Oomen, C. A., Saksida, L. M., & Bussey, T. J. (2011). Effects of environmental enrichment and voluntary exercise on neurogenesis, learning and memory, and pattern separation: BDNF as a critical variable? *Seminars in cell & developmental biology*, 22(5):536–42.
- Ben Abdallah, N. M.-B., Slomianka, L., Vyssotski, A. L., & Lipp, H.-P. (2010). Early age-related changes in adult hippocampal neurogenesis in C57 mice. *Neurobiology of aging*, 31(1): 151–61.
- Bennett, J. C., McRae, P. A., Levy, L. J., & Frick, K. M. (2006). Long-term continuous, but not daily, environmental enrichment reduces spatial memory decline in aged male mice. *Neurobiology of learning and memory*, 85(2):139–52.
- Belichenko, P. V., & Kleschevnikov, A. M. (2011). Deficiency of Adult Neurogenesis in the Ts65Dn Mouse Model of Down Syndrome. *Genetics and Etiology of Down Syndrome*.
- Bonaguidi, M. A., Song, J., Ming, G. L., & Song, H. (2012). A unifying hypothesis on mammalian neural stem cell properties in the adult hippocampus. *Current opinion in neurobiology*, 22(5):754–61.
- Bruel-Jungerman, E., Davis, S., Rampon, C., & Laroche, S. (2006). Long-term potentiation enhances neurogenesis in the adult dentate gyrus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 26(22):5888–93.
- Bruel-Jungerman, E., Laroche, S., & Rampon, C. (2005). New neurons in the dentate gyrus are involved in the expression of enhanced long-term memory following environmental enrichment. *The European journal of neuroscience*, 21(2):513–21.
- Bruel-Jungerman, E., Veyrac A., Dufour, F., Horwood, J., Laroche, S., & Davis, S. (2009). Inhibition of PI3K-Akt signaling blocks exercise-mediated enhancement of adult neurogenesis and synaptic plasticity in the dentate gyrus. *PloS one*, 4(11):e7901.
- Cargnello, M., & Roux, P. P. (2011). Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 75(1):50–83.
- Chen, R. H., Abate, C., & Blenis, J. (1993). Phosphorylation of the c-Fos transrepression domain by mitogen-activated protein kinase and 90-kDa ribosomal S6 kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(23):10952–6.
- Chiurazzi, P., Schwartz, C. E., Gecz, J., & Neri, G. (2008). XLMR genes: update 2007. *European journal of human genetics : EJHG*, 16(4):422–34.

- Cho, Y., He, Z., & Zhang, Y. (2005). The p53 Protein Is a Novel Substrate of Ribosomal S6 Kinase 2 and a Critical Intermediary for Ribosomal S6 Kinase 2 and Histone H3 Interaction, *Cancer Research*, 65(9):3596-603.
- Cho, Y. Y., Yao, K., Kim, H. G., Kang, B. S., Zheng, D., Bode, A. M., & Dong, Z. (2007). Ribosomal S6 kinase 2 is a key regulator in tumor promoter induced cell transformation. *Cancer Research*, 67(17):8104-12.
- Choi, Y. S., Karelina, K., Alzate-Correa, D., Hoyt, K. R., Impey, S., Arthur, J. S., & Obrietan, K. (2012). Mitogen- and stress-activated kinases regulate progenitor cell proliferation and neuron development in the adult dentate gyrus. *Journal of neurochemistry*, 123(5):676-88
- Clark, D. E., Errington, T. M., Smith, J. A., Frierson, H. F. Jr., Weber, M. J., & Lannigan, D. A. (2005). The serine/threonine protein kinase, p90 ribosomal S6 kinase, is an important regulator of prostate cancer cell proliferation. *Cancer research*, 65(8):3108-16.
- Clark, C. J., McDade, D. M., O'Shaughnessy, C. T., & Morris, B. J. (2007). Contrasting roles of neuronal Msk1 and Rsk2 in Bad phosphorylation and feedback regulation of Erk signalling. *Journal of neurochemistry*, 102(4):1024–34.
- Clelland, C. D., Choi, M., Romberg, C., Clemenson, G. D., Fragniere, A., Tyers, P., Jessberger, S., Saksida, L.M., Barker, R.A., Gage, F.H. & Bussey, T. J. (2009). A functional role for adult hippocampal neurogenesis in spatial pattern separation. *Science (New York, N.Y.)*, 325(5937):210–3.
- Creer, D. J., Romberg, C., Saksida, L. M., van Praag, H., & Bussey, T. J. (2010). Running enhances spatial pattern separation in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(5):2367–72.
- Czéh, B., Müller-Keuker, J. I., Rygula, R., Abumaria, N., Hiemke, C., Domenici, E., & Fuchs, E. (2007). Chronic Social Stress Inhibits Cell Proliferation in the Adult Medial Prefrontal Cortex: Hemispheric Asymmetry and Reversal by Fluoxetine Treatment. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 32(7):1490-503.
- Dalby, K. N. (1998). Identification of Regulatory Phosphorylation Sites in Mitogen-activated Protein Kinase (MAPK)-activated Protein Kinase-1a/p90rsk That Are Inducible by MAPK. *Journal of Biological Chemistry*, 273(3):1496–1505.
- Darcq, E., Befort, K., Koebel, P., Pannetier, S., Mahoney, M. K., Gaveriaux-Ruff, C., Hanauer, A., & Kieffer, B. L. (2012). RSK2 signaling in medial habenula contributes to acute morphine analgesia. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 37(5):1288–96.
- Darcq, E., Koebel, P., Boca, C. Del, Pannetier, S., Befort, K., Kieffer, B. L., & Garnier, J. (2011). RSK2 signaling in brain habenula contributes to place aversion learning. *Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, 18(9):574-8.
- Davis, S., Renaudineau, S., Poirier, R., Poucet, B., Save, E., & Laroche, S. (2010). The formation and stability of recognition memory: what happens upon recall? *Frontiers in behavioral neuroscience*, 4:177.

- De Cesare, D., Jacquot, S., Hanauer, A., & Sassone-Corsi, P. (1998). Rsk-2 activity is necessary for epidermal growth factor-induced phosphorylation of CREB protein and transcription of c-fos gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(21):12202–7.
- Döbrössy, M. D., Drapeau, E., Aurousseau, C., Le Moal, M., Piazza, P. V., & Abrous, D. N. (2003). Differential effects of learning on neurogenesis: learning increases or decreases the number of newly born cells depending on their birth date. *Molecular psychiatry*, 8(12):974–82.
- Driscoll, I., Howard, S. R., Stone, J. C., Monfils, M. H., Tomanek, B., Brooks, W. M., & Sutherland, R. J. (2006). The aging hippocampus: a multi-level analysis in the rat. *Neuroscience*, 139(4):1173–85.
- Duan, X., Kang, E., Liu, C. Y., Ming, G.-L., & Song, H. (2008). Development of neural stem cell in the adult brain. *Current opinion in neurobiology*, 18(1):108–15.
- Dufresne, S. D., Bjørbæk, C., El-haschimi, K., Zhao, Y. I., Aschenbach, W. G., Moller, D. E., & Goodyear, L. J. (2001). Altered Extracellular Signal-Regulated Kinase Signaling and Glycogen Metabolism in Skeletal Muscle from p90 Ribosomal S6 Kinase 2 Knockout Mice. *Society*, 21(1):81–87.
- Dugani, C. B., Paquin, A., Kaplan, D. R., & Miller, F. D. (2010). Coffin-Lowry syndrome: A role for RSK2 in mammalian neurogenesis. *Developmental biology*, 347(2):358–59.
- Dümmmler, B.A., Hauge, C., Silber, J., Yntema, H. G., Kruse, L. S., Kofoed, B., Hemmings, B. A., Alessi, D. R., & Frödin, M. (2005). Functional Characterization of Human RSK4, a New 90-kDa Ribosomal S6 Kinase, Reveals Constitutive Activation in Most Cell Types. *J Biol Chem*, 280(14):13304–14.
- Dupret, D., Fabre, A., Döbrössy, M. D., Panatier, A., Rodríguez, J. J., Lamarque, S., Lemaire, V., Olié, S. H., Piazza PV., & Abrous, D. N. (2007). Spatial learning depends on both the addition and removal of new hippocampal neurons. *PLoS biology*, 5(8):e214.
- Dupret, D., & Abrous D. N. (2010) [A new chapter in the field of memory: hippocampal neurogenesis]. *Biologie aujourd'hui*, (2):113–29.
- Ehninger, D., & Kempermann, G. (2006). Paradoxical effects of learning the Morris water maze on adult hippocampal neurogenesis in mice may be explained by a combination of stress and physical activity. *Genes, brain, and behavior*, 5(1):29–39.
- El-haschimi, K., Dufresne, S. D., Hirshman, M. F., Flier, J. S., Goodyear, L. J., & Bjørbæk, C. (2003). Insulin Resistance and Lipodystrophy in Mice Lacking Ribosomal S6 Kinase 2. *Diabetes*, 52(6):1340–6.
- Ellison, J. W., Rosenfeld, J. A., & Shaffer, L. G. (2013). Genetic basis of intellectual disability. *Annual review of medicine*, 64, 441–50.
- Epp, J. R., Spritzer, M. D., & Galea, L. A. (2007). Hippocampus-dependent learning promotes survival of new neurons in the dentate gyrus at a specific time during cell maturation. *Neuroscience*, 149(2):273–85.

- Epp, Jonathan, R., Chow, C., & Galea, L. A. (2013). Hippocampus-dependent learning influences hippocampal neurogenesis. *Frontiers in Neuroscience*, 7(4):1–9.
- Eriksson, P. S., Perfilieva, E., Björk-Eriksson, T., Alborn, A. M., Nordborg, C., Peterson, D. A., & Gage F. H.(1998). Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nature medicine*, 4(11):1313-7
- Fabel, K., Wolf, S. A., Ehninger, D., Babu, H., Leal-Galicia, P., & Kempermann, G. (2009). Additive effects of physical exercise and environmental enrichment on adult hippocampal neurogenesis in mice. *Frontiers in neuroscience*, 3(11):50.
- Fan, Y., Liu, Z., Weinstein, P. R., Fike, J. R., & Liu, J. (2007). Environmental enrichment enhances neurogenesis and improves functional outcome after cranial irradiation. *The European journal of neuroscience*, 25(1):38–46.
- Fanselow, M. S., & Dong, H. W. (2010) Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures? *Neuron*, Jan 14;65(1):7-19
- Farioli-Vecchioli, S., Saraulli, D., Costanzi, M., Leonardi, L., Cinà, I., Micheli, L., Nutini, M., Longone, P., Oh, S.P., Cestari, V., & Tirone, F. (2009). Impaired terminal differentiation of hippocampal granule neurons and defective contextual memory in PC3/Tis21 knockout mice. *PloS one*, 4(12):e8339.
- Farioli-Vecchioli, S., Saraulli, D., Costanzi, M., Pacioni, S., Cinà, I., Aceti, M., Micheli, L., Bacci, A., Cestari, V., & Tirone, F. (2008). The timing of differentiation of adult hippocampal neurons is crucial for spatial memory. *PLoS biology*, 6(10):e246.
- Ferragud, A., Haro, A., Sylvain, A., Velázquez-Sánchez, C., Hernández-Rabaza, V., & Canales, J. J. (2010). Enhanced habit-based learning and decreased neurogenesis in the adult hippocampus in a murine model of chronic social stress. *Behavioural brain research*, 210(1):134–9.
- Fisher, T. L., & Blenis, J. (1996). Evidence for Two Catalytically Active Kinase Domains in pp90 rsk. *Molecular and cellular biology*, 16(3):1212–1219.
- Franklin, K. B. J., & Paxinos, G. (1997). The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates. *Academic Press*.
- Frick, K. M., & Fernandez, S. M. (2003). Enrichment enhances spatial memory and increases synaptophysin levels in aged female mice. *Neurobiology of aging*, 24(4):615–26.
- Fujita, N., Sato, S., & Tsuruo, T. (2003). Phosphorylation of p27Kip1 at threonine 198 by p90 ribosomal protein S6 kinases promotes its binding to 14-3-3 and cytoplasmic localization. *The Journal of biological chemistry*, 278(49):49254–60.
- Gage, F. H. (2000). Mammalian Neural Stem Cells. *Science*, 287(5457):1433–1438.
- Garthe, A., Behr, J., & Kempermann, G. (2009). Adult-generated hippocampal neurons allow the flexible use of spatially precise learning strategies. *PloS one*, 4(5):e5464.
- Ge, S., Yang, C.-H., Hsu, K.-S., Ming, G.-L., & Song, H. (2007). A critical period for enhanced synaptic plasticity in newly generated neurons of the adult brain. *Neuron*, 54(4):559–66.



- Georg, H., & Gage, F. H. (1996). Neurogenesis in the Dentate Gyrus of the Adult Decrease of Neuronal Progenitor Proliferation Rat : Age-Related, 76(6):2027–2033.
- Gould, E., Beylin, A., Tanapat, P., Reeves, A., & Shors, T. J. (1999). Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation. *Nature neuroscience*, 2(3):260–5.
- Gould, E. (2007). How widespread is adult neurogenesis in mammals? *Nature reviews. Neuroscience*, 8(6):481–8.
- Gross, C. G. (2000). Neurogenesis in the adult brain: death of a dogma. *Nature reviews. Neuroscience*, 1(1):67–73.
- Groves, J. O., Leslie, I., Huang, G.-J., McHugh, S. B., Taylor, A., Mott, R., Munafò, M., Bannerman, D. M., & Flint, J. (2013). Ablating adult neurogenesis in the rat has no effect on spatial processing: evidence from a novel pharmacogenetic model. *PLoS genetics*, 9(9):e1003718.
- Gu, Y., Arruda-Carvalho, M., Wang, J., Janoschka, S. R., Josselyn, S. A., Frankland, P. W., & Ge, S. (2012). Optical controlling reveals time-dependent roles for adult-born dentate granule cells. *Nature Neuroscience*, 15(12):1700–6.
- Guimiot, F., Delezoide, A.-L., Hanauer, A., & Simonneau, M. (2004). Expression of the RSK2 gene during early human development. *Gene Expression Patterns*, 4(1):111–114.
- Guo, W., Allan, A. M., Zong, R., Zhang, L., Johnson, E. B., Schaller, E. G., Murthy, A. C., Goggin, S. L., Eisch, A. J., Oostra, B. A., Nelson, D. L., Jin, P., & Zhao, X. (2011). Ablation of Fmrp in adult neural stem cells disrupts hippocampus-dependent learning. *Nature medicine*. 17(5):559–65.
- Hahn, J. S., & Hanauer, A. (2012). Stimulus-induced drop episodes in Coffin-Lowry syndrome. *European journal of medical genetics*, (April):110–112.
- Hairston, I. S., Little, M. T. M., Scanlon, M. D., Barakat, M. T., Palmer, T. D., Sapolsky, R. M., & Heller, S. C. (2005). Sleep Restriction Suppresses Neurogenesis Induced by Hippocampus-Dependent Learning. *Journal of neurophysiology*, 94(6):4224–33.
- Hanauer, A., & Young, I. D. (2002). Coffin-Lowry syndrome: clinical and molecular features. *Journal of medical genetics*, 39(10):705–13.
- Harburger, L. L., Lambert, T. J., & Frick, K. M. (2007). Age-dependent effects of environmental enrichment on spatial reference memory in male mice. *Behavioural brain research*, 185(1):43–8.
- Hauge, C., & Frödin, M. (2006). RSK and MSK in MAP kinase signalling. *Journal of cell science*, 119(Pt 15):3021–3.
- Heine, V. M., Maslam, S., Joëls, M., & Lucassen, P. J. (2004). Prominent decline of newborn cell proliferation, differentiation, and apoptosis in the aging dentate gyrus, in absence of an age-related hypothalamus-pituitary-adrenal axis activation. *Neurobiology of aging*, 25(3):361–75.
- Hernández-Rabaza, V., Llorens-Martín, M., Velázquez-Sánchez, C., Ferragud, A., Arcusa, A., Gumus, H. G., Gómez-Pinedo, U., Pérez-Villalba, A., Roselló, J., Trejo J. L., Barcia, J. A., &

- Canales, J. J. (2009). Inhibition of adult hippocampal neurogenesis disrupts contextual learning but spares spatial working memory, long-term conditional rule retention and spatial reversal. *Neuroscience*, 159(1):59-68.
- Hewitt, C. A., Ling, K. H., Merson, T. D., Simpson, K. M., Ritchie, M. E., King, S. L., Pritchard, M. A., Smyth, G. K., Thomas, T., Scott, H. S., & Voss, A. K. (2010) Gene network disruptions and neurogenesis defects in the adult Ts1Cje mouse model of Down syndrome. *PLoS One* 5(7):e11561.
- Hunter, A. G. W. (2002). Coffin-Lowry syndrome: a 20-year follow-up and review of long-term outcomes. *American journal of medical genetics*, 111(4):345-55.
- Imayoshi, I., Sakamoto, M., Ohtsuka, T., Takao, K., Miyakawa, T., Yamaguchi, M., Mori, K., Ikeda, T., Itohara, S., & Kageyama, R. (2008). Roles of continuous neurogenesis in the structural and functional integrity of the adult forebrain. *Nature neuroscience*, 11(10):1153-61
- Ishihara, K., Amano, K., Takaki, E., Shimohata, A., Sago, H., Epstein, C. J., & Yamakawa K. (2010). Enlarged brain ventricles and impaired neurogenesis in the Ts1Cje and Ts2Cje mouse models of Down syndrome. *Cerebral cortex*, 20(5):1131-43.
- Iso, H., Simoda, S., & Matsuyama, T. (2007). Environmental change during postnatal development alters behaviour, cognitions and neurogenesis of mice. *Behavioural brain research*, 179(1):90-8.
- Iwata, Y., Suzuki, K., Wakuda, T., Seki, N., Thanseem, I., Matsuzaki, H., Mamiya, T., Ueki, T., Mikawa, S., Sasaki, T., Suda, S., Yamamoto, S., Tsuchiya, K. J., Sugihara, G., Nakamura, K., Sato, K., Takei, N., Hashimoto, K., & Mori, N. (2008). Irradiation in adulthood as a new model of schizophrenia. *PloS one*, 3(5):e2283.
- Jaholkowski, P., Kiryk, A., Jedynak, P., Ben Abdallah, N. M., Knapska, E., Kowalczyk, A., Piechal, A., Blecharz-Klin, K., Figiel, I., Lioudyno, V., Widy-Tyszkiewicz, E., Wilczynski, G. M., Lipp, H. P., Kaczmarek, L., & Filipkowski, R. K. (2009). New hippocampal neurons are not obligatory for memory formation; cyclin D2 knockout mice with no adult brain neurogenesis show learning. *Learning & memory*, 16(7):439-51
- Jensen, C. J., Buch, M.B., Krag, T. O., Hemmings, B. A., Gammeltoft, S., & Frödin M. (1999). 90-kDa Ribosomal S6 Kinase Is Phosphorylated and Activated by 3-Phosphoinositide-dependent Protein Kinase-1. *Journal of Biological Chemistry*, 274(38):27168-27176.
- Jones, S. W., Eriksont, E., Blenis, J., Mallert, J. L., & Erikson, R. L. (1988). A Xenopus ribosomal protein S6 kinase has two apparent kinase domains that are each similar to distinct protein kinases, 85(5):3377-3381.
- Jurkiewicz, D., Jezela-Stanek, A., Ciara, E., Piekutowska-Abramczuk, D., Kugaud, M., Gajdulewicz, M., Chrzanowska, K., Popowska, E., & Krajewska-Walasek, M. (2010). Four novel RSK2 mutations in females with Coffin-Lowry syndrome. *European journal of medical genetics*, 53, 268-273.
- Kannangara, T. S., Eadie, B. D., Bostrom, C. A., Morch, K., Brocardo, P. S., & Christie, B. R., (2014). GluN2A-/- Mice Lack Bidirectional Synaptic Plasticity in the Dentate Gyrus and Perform Poorly on Spatial Pattern Separation Tasks. *Cereb Cortex*.

- Kee, N., Teixeira, C. M., Wang, A. H., & Frankland, P. W. (2007). Preferential incorporation of adult-generated granule cells into spatial memory networks in the dentate gyrus. *Nature neuroscience*, 10(3):355–62.
- Kempermann, G., Kuhn, H. G., & Gage, F. H. (1997). More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature*, 386(6624):493–5.
- Kempermann, G., Brandon, E. P., & Gage, F. H. (1998). Environmental stimulation of 129/SvJ mice causes increased cell proliferation and neurogenesis in the adult dentate gyrus. *Current biology : CB*, 8(16):939–42.
- Kempermann, G., Jessberger, S., Steiner, B., & Kronenberg, G. (2004). Milestones of neuronal development in the adult hippocampus. *Trends in neurosciences*, 27(8):447–52.
- Kesler, S. R., Simensen, R. J., Voeller, K., Abidi, F., Stevenson, R. E., Schwartz, C. E., & Reiss, A. L. (2007). Altered neurodevelopment associated with mutations of RSK2: a morphometric MRI study of Coffin-Lowry syndrome. *Neurogenetics*, 8(2):143–7.
- Kintner, C. (2002). Neurogenesis in embryos and in adult neural stem cells. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 22(3):639–43.
- Kishi, N., & Macklis, J. D. (2004). MECP2 is progressively expressed in post-migratory neurons and is involved in neuronal maturation rather than cell fate decisions. *Molecular and cellular neurosciences*, 27(3):306–21.
- Kohn, M., Hameister, H., Vogel, M., & Kehrer-Sawatzki, H. (2003). Expression pattern of the Rsk2, Rsk4 and Pdk1 genes during murine embryogenesis. *Gene Expression Patterns*, 3(2):173–177.
- Kondoh, T., Matsumoto, T., Ochi, M., Sukegawa, K., & Tsuji, Y. (1998). New radiological finding by magnetic resonance imaging examination of the brain in Coffin-Lowry syndrome. *Journal of human genetics*, 43(1):59–61.
- Kronenberg, G., Reuter, K., Steiner, B., Brandt, M. D., Jessberger, S., Yamaguchi, M., & Kempermann, G. (2003). Subpopulations of proliferating cells of the adult hippocampus respond differently to physiologic neurogenic stimuli. *The Journal of comparative neurology*, 467(4), 455–63.
- Lafenetre, P., Leske, O., Wahle, P., & Heumann, R. (2011). The beneficial effects of physical activity on impaired adult neurogenesis and cognitive performance. *Frontiers in neuroscience*, 5(4):5:51.
- Lagace, D. C., Donovan, M. H., DeCarolis, N. A., Farnbauch, L. A., Malhotra, S., Berton, O., Nestler, E. J., Krishnana, V., & Eisch, A. J. (2010). Adult hippocampal neurogenesis is functionally important for stress-induced social avoidance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(9):4436–41.
- Lazarov, O., Demars, M. P., Zhao, K. D. T., Ali, H. M., Grauzas, V., Kney, A., & Larson, J. (2012). Impaired survival of neural progenitor cells in dentate gyrus of adult mice lacking FMRP. *Hippocampus*, 22(6):1220–4.
- Lee, S. W., Clemenson, G. D., & Gage, F. H. (2012). New neurons in an aged brain. *Behavioural brain research*, 227(2):497–507.

- Leuner, B., Mendolia-Loffredo, S., Kozorovitskiy, Y., Samburg, D., Gould, E., & Shors, T. J. (2004). Learning enhances the survival of new neurons beyond the time when the hippocampus is required for memory. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 24(34):7477–81.
- Leuner, B., Waddell, J., Gould, E., & Shors, T. J. (2006). Temporal discontinuity is neither necessary nor sufficient for learning-induced effects on adult neurogenesis. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 26(52):13437–42.
- Leuner, B., Glasper, E. R., & Gould, E. (2009). Thymidine analog methods for studies of adult neurogenesis are not equally sensitive. *The Journal of comparative neurology*, 517(2):123–33.
- Llorens-Martín, M., Tejeda, G. S., & Trejo, J. L. (2010). Differential regulation of the variations induced by environmental richness in adult neurogenesis as a function of time: a dual birthdating analysis. *PloS one*, 5(8):e12188.
- Lipp, H. P., & Wolfer, D. P. (1998). Genetically modified mice and cognition lipp. *Current opinion in neurobiology*, 8(2):272–80.
- Lonetti, G., Angelucci, A., Morando, L., Boggio, E. M., Giustetto, M., & Pizzorusso, T. (2010). Early environmental enrichment moderates the behavioral and synaptic phenotype of MeCP2 null mice. *Biological psychiatry*, 67(7):657–65.
- Lopez-Atalaya, J. P., Ciccarelli, A., Viosca, J., Valor, L. M., Jimenez-Minchan, M., Canals, S., Giustetto, M., & Barco, A. (2011). CBP is required for environmental enrichment-induced neurogenesis and cognitive enhancement. *European Molecular Biology Organization*, 30(20):4287–98.
- Lubs, H. A., Stevenson, R. E., & Schwartz, C. E. (2012). Fragile X and X-linked intellectual disability: four decades of discovery. *American journal of human genetics*, 90(4):579–90.
- Luo, Y., Shan, G., Guo, W., Smrt, R. D., Johnson, E. B., Li, X., Pfeiffer, R. L., Szulwach, K. E., Duan, R., Barkho, B. Z., Li, W., Liu, C., Jin, P., & Zhao, X. (2010). Fragile x mental retardation protein regulates proliferation and differentiation of adult neural stem/progenitor cells. *PLoS genetics*, 6(4):e1000898.
- Madroñal, N., López-Aracil, C., Rangel, A., Del Río, J. A., Delgado-García, J. M., & Gruart, A. (2010). Effects of enriched physical and social environments on motor performance, associative learning, and hippocampal neurogenesis in mice. *PloS one*, 5(6):e11130.
- Madsen, T. M., Kristjansen, P. E., Bolwig, T. G., & Wörtwein, G. (2003). Arrested neuronal proliferation and impaired hippocampal function following fractionated brain irradiation in the adult rat. *Neuroscience*, 119(3):635–42.
- Mandyam, C. D., Harburg, G. C., & Eisch, A. J. (2007). Determination of key aspects of precursor cell proliferation, cell cycle length and kinetics in the adult mouse subgranular zone. *Neuroscience*, 146(1):108–22.
- Manouvrier-Hanu, S., Amiel, J., Jacquot, S., Merienne, K., Moerman, A., Coëslie, a., Labarriere, F., Vallée, L., Croquette, M. F., & Hanauer, A. (1999). Unreported RSK2 missense mutation in two male sibs with an unusually mild form of Coffin-Lowry syndrome. *Journal of medical genetics*, 36(10):775–8.

- Marín-Burgin, A., & Schinder, A. F. (2012). Requirement of adult-born neurons for hippocampus-dependent learning. *Behavioural brain research*, 227(2):391–9.
- Martinez-Canabal, A., Akers, K. G., Josselyn, S. A., & Frankland, P. W. (2012). Age-dependent effects of hippocampal neurogenesis suppression on spatial learning. *Hippocampus*, 23(1):66-74.
- Martínez-Cué, C., Baamonde, C., Lumberras, M., Paz, J., Davisson, M. T., Schmidt, C., Dierssen, M., & Flórez, J. (2002). Differential effects of environmental enrichment on behavior and learning of male and female Ts65Dn mice, a model for Down syndrome. *Behavioural brain research*, 134(1-2):185–200.
- Maulik, P. K., Mascarenhas, M. N., Mathers, C. D., Dua, T., & Saxena, S. (2011). Prevalence of intellectual disability: a meta-analysis of population-based studies. *Research in developmental disabilities*, 32(2):419–36.
- McHugh, T. J., Jones, M. W., Quinn, J. J., Balthasar, N., Coppari, R., Elmquist, J. K., Lowell, B. B., Fanselow, M. S., Wilson, M. A., & Tonegawa S. (2007) Dentate gyrus NMDA receptors mediate rapid pattern separation in the hippocampal network. *Science*, 6;317(5834).
- Meshi, D., Drew, M. R., Saxe, M., Ansorge, M. S., David, D., Santarelli, L., Malapani, C., Moore, H., & Hen, R. (2006). Hippocampal neurogenesis is not required for behavioral effects of environmental enrichment. *Nature Neuroscience*, 9(6):729–731.
- Ming, G.-L., & Song, H. (2011). Adult neurogenesis in the Mammalian brain: significant answers and significant questions. *Neuron*, 70(4):687–702.
- Mohapel, P., Mundt-Petersen, K., Brundin, P., & Frielingsdorf. (2006). Working memory training decreases hippocampal neurogenesis. *Neuroscience*, 142(3):609-13.
- Moretti, P., Levenson, J. M., Battaglia, F., Atkinson, R., Teague, R., Antalffy, B., Armstrong, D., Arancio, O., Sweatt, J.D., & Zoghbi, H. Y. (2006). Learning and memory and synaptic plasticity are impaired in a mouse model of Rett syndrome. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 26(1):319–27.
- Morice, E., Farley, S., Poirier, R., Dallerac, G., Chagneau, C., Pannetier, S., Hanauer, A., Davis, S., Vaillend, C., & Laroche, S. (2013). Defective synaptic transmission and structure in the dentate gyrus and selective fear memory impairment in the Rsk2 mutant mouse model of Coffin-Lowry syndrome. *Neurobiology of disease*, 58(10):156-68
- Moser, M. B., & Moser, E. I. (1998). Functional differentiation in the hippocampus. *Hippocampus*, 8(6):608–19.
- Mustafa, S., Walker, A., Bennett, G., & Wigmore P. M. (2008). 5-Fluorouracil chemotherapy affects spatial working memory and newborn neurons in the adult rat hippocampus. *The European journal of neuroscience*, 28(2):323-30.
- Nakamura, M., Yamagata, T., Mori, M., & Momoi, M. Y. (2005). RSK2 gene mutations in Coffin-Lowry syndrome with drop episodes. *Brain & development*, 27(2):114–7.
- Nakashiba, T., Cushman, J. D., Pelkey, K. A., Renaudineau, S., Buhl, D. L., McHugh, T. J., Rodriguez, Barrera, V., Chittajallu, R., Iwamoto, K. S., McBain, C. J., Fanselow, M.S., &

- Tonegawa, S. (2012). Young Dentate Granule Cells Mediate Pattern Separation, whereas Old Granule Cells Facilitate Pattern Completion. *Cell*, 149(1):188–201.
- Neunuebel, J. P., & Knierim, J. J. (2014). CA3 retrieves coherent representations from degraded input: direct evidence for CA3 pattern completion and dentate gyrus pattern separation. *Neuron*, 81(2):416–2
- Nilsson, M., Perfilieva, E., Johansson, U., Orwar, O., & Eriksson, P. S. (1999). Enriched environment increases neurogenesis in the adult rat dentate gyrus and improves spatial memory. *Journal of neurobiology*, 39(4):569–78.
- Nithianantharajah, J., & Hannan, A. J. (2006). Enriched environments, experience-dependent plasticity and disorders of the nervous system. *Nature reviews. Neuroscience*, 7(9):697–709.
- Oike, Y., Hata, A., Mamiya, T., Kaname, T., Noda, Y., Suzuki, M., Yasue, H., Nabeshima, T., Araki, K., & Yamamura, K. (1999). Truncated CBP protein leads to classical Rubinstein-Taybi syndrome phenotypes in mice: implications for a dominant-negative mechanism. *Human molecular genetics*, 8(3):387–96.
- Orphanet. (2006). Le syndrome de Rett. *Encyclopédie Orphanet Grand Public*, 1–8.
- Orphanet. (2007). Le syndrome de Coffin Lowry. *Encyclopédie Orphanet Grand Public*, 1–8.
- Orphanet. (2012). Le syndrome de L'X fragile. *Encyclopédie Orphanet Grand Public*, 1–20.
- Pang, T. Y., & Hannan, A. J. (2013). Enhancement of cognitive function in models of brain disease through environmental enrichment and physical activity. *Neuropharmacology*, 64:515–28.
- Partington, M. W., Mulley, J. C., Sutherland, G. R., Thode, A., & Turner, G. (1988). A family with the Coffin Lowry syndrome revisited: localization of CLS to Xp21-pter. *American journal of medical genetics*, 30(1-2):509–21
- Pereira, P. M., Schneider, A., Pannetier, S., Heron, D., & Hanauer, A. (2010). Coffin-Lowry syndrome. *European journal of human genetics : EJHG*, 18(6):627–33.
- Pham, K., Nacher, J., Hof, P. R., & McEwen, B. S. (2003). Repeated restraint stress suppresses neurogenesis and induces biphasic PSA-NCAM expression in the adult rat dentate gyrus. *European Journal of Neuroscience*, 17(4):879–886.
- Poirier, R., Jacquot, S., Vaillend, C., Southiphong, A. A., Libbey, M., Davis, S., Laroche, S., Hanauer, A., Welzl, H., Lipp, H. P., & Wolfer, D. P. (2007). Deletion of the Coffin-Lowry syndrome gene Rsk2 in mice is associated with impaired spatial learning and reduced control of exploratory behavior. *Behavior genetics*, 37(1):31–50.
- Pons-Espinal, M., De Lagran, M. M., & Dierssen, M. (2013). Functional implications of hippocampal adult neurogenesis in intellectual disabilities. *Amino acids*, 45(1):113–31.
- Prieur, F. (1995). Retard mental et syndrome de fragilit. <http://www.psycom.ch/>, 2, S50–S53.
- Raber, J., Rola, R., Lefevour, A., Morhardt, D., Curley, J., Mizumatsu, S., VandenBerg, S.R., & Fike, J. R. (2004). Radiation-Induced Cognitive Impairments are Associated with Changes in Indicators of Hippocampal Neurogenesis. *Radiation research society*, 162(1):39–47.

- Ramirez-Amaya, V., Marrone, D. F., Gage, F. H., Worley, P. F., & Barnes, C. A. (2006). Integration of new neurons into functional neural networks. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 26(47):12237–41.
- Rampon, C., Tang, Y. P., Goodhouse, J., Shimizu, E., Kyn, M., & Tsien, J. Z. (2000). Enrichment induces structural changes and recovery from nonspatial memory deficits in CA1 NMDAR1-knockout mice. *Nature neuroscience*, 3(3):238–44.
- Restivo, L., Ferrari, F., Passino, E., Sgobio, C., Bock, J., Oostra, B. A., Bagni, C., Ammassari-Teule, M. (2005). Enriched environment promotes behavioral and morphological recovery in a mouse model for the fragile X syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(32):11557–62.
- Romeo, Y., Zhang, X., & Roux, P. P. (2012). Regulation and function of the RSK family of protein kinases. *The Biochemical journal*, 441(2):553–69.
- Ropers, H.-H., & Hamel, B. C. J. (2005). X-linked mental retardation. *Nature reviews. Genetics*, 6(1):46–57.
- Rueda, N., Mostany, R., Pazos, A., Florez, J., & Martinez-Cue, C. (2005). Cell proliferation is reduced in the dentate gyrus of aged but not young Ts65Dn mice, a model of Down syndrome. *Neuroscience letters*, 380(1-2):197–201.
- Rueda, N., & Tejeda, G. S. (2010). Effects of voluntary physical exercise on adult hippocampal neurogenesis and behavior of ts65dn mice, a model of down syndrome. *Neuroscience*, 171(4):1228–1240.
- Sahay, A., Wilson, D. A., & Hen, R. (2011a). Pattern separation: a common function for new neurons in hippocampus and olfactory bulb. *Neuron*, 70(4):582–8.
- Sahay, A., Scobie, K. N., Hill, A. S., O'Carroll, C. M., Kheirbek, M. A., Burghardt, N. S., Fenton, A. A., Dranovsky, A. & Hen, R. (2011b). Increasing adult hippocampal neurogenesis is sufficient to improve pattern separation. *Nature*, 472(7344):466–70.
- Sale, A., Berardi, N., & Maffei, L. (2014). Environment and brain plasticity: towards an endogenous pharmacotherapy. *Physiological reviews*, 94(1):189–234.
- Sandoval, C. J., Martínez-Claros, M., Bello-Medina, P. C., Pérez, O., & Ramírez-Amaya, V. (2011). When are new hippocampal neurons, born in the adult brain, integrated into the network that processes spatial information? *PloS one*, 6(3):e17689.
- Sassone-Corsi, P., Mizzen, C. A., Cheung, P., Crosio, C., Monaco, L., Jacquot, S., Hanauer, A., & Allis, C. D. (1999). Requirement of Rsk-2 for Epidermal Growth Factor-Activated Phosphorylation of Histone H3. *Science*, 285(5429):886–891.
- Saxe, M. D., Battaglia, F., Wang, J.-W., Malleret, G., David, D. J., Monckton, J. E., Garcia, A. D., Sofroniew, M. V., Kandel, E. R., Santarelli, L., Hen, R., & Drew, M. R. (2006). Ablation of hippocampal neurogenesis impairs contextual fear conditioning and synaptic plasticity in the dentate gyrus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(46):17501–6.

- Schneider, A., Mehmood, T., Pannetier, S., & Hanauer, A. (2011). Altered ERK/MAPK signaling in the hippocampus of the *mrsk2\_KO* mouse model of Coffin-Lowry syndrome. *Journal of neurochemistry*, 119(3):447-59
- Schoenfeld, T. J., & Gould, E. (2012). Stress, stress hormones, and adult neurogenesis. *Experimental neurology*, 233(1):12-21.
- Shen, L., Nam, H. S., Song, P., Moore, H., & Anderson, S. A. (2006). FoxG1 haploinsufficiency results in impaired neurogenesis in the postnatal hippocampus and contextual memory deficits. *Hippocampus*, 16(10):875-90
- Shors, T. J., Miesegaes, G., Beylin, A., Zhao, M., Rydel, T., & Gould, E. (2001). Neurogenesis in the adult is involved in the formation of trace memories. *Nature*, 410(6826):372-6.
- Shors, T. J., Townsend, D. A., Zhao, M., Kozorovitskiy, Y., & Gould, E. (2002). Neurogenesis may relate to some but not all types of hippocampal-dependent learning. *Hippocampus*, 12(5):578-84.
- Sisti, H. M., Glass, A. L., & Shors, T. J. (2007). Neurogenesis and the spacing effect: learning over time enhances memory and the survival of new neurons. *Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, 14(5):368-75.
- Smith, J. A., Poteet-Smith, C. E., Xu, Y., Errington, T. M., Hecht, S. M., & Lannigan, D. a. (2005). Identification of the first specific inhibitor of p90 ribosomal S6 kinase (RSK) reveals an unexpected role for RSK in cancer cell proliferation. *Cancer research*, 65(3):1027-34.
- Smrt, R. D., Eaves-Egenes, J., Barkho, B. Z., Santistevan, N. J., Zhao, C., Aimone, J. B., Gage F. H., & Zhao, X. (2007). Mecp2 deficiency leads to delayed maturation and altered gene expression in hippocampal neurons. *Neurobiology of disease*, 27(1):77-89.
- Snyder, J. S., Hong, N. S., McDonald, R. J., & Wojtowicz, J. M. (2005). A role for adult neurogenesis in spatial long-term memory. *Neuroscience*, 130(4):843-52.
- Snyder, J. S., Choe, J. S., Clifford, M. A., Jeurling, S. I., Hurley, P., Brown, A., Kamhi, J. F., & Cameron, H. A. (2009a). Adult-born hippocampal neurons are more numerous, faster maturing, and more involved in behavior in rats than in mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 29(46):14484-95.
- Snyder, J. S., Glover, L. R., Sanzone, K. M., Kamhi, J. F., & Cameron, H. A. (2009b). The effects of exercise and stress on the survival and maturation of adult-generated granule cells. *Hippocampus*, 19(10):898-906.
- Snyder, J. S., Ferrante, S. C., & Cameron, H. A. (2012). Late maturation of adult-born neurons in the temporal dentate gyrus. *PloS one*, 7(11):e48757
- Soloaga, A., Thomson, S., Wiggin, G. R., Rampersaud, N., Dyson, M. H., Hazzalin, C. A., Mahadevan, L. C., & Arthur, J. S. C. (2003). MSK2 and MSK1 mediate the mitogen- and stress-induced phosphorylation of histone H3 and HMG-14. *The EMBO journal*, 22(11):2788-97.
- Spalding, K. L., Bergmann, O., Alkass, K., Bernard, S., Salehpour, M., Huttner, H. B., Boström, E., Westerlund, I., Vial, C., Buchholz, B. A., Possnert, G., Mash, D. C., Druid, H.,



- & Frisén, J. (2013). Dynamics of Hippocampal Neurogenesis in Adult Humans. *Cell*, 153(6):1219–1227.
- Suh, H., Consiglio, A., Ray, J., Sawai, T., D'Amour, K. A., & Gage, F. H. (2008). In vivo fate analysis reveals the multipotent and self-renewal capacities of Sox2<sup>+</sup> neural stem cells in the adult hippocampus. *Cell stem cell*, 1(5):515–528.
- Sutherland, C., Leighton, I. A., & Cohen, P. (1993). Inactivation of glycogen synthase kinase-3 beta by phosphorylation: new kinase connections in insulin and growth-factor signalling. *The Biochemical journal*, 296 Pt 1, 15–9.
- Tan, Y., Ruan, H., Demeter, M. R., & Comb, M. J. (1999). p90RSK Blocks Bad-mediated Cell Death via a Protein Kinase C-dependent Pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 274(49):34859–34867.
- Tashiro, A., Makino, H., & Gage, F. H. (2007). Experience-specific functional modification of the dentate gyrus through adult neurogenesis: a critical period during an immature stage. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 27(12):3252–9.
- Taupin, P. (2007). BrdU immunohistochemistry for studying adult neurogenesis: paradigms, pitfalls, limitations, and validation. *Brain research reviews*, 53(1):198–214.
- Thomas, R. M., Hotsenpiller, G., & Peterson, D. A. (2007). Acute psychosocial stress reduces cell survival in adult hippocampal neurogenesis without altering proliferation. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 27(11):2734–43.
- Tian, C., Gong, Y., Yang, Y., Shen, W., Wang, K., Liu, J., Xu, B., Zhao, J., & Zhao, C. (2012). Foxg1 has an essential role in postnatal development of the dentate gyrus. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 32(9):2931–49.
- Touraine, R-L., Zeniou, M., & Hanauer, A. (2002). A syndromic form of X-linked mental retardation: the Coffin-Lowry syndrome. *European Journal of Pediatrics*, 161(4):179–187.
- Treves, A., Tashiro, A., Witter, M. E., & Moser, E. I. (2008). What is the mammalian dentate gyrus good for? *Neuroscience*, 154(4):1155–72.
- Trivier, E., De Cesare, D., Jacquot, S., Pannetier, S., Zackai, E., Young, I., Mandel, J. L., Sassone-Corsi, P., & Hanauer, A. (1996). Mutations in the kinase Rsk-2 associated with Coffin-Lowry syndrome. *Nature*, 384(6609):567-70.
- Trouche, S., Bontempi, B., Roullet, P., & Rampon, C. (2009). Recruitment of adult-generated neurons into functional hippocampal networks contributes to updating and strengthening of spatial memory. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(14):5919–24.
- Vaillend, C., Poirier, R., & Laroche, S. (2008). Genes, plasticity and mental retardation. *Behavioural brain research*, 192(1):88–105
- Van Praag, H., Christie, B. R., Sejnowski, T. J., & Gage, F. H. (1999). Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(23):13427–31.

- Van Praag, H., Kempermann, G., & Gage, F. H. (2000). Neural consequences of environmental enrichment. *Nature reviews. Neuroscience*, 1(3):191–8.
- Van Strien, N. M., Cappaert, N. L., & Witter, M. P. (2009). The anatomy of memory: an interactive overview of the parahippocampal-hippocampal network. *Nature reviews. Neuroscience*, 10(4):272–82.
- Verpelli, C., & Sala, C. (2012). Molecular and synaptic defects in intellectual disability syndromes. *Current opinion in neurobiology*, 22(3):530–6.
- Vescovi, A. L., Galli, R., & Reynolds, B. A. (2006). Brain tumour stem cells. *Nature reviews. Cancer*, 6(6):425–36.
- Veyrac, A., Gros, A., Bruel-jungerman, E., Rochefort, C., Kleine, Borgmann, F. B., Jessberger, S., & Laroche, S. (2013). Zif268/egr1 gene controls the selection, maturation and functional integration of adult hippocampal newborn neurons by learning. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(17):7062–71–6.
- Villeda, S. A., Luo, J., Mosher, K. I., Zou, B., Britschgi, M., Bieri, G., Stan, T. M., Fainberg, N., Ding, Z., Eggel, A., Lucin, K. M., Czirr, E., Park, J. S., Couillard-Després, S., Aigner, L., Li, G., Peskind, E. R., Kaye, J. A., Quinn, J. F., Galasko, D. R., Xie, X. S., Rando, T. A., & Wyss-Coray, T. (2011). The ageing systemic milieu negatively regulates neurogenesis and cognitive function. *Nature*, 477(7362):90–4.
- Von Bohlen Und Halbach, O. (2011). Immunohistological markers for proliferative events, gliogenesis, and neurogenesis within the adult hippocampus. *Cell and tissue research*, 1–19.
- Vorhees, C. V., & Williams, M. T. (2006). Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. *Nature protocols*, 1(2):848–58.
- Waddell, J., Anderson, M. L., & Shors, T. J. (2011). Changing the rate and hippocampal dependence of trace eyeblink conditioning: slow learning enhances survival of new neurons. *Neurobiology of learning and memory*, 95(2):159–65.
- Warner-Schmidt, J. L., Madsen, T. M., & Duman, R. S. (2008). Electroconvulsive seizure restores neurogenesis and hippocampus-dependent fear memory after disruption by irradiation. *European journal of neuroscience*, 27(6):1485–93.
- Wiggin, G. R., Soloaga, A., Foster, J. M., Murray-tait, V., Cohen, P., & Arthur, J. S. (2002). MSK1 and MSK2 Are Required for the Mitogen- and Stress-Induced Phosphorylation of CREB and ATF1 in Fibroblasts. *Society*, 22(8):2871–2881.
- Wojtowicz, J. M., Askew, M. L., & Winocur, G. (2008). The effects of running and of inhibiting adult neurogenesis on learning and memory in rats. *The European journal of neuroscience*, 27(6):1494–502.
- Wolfer, D. P., Stagljär-Bozicevic, M., Errington, M. L., & Lipp, H-P. (1998). Spatial Memory and Learning in Transgenic Mice: Fact or Artifact? *News in physiological sciences : an international journal of physiology produced jointly by the International Union of Physiological Sciences and the American Physiological Society*, 13, 118–123.
- Wong-Goodrich, S. J., Pfau, M. L., Flores, C. T., Fraser, J. A., Williams, C. L., & Jones, L. W. (2010). Voluntary running prevents progressive memory decline and increases adult

hippocampal neurogenesis and growth factor expression after whole-brain irradiation. *Cancer research*, 70(22):9329–38.

Xu, Z., Li, J., Zhang, F., Wu, Y., Gao, Y., Liang, J., & Zhang, C. (2011). Working memory task decreases the survival of newly born neurons in hippocampus. *Neurobiology of learning and memory*, 95(3):239–47.

Yang, M., Kim, H., Kim, J., Kim, S-H., Kim, J-C., Bae, C.-S., Kim, J. S., Shin, T., & Moon, C. (2012). Fast neutron irradiation deteriorates hippocampus-related memory ability in adult mice. *Journal of Veterinary Science*, 13(1):1.

Yang, X., Matsuda, K., Bialek, P., Jacquot, S., Masuoka, H. C., Schinke, T., Li, L., Brancorsini, S., Sassone-Corsi, P., Townes, T. M., Hanauer, A., & Karsenty, G. (2004). ATF4 is a substrate of RSK2 and an essential regulator of osteoblast biology ; implication for Coffin-Lowry Syndrome. *Cell*, 117(3):387-98

Yap, J. J., Takase, L. F., Kochman, L. J., Fornal, C. A., Miczek, K. A., & Jacobs, B. L. (2006). Repeated brief social defeat episodes in mice: effects on cell proliferation in the dentate gyrus. *Behavioural brain research*, 172(2):344–50.

Yassa, M., & Stark, C. (2011). Pattern separation in the hippocampus. *Trends in neurosciences*, 50(1):1–8.

Zaru, R., Ronkina, N., Gaestel, M., Arthur, J. S. C., & Watts, C. (2007). The MAPK-activated kinase Rsk controls an acute Toll-like receptor signaling response in dendritic cells and is activated through two distinct pathways. *Nature immunology*, 8(11):1227–35.

Zeniou, M., Ding, T., Trivier, E., & Hanauer, A. (2002). Expression analysis of RSK gene family members: the RSK2 gene, mutated in Coffin-Lowry syndrome, is prominently expressed in brain structures essential for cognitive function and learning. *Human molecular genetics*, 11(23):2929-40

Zhang, C. L., Zou, Y., He, W., Gage, F. H., & Evans, R. M. (2008). A role for adult TLX-positive neural stem cells in learning and behaviour. *Nature*, 451(7181):1004-7.

Zhao, Y., Bjørbaek, C., Weremowicz, S., Morton, C. C., & Moller, D. E. (1995). RSK3 encodes a novel pp90rsk isoform with a unique N-terminal sequence: growth factor-stimulated kinase function and nuclear translocation. *Molecular and cellular biology*, 15(8):4353–63

Zhao, C., Deng, W., & Gage, F. H. (2008). Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell*, 132(4):645–60.

Zhao, C., Teng, E. M., Summers, R. G., Ming, G. L., & Gage, F. H. (2006). Distinct morphological stages of dentate granule neuron maturation in the adult mouse hippocampus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 26(1):3–11.



## Abstract

The Coffin-Lowry Syndrome is a rare syndromic form of X-linked intellectual disability. This syndrome is caused by mutations of the *Rsk2* gene that encodes a protein kinase, RSK2, in the MAPK/ERK signaling pathway. Characterization of the behavioural phenotype of *Rsk2*-KO mice mainly showed that they display delayed acquisition and long-term deficits in a spatial reference memory task, suggesting an alteration in hippocampal function. Here, we show that *Rsk2*-KO mice are also deficient in a learning and memory task that involves dentate gyrus-dependent pattern separation function. Several studies showed the formation of new neurons in the adult dentate gyrus by neurogenesis is a form of plasticity that plays a significant role in hippocampal-dependent learning and memory, in particular for spatial learning and memory and pattern separation. As these functions are altered in *Rsk2*-KO mice, we studied hippocampal adult neurogenesis in these mice. No difference in proliferation, survival and maturation of newborn neurons was found in the dentate gyrus of the mutant mice in basal conditions, nor after a pattern separation task. However, we found a deficit in the survival of newborn cells in *Rsk2*-KO mice submitted to spatial learning and memory in the Morris water maze task. According to several studies, environmental enrichment in rodents has beneficial effects on cognitive performance and is associated with an enhancement of adult hippocampal neurogenesis. Thus, we assessed the potential effect of environmental enrichment on spatial learning and memory performance and adult hippocampal neurogenesis in *Rsk2*-KO mice. Our results show that an environmental enrichment protocol of 3h per day during 24 days can rescue or ameliorate spatial learning and memory performance and pattern separation function in *Rsk2*-KO mice and increase adult hippocampal neurogenesis.

## Résumé

Le syndrome de Coffin Lowry est une forme syndromique rare de déficience intellectuelle liée au chromosome X. Ce syndrome est dû à des mutations du gène *Rsk2* codant la protéine kinase RSK2 dans la voie de signalisation des MAPK/ERK. La caractérisation phénotypique du modèle murin *Rsk2*-KO a principalement mis en évidence un retard d'acquisition ainsi qu'un déficit de mémoire spatiale à long terme, suggérant une altération des fonctions hippocampiques. Nous avons montré que les souris *Rsk2*-KO présentent également des déficits dans une forme d'apprentissage et de mémoire mettant en jeu la fonction de séparation de patterns dépendante du gyrus denté. Plusieurs études montrent que la genèse de nouveaux neurones dans le gyrus denté chez l'adulte constitue une forme de plasticité jouant un rôle important dans l'apprentissage et la mémoire dépendante de l'hippocampe, en particulier dans les tâches spatiales et de séparation de patterns. En raison des déficits observés chez les souris *Rsk2*-KO, nous nous sommes intéressés à la neurogenèse adulte chez ce modèle murin. Aucune différence de prolifération, de survie ou de maturation n'a été observée dans le gyrus denté des souris *Rsk2*-KO à l'état basal, ni après une tâche de séparation de patterns. Cependant, nous avons observé un déficit de survie des nouvelles cellules chez les souris *Rsk2*-KO après apprentissage dans la piscine de Morris. La littérature montre que l'enrichissement environnemental a des effets bénéfiques sur les performances cognitives des rongeurs et est notamment capable d'augmenter la neurogenèse adulte hippocampique. Nous avons donc analysé les effets de l'enrichissement sur les performances comportementales et la neurogenèse adulte des souris *Rsk2*-KO. Nos résultats montrent qu'un protocole d'enrichissement environnemental de 3 heures par jours durant 24 jours est capable de compenser ou d'améliorer les performances des souris *Rsk2*-KO dans les tâches de mémoire spatiale et de séparation de patterns et aussi d'augmenter la neurogenèse hippocampique adulte.