

Interactions neurogliales dans la déficience intellectuelle : étude du modèle oligophrénine-1

Laure-Elise Pillet

▶ To cite this version:

Laure-Elise Pillet. Interactions neurogliales dans la déficience intellectuelle : étude du modèle oligophrénine-1. Neurobiologie. Université Sorbonne Paris Cité, 2018. Français. NNT : 2018US-PCB246 . tel-02527909

HAL Id: tel-02527909 https://theses.hal.science/tel-02527909

Submitted on 1 Apr 2020 $\,$

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers. L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



MEMBRE DE USPC Université Sorbonne Paris Cité

Université Paris Descartes

Ecoles Doctorales BioSPC (ED562)

Institut Cochin – Equipe Billuart-Bienvenu : Génétique, physiopathologie et approches thérapeutiques des maladies mentales Collège de France, CIRB (Centre International de Recherche en Biologie) – Equipe Rouach : Interaction neurogliales dans la physiopathologie cérébrale

INTERACTIONS NEUROGLIALES DANS LA DEFICIENCE INTELLECTUELLE : ETUDE DU MODELE OLIGOPHRENINE-1

Par Laure-Elise Pillet

Thèse de doctorat de Neurobiologie

Dirigée par Pierre Billuart et Nathalie Rouach

Présentée et soutenue publiquement le 16/11/2018

Devant un jury composé de :

Frédéric Laumonnier, rapporteur

Jean-Vianney Barnier, rapporteur

Sandrine Etienne-Manneville, examinatrice

Pierre Billuart, directeur de thèse

Nathalie Rouach, directrice de thèse

A mes grands-parents.

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier chaleureusement Pierre Billuart et Nathalie Rouach, pour m'avoir proposé ce projet de thèse fascinant en co-direction, pour leur accueil dans leurs équipes et la confiance qu'ils m'ont accordée, pour leur bienveillance et leur exigence qui m'a beaucoup appris sur la rigueur, l'implication et l'esprit critique qu'exige un travail de recherche. Grâce à vous je ressors grandie et enrichie de cette expérience passionnante.

Aussi, je voudrais remercier les membres du jury qui ont accepté d'être examinateur ou rapporteur de ma thèse : Frederick Laumonnier, Jean-Vianney Barnier, Sandrine Etienne-Manneville.

Je voudrais également remercier l'Université Sorbonne Paris Cité et les membres du jury qui m'ont accordé la bourse « double culture », les écoles doctorale ED562 et ED158 pour avoir donné leur accord sur ce contrat et ce projet de thèse.

Ensuite, je voudrais remercier toutes les personnes de l'équipe de Pierre et de Thierry Bienvenu qui m'ont accueillie et soutenue, qui ont eu un rôle important avant et au cours de ma thèse, qui ont été disponibles et m'ont donné des conseils précieux, qui m'ont fait découvrir le monde riche de la recherche en neurosciences, qui ont participé de près ou de loin à mon projet: Yoann, Nicolas, Guiseppe, Chloé, Juliette, Rodrick, Julie, Mariana, Anne, Olivier, Karine, Laurence, Thierry, et beaucoup d'autres de passage dans l'équipe!

Je tiens aussi à remercier tous les membres de l'équipe de Nathalie Rouach pour leur accueil et leur grande aide au cours de la deuxième partie de ma thèse. Vos nombreux conseils, votre disponibilité, votre dynamisme, votre compagnie agréable m'ont permis d'avancer encore plus loin dans mon projet: Pascal, Grégory, Charles, Flora, Anna, Noémie M., Danijela, Anne-Cécile, Alice, Elena, Johnathan, Giselle, Armelle, Julien, Glenn, David, Josien, Jérôme, Eleonore, Gilles, Claudie, Vincent, et plus particulièrement Noémie C. avec qui j'ai pris beaucoup de plaisir à travailler sur le projet Oligophrénine-1 et qui m'a beaucoup apporté à la fin de cette thèse!

Enfin, je tiens à remercier mes proches : ma famille toujours présente pour moi et de bons conseils, mes amis que j'ai eu la chance de rencontrer au collège, au lycée, en prépa, en Ecole, en Allemagne, ou pendant mon master de Neurosciences. Grâce à vous tous, les moments difficiles que j'ai pu avoir au cours de ces trois années de thèse l'étaient un peu moins, et les moments heureux l'étaient encore plus !

Liste des principales abréviations

AraC : Cytosine arabinoside CNF1 : Cytotoxic necrotizing factor 1 Cx: Connexine DI : Déficience intellectuelle DILX : Déficience intellectuelle liée à l'X DMEM : Dulbecco's Modified Eagle's medium **FMRP : Fragile X Mental Retardation Protein** GABA : Gamma-aminobutyric acid GFAP : Glial fibrillary acidic protein GFP : Green fluorescent protein LPA : Lysophosphatidic acid LTD : Dépression à long terme LTP : Potentiation à long terme MEC : Milieu extra-cellulaire MLC2 : Myosin light chain 2 **OPHN1**: Oligophrénine-1 PAP: prolongements astrocytaires périsynaptiques RhoGEF : Rho-Guanine nucleotide exchange factors **RhoGAP: RhoGTPase-activating proteins** RhoGDI: Rho GDP-dissociation inhibitor **ROCK : Rho-associated protein kinase** SNC: Système nerveux central

Liste des figures

Figure 1: Représentation des 106 gènes référencés impliqués dans la DILX et
classification suivant le nombre de mutations reportees
Figure 2: Les voies synaptiques générales dont les protéines actrices sont impliquées dans la DI
Figure 3: Les gènes de DI et les mécanismes de plasticité et de transmission synaptiques.
Figure 4: Faits marquants dans la découverte et l'étude des RhoGTPases entre 1985 et 2014
Figure 5: Effet de l'activation de Rho, Rac et Cdc42 dans des fibroblastes préalablement privés de sérum sur le réassemblage du cytosquelette d'actine (gauche) et la formation des points focaux d'adhésion marqués par la vinculine (droite)
Figure 6: les RhoGTPases et leurs effecteurs dans la dynamique du cytosquelette d'actine et des microtubules
Figure 7: Représentation schématique de la régulation de la voie de signalisation dépendante de FAK en réponse à un stimulus mécanique extérieur menant à diverses réponses cellulaires
Figure 8: Représentation schématique de l'activation de RhoA par des forces mécaniques
Figure 9: Localisation des zones d'action des RhoGTPases (A) et des différentes contraintes mécaniques sur des cellules en migration (B)
Figure 10: Schéma représentatif de l'activation, l'inactivation et la stabilisation de la forme inactive soluble des RhoGTPases par RhoGEF et RHoGAP et RhoGDI
respectivement. 54
Figure 11: Représentation schématique des différents domaines d'Oligophrénine-1 et ses
Figure 12: Marquage astrocytaire comparant la taille et la complexité d'un astrocyte murin, de primate et humain
Figure 13: Représentation du marquage de Golgi dans le cervelet humain dessiné par Ramon y Cajal
Figure 14: La morphologie des astrocytes réelle révélée par la transfection d'un
plasmide exprimant le marquage membranaire Lck-GFP.
Figure 15: Interaction neuro-gliale au niveau de la synapse tripartite
Figure 10. Image de incroscopie electronique et reconstruction 3D d'une synapse
Figure 18: Induction de la stellation des astrocytes in vitro par l'inhibition de RhoA 89

Figure 19: Augmentation de la migration astrocytaire in vitro par l'inhibition de la voie
RhoA/ROCK.
Figure 20: Dynamique du calcium cytosolique et de l'activation de RhoA et Cdc42 dans
un astrocyte in vitro
Figure 21:Transcription d'OPHN1 dans les différents types cellulaires du CNS chez la
souris et chez l'Homme
Figure 22: OPHN1 régule l'effet du LPA sur la migration des astrocytes in vitro 124
Figure 23: Représentation schématique de l'invalidation conditionnelle du gène Ophn1
dans les astrocytes
Figure 24: Observation de l'effet de l'inactivation d'OPHN1 dans les astrocytes sur la
taille de la zone proximale au niveau de la cicatrice gliale dans le modèle KO
conditionnel
Figure 25: Comparaison de deux analyses de Scholl basée sur la protéine GFP ou GFAP.
Figure 26: OPHN1 régule la morphologie astrocytaire de manière cellulaire autonome.
Figure 27: L'actine interagit avec Cx30 dans les astrocytes in vitro153
Figure 28: La Cx30 contrôle la vitesse de migration des astrocytes in vitro 154
Figure 29: OPHN1 régule l'adhésion des astrocytes in vitro
Figure 30: Cx30 contrôle l'adhésion des astrocytes sur des matrices extracellulaires de
collagène in vitro
Figure 31: OPHN1 régule l'expression de la Cx30 au niveau de la cicatrice gliale 157

Table des matières

REME	RCIEMENTS	<u> 3</u>				
LISTE	DES PRINCIPALES ABREVIATIONS	5				
<u>LISTE</u>	DES FIGURES	<u> 6</u>				
TABLE	TABLE DES MATIERES					
INTRO	ODUCTION	<u>. 11</u>				
<u>CHAP</u>	ITRE 1 : LA DEFICIENCE INTELLECTUELLE	<u>. 11</u>				
1.1)	PRESENTATION GENERALE DE LA PATHOLOGIE CHEZ L'HOMME	. 11				
1.1.1)	DEFINITION ET DIAGNOSTIC	11				
1.1.2)	PREVALENCE, COUT ECONOMIQUE ET SOCIAL	13				
1.1.3)	SOLUTIONS THERAPEUTIQUES PROPOSEES	14				
1.2)	LES CAUSE DE LA DI, UNE COMPOSANTE A DOMINANTE GENETIQUE	. 17				
1.2.1)	LES DIFFERENTES CAUSES DE DI	17				
1.2.2)	LES CAUSES GENETIQUES	19				
1.2.3)	LA DEFICIENCE INTELLECTUELLE LIEE A L'X	22				
1.3)	DIVERS SYNDROMES, UNE PATHOLOGIE	. 27				
1.3.1)	LES GENES ASSOCIES A LA DI : TRANSCRIPTION, EPIGENETIQUE, SYNAPSE	27				
1.3.2)	LA NOTION DE SYNAPTOPATHIE	28				
1.3.3)	DEREGULATION D'UNE VOIE IMPLIQUEE DANS SYNAPTOPATHIE : LA VOIE DES RHOGTPASES	31				
<u>CHAP</u>	ITRE 2 : LES RHOGTPASES	<u>. 35</u>				
2.1)	PRESENTATION DE LA FAMILLE DES RHOGTPASES	. 35				
2.1.1)	HISTOIRE DE LA DECOUVERTE DES RHOGTPASES : DES FONCTIONS CELLULAIRES FORTEMENT CONSERVEES	CHEZ				
DIVERS	SES ESPECES	35				
2.1.2)	DES FONCTIONS CLES DES LE DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE	37				
2.2)	LEURS DIVERS ROLES CELLULAIRES, PLASTICITE MORPHOLOGIQUE	. 41				
2.2.1)	REORGANISATION DU CYTOSQUELETTE	41				
2.2.2)	ADHESION	44				
2.2.3)	MIGRATION	46				
2.3)	LEUR REGULATION	. 47				
2.3.1)	STIMULATIONS CHIMIQUE ET BIOPHYSIQUE	47				
2.3.2)	ACTIVATION ET INHIBITION DES RHOGTPASES LORS DE LA MIGRATION CELLULAIRE	51				
2.3.3)	GDI, GEF ET GAP	53				
2.3.4)	UN EXEMPLE DE DEFICIENCE INTELLECTUELLE IMPLIQUANT UNE RHOGAP : LE MODELE OLIGOPHRENINE-1	56				
2.4)	RHOGTPASES ET DI	. 58				
2.4.1)	LES DEFAUTS DE DEVELOPPEMENT DU CORTEX ET DE MISE EN PLACE DU RESEAU NEURONAL	58				
2.4.2)	DES DEFAUTS SYNAPTIQUES	60				
2.4.3)	MODULATION DES VOIES IMPLIQUANT LES RHOGTPASES COMME TRAITEMENT POTENTIEL DE LA DI	62				

CHAPITRE 3 : LES ASTROCYTES, POTENTIELS ACTEURS DANS LA DI		
3.1) LES ASTROCYTES, CELLULES GLIALES PARTENAIRES DES NEURONES		
3.1.1) LES PREMIERES OBSERVATIONS HISTORIQUES		
3.1.2) UNE POPULATION HETEROGENE		
3.1.3) LA NOTION DE SYNAPSE TRIPARTITE		
3.2) PLASTICITE STRUCTURALE ASTROCYTAIRE LORS DE LA MISE EN PLACE DES RESEAUX NEURONAUX		
3.2.1) FORMATION ET ELIMINATION DES SYNAPSES, GUIDAGE AXONAL		
3.2.2) FONCTIONNEMENT DE LA SYNAPSE : HOMEOSTASIE IONIQUE ET METABOLIQUE DE LA SYNAPSE,		
GLIOTRANSMISSION		
3.3) LES ASTROCYTES COMME POTENTIELS ACTEURS DANS LA DI		
3.3.1) DES ELEMENTS DE REPONSES EN FAVEUR DE L'IMPLICATION DES ASTROCYTES DANS LA DI		
3.3.2) ASTROCYTES ET RHOGTPASES		
3.3.3) EXPRESSION ASTROCYTAIRE D'OLIGOPHRENINE-1 DANS LES ASTROCYTES		
OBJECTIFS DE LA THESE		
RESULTATS		
CHAPITRE 1 : LE ROLE D'OLIGOPHRENINE-1 DANS LES ASTROCYTES		
1.1) MODULATION DE LA MORPHOLOGIE, ADHESION ET MIGRATION DES ASTROCYTES DEFICIENTS EN OPHN1 97		
1.1.1) RESUME		
1.1.2) ARTICLE (SOLIMIS) 98		
1 1 3) DISCUSSION 121		
1.2) MODULATION DE LA VOIE DE SIGNALISATION MOLECULAIRE RHOA/ROCK		
1 2 1) MATERIELS ET METHODES 123		
1.2.2) RESULTATS 124		
1.2.3) Discussion		
CHAPITRE 2 1 A COMPOSANTE ASTROCYTAIRE CELLUI AIRE ALITONOME DE LA DULLEE A		
OLIGOPHRENINE-1		

127
127
128
128
131
131
136

CHAPITRE 3 : LA CONNEXINE 30, UNE PROTEINE IMPLIQUEE DANS LA PLASTICITE ASTROCYTAIRE

3.1)	CONNEXINE 30 ET POLARISATION ASTROCYTAIRE AU COURS DU DEVELOPPEMENT POSTNATAL	139
3.1.1)	Resume	139
3.1.2)	ARTICLE	139
3.2)	LA Cx30 ET OPHN1	151
3.2.1)	MATERIELS ET METHODES	151

3.2.2)	Cx30 ET OPHN1 IMPLIQUEES DANS DES PROCESSUS CELLULAIRES ASTROCYTAIRES SIMILAIRES	152					
3.2.3)	REGULATION DE L'EXPRESSION DE LA CX30 PAR OPHN1 AU NIVEAU DE LA CICATRICE GLIALE	156					
3.2.4)	DISCUSSION	157					
DISCUS	DISCUSSION ET PERSPECTIVES						
	CRADUIE	164					
DIDLIU		104					
<u>RESUM</u>	1E DE LA THESE	214					
<u>SUMM</u>	IARY	215					

INTRODUCTION

Chapitre 1 : La déficience intellectuelle

1.1) Présentation générale de la pathologie chez l'Homme

1.1.1) Définition et diagnostic

La déficience intellectuelle (DI) selon l'Organisation Mondiale de la Santé (WHO) se définit par un développement neurologique incomplet ou stoppé, caractérisé par des lacunes à chaque étape du développement contribuant à l'intelligence globale de l'individu. Cette intelligence regroupe des fonctions linguistiques, cognitives, motrices et sociales. Les lacunes accumulées sont *in fine* responsables des problèmes d'adaptation de l'individu à son environnement.

Afin de clarifier le statut juridique et administratif de cette pathologie, et à l'occasion de la nouvelle définition de cette maladie, l'Association Américaine de la Déficience Intellectuelle et Développementale (AAIDD) et la WHO ont pris la décision il y a quelques années de remplacer le terme « retard mental » (mental retardation) par le terme « déficience intellectuelle » (intellectual disability) jugé moins péjoratif et plus précis en termes de vocabulaire employé pour désigner un handicap. (Carulla et al., n.d.) Les pédiatres parlent eux de retard développemental (develomental delay) et d'autre termes sont également employés pour faire référence à la DI comme « intellectual developmental disorder », « neurodevelopmental disorder » ou « developmental cognitive impairment ». Cependant ces termes un peu plus complexes étaient beaucoup moins populaires. À la suite des revendications des parents et des patients, la Rosa's law a été signée par la Président Obama en 2010, stipulant que le terme « retard mental » devait être remplacé dans tous les contextes par « déficience intellectuelle » (Chiurazzi & Pirozzi, 2016).

Auparavant, la DI était simplement déterminée par un quotient intellectuel (QI) bas, inférieur à 70, dont la valeur définissait le degré de gravité de la DI. Le QI est une notion datant du début du XXe siècle, ayant pour but de mesurer l'intelligence. Le QI avait à l'époque pour but de repérer en avance les élèves scolairement faibles. Aujourd'hui, ce diagnostic est beaucoup plus complexe. L'AAIDD définit la DI par la mesure d'un score global impliquant plusieurs facteurs :

- l'intelligence (le QI)
- les capacités d'adaptation de l'individu incluant des facultés sociales, conceptuelle et pratique.

La DI n'est avérée que si un QI faible est associé à un déficit dans au moins deux facultés adaptatives avant l'âge de 18 ans dans les domaines suivants : communication, soins personnels, vie quotidienne, sociabilité, intégration à la communauté, autonomie, réussite scolaire, loisir, emploi. Le degré de gravité de la maladie se répartit lui en quatre catégories : léger, modéré, sévère et profond. Ce degré est évalué par différents critères selon l'âge de l'individu : de développement avant 5 ans, scolaires entre 6 et 20 ans, d'insertion et d'adéquation à la société après 21 ans. Avant l'âge de 5 ans, un retard développemental global de l'enfant (impliquant la DI mais aussi d'autres pathologies développementales) peut dans un premier temps prédire le futur diagnostic de DI et le développement de la pathologie. Ce retard se manifeste par des lacunes précoces dans au moins deux de ces domaines : moteur, linguistique, cognitif et social. Dans certains cas, le diagnostic de DI, dont la gravité peut varier, ne peut pas être fait précocement si le retard global développemental n'est pas assez marqué. En effet, le développement dans les premières années de la vie varie beaucoup selon l'individu et le diagnostic n'est fait que lorsque l'enfant est assez âgé pour réaliser un test de QI par exemple (Katz & Lazcano-Ponce, 2008; Maris, Barbato, Trott, & Montano, 2013; Moeschler, Shevell, & Committee on Genetics, 2014).

Les notions d'intelligence et d'adaptation ne sont pas les seules dimensions abordées pour caractériser la pathologie. Les notions de participation ou rôle social, de santé physique et mentale, de contexte social (environnement, culture, opportunités) sont également prises en compte. Ceci souligne la complexité à définir cette maladie dont la manifestation et les symptômes sont à étudier au cas par cas. Certaines DI sont d'ailleurs associées à d'autres pathologies. Cette comorbidité peut être d'ordre mentale comme pour la dépression, l'hyperactivité, ou le syndrome de déficit d'attention, ou d'ordre physique comme l'épilepsie (syndrome de l'X-Fragile) ou une motricité très réduite (syndrome de Rett) rendant chaque cas de DI unique (Munir, 2016).

La notion de mesure et d'hérédité de l'intelligence est encore aujourd'hui soumise au débat et le diagnostic réalisé par des professionnels doit impérativement prendre en compte des facteurs objectifs et standardisés (Battaglia & Carey, 2003; Cook & Oliver, 2011).

1.1.2) Prévalence, coût économique et social

Il est important de souligner qu'il est encore difficile d'estimer la prévalence de la maladie à travers le monde. En effet, les bases de données sont aujourd'hui incomplètes et difficiles à comparer et mettre en relation. Si l'on prend en compte tous les degrés de sévérité de la DI, la prévalence de la pathologie est évaluée à 1-3% de la population mondiale. Concernant l'Europe, la prévalence de la maladie est de 1% de la population. En revanche, si l'on ne prend en compte que les cas de DI modérée à profonde, la prévalence de cette maladie ne serait plus que de 0.4% de la population européenne (Bakel et al., n.d.). De plus, il faut également noter que cette prévalence est plus importante suivant le niveau économique du pays et la catégorie sociale des personnes prises en compte. En effet, il a été observé que les communautés pauvres avaient un plus fort taux de DI que dans la population générale (Karam et al., 2015). Ceci pourrait s'expliquer de deux manières : d'abord la pauvreté est associée à un grand nombre de facteurs environnementaux et psychosociaux pouvant jouer un rôle important sur le développement de la DI, ensuite parce que les familles dont un des membres est concerné par la pathologie sont plus à même de faire face à d'importants frais de prise en charge (Katz & Lazcano-Ponce, 2008). En effet, les coûts engagés lors de la vie d'une personne atteinte de DI pour leur assistance sont estimés à 1 million de dollars par personne (Moeschler et al., 2014; Reichenberg et al., 2016). Les enfants atteints de DI sont particulièrement vulnérables et demandent des soins quotidiens et appropriés tout au long de leur vie (Casson et al., 2018). Il est estimé que les coûts nécessaires pour la prise en charge des enfants américains nés en 2000 et atteints de DI s'élèveraient à 50 milliards de dollars (Srour & Shevell, 2014). De plus, la population des personnes atteintes de DI est de plus en plus vieillissante (Reppermund & Trollor, 2016). Les personnes âgées atteintes de DI sont plus susceptibles de développer des problèmes liés à l'âge et ce de manière plus précoce (Coppus, 2013; Dykens, 2013; Kwan & Kirschner, 2005). Des accidents de chutes ou des problèmes de démence (maladie d'Alzheimer) liés à l'âge, qui demandent une prise en charge soutenue avec des coûts importants, touchent plus les personnes âgées atteintes de DI que la population vieillissante normale (Casson et al., 2018; Coppus, 2013; Dykens, 2013; Innes, McCabe, & Watchman, 2012; Morisse, Vandemaele, Claes, Claes, & Vandevelde, 2013; Reppermund & Trollor, 2016; Tse, Kwan, & Lau, 2018).

1.1.3) Solutions thérapeutiques proposées

Les traitements pharmacologiques étudiés aujourd'hui tenteraient d'améliorer l'intelligence des personnes concernées par la DI en améliorant leurs facultés cognitives et comportementales. Cependant les essais cliniques menés jusqu'ici n'ont pas donné de résultats flagrants. L'utilisation d'antipsychotiques a pu montrer un changement positif dans le comportement, en agissant par exemple sur l'irritabilité pouvant être associée à la DI, avec des effets secondaires indésirables comme des insomnies ou une prise de poids. Afin de mettre en place des traitements plus sélectifs dans le but d'améliorer non-seulement le comportement mais aussi les facultés cognitives du patient, des études sur les protéines et les voies dérégulées dans des modèles de DI sont envisagées et testées (Verpelli, Galimberti, Gomez-Mancilla, & Sala, 2014).

Il existe dans la bibliographie un grand nombre de publications traitant du syndrome du X fragile, une des premières DI monogéniques identifiée et plus largement étudiée. Cette littérature riche s'explique sûrement par une meilleure connaissance des mécanismes moléculaires et biologiques de cette pathologie qui ont été plus longuement étudiés que dans les autres cas de DI génétiques. Par exemple, il a été montré chez une souris modèle de syndrome du X fragile, que l'excès d'activité des récepteurs au glutamate (mGluR5) est responsable d'anomalies comportementales et cognitives et que la réduction de l'activité de ces récepteurs, grâce à l'utilisation d'un antagoniste, permettrait une amélioration du phénotype (Pop, Gomez-Mancilla, Neri, Willemsen, & Gasparini, 2014). De la même manière, d'autre cibles thérapeutiques ont été identifiées parmi les protéines dont l'expression est dérégulée en l'absence de la protéine FMRP (Fragile X Mental Retardation Protein), comme les récepteurs GABA (Castagnola, Bardoni, & Maurin, 2017; Heulens & Kooy, 2011; Levenga, de Vrij, Oostra, & Willemsen, 2010). Cependant, le récent bilan des essais cliniques pour le traitement du syndrome de l'X fragile basé sur ces paradigmes, sont en cours ou n'ont pas montré de résultats concluants. L'une des raisons principales est d'une part que les effets observés chez la souris et chez les humains ne sont pas les mêmes. Ce phénomène n'est pas seulement observé dans le domaine des neurosciences. C'est pour cela qu'à l'avenir, les molécules testées chez l'Homme devraient être préalablement validées en recherche fondamentale chez plusieurs espèces, ce qui souligne la nécessité de développer plusieurs modèles animaux pour une pathologie. D'autres part, les tests cliniques réalisés pour le syndrome du X fragile ont été faits chez des patients adultes ou adolescents. La DI étant une maladie neurodéveloppementale, il faudrait envisager de réaliser directement les tests cliniques chez des patients plus jeunes (Berry-Kravis et al., 2018). Comme pour le syndrome du X fragile, des pistes thérapeutiques sont explorées pour traiter plus généralement la DI. Les stratégies explorées chez la souris aujourd'hui sont (Picker & Walsh, 2013):

- l'implantation de cellules souches neuronales normales
- l'utilisation de microARN pour bloquer spécifiquement les ARN messagers en excès
- des approches transgéniques
- des approches pharmacologiques (en testant des médicaments déjà sur le marché ou de nouvelles molécules)
- électrophysiologiques
- environnementales (enrichissement du milieu de vie des souris, etc.)

Les études montrent que les altérations neuronales surviennent dès le développement fœtal. Ainsi, un diagnostic prénatal permettrait d'intervenir *in utero* pour pouvoir améliorer le développement post-natal dans le cas où une interruption de grossesse ne serait pas envisagée. Cependant les approches *in utero* chez la souris sont seulement à leur commencement (Guedj, Bianchi, & Delabar, 2014).

Aujourd'hui, la recherche fondamentale a pour but de répondre aux questions suivantes concernant l'étude d'un potentiel traitement pour la DI (Faundez et al., 2018) :

- Comment réussir à modéliser cette maladie aussi complexe en utilisant des organoïdes ou des modèles cellulaires issus de cellules souches pluripotentes humaines ?
- Comment mettre en relation les interactomes protéomiques et génomiques pour définir les mécanismes responsables des DI ?
- Comment choisir les cibles thérapeutiques et mettre en place des essais cliniques adaptés ?
- Quelle stratégie adopter pour trouver des approches thérapeutiques innovantes en neurosciences ? (stimulations neuronales non invasives, exercices cognitifs...)

Malheureusement, les connaissances aujourd'hui concernant la DI permettent d'identifier des voies et des cibles moléculaires potentielles mais n'ont pas permis encore de guérir ou d'améliorer la qualité de vie des enfant touchés par cette pathologie. Les recherches actuelles permettent d'identifier des voies de signalisation que l'on pourrait moduler avec des traitements pharmacologiques déjà existant sur le marché (repositionnement de médicaments) puisque le développement de nouveaux médicaments pour traiter les cas rares de DI ne sont pas attractifs pour les industries pharmaceutiques (Tranfaglia et al., 2018).

La déficience intellectuelle est donc une maladie incurable, aucun traitement pharmacologique n'ayant été validé aujourd'hui. Ainsi, les solutions proposées ne concernent que le bien-être de l'individu, son épanouissement et son intégration à la société. Des études montrent qu'un diagnostic et une prise en charge précoces permettent d'améliorer significativement le développement de l'enfant. La prise en charge doit rester soutenue tout au long de sa vie (P. Jacobs, MacMahon, & Quayle, 2018; Moeschler et al., 2014). Le premier facteur déterminant dans cette prise en charge est l'intervention des parents. En effet, ceuxci, en plus d'accepter le diagnostic, doivent être entourés et supportés par des professionnels pour avoir une éducation adaptée à la pathologie de leur enfant. Leur regard sur la maladie et l'accès à des structures spécialisées sont déterminants pour l'état psychologique de l'enfant mais aussi pour le développement de la maladie (Katz & Lazcano-Ponce, 2008). Au niveau européen, des aides financières sont et seront mises en place afin de subvenir aux besoins des enfants atteints de DI. C'est d'ailleurs tout l'enjeu posé par la définition et le diagnostic de la pathologie qui permettront de définir si les individus concernés sont éligibles pour certaines aides sociales (Balboni et al., 2014; Greenspan & Woods, 2014; Kvarnung & Nordgren, 2017; National Research Council (US) Committee on Disability Determination for Mental Retardation, 2002).

La déficience intellectuelle, anciennement appelée retard mental, est une maladie neurodéveloppementale qui se manifeste avant l'âge de 18 ans. Cette pathologie se caractérise par des problèmes de raisonnement, mesurés par un quotient intellectuel inférieur à 70, associés à des difficultés d'adaptation faisant appel à l'intelligence sociale, conceptuelle et/ou pratique. Elle concerne environ 1% à 3% de la population mondiale selon l'étude prise en compte, mais les problèmes de diagnostic et de prise en charge persistent et représentent des coûts économiques et des enjeux sociaux importants, montrant la nécessité de comprendre les mécanismes génétiques et biologiques sous-jacent à cette pathologie dont les approches permettraient de découvrir et d'explorer de potentielles cibles thérapeutiques afin de traiter cette maladie neurologique.

1.2) Les cause de la DI, une composante à dominante génétique

1.2.1) Les différentes causes de DI

La DI est une maladie hétérogène tant par la palette des degrés de gravité qui lui sont attribués, que par les pathologies qui lui sont associées. On parle alors de DI syndromique, lorsque la DI est associée à des anomalies morphologiques, physiologiques et/ou métaboliques bien définies, qui caractérisent la pathologie de tous les individus ayant la même étiologie de DI. Un des meilleurs exemples est la trisomie 21, cas de DI due à une triploïdie du chromosome 21, où tous les individus présentent des caractéristiques morphologiques faciales typiques. En ce qui concerne la DI non-syndromique, aucune association de signes cliniques précis et caractéristiques ne sont retrouvés, la DI étant l'unique symptôme clinique décrit. Il faut cependant noter qu'il est souvent difficile de déterminer la limite entre DI syndromique et non syndromique puisque le syndrome ne peut être établi que lorsque plusieurs patients sont comparés avec des tests cliniques variés. Les causes de la DI sont les facteurs responsables du mauvais développement et fonctionnement du système nerveux central (SNC). Elles sont diverses et multifactorielles, d'origine environnementale ou génétique, souvent à l'interaction des deux. Parmi les causes environnementales, on distingue les causes pré-, péri-, et post-natales. Les principales causes environnementales sont (Bilder et al., 2013; Chokroborty-Hoque, Alberry, & Singh, 2014; Huang, Zhu, Qu, & Mu, 2016) :

- l'âge de la mère
- la malnutrition de la mère
- l'état de santé maternel : tabagisme, diabète, obésité, épilepsie, hypertension, etc.
- une infection ou une maladie lors de la grossesse qui perturbe son bon déroulement (rubéole, toxoplasmose)
- une exposition à des agents neurotoxiques qui perturbent le développement de l'embryon, notamment une exposition chronique de fortes doses d'alcool pendant la grossesse, on parle alors de syndrome alcoolique fœtal
- un accouchement prématuré
- un traumatisme ou un épisode d'asphyxie plus ou moins long à la naissance et pendant l'enfance

Ces causes environnementales sont responsables principalement des DI légères à modérées, alors que les causes des DI sévères sont, elles, dues à des causes génétiques. L'hypothèse mise en avant aujourd'hui est que les causes des DI légères à modérées sont les mêmes que celles responsables de la courbe de distribution du QI de la population générale suivant une loi normale, ce qui ne serait pas le cas des DI sévères (Reichenberg et al., 2016). Malgré des sources et des études très variées, on observe tout de même que les causes génétiques sont responsables jusqu'à 65% des DI modérées à sévères. Ainsi, on remarque que lorsque seulement 20% des DI légères peuvent être diagnostiquées par un examen génétique ou métabolique, environ 50% à 65% des DI modérées à sévères peuvent bénéficier d'un tel diagnostic (van Bokhoven, 2011). Un autre argument en faveur d'une contribution génétique dominante dans les DI sévères est que la DI est très souvent associée à d'autres pathologies neuronales (autisme, épilepsie, etc.) partageant les mêmes causes génétiques que la DI (Mefford, Batshaw, & Hoffman, 2012; Srivastava & Schwartz, 2014). La comparaison et la mise

en relation du phénotype et du génotype du patient atteint de DI sont donc fondamentales pour mieux comprendre la contribution des anomalies génétiques observées dans des cas de DI syndromiques (Roselló et al., 2014).

1.2.2) Les causes génétiques

Environ 40% des causes génétiques de la DI sont aujourd'hui encore inexpliquées. Les anomalies chromosomiques sont à l'origine de 22% des cas de DI sévères, le cas le plus fréquent étant la trisomie 21 avec une prévalence de 0.1% des naissances (Iqbal & van Bokhoven, 2014; Karam et al., 2015).

Les causes génétiques de DI incluent :

- les anomalies chromosomiques de type aneuploïdies (altérations du nombre de chromosomes) ou aneusomies (duplications ou délétions) affectant souvent plusieurs gènes
- les maladies multigéniques
- les mutations d'un unique gène responsable de la DI.

L'identification des gènes responsables de DI a commencé dans les années 80 et a énormément évolué depuis le développement des nouvelles techniques de séquençage. De nouveaux gènes de DI sont encore identifiés aujourd'hui, et leurs fonctions doivent être plus spécifiquement étudiées (Lelieveld et al., 2016). Le syndrome de l'X fragile est considéré comme l'un des premiers syndromes de DI expliqué par une anomalie génétique précise qui a pour conséquence l'extinction du gène FMR1. Depuis, le nombre de gènes de DI identifiés a augmenté de manière exponentielle. Aujourd'hui, plus de 700 gènes de DI ont été identifiés (Vissers, Gilissen, & Veltman, 2016). Dans un premier temps, ce sont les gènes de DI syndromiques qui ont pu être identifiés car les analyses génétiques ont pu être réalisées parallèlement sur une population d'individus touchés par ce syndrome, et sur leurs familles. C'est le cas par exemple du syndrome Rubinstein-Taybi ou du syndrome ATR 16. Pour les autres cas de DI, l'identification de gènes était compliquée par le grand nombre de données à comparer entre plusieurs familles touchées par des cas de DI non syndromiques, et l'hétérogénéité génétique de ces pathologies (Ellison, Rosenfeld, & Shaffer, 2013).

Il est possible de catégoriser les fonctions de gènes de DI suivant les mécanismes cellulaires ou moléculaires affectés (Miclea, Peca, Cuzmici, & Pop, 2015) :

Cellulaires :

- de neurogénèse ou de migration neuronale souvent associées à des anomalies du développement du cortex (micro ou macrocéphalie, lissencéphalie, double cortex et hétérotopies...)
- de fonctions synaptiques : pré et post-synaptiques (souvent associé à des DI non syndromiques)

Moléculaires :

- de métabolismes (acide organique, polysaccharide, glycosylation des protéines, etc.)
- de signalisations intracellulaires (voies Ras-MAPK et des GTPases Rho, on parle alors de Ras-opathie et Rho-pathie)
- de transcriptions/régulations épigénétiques (régulation des protéines histones, facteurs de transcription, modification de la chromatine, etc.)

Les récentes évolutions techniques en génétique permettent aujourd'hui de poser des diagnostics beaucoup plus précis. En effet, une fois la DI constatée, d'autres tests permettent de déterminer de manière précise l'origine de la pathologie.

Aujourd'hui les techniques de diagnostics génétiques disponibles sont :

- les analyses cytogénétiques et moléculaires :
 - le caryotypage
 - l'hybridation in situ par sondes fluorescentes (Fluorescence in Situ Hybridization, FISH)
 - les techniques comparatives sur puces à ADN (Comparative Genome hybridization, CGH)

- les analyses de la séquence d'ADN basées sur le séquençage très haut débit (next generation sequencing)
 - des exons (Whole Exome Sequencing)
 - o du génome entier (Whole Genome Sequencing)

Les analyses chromosomiques sur puces à ADN permettent de faire un diagnostic beaucoup plus précis que l'analyse du caryotype avec 10% à 15% d'anomalies chromosomiques identifiées qui ne le seraient pas avec un caryotype classique (Malan & Romana, 2012).

L'hybridation *in situ* permet de détecter des syndromes de DI connus dus à des microdélétions. Chaque sonde est spécifique d'un syndrome et il est donc nécessaire de faire préalablement un diagnostic clinique (Puri, Tuteja, & Verma, 2016).

Le séquençage très haut débit permet de trouver les mutations dans le génome entier, sans pour autant avoir d'à priori sur le gène ou la fonction du gène muté. Le séquençage de l'exome entier, lui est en fait une technique de séquençage haut débit seulement sur les régions codantes du génome. Ces techniques ont permis d'identifier des gènes candidats, chez des patients atteints de DI non identifiées, afin d'étudier les fonctions de leur protéine correspondante (de Ligt et al., 2012). Le plus intéressant dans ce cas est la redondance génétique, c'est à dire trouver le même gène muté chez plusieurs patients non apparentés mais présentant tous une DI avec les mêmes signes cliniques associés, s'il y en a (Helsmoortel et al., 2015). A l'avenir, ce grand nombre de données de séquençage devrait être partagé entre les différents laboratoires de recherche afin de pouvoir comparer ces énormes bases de données.

De récentes publications mettent bien en valeur le fait que les pédiatres doivent impérativement travailler avec des généticiens une fois que la DI a été déterminée chez l'enfant (Flore & Milunsky, 2012). En effet, le diagnostic génétique apporte plusieurs éléments : la validation du diagnostic de DI, des réponses sur la prise en charge et l'espoir d'un potentiel traitement, un support psychologique pour la famille qui cherche des réponses face

aux questions que posent la maladie. De plus, les progrès en génétique permettraient également un possible diagnostic prénatal (Moeschler et al., 2014).

Les anomalies génétiques sur le chromosome X sont responsables de 25% à 30% des DI, on appelle ce cas la DI liée à l'X (DILX). Les gènes autosomiques associés aux formes non syndromiques de DI sont beaucoup moins bien étudiés car les analyses génétiques sont plus complexes à mettre en place étant donné le manque de données familiales exploitables pour pouvoir identifier la mise en cause d'un gène. Les études de familles à forte consanguinité, et donc forte homozygotie, ont permis de comparer des individus proches génétiquement touchés ou non par la DI et d'identifier plus facilement les mutations responsables de la DI.

1.2.3) La déficience intellectuelle liée à l'X

La prévalence de la DILX est de 10% à 15% de la population déficiente intellectuelle, et elle est de 20% à 25% de la population déficiente intellectuelle masculine (Peng, Liu, Xie, & Chen, 2017). De plus, la DI étant 30% à 50% plus fréquente chez les hommes que chez les femmes, la contribution du chromosome X à la prévalence de la maladie semble être très importante. A cause de la plus forte prévalence de DI chez les hommes, et de l'identification de famille avec la ségrégation d'une mutation clairement liée à l'X, l'attention s'est plus facilement portée sur ces cas précis de DI. Ainsi, les études génétiques des DILX sont plus accessibles, d'une part parce qu'il est plus facile d'identifier des anomalies génétiques dans des conditions hémizygotes, d'autres part, car les mères saines porteuses de ce type d'anomalie donnent naissances à des fratries dont les individus touchés ou non par la DI sont génétiquement facilement comparables (van Bokhoven, 2011).

Le chromosome X semble être enrichi en gènes associés à la DI. Même s'il existe des gènes assez communs de DILX, la plupart des mutations identifiées sont généralement très rares ou même uniques à un patient ou une famille (Niranjan et al., 2015). A ce jour, il y aurait plus d'une centaine de gènes associés à la DILX (Fig. 1) sur les 800 gènes présents sur le chromosome X codant pour des protéines. Un tiers environ seraient associés à des DILX non-syndromiques et les deux autres tiers à des DILX syndromiques (Bassani et al., 2013; Lubs, Stevenson, & Schwartz, 2012). Parmi les DILX syndromiques, on distingue plusieurs symptômes cliniques concernant l'anatomie du cerveau :

- les microcéphalies, que l'on retrouve dans 1/5^e des cas de DILX syndromiques
- les macrocéphalies, dues à une augmentation du volume du tissu ou du liquide céphalo-rachidien (syndrome de l'X Fragile)
- les dysgénésies ou agénésies du corps calleux
- les calcifications, ou dépôts de cuivre
- les dysgénésies ou hypoplasies cérébelleuses.

Paradoxalement, dans certains cas de DILX syndromiques, ils existent des signes cliniques non cérébraux. Il s'agit de défauts des systèmes auditif, visuel (les cataractes concernent 5% des DILX syndromiques), cardiaque (5% à 10% de DILX syndromiques), digestif, génital, et orofacial (fentes) (Stevenson & Schwartz, 2009).

Cependant, il faut noter que l'enrichissement des gènes de DI sur le chromosome X est régulièrement remis en question car il serait en fait un biais dû aux études plus nombreuses et à l'intérêt porté sur ce chromosome (Chiurazzi & Pirozzi, 2016).

Les gènes de DILX peuvent être impliqués dans des mécanismes épigénétiques (Gonçalves et al., 2014), mais finalement, plus de la moitié des gènes responsables de DILX, syndromiques ou non, codent pour des protéines présentes au niveau de la synapse, dans les deux compartiments pré- et post synaptiques. La fonction de ces protéines est importante pour la formation de synapses et leur plasticité. On pourrait distinguer deux types de protéines (Verpelli & Sala, 2012) :

- celles présentes au niveau de la synapse qui interviennent directement sur sa formation et son fonctionnement
- celles qui agissent indirectement sur la mise en place du réseau neuronal par la synthèse, la modification post-transcriptionelle, la dégradation des protéines synaptiques, ou par interactions avec le cytosquelette d'actine

Parmi les protéines de DILX connues on retrouve par exemple IL1RAPL1, protéine d'adhésion synaptique, MECP2 (methyl CpG binding protein 2), protéine de liaison à l'ADN méthylé, ou

23

FMRP, protéine de liaison à l'ARN. La mutation de *FMR1*, gène codant pour la protéine FMRP, responsable du syndrome du X fragile, est la cause de 1% à 2% des DI totales et est la cause connue la plus commune des DILX. Les formes syndromiques facilitent l'identification des mutations responsables de la DI par la comparaison de populations présentant les mêmes symptômes et les mêmes gènes mutés. Cependant, l'apparition des signes cliniques n'est pas toujours bien observée, la limite entre DI syndromique et non syndromique étant parfois floue, la contribution de certains gènes responsables de DILX est parfois remise en question. Plusieurs approches sont employées pour déterminer les gènes de DILX (van Bokhoven, 2011) :

- le clonage positionnel basé sur le nombre de copies variables (copy-number variants) sur le chromosome X
- le criblage des gènes dans des zones candidates du chromosome X par l'analyse de larges familles touchées par la DILX
- le séquençage de gènes candidats de DILX connus, associés aux symptômes cognitifs, mais aussi cliniques ou métaboliques observés
- la comparaison de l'exome total avec l'exome du chromosome X

Une fois la ou les mutation(s) des gènes identifiée(s), une analyse fonctionnelle est nécessaire pour savoir si la mutation a un impact sur le rôle de la protéine concernée, surtout lorsque les mutations observées sont retrouvées que dans quelques cas de DI familiales. Les études fonctionnelles des conséquences de la mutation se font à l'échelle protéique, cellulaire ou de l'organisme. Il n'est pas toujours facile de conclure, car il est possible que les effets observés sur les modèles biologiques à ces échelles ne soient pas intrinsèquement responsables de la DI. En plus de ces études, il est nécessaire de vérifier si la mutation n'est pas retrouvée chez une population saine contrôle. Il faut aussi noter qu'il est possible que des variants sans conséquence ségrégent avec la maladie car ils sont très proches de la région mutée responsable de la DI qui contient un grand nombre de gènes. Il arrive même que deux gènes mutés chez les mêmes patients participent tous deux à la DI (Homan et al., 2014). De plus, les cas de DILX avec des mutations *de novo* apparaissent chez la mère qui peut être alors porteuse saine (Piton, Redin, & Mandel, 2013).

Étonnamment, il existe des cas de DILX dont la prévalence est plus importante chez les filles, c'est le cas du syndrome de Rett par exemple. Ceci peut s'expliquer de plusieurs manières. D'abord, il est possible que la mutation dans un contexte hémizygote ne soit pas viable. Autrement, il est possible que la mutation induise un biais de l'inactivation de l'X qui favoriserait le développement de la DI (Stevenson & Schwartz, 2009; Tzschach et al., 2015). Il existe également des cas de translocation entre le chromosome X et un chromosome autosomique dont les conséquences sur le développement d'une DILX sont très variables (Moysés-Oliveira et al., 2015). Ces observations nous montrent que les mécanismes génétiques des DILX peuvent être parfois difficiles à décrypter et les connaissances dans ce domaine sont finalement limitées.



<u>Figure 1</u>: Représentation des 106 gènes référencés impliqués dans la DILX et classification suivant le nombre de mutations reportées.

D'après (Piton et al., 2013). Voir aussi : https://www.ggc.org/xlid-genetic-research.

Les causes de la DI sont complexes et comprennent des facteurs environnementaux, génétiques, et à l'interface des deux (épigénétiques). Les cas de DI sévères sont essentiellement génétiques dont les formes les plus fréquentes sont la trisomie 21 et le syndrome de l'X fragile.

1.3) Divers syndromes, une pathologie

1.3.1) Les gènes associés à la DI : transcription, épigénétique, synapse

A ce jour, environ 450 gènes sont associés à la DI. L'une des idées émergentes est que la diversité de ces gènes impliquerait finalement une ou quelques voies de signalisations impliquées dans des phénomènes cellulaires similaires dont le dysfonctionnement serait responsable du développement de la DI. Ainsi, les protéines codées par les gènes de DI seraient en fait les divers acteurs de ces voies. Les voies cellulaires générales impliquées dans la DI sont notamment les voies de neurogénèse et de mise en place du réseau neuronale, du fonctionnement de la synapse, de translation et de transcription. Les phénomènes de translation et de transcription sont en fait liés à des phénomènes épigénétiques. Ces phénomènes épigénétiques ont pour résultat un changement de la structure du chromosome sans changer sa séquence d'ADN. Ils sont influencés par des facteurs environnementaux comme le régime alimentaire, le tabagisme, les interactions sociales, le style de vie et le vieillissement. Plusieurs DI syndromiques d'origine génétique impliquent l'absence ou le dysfonctionnement de protéines actrices dans les phénomènes d'épigénétiques comme le syndrome ATR 16, le syndrome Taybi-Rubinstein, le syndrome de Rett ou la trisomie 21. Les principaux facteurs épigénétiques décrits sont le taux de méthylation de l'ADN et l'action des protéines histones sur l'enroulement et la structure de la chromatine. La structure de la chromatine est importante car elle détermine l'expression du gène plus ou moins accessible à la machinerie de transcription (ARN et enzymes). Certaines publications parlent même de chromatinopathies (Larizza & Finelli, 2018) en faisant référence aux DI dont le mécanisme pathogène est la mutation de gènes codant pour des protéines régulatrices de la structure de la chromatine. Cette accessibilité du gène au niveau de la chromatine est déterminant car elle joue un rôle d'une part sur l'inactivation de l'X, mais aussi sur l'expression des gènes et la différenciation cellulaire suivant un profil spécifique responsable de la spécialisation des différents tissus. Le cerveau lui est un organe extrêmement spécialisé et complexe où des centaines de millions de cellules se spécialisent et se synchronisent selon leurs emplacements. Il est donc facilement concevable que les phénomènes épigénétiques puissent avoir un impact déterminant sur le développement de cet organe. De plus les phénomènes épigénétiques seraient aussi spécifiquement impliqués dans les phénomènes de mémoire et de plasticité synaptique où la coordination et la régulation de gènes spécifiques sont nécessaires. La DI implique avant tout un déficit neuronal, on parle aujourd'hui de synaptopathie pour expliquer la DI (Angelova et al., 2018; Bardoni, Abekhoukh, Zongaro, & Melko, 2012; Kolarova et al., 2015; Lopez-Atalaya, Valor, & Barco, 2014; Sanchez-Mut, Huertas, & Esteller, 2012; Taniguchi & Moore, 2014; Toma, Gil, Ossowski, & Dierssen, 2016; Valnegri, Sala, & Passafaro, 2012).

1.3.2) La notion de synaptopathie

Les mutations identifiées chez l'Homme des gènes codant pour des protéines synaptiques sont très présentes dans des cas de maladies neurodéveloppementales comme l'épilepsie, l'autisme, la schizophrénie, et bien sûr la déficience intellectuelle. Chacune de ces maladies ont leurs propres symptômes mais toutes présentent des déficits comportementaux et cognitifs. De plus, toutes ces maladies neurodéveloppementales présentent des comorbidités et un chevauchement génétique, de plus en plus flagrant. Même si la synaptopathie englobe plusieurs pathologies qui devraient peut-être être considérées collectivement. Un traitement ciblé sur le mécanisme de la synapse pourrait potentiellement constituer une thérapie commune (Luo, Norris, Gordon, & Nithianantharajah, 2018). De manière plus pointue, on pourrait catégoriser les gènes de DI dans des voies cellulaires et moléculaires différentes. En effet, malgré leur hétérogénéité, un très grand nombre de gènes de DI connus ont des fonctions dans des processus cellulaires du développement du SNC, à savoir la formation et la maturation des épines dendritiques, et dans le fonctionnement de la synapse. L'idée que des défauts synaptiques sont à l'origine de la DI est un concept relativement récent (Chechlacz & Gleeson, 2003). Il semblerait que la maturation des épines joue un rôle sur la plasticité synaptique et qu'en effet certaines formes d'apprentissage augmenteraient le nombre d'épines dendritiques dont la morphologie serait associée à des phénomènes cellulaires nécessaires à la mémorisation (von Bohlen Und Halbach, 2010). En plus d'une altération de la morphologie de la synapse, il a été également observé dans plusieurs modèles de DI que les circuits neuronaux et la balance d'excitation/inhibition au sein de ce réseau sont dérégulés, ce qui a pour conséquence des défauts de mémorisation et d'apprentissage (Golden, Buxbaum, & De Rubeis, 2018).

La dérégulation de ces gènes donne ainsi un phénotype commun : un dysfonctionnement du réseau synaptique ayant pour conséquence un déficit cognitif. Malgré la grande hétérogénéité des phénotypes de DI, l'un des phénotypes communs à toutes est l'altération de l'arborisation dendritique et la structure des épines, sans forcément observer une altération de la morphologie générale du cerveau. Les anomalies observées ne sont pas forcément similaires ni uniformes d'une DI à l'autre, suggérant que différents mécanismes moléculaires impliquant une grande variété de gènes de DI peuvent être sous-jacents au phénotype neuronal. Le réseau moléculaire impliqué dans la synaptopathie peut être pré- ou post-synaptique, lié à la dynamique du cytosquelette, mais aussi, comme vu précédemment, lié à des phénomènes de traduction et de transduction au niveau de la synapse (van Bokhoven, 2011).

Pendant l'adolescence, les connexions neuronales au sein du cerveau se mettent en place par la formation et l'élimination de synapses. Cette régulation dynamique des synapses est importante pour les phénomènes d'apprentissage est de mémorisation mais aussi pour les fonctions cognitives assurées par le cerveau adulte. (Vaillend, Poirier, & Laroche, 2008) En réponse aux stimuli, les épines dendritiques sont sujettes à de rapides changements morphologiques et structuraux qui viennent s'ajouter aux mécanismes responsables de la plasticité synaptique. Les protéines impliquées dans cette plasticité sont essentiellement des protéines :

- d'adhésion qui s'assemblent et se désassemblent au niveau de la fente synaptique
- de remodelage du cytosquelette d'actine
- de trafic membranaire des récepteurs au niveau de la synapse.

Les gènes de DI ont des fonctions liées plus ou moins directement à ce processus cellulaire. Plus généralement, les gènes de DI codent pour des protéines impliquées dans (Piton et al., 2013; van Bokhoven, 2011):

29

- la gestion du pool de vésicules présynaptiques contenant généralement des neurotransmetteurs prêts à être relargués dans la fente synaptique
- la synthèse et l'adressage des récepteurs et canaux ioniques postsynaptiques, qui régulent l'ouverture et la fermeture des canaux ioniques, générateur d'un potentiel d'action post-synaptique
- La gestion de la densité post-synaptique, dépendante des messagers secondaires relargués par les récepteurs post-synaptiques, et la synthèse locale de protéines dépendante de l'activité.
- L'activation de voies moléculaires contrôlant l'expression des gènes neuronaux
- La réorganisation du cytosquelette

Dans tous les cas de DI, une de ces voies est perturbée. (Fig. 2)



<u>Figure 2</u>: Les voies synaptiques générales dont les protéines actrices sont impliquées dans la DI.

Schéma d'une synapse comprenant l'axone du neurone pré-synaptique et l'épine dendritique du neurone post-synaptique. D'après (van Bokhoven, 2011).

1.3.3) Dérégulation d'une voie impliquée dans synaptopathie : la voie des RhoGTPases

Les changements morphologiques des épines dendritiques sont très rapides et très plastiques, ne durant parfois que quelques secondes. Ils sont la conséquence du remodelage constant du cytosquelette, en particulier des filaments d'actine et de la dynamique des microtubules au niveau de la synapse. Les RhoGTPases sont des protéines clés de cette dynamique. Le rôle des RhoGTPases dans le développement neuronal et leur implication dans la DI sont étudiés depuis de nombreuses années et la littérature à ce sujet est très riche. Elles régulent la mort ou la survie neuronale (suivant la voie impliquée et le type de neurone), la croissance des neurites, la polarisation neuronale (croissance et orientation des axones), la dynamique de croissance du cône axonal, et la morphogénèse des épines dendritiques (Benarroch, 2007; Govek, Newey, & Van Aelst, 2005; Linseman & Loucks, 2008; Newey, Velamoor, Govek, & Van Aelst, 2005; Ramakers, 2002; van Galen & Ramakers, 2005). Parmi les gènes de DILX, plusieurs codent directement pour des protéines régulatrices des RhoGTPases (OPHN1, PAK3, aPIX or ARGHEF6, ARHGEF9, RhoGEF, etc.) (Ba, van der Raadt, & Nadif Kasri, 2013; Kutsche et al., 2000; Pengelly et al., 2016). Les principales RhoGTPases étudiées sont RhoA, Rac1 et Cdc42. L'implication de la voie des RhoGTPases impliquant leurs régulateurs positifs ou négatifs et leurs effecteurs concerne toutes les formes de DI (Govek et al., 2005; van Galen & Ramakers, 2005):

- DILX non syndromique : par exemple PAK3 (effecteur de Rac1 et Cdc42), IL1RAPL (voieRhoA)
- DILX syndromique : par exemple OCRL (régulateur de RhoA) pour le syndrome de Lowe, FMRP (voie de Rac1) pour le syndrome du X fragile, etc.
- DI autosomique syndromique : par exemple LMK1 (effecteur de Rac1 et RhoA) pour le syndrome de Williams, etc.

Les problèmes de structure cérébrale ne sont pas toujours reportés chez des patients atteints de DILX associée à un défaut de régulation des RhoGTPases car les données en imagerie ne sont parfois pas accessibles ou n'ont pas été faites. En revanche, les modèles animaux permettent de faire ce type d'observations et de tester des molécules modulant la voie des RhoTPases pour traiter les déficits liés à la DI (problèmes de structure du réseau neuronal, une plasticité synaptique altérée et une balance excitation/inhibition déséquilibrée). Parmi tous ces phénomènes, une voie de signalisation semble émerger et représenterait une voie commune à un grand nombre de DILX, la voie des RhoGTPases (Fig. 3). Plus récemment, des données d'interactomes obtenues à partir de synaptosomes montrent que la fonction « régulation de RhoGTPases » semble être au centre de ces interactions, rendant cette voie de signalisation particulièrement intéressante pour traiter un grand nombre de DI (De Filippis et al., 2012; Tejada-Simon, 2015; Vissers et al., 2016; Zamboni et al., 2018).



Figure 3: Les gènes de DI et les mécanismes de plasticité et de transmission synaptique. Les protéines de DI sont représentées en rouge. La voie des RhoGTPases ressort comme l'une des voies centrales, régulatrice du relargage pré-synaptique des neurotransmetteurs, et de la plasticité synaptique par la régulation du cytosquelette. D'après (Vaillend et al., 2008).

Depuis de nombreuses années, les recherches tendent à identifier des voies de signalisations communes aux DILX, même si les protéines impliquées présentent différentes fonctions et que le rapprochement entre les différents cas de DI n'est pas toujours évident, en particulier pour les cas de DILX non syndromiques (Pandey & Mittal, 2004; Renieri et al., 2005). Les gènes des voies des RhoGTPAses impliqués dans la DILX représentent la plus importante catégorie fonctionnelle, ce qui laisserait penser que ces gènes seraient impliqués dans le développement et l'évolution de l'intelligence et la cognition humaine. De plus, une activation pharmacologique des RhoGTPases chez la souris aurait amélioré leurs capacités d'apprentissage et de mémorisation (Crespi, Summers, & Dorus, 2010). De nombreux régulateurs de RhoGTPases sont impliqués dans la DI, régulant leurs formes active GTP ou inactive GDP. Les phénotypes de DI associés à ces gènes sont variables (syndrome de Lowe, DI non syndromique) régulant différentes RhoGTPases dans des voies de signalisation qui leur sont propres. Les RhoGTPases Rac, Cdc42 et RhoA et leurs effecteurs sont impliqués dans diverses DI.

Les gènes de DI, et plus particulièrement de DILX, codent majoritairement pour des protéines synaptiques. Or, une des caractéristiques communes à toutes les DI réside dans des défauts synaptiques, appelée synaptopathie. Beaucoup de gènes de DILX sont plus ou moins directement impliqués dans la régulation des RhoGTPases, de petites protéines jouant un rôle clé dans le remodelage du cytosquelette. Les RhoGTPases régulent divers processus cellulaires neuronaux essentiels pour la mise en place du réseau neuronal et son fonctionnement, primordiaux pour le développement des facultés cognitives. Leur implication dans la DI d'un point de vue neuronal est largement étudiée.

Chapitre 2 : Les RhoGTPases

2.1) Présentation de la famille des RhoGTPases

2.1.1) Histoire de la découverte des RhoGTPases : des fonctions cellulaires fortement conservées chez diverses espèces

Les premiers membres de la famille des RhoGTPases ont été identifiés en 1985. Parmi la famille des GTPases, les sous familles les plus étudiées sont la famille Rho comprenant RhoA (et ses homologues RhoB et RhoC), mais aussi Rac et Cdc42 (Thumkeo, Watanabe, & Narumiya, 2013). Rho a en fait été découvert par hasard chez l'aplysie (mollusque marin gastéropode, ressemblant à une limace), identifié comme un homologue de Ras (d'où son nom « Rho » pour « Ras <u>ho</u>molog »). Comme Ras, Rho est une protéine dont l'action repose sur des phénomènes d'hydrolyse d'un groupement GTP (guanine triphosphate) en GDP (guanine diphosphate) couplée à la transduction de signaux moléculaires dans la cellule. Depuis une dizaine d'années, la compréhension du rôle des RhoGTPases a rapidement évolué. De nombreuses RhoGTPases (une vingtaine) ont été découvertes chez les Eucaryotes, régulant un grand nombre de processus cellulaires impliquant :

- la dynamique du cytosquelette, par la polymérisation des fibres de stress d'actine et l'activation de la myosine II, pour la formation des protrusions, des lamellipodes et des filipodes (notamment dans l'axogénèse et le guidage axonal)
- l'activité oxydase de NADPH, en régulant le complexe enzymatique NOX impliqué dans les processus de phagocytose
- la migration et la formation des point focaux d'adhésion
- l'adhésion inter-cellulaire et avec la matrice extra-cellulaire
- la polarisation
- le trafic membranaire
- la dynamique des microtubules
- la transcription

Cependant, cette petite protéine de 21 kDa ne possède pas de site d'interaction directe avec les molécules d'actine, c'est pour cela qu'à l'époque, l'existence de différents effecteurs a été rapidement suggéré, ses fonctions étant réalisées grâce à l'activation de ceux-ci. Des réponses cellulaires RhoGTPases spécifiques lui ont été ensuite attribuées. A la fin des années 90, plusieurs effecteurs de la famille des Rho étaient connus (rhotekin, rhodophilin, citron, ROCK ou Rho-kinase, et mDia) et ont été caractérisés *in vitro*. (Thumkeo et al., 2013) Ces effecteurs n'ont pas été découverts facilement car la plupart ne possèdent pas de domaine conservé. Ils ont pu être identifiés par plusieurs expériences de chromatographie d'affinité, de purification de protéines et de criblage par double hybride dans la levure. Plus de 100 cibles des RhoGTPases ont pu être identifiées, dont une grosse proportion sont des protéines kinases. (Hall, 2012) Les régulateurs de RhoGTPases ont ensuite été progressivement découverts par l'alliance de différentes approches biochimiques et génétiques. (Fig. 4)



<u>Figure 4:</u> Faits marquants dans la découverte et l'étude des RhoGTPases entre 1985 et 2014. D'après (Narumiya & Thumkeo, 2018)

Plusieurs techniques ont permis d'étudier le rôle cellulaire plus en détails grâce à :

- l'utilisation de formes mutées actives ou inactives de Rho, Rac et Cdc42
- l'existence de toxines bactériennes capables d'altérer leur activité (Ridley, 2012)
 comme l'enzyme botulinique C3 (C3 bot), un inhibiteur spécifique de Rho, qui a permis
 de mettre en évidence le rôle de Rho dans la cytokinèse. (Thumkeo et al., 2013)
- l'interférence spécifique par ARN
- l'utilisation de modèles génétiquement modifiés in vivo

La grande diversité des régulateurs et effecteurs des RhoGTPases rend l'identification et la compréhension de leurs mécanismes cellulaires associés très complexes.

Les processus cellulaires dépendants des RhoGTPases observés principalement *in vitro* et *ex vivo* ont pu être décrits et/ou validés que récemment *in vivo*, grâce notamment à la mise en place de KO murins. Dans cette partie, nous nous concentrerons sur le rôle de Rac1, de Cdc42, de RhoA, et de son effecteur ROCK, l'un des effecteurs les plus caractérisés de Rho (Thumkeo et al., 2013), chez les Mammifères dans les tissus cérébraux. Les RhoGTPases sont une famille de protéines très conservées présentes chez toutes les espèces Eucaryotes. Il a même été démontré que la protéine Cdc42 retrouvée chez les Mammifères pouvait *in vitro* sauver, ou du moins en partie, la délétion de Cdc42 chez la levure S. cerevisiae (Hall, 2012). Au cours des années, sept RhoGTPases ont été découvertes chez la levure S. cerevisiae, 9 chez la drosophile D. melanogaster, 23 chez les Mammifères (Thumkeo et al., 2013). Depuis leur découverte chez l'aplysie, 18 gènes de protéines similaires à Rho ont été identifiés chez l'Homme (Hall, 2012).

2.1.2) Des fonctions clés dès le développement embryonnaire

Les RhoGTPases sont importantes pour divers processus cellulaires durant le développement au cours de l'embryogénèse et la morphogénèse des différents tissus (polarisation et migration). Il n'est donc pas surprenant que les formes KO constitutives de RhoA, Rac ou Cdc42 soient létales. Il a donc fallu utiliser d'autres modèles *in vitro* ou des modèles génétiques *in vivo* pour étudier la fonction des RhoGTPases en ciblant leurs régulateurs, leurs effecteurs, ou seulement l'un de leurs isoformes, ou en les délétant de manière tissu-spécifique. Les RhoGTPases sont impliquées dans l'organogénèse de la peau, des tissus dérivant de la tubulogénèse (intestins, pancréas, poumons, reins), du SNC, et des membres (Duquette & Lamarche-Vane, 2014). Pour mieux comprendre le rôle des RhoGTPases dans la mise en place du réseau neuronal, il faut savoir que les stades embryonnaires clés du SNC sont des étapes où la division cellulaire, la migration et l'adhésion cellulaire sont mis au premier plan. Ces étapes se décrivent de la manière suivante :

- la gastrulation et la génération de l'ectoderme
- la neurulation, c'est-à-dire la formation du tube neurale par l'enroulement et la fusion sur la ligne dorsale de l'ectoderme
- la division cellulaire symétrique ou asymétrique, la migration et la différenciation des cellules neuro-épithéliales en neurones ou en cellules gliales à l'âge adulte
- la formation de la glie radiaire chaperonne de la migration radiaire des neurones excitateurs vers le cortex
- la migration tangentielle des interneurones par rapport au cortex, en suivant des stimuli extra-cellulaires
- la croissance de l'axone dont la pointe riche en actine est appelée cône de croissance
- la synaptogénèse, une fois que l'axone a atteint sa structure de destination et son neurone cible.

La littérature nous montre que RhoA, Rac1 et/ou Cdc42 sont impliqués dans l'une ou plusieurs de ces étapes. Par exemple Rac1 est impliqué dans la neurulation à un stade embryonnaire très précoce ou dans la formation de la plaque corticale faisant intervenir la polarisation de la glie radiaire, la migration des neurones corticaux et la migration tangentielle des neurones (Cappello, 2013; Ito, Morishita, Tabata, & Nagata, 2014). La délétion tissu-spécifique d'une de ces RhoGTPases dans le cerveau peut avoir des conséquences très variées (Tableau 1).

tissues/type cellulaire	RhoGTPase délétée		
	Rac1	Cdc42	RhoA
surface de l'ectoderme	exencéphaly et spina-bifida		
cerveau antérieur précoce	phénotype embryonnaire léthal, microcéphalie, petits bulbes olfactifs, défauts au niveau du corps calleux, désorganisation des couches corticales et des fibres de la glie radiaire, augmentation de l'apoptose	amincissement du neuro- épithélium, holoprosencéphalie, problème de polarité cellulaire, défauts des jonctions adhérentes	élargissement du cerveau antérieur, protrusions de type exencéphalie, problèmes de polarité cellulaire
télencéphalon dorsal	absence de commissures antérieures et de corps calleux	augmentation de l'épaisseur du cortex, défauts de polarité et de jonctions adhérentes, augmentation de progéniteurs intermédiaires et neurogénèse précoce	cortex hétéroptopique, défauts de glie radiaire (déstabilisation de l'actine et des microtubules)
progéniteurs des éminences ganglionnaires médianes (EGM)	phénotype post natal (3 semaines) léthal, diminution des interneurones corticaux des EGM		
interneurones post-mitotiques des EGM	phénotype post-natal précoce léthal, développement du néocortex normal		
progéniteurs des EGM de la zone subventriculaire	migration neuronale normales	pas de phénotype	migration normale des interneurones corticaux
progéniteurs du CNS	phénotype post-natal (3 semaines) létal, les souris à P10 ont des tremblements, un élargissement des ventricules, un rétrécissement du cervelet, augmentation de l'apoptose	phénotype post natal (P0) létal, perturbation des voies axonales, élargissement du cône de croissance avec une actine diffuse et absence de filipodes	
neurones post- mitotiques	phénotype post natal (2 semaines) létal, épilepsie, diminution des interneurones inhibiteurs corticaux		
zone ventriculaire des EGM		défaut de migration des interneurones corticaux, désorganisation du neuroépithélium, perte des jonctions adhérentes, défaut de survie des neurones moteurs	défaut de migration des interneurones corticaux, désorganisation du neuroépithélium, perte des jonctions adhérentes, défaut de survie des neurones moteurs

<u>Tableau 1</u>: Conséquence de la perte tissu-spécifique des RhoGTPases dans le développement du SNC.

D'après (Duquette & Lamarche-Vane, 2014)

Chez la souris, la perte conditionnelle de RhoA dans le neuroépithélium frontal et préfrontal a pour conséquence une perte des jonctions adhérentes ainsi que des projections interneuronales aberrantes au niveau de la moelle épinière. La perte conditionnelle de RhoA dans les progéniteurs neuronaux détériore la fonction des cellules gliales radiaires, nécessaires à la migration des progéniteurs neuronaux excitateurs dans le cortex, à cause d'une perte de stabilité des microtubules et un défaut au niveau du cytosquelette d'actine. La surexpression de RhoA amène aussi à des défauts apicaux et basaux de la glie radiaire, mettant en valeur un effet de concentration plus que d'absence de l'activité de RhoA. Une absence de RhoA dans la glie radiaire a les mêmes conséquences qu'une mutation dans un gène de protéine membranaire d'adhésion de type B1-intégrine, suggérant un rôle de RhoA dans l'adhésion (Thumkeo et al., 2013).

ROCK, est connu aujourd'hui pour réguler la contraction actine /myosine par la phosphorylation de MLC2 (Myosin Light Chain 2) et de la phosphatase de la myosine. Grâce au Y-27632, un inhibiteur spécifique de ROCK, ROCK est l'effecteur de Rho le plus étudié et par conséquent le plus connu. Grâce à cet inhibiteur, les rôles de ROCK *in vitro* ont pu être montrés dans : la migration cellulaire, l'adhésion inter-cellulaire, la transcription, l'apoptose, et plus particulièrement dans l'axonogénèse des neurones. *In vivo*, le Y-27632 a pour conséquence un défaut de formation du tube neural chez l'embryon du poulet. Chez des KO des isoformes de ROCK (I et II chez le Mammifères), il a pu aussi être montré que ROCK I jouait un rôle dans la cicatrisation de la moelle épinière (Thumkeo et al., 2013). Il est également possible de déléter l'expression des effecteurs des RhoGTPases de manière tissu-spécifique ou non pour mieux comprendre leurs mécanismes d'action. Par exemple, la délétion des homologues ROCK I et ROCK II montrent que cet effecteur de RhoA est primordial pour la formation et le développement de l'embryon entre les stades blastocyte et E8 chez la souris (Thumkeo et al., 2013).

Les RhoGTPases sont de petites protéines G très conservées à travers les espèces. Les plus étudiées et les plus connues sont RhoA, Rac1 et Cdc42. Le rôle des RhoGTPases est essentiel dès le développement embryonnaire mais aussi une fois que l'organisme est mis en place, en particulier dans le SNC. Leurs fonctions cellulaires sont diverses mais reposent principalement sur le remodelage du cytosquelette cellulaire, traduisant une certaine plasticité morphologique.

2.2) Leurs divers rôles cellulaires, plasticité morphologique

2.2.1) Réorganisation du cytosquelette

L'une des premières fonctions cellulaires identifiées des RhoGTPases est leur rôle dans la formation des fibres de stress d'actine associées aux points focaux d'adhésion (Fig. 5) (Hall, 1998).



Figure 5: Effet de l'activation de Rho, Rac et Cdc42 dans des fibroblastes préalablement privés de sérum sur le réassemblage du cytosquelette d'actine (gauche) et la formation des points focaux d'adhésion marqués par la vinculine (droite).

D'après (Hall, 1998)

C'est vers la fin des années 90 qu'on a observé le rôle des RhoGTPases dans la régulation du cytosquelette et des changements morphologiques de la cellule en réponse à des stimuli extérieurs. Les RhoGTPases constitueraient en fait le lien entre les récepteurs à la surface de la cellule et l'assemblage du cytosquelette d'actine. Cette réorganisation du cytosquelette est essentielle et commune à tous les types cellulaires car elle est impliquée dans (Etienne-Manneville & Hall, 2002; Sit & Manser, 2011) :

- l'internalisation de la membrane (endocytose) qui est un mécanisme clé de

compensation de l'exocytose afin de conserver une surface cellulaire constante et homogène

- le maintien de l'actine corticale qui soutient la membrane et ses récepteurs transmembranaires à la surface de la cellule

- la formation des protrusions (filipodes et lamellipodes)

- les zones d'encrage avec le milieu extracellulaire grâce à de gros complexes protéiques transmembranaires, les points focaux d'adhésion

- la rétraction du corps cellulaire lors de la migration

- la polarité cellulaire par changement morphologique et repositionnement du centrosome et du noyau

Les RhoGTPases et leurs effecteurs sont impliqués dans ces différents mécanismes moléculaires qui régulent la réorganisation des molécules d'actine, à savoir l'initiation et l'embranchement des fibres d'actine lors de la polymérisation, la contraction actine/myosine, et la dépolymérisation des fibres de stress (Sit & Manser, 2011). Ces phénomènes ont été beaucoup mieux étudiés et caractérisés pour les protéines RhoA, Rac et Cdc42 (Fig. 6).



<u>Figure 6:</u> les RhoGTPases et leurs effecteurs dans la dynamique du cytosquelette d'actine et des microtubules.

D'après (Govek et al., 2005)

Outre les approches génétiques ciblant les GTPases Rho, leur régulateurs ou leurs effecteurs, le développement d'inhibiteurs de kinases en cancérologie a permis également d'étudier les différentes voies de signalisation moléculaires et leurs effets biologiques.

L'utilisation d'un inhibiteur spécifique de ROCK (ou Rho-kinase), le Y-27632 a permis de décrire son rôle dans la contraction actine/myosine par la phosphorylation de chaine légère de la myosine (MLC), mais aussi dans d'autres mécanismes. Le Y-27632 inhibe la formation des fibres de stress et la rétraction des neurites dans les neuroblastomes. Ceci a permis de mettre en lumière également l'inhibition de la dépolymérisation de l'actine par la voie ROCK (Narumiya & Thumkeo, 2018).

2.2.2) Adhésion

Etant donné la diversité des mécanismes d'adhésion, il est important de préciser le type de phénomènes cellulaires dont il s'agit. En effet, l'adhésion d'une cellule sur son substrat en condition basale ou lors de la migration, ou l'adhésion inter-cellulaire n'impliquent pas les mêmes mécanismes moléculaires. Nous traiterons ici les mécanismes d'adhésion basale et inter-cellulaire. Les mécanismes d'adhésion lors de la migration seront davantage traités dans la partie suivante.

Avant d'aborder le rôle des RhoGTPases dans les mécanismes d'adhésion, il faut savoir qu'il existe plusieurs protéines d'adhésion impliquées dans différents types de fonction d'adhésion :

- les jonctions adhérentes formées par les cadhérines qui interagissent avec le cytosquelette cortical d'actine

- les desmosomes formés par les desmogléines et les desmocollines, qui interagissent avec les filaments intermédiaires (autres composants du cytosquelette)

 Les jonctions serrées formées par les claudines et les occludines qui interagissent avec les filaments d'actine

Même si de nombreuses études impliquent les RhoGTPases dans les phénomènes d'adhésion, il faut noter que leurs rôles et leurs régulations peuvent être radicalement différents suivant le type cellulaire (épithéliale, neuronale, tumorale, etc.) et suivant le modèle d'adhésion (cellules confluentes, sub-confluentes, en suspension, ancrage au milieu extracellulaire, dispersion cellulaire, etc.)

La plupart des connaissances sur les mécanismes moléculaires d'adhésion reposent sur la régulation des RhoGTPases les plus connues. Les premières études à ce sujet révèlent que l'expression d'un mutant dominant négatif ou d'une forme constitutivement active d'une de

ces RhoGTPases a le même impact sur la régulation de l'adhésion, à savoir :

- la perte de la fonction barrière de jonction serrées
- l'inhibition et la perturbation de l'assemblage des différents types de jonctions
- un défaut de localisation des protéines de jonction

Plus précisément, on peut attribuer aux trois RhoGTPases les plus étudiées des fonctions d'adhésion plus spécifique (Citi, Guerrera, Spadaro, & Shah, 2014; McCormack, Welsh, & Braga, 2013; Menke & Giehl, 2012; Ratheesh, Priya, & Yap, 2013) :

Rac : - est impliqué dans la morphogénèse des épithélia

- régule le recrutement des filaments d'actine au niveau des récepteurs cadhérines et l'assemblage des jonctions serrées

- initie (avec Cdc42) la formation des jonctions lors de la polymérisation des filaments d'actine des lamellipodes et filipodes

RhoA : - régule la formation des complexes protéiques impliqués dans l'adhésion

- régule la contraction actine/myosine qui génère une tension et donc une adhésion plus ou moins forte

 - est impliqué dans la mise en place et la maintenance des jonctions adhérentes et de jonctions serrées

Cdc42 : - est impliqué dans l'adhésion médiée par la cadhérine (suivant le type cellulaire)

- régule la polarité (apico-basale) et définie la position des complexes protéiques d'adhésion

- joue un rôle dans l'assemblage des jonctions adhérentes.

2.2.3) Migration

Deux types de migrations cellulaires sont possibles in vitro et in vivo :

- la migration cellulaire individuelle, où la cellule est détachée de ses cellules voisines et migre seule, nécessaire par exemple à la migration de cellules matures vers leur tissu cible
- la migration collective, où des cellules confluentes migrent toutes en même temps et où le maintien des interactions inter-cellulaires a un rôle primordial, nécessaire à la cohésion des épithélia

Les éléments clés de la migration cellulaire impliquent :

- La réorganisation du cytosquelette : au front de migration, les cellules étendent des protrusions qu'on appelle lamellipodes ou filipodes riches en fibre d'actine.
- la formation et le maintien des jonctions adhérentes : les interactions intercellulaires assurées par les jonctions adhérentes mais aussi les jonctions serrées et les desmosomes assurent la cohésion du tapis cellulaire en migration
- la contraction actine/myosine à l'avant et à l'arrière de la cellule
- l'assemblage et le désassemblage des structures d'actine
- le renouvèlement des points focaux d'adhésion, gros complexes protéiques faisant le lien entre le cytosquelette de la cellule et la matrice extra-cellulaire

Tous ces phénomènes nécessaires à la migration sont régulés par différentes voies de signalisation, et en particulier la voie des RhoGTPases. La migration cellulaire requiert l'intervention de plusieurs membres de la famille des RhoGTPases, faisant intervenir en particulier RhoA, Rac1 et Cdc42. Ils doivent être régulés de manière spatio-temporelle pour assurer une réponse adéquate aux stimuli extérieurs (De Pascalis & Etienne-Manneville, 2017; Lawson & Ridley, 2018).

Il a été possible par l'étude des régulateurs des RhoGTPases lors de la migration de décrire l'activation des RhoGTPases dans la cellule en mouvement suivant le timing de migration, leurs positions dans la cellule et la ou les protéine(s) régulatrice(s) avec qui elles interagissent.

Rac1 est impliqué dans le renouvèlement et le recrutement des points focaux d'adhésion, la formation des invadopodia, les phénomènes de chimiotaxie, la contraction de la cellule, la polarité planaire de la cellule, l'adhésion inter-cellulaire, le recrutement de la membrane plasmique. RhoA régule la réorganisation du cytosquelette, la formation des fibres de stress associé au points focaux d'adhésion, les phénomènes de chimiotaxie. Cdc42 joue un rôle dans la polarisation au front de migration où il est recruté au moment de la migration, et la migration tridimensionnelle dans une matrice de collagène

Les RhoGTPases ont des rôles clés dans des phénomènes cellulaires impliquant un remodelage important du cytosquelette de la cellule. Elles font le lien entre les stimuli extracellulaires et la réponse intracellulaire. Lors du mouvement cellulaire les activations et les inactivations spatio-temporelles des RhoGTPases se font de manière subtile, en particulier lors de la migration cellulaire où la régulation de l'adhésion, la réorganisation du cytosquelette et la polarité sont des éléments clés régulés finement par les RhoGTPases.

2.3) Leur régulation

2.3.1) Stimulations chimiques et biophysiques

Les RhoGTPases sont activées via l'activation de récepteurs cellulaires par des stimuli extracellulaires comme par exemple des facteurs de croissance, des cytokines ou des hormones. Des études visant à traiter des pathologies liées aux RhoGTPases ont permis d'identifier un grand nombre de molécules capables d'inhiber l'activité des RhoGTPases ou leur cibles de manière plus ou moins ciblée (Y. Lin & Zheng, 2015; Palsuledesai et al., 2018) :

par l'inhibition de l'activation de RhoA, Rac et Cdc42 : par exemple Rhosin, NSC23766,
 CASIN bloquent respectivement leur site de liaison avec leur activateurs, les facteurs d'échange du GTP/GDP (RhoGEFs)

par l'inhibition de leur effecteurs : par exemple le Fasudil ou le Y27632 pour ROCK,
 K252 pour PAK (effecteur de Rac et Cdc42)

Elles peuvent également être activées par des stimuli mécaniques et biophysiques induits principalement par la matrice extracellulaire. L'activation des RhoGTPases par des stimuli extérieurs est primordiale pour assurer une réponse adaptée de la cellule à son milieu extracellulaire (MEC). Les deux facteurs physiques de la matrice extracellulaire à prendre en compte sont la rigidité et la topographie. La rigidité est importante *in vivo* car elle détermine l'intégrité et la délimitation du tissu concerné. La topographie, suivant si elle est anisotrope ou isotrope, joue un rôle dans la polarité, la morphologie et la différenciation de la cellule. Ainsi les processus cellulaires modulés par des effets mécaniques alliant contractibilité cellulaire et formation des points focaux d'adhésion sont la migration, la prolifération et la différenciation cellulaire. Nous nous pencherons ici sur la migration cellulaire.

Il a été montré que la vitesse de migration dépendait de la rigidité de la MEC. Cette vitesse n'augmente pas de façon linéaire avec la rigidité mais il existe une rigidité optimale en-dessous de laquelle les forces de traction ne sont pas assez forte pour enclencher la migration, et audessus de laquelle le désassemblage des points focaux d'adhésion au front de migration stabilisés par la rigidité de la matrice extracellulaire est plus lent. On appelle ce phénomène la durotaxie. Il a été également montré que la topographie du MEC jouait un rôle sur le chemin de migration de la cellule. En effet, un milieu anisotropique a tendance à favoriser la migration de la cellule en ligne droite, tandis qu'un milieu isotrope avait tendance à inhiber ou ralentir la migration de la cellule. La cellule interagit avec la topographie de son environnement grâce à la formation de filipodes. Si le filipode n'est plus en contact avec le MEC car la topographie est trop irrégulière et espacée, alors la formation du point focal d'adhésion ne peut pas se faire et la migration est stoppée. Les phénomènes de réponses de la cellule à son MEC sont des processus régulés par les RhoGTPases. Par exemple la formation du filipode et la stabilisation des points focaux d'adhésion sont régulées par Rac1, tandis que les phénomènes de tension et de contractibilité sont plutôt régulés par RhoA. La manière dont les RhoGTPases régulent les réponses cellulaires à des stimuli mécaniques est encore mal connu mais leur implication est bien réelle. Par exemple l'activation de FAK, faisant partie du complexe protéique des point focaux d'adhésion, par l'interaction entre les intégrines et la MEC peut activer la voie RhoA/ROCK/MLC impliquée dans la contraction cellulaire (Fig. 7) (Hoon, Tan, & Koh, 2016).





D'après (Hoon et al., 2016)

Plusieurs études montrent notamment que l'activation de RhoA et Rac est régulée par des stress mécaniques. De plus, l'inactivation de RhoA et de ses effecteurs comme ROCK perturbe la réorientation des fibres de stress sous des contraintes d'étirement. Rac1 est impliqué dans

la réponse induite par des forces mécaniques des cellules endothéliales. Tous ces résultats montrent que les RhoGTPases jouent un rôle crucial dans la transduction des signaux mécaniques. Les régulateurs des RhoGTPases, les Rho-GEFs (Rho-guanine nucleotide exchange factors), qui activent les RhoGTPases, et les Rho-GAPs (Rho-GTPase activating proteins), qui inactivent les RhoGTPases sont également impliqués dans le remodelage du cytosquelette lors de réponses à des stimuli mécaniques. (Fig. 8) Par exemple :

- Vav2 et GEF-H1 sont impliqués dans l'activation de RhoA induite par des étirements

- GEF-H1 et Larg sont impliqués dans l'activation de RhoA induite par des forces de tensions

- PIX-1 et DOCK180 sont impliqués dans l'activation de Rac induit par des forces mécaniques

- p190RhoGAP est impliqué dans l'inhibition de RhoA et le remodelage du cytosquelette d'actine lors de contraintes de cisaillement

- FilGAP est impliqué dans l'inhibition de Rac dans la méchanoprotection



Figure 8: Représentation schématique de l'activation de RhoA par des forces mécaniques. Les récepteurs d'adhésion comme les intégrines transduisent une déformation induite par des contraintes mécaniques. Le changement de conformation des protéines membranaires permet une activation des régulateurs de RhoA. D'après (Marjoram, Lessey, & Burridge, 2014)

2.3.2) Activation et inhibition des RhoGTPases lors de la migration cellulaire

Initialement, l'hypothèse *in vitro* était que la migration deux dimensionnelle (2D) de cellules mésenchymateuses (migration collective) impliquait la formation de protrusions riches en actine à l'avant par Rac, la contraction actine/myosine à l'arrière par RhoA, ainsi qu'une mise en place de la polarité par chimiotaxie ou stimulation mécanique nécessitant l'intervention de Cdc42. Cependant, l'utilisation de technologies de plus en plus sophistiquées pour étudier l'activation des RhoGTPases pendant la migration, et une meilleure connaissance des différents types de migration selon le type cellulaire et l'environnement ont permis d'enrichir la compréhension de rôle de la famille Rho dans la migration, ces observations ne se restreignant pas seulement aux conditions 2D *in vitro*. L'idée prépondérante qui persiste est que l'activation des différentes RhoGTPases pendant la migration doit être régulée de manière fine et spatio-temporelle, et qu'une même Rho peut activer des mécanismes moléculaires différents suivant sa position à l'avant ou à l'arrière de la cellule en migration (Hall, 2012).

La littérature concernant la régulation des RhoGTPases et des voies de signalisation activées par leurs effecteurs de manière spatio-temporelle lors des différents types de migration (cellule isolée, migration collective, 2D et 3D, etc.) est très riche. Les voies de signalisation sont souvent très complexes car elles font intervenir un grand nombre d'acteurs moléculaires, différents ou non, suivant le type cellulaire et les conditions de migration (MEC, stimuli moléculaires et mécaniques, etc.) (Labouesse, 2004).

Ce que l'on peut remarquer de manière intéressante, est que les RhoGTPases sont activées différemment selon les contraintes mécaniques appliquées sur la membrane de la cellule et que justement ces contraintes mécaniques sont différentes lors de la migration sur les côtés, à l'avant ou à l'arrière de la cellule. Cela expliquerait en partie comment les RhoGTPases sont activées spatio-temporellement lors de la migration pour que le changement de morphologie de la cellule et son mouvement soient adaptés à son environnement. (Fig. 9) (De Pascalis & Etienne-Manneville, 2017; Devreotes & Horwitz, 2015; Lawson & Burridge, 2014; Murali & Rajalingam, 2014; Plutoni, Bazellières, & Gauthier-Rouvière, 2016; Schmitz, Govek, Böttner, & Van Aelst, 2000; Spiering & Hodgson, 2011)



<u>Figure 9:</u> Localisation des zones d'action des RhoGTPases (A) et des différentes contraintes mécaniques sur des cellules en migration (B).

D'après (De Pascalis & Etienne-Manneville, 2017)

2.3.3) GDI, GEF et GAP

Il semblerait que l'activation spatio-temporelle des RhoGTPases comme vu précédemment lors de la migration cellulaire serait en grande partie mise en place et régulée par les différentes RhoGAP et RhoGEF (Fritz & Pertz, 2016; Olson, 2018).

Le passage de la forme active à inactive de la RhoGTPase, et réciproquement, peut se faire

seule mais le complexe avec une RhoGEF ou une RhoGAP catalyse ce changement de conformation. Pour certaines RhoGTPases, le passage de la forme active ancrée à la membrane à la forme inactive soluble dans le cytosol fait intervenir les GDIs (guanine dissociation inhibitors) qui stabilisent la forme inactive dans le cytosol. (Fig. 10) (Cherfils & Zeghouf, 2013).



Figure 10: Schéma représentatif de l'activation, l'inactivation et la stabilisation de la forme inactive soluble des RhoGTPases par RhoGEF, RHoGAP et RhoGDI respectivement. D'après (Cherfils & Zeghouf, 2013)

Les RhoGDI ne jouent pas à proprement parler un rôle d'activation ou d'inibition des RhoGTPases comme les RhoGEF et les RhoGAP. Les RhoGDI n'interviennent pas seulement en tant que stabilisateurs des RhoGTPases inactivées dans le cytosol mais sont aussi impliqués dans les voies d'activation des RhoGTPAses. Ils pourraient les réguler et les cibler de manière spatio-temporelle dans la cellule (Dovas & Couchman, 2005). En effet, même si les RhoGDI ne semblent pas être impliqués dans réorganisation du cytosquelette d'actine régulée par Rac1

et Cdc42 (Gandhi et al., 2004; Gibson et al., 2004), leur capacité à se lier aux RhoGTPases est nécessaire à la transformation cellulaire des fibroblastes, c'est-à-dire leur aptitude à se multiplier et à former des colonies, dépendante de l'activation de Cdc42. L'inhibition de la transformation cellulaire liée à la perte de fonctions d'une RhoGDI est également associée à un mauvais adressage de Cdc42 aux différents compartiments subcellulaires (Q. Lin, Fuji, Yang, & Cerione, 2003). Aussi, certaines RhoGDI sont capables de former des complexes avec les RhoGTPases et leurs effecteurs, permettant une translocation des RhoGTPases avec leurs effecteurs et l'initiation rapide d'une voie de signalisation spécifique dépendante des RhoGTPAses. Par exemple, le complexe cytosolique RhoGDIα/Rac1/PAK est adressé à la membrane après stimulation (ajout de sérum dans le milieu) où le duo Rac1/PAK est impliqué dans la formation des protrusions (Hansen & Nelson, 2001). Enfin, le relargage des RhoGTPases par les RhoGDI serait régulé par des domaines membranaires spécifiques. C'est le cas par exemple de Rac qui serait relargué localement par les RhoGDI à la membrane de manière dépendante à la stimulation de l'intégrine (Pozo et al., 2002).

Comme vu précédemment les RhoGTPases sont activées par les RhoGEF et inactivées par les RhoGAP. Les RhoGAP activent la fonction intrinsèque GTPase des protéines de la famille Rho qui se retrouve alors sous leur forme inactive GDP. Les RhoGEF favorisent la forme active des RhoGTPases par le remplacement du GDP en GTP. La régulation des RhoGTPases mais aussi des RhoGAP et RhoGEF eux-mêmes peut être altérée par d'autres phénomènes posttranslationnels comme la phosphorylation, la sumoylation ou l'ubiquitination qui peuvent changer leur stabilité, leur activité et leur localisation. (Hodge & Ridley, 2016) Les RhoGAP et RhoGEF ont été identifiées au début des années 90, et depuis entre 50 et 77 protéines comprenant un domaine RhoGAP et 83 comprenant un domaine RhoGEF ont été identifiées dans le génome humain pour une vingtaine de RhoGTPases. Les gènes codant pour les RhoGAP sont répartis dans tout le génome et non rassemblés sur un ou quelques chromosomes. Dans toutes les espèces, le nombre de RhoGAP connus surpasse celui des RhoGTPases. Ceci pourrait s'expliquer de plusieurs manières dont les plus probables sont que les RhoGAP inactivent une voie de signalisation des RhoGTPases qui leur est spécifique, ou que les RhoGAP agissent de manière tissu-spécifique. Il est difficile de déterminer si les RhoGAP ont des cibles RhoGTPases privilégiées, d'abord parce que la plupart des études se concentrent principalement sur 3 RhoGTPases RhoA, Cdc42 et Rac1, ensuite parce qu'il a été vu pour certaines protéines que leurs cibles spécifiques pouvaient changer selon le type d'étude *in vitro* ou *in vivo*. De plus, les protéines contenant un domaine RhoGAP possèdent également d'autres sites actifs pouvant intervenir en amont ou en aval de la voie de signalisation. Enfin, les RhoGAP peuvent également interagir avec les effecteurs et d'autres régulateurs des RhoGTPases. Par exemple, la phosphorylation de FilGAP par ROCK stimule l'activation de RacGAP *in vivo* (Peck, Douglas, Wu, & Burbelo, 2002; Tcherkezian & Lamarche-Vane, 2007; Vigil, Cherfils, Rossman, & Der, 2010).

2.3.4) Un exemple de déficience intellectuelle impliquant une RhoGAP : le modèle Oligophrénine-1

Le gène Oligophrénine-1 est un gène de DILX identifié chez l'Homme. Il a été découvert pour la première fois par Billuart et al. en 1998 chez une patiente présentant une DI modérée due à une translocation autosomale du chromosome X (Billuart et al., 1998). Depuis, de nombreux cas familiaux de DILX avec une perte de fonction d'OPHN1 ont été reportés et le phénotype des différents patients décrits (Al-Owain et al., 2011; Bedeschi et al., 2008; Bergmann et al., 2003; Billuart et al., 2000; Madrigal, Rodríguez-Revenga, Badenas, Sánchez, & Milà, 2008; Menten et al., 2007; Moortgat et al., 2018; Pirozzi et al., 2011; Rocas et al., 2013; Schwartz et al., 2018; Tentler et al., 1999; Wieland et al., 2007; Zanni et al., 2005). Au début considérée comme une DI non syndromique, la DI liée à OPHN1 s'est en fait révélée être une DI syndromique associée à un élargissement des ventricules, une hypoplasie cérébelleuse, et d'autres paramètres cliniques comme de l'épilepsie, des strabismes et une dysmorphie faciale (Moortgat et al., 2018). Ce gène placé sur le locus Xq12 et composé de 25 exons code pour une protéine d'environ 92 kD possédant plusieurs domaines, dont un domaine RhoGAP. Il s'agit d'une protéine ubiquitaire exprimée chez l'Homme dès le développement embryonnaire (Barresi et al., 2014) et pendant l'âge adulte, et plus particulièrement au niveau du SNC. Oligophrénine-1 est une protéine neuronale, pré- et post-synaptique. Elle possède plusieurs partenaires moléculaires. Elle peut interagir via son domaine BAR avec la protéine Homer importante dans les phénomènes d'endocytose, via son domaine RhoGAP inactiver les RhoGTPases (à priori sans affinité différente entre RhoA, Rac1 ou Cdc42), via son domaine Cter riche en proline interagir avec les protéines impliquées dans l'endocytose médiée par la clathrine et avec les filaments d'actine avec lesquels elle interagit directement. (Fig. 11)



Figure 11: Représentation schématique des différents domaines d'Oligophrénine-1 et ses différents partenaires moléculaires.

D'après (Fauchereau et al., 2003)

OPHN1 est également exprimée chez la souris au cours du développement et à l'âge adulte, et son expression dans le cerveau n'est pas restreinte aux neurones mais existe également dans les cellules gliales et les cellules endothéliales. La souris générée Knock-Out pour ce gène reproduit certaines caractéristiques observées chez l'Homme comme des problèmes de mémoire et d'apprentissage ainsi qu'un élargissement des ventricules mais pas la réduction de la taille du cervelet (Khelfaoui et al., 2007). L'étude de cette souris modèle depuis maintenant plus de 10 ans a permis d'élucider en partie le rôle d'OPHN1, en particulier dans les neurones. Oliophrénine-1 régule la voie cAMP/PKA et la voie RhoA (Fotinos et al., 2015; Khelfaoui et al., 2014; C.-L. Zhang et al., 2017). D'un point de vue cellulaire, elle régule également les phénomènes d'endocytose synaptique et neuroendocrine (Houy et al., 2015; Khelfaoui et al., 2007, 2009; Nakano-Kobayashi, Kasri, Newey, & Van Aelst, 2009; Nakano-Kobayashi, Tai, Nadif Kasri, & Van Aelst, 2014), elle est impliquée dans les phénomènes d'adhésion et de migration (Bleijerveld et al., 2013; Goto et al., 2014), et dans la formation et la maturation des neurones et des épines dendritiques (Allegra et al., 2017; Compagnucci et al., 2016; Govek et al., 2004; Powell et al., 2012), la migration des interneurones inhibiteurs du bulbe olfactif (Redolfi et al., 2016). Des traitements pharmacologiques visant à moduler la voie PKA et RhoA par le Fasudil et/ou le Y-27632 a permis de rétablir au moins partiellement un phénotype normal de comportement, d'endocytose et de maturation du réseau neuronal (Allegra et al., 2017; Khelfaoui et al., 2009; Meziane et al., 2016).

Les RhoGTPases constituent la charnière de transduction des messages extérieurs pour une

réponse cellulaire adaptée. Ces stimuli extérieurs régulent la plupart du temps les RhoGEF et les RhoGAP qui activent et inhibent respectivement les RhoGTPases. Le nombre de RhoGEF et RhoGAP est beaucoup plus important par rapport à celui des RhoGTPases, ce qui sousentend que ces régulateurs agissent de manière tissue-spécifique et régulent des voies précise de signalisation des RhoGTPases qui sont très nombreuses et dont les effecteurs peuvent à leur tour moduler l'activité des RhoGEF et RhoGAP. La régulation et l'activation spatio-temporelle des RhoGTPases jouant un rôle décisif dans le développement du CNS nous laisse penser que l'activité des RhoGAP et des RhoGEF est crucial dans la DI. C'est le cas d'Oligophrénine-1, une protéine ubiquitaire fortement exprimée dans le CNS et possédant un domaine RhoGAP. Cependant, l'implication des RhoGAP et des RhoGEF dans le développement de la DI est connue mais encore mal élucidée. D'autres acteurs cellulaires du CNS autres que les neurones et exprimant les RhoGTPases et leurs RhoGEF ou RhoGAP associés pourraient jouer un rôle dans la physiopathologie de la DI.

2.4) RhoGTPases et DI

2.4.1) Les défauts de développement du cortex et de mise en place du réseau neuronal

Le bon fonctionnement du SNC dépend de la mise en place et de la maintenance du réseau neuronal. Dès le développement embryonnaire les différentes structures du cerveau se mettent en place et font intervenir directement les RhoGTPases. Il est intéressant de remarquer que la voie des RhoGTPases est impliquée dans des malformations du cerveau, en particulier des malformations corticales au cours du développement. En effet, les gènes impliqués dans ce type de pathologie chez l'Homme et chez la souris ont un rôle entre autres dans le remodelage du cytosquelette d'actine. La perte de fonction de Cdc42 cause des hétérotopies périventriculaires, et une malformation congénitale du développement cortical. De plus, l'une des protéines directement impliquées dans cette pathologie (FilamininA) interagit directement avec RhoA. Enfin, des mutations dans le gène *ARGHEF2* cause la même maladie (J. Zhang et al., 2013).

La mise en place du réseau neuronal et la formation des synapses demandent également une

activation spatio-temporelle des RhoGTPases, les plaçant à un point clé du développement, notamment dans la mise en place de la synapse (Tolias, Duman, & Um, 2011). Les neurones génèrent un axone capable de créer des connections avec de nombreux autres neurones cibles, parfois dans une structure différente du cerveau. La ramification à partir de l'axone principal est essentielle pour assurer cette connectivité complexe au cours du développement mais aussi au cours de la cicatrisation lorsque le tissu nerveux est lésé, où la plasticité et le remodelage du réseau sont mis en jeu. La littérature variée concernant l'implication des RhoGTPases dans la mise en place du réseau neuronale met en valeur leurs rôles dans (Martin-Vilchez et al., 2017; Spillane & Gallo, 2014) :

- la formation des filipodes et la progression du cône de croissance axonal,
- la ramification de l'axone
- l'arborisation dendritique : le neurone est composé d'un corps cellulaires et de plusieurs prolongements à partir de ce corps cellulaire, l'axone étant le principal axe de la cellule.
- Le développement du cône de croissance au bout de l'axone
- Le guidage axonal
- La morphogénèse de l'épine post-synaptique sous-jacente à la transmission du message excitateur
- La survie et la mort neuronale (Stankiewicz & Linseman, 2014)

Il semblerait que les protéines Rho seraient impliquées dans l'extension des neurites, et que Cdc42 et Rac seraient des régulateurs positifs de la croissance des neurites et de la formation des épines par l'assemblage des filaments d'actine formant une protrusion membranaire (Auer, Hausott, & Klimaschewski, 2011). L'axone en croissance peut se ramifier afin de créer plusieurs connexions avec différents autres neurones. Rac et Cdc42 sont impliqués dans la chimio-attraction du cône de croissance. Cdc42 semble être impliqué dans la formation des axones mais pas leur ramification. RhoA et Rac, selon le type de neurone et l'espèce, sont

impliqués dans la régulation négative ou positive de la ramification axonale. RhoA est impliqué dans les phénomènes de rétraction de l'axone en réponse à un stimuli négatif. Cependant, l'idée selon laquelle RhoA médie la répulsion, et Rac1 et Cdc42 promeuvent l'attraction est remise en question (Auer et al., 2011; Spillane & Gallo, 2014).

Le rôle des différentes RhoGTPases n'est pas encore bien élucidé, d'autant plus que les résultats contrastés de la littérature mettent en lumière la complexité du rôle des RhoGTPases dans le mise en place du réseau axonal dépendant (Auer et al., 2011; Spillane & Gallo, 2014):

- de l'espèce (souris, drosophile, poulet, etc.)

- de la structure impliquée
- du type de neurones concernés
- de l'environnement (in vitro vs. in situ)

- de l'activité neuronale, sachant que l'état électrophysiologique des neurones *ex vivo* pourrait réguler l'activation des RhoGTPases.

2.4.2) Des défauts synaptiques

Une fois le réseau neuronal mis en place, le rôle des RhoGTPases reste essentiel au bon fonctionnement de la synapse. Dans le CNS adulte, environ 100 milliards de neurones communiquent au niveau des nombreuses synapses qu'ils forment entre eux. La plupart des synapses excitatrices se forment au niveau des épines dendritiques, de petites protrusions riches en actine. Il a été montré que la formation de ces épines est régulée par les différentes RhoGTPases selon une activité spécifique au stade de développement de la synapse. La dynamique d'interactions actine/myosine est essentielle pour la morphogénèse de l'épine post-synaptique, soit au moment de la formation précoce de l'épine, soit plus tard au moment de sa maturation qui se traduit par une apparence de « champignon ». Rac1 est impliqué dans la formation des précurseurs des épines qui a alors l'apparence d'un filipode, tandis que la balance d'activation de RhoA et Cdc42 est impliquée dans l'élongation de ce précurseur. L'action de Rac1 dans la formation du précurseur de la synapse est régulée par les stimulations

excitatrices associées à une potentialisation à long terme. Enfin, il a été observé que la voie RhoA/ROCK était impliquée dans la maturation de l'épine (Martin-Vilchez et al., 2017). En réponse à des stimuli extérieurs, le remodelage des synapses est important, pouvant se faire de manière très rapide (Duman, Mulherkar, Tu, X Cheng, & Tolias, 2015). Ce remodelage est impliqué dans les processus de plasticité synaptique essentiels à la mise en place de la mémoire et à l'apprentissage. De nombreux autres processus cellulaires sont nécessaires aux fonctions synaptiques impliquant fondamentalement le remodelage du cytosquelette, à savoir le trafic membranaire pré- et post-synaptique, et la translation locale de protéines. Des études ont montré chez le rat la présence des RhoGTPases RhoA, Rac1 et Cdc42 dans le compartiment pré-synaptique. Selon les modèles, il a été montré que Rac1 jouait un rôle dans l'exocytose dépendant de la concentration cytoplasmique en calcium, et que RhoA, Rac1 et Cdc42 étaient impliqués dans la sécrétion déclenchée par des stimuli extérieurs (Ménager & Kaibuchi, 2003). Le rôle des RhoGTPases dans la neurosécrétion n'est pas encore bien élucidé mais plusieurs indices montrent que leur implication dans ce processus est importante (Momboisse et al., 2011). Les rôles des RhoGTPases au niveau de la synapse ont essentiellement été caractérisés par l'étude de leurs protéines régulatrices impliquées dans des cas de DI ou de troubles du spectre autistique. Leurs rôles variés au niveau de la synapse reposent sur la grande variabilité de leurs régulateurs et de leurs effecteurs (Boda, Dubos, & Muller, 2010). Ceci a révélé qu'une mauvaise régulation des RhoGTPases avait des conséquences fondamentales sur les neurones :

- des problèmes de mort cellulaire et survie neuronale (Linseman & Loucks, 2008)
- des problèmes de guidage axonale (chimio-attraction, polarité, polarisation et dépolarisation du cytosquelette d'actine)
- des problèmes de ramification des dendrites et de l'axone
- des problèmes de maturation des épines dendritiques ayant pour conséquence une morphologie inappropriée
- des problèmes de sécrétion pré-synaptique

- des problèmes de recyclage des récepteurs post-synaptiques (notamment via la voie RhoA/ROCK)
- des problèmes d'élimination de synapses excitatrices (ou « pruning ») par dépolymérisation de l'actine, essentielle à une balance équilibrée entre les transmissions excitatrices/inhibitrices

Plus généralement les voies de signalisation médiées par d'autres GTPases telle que Ras (SynGAP)et Rab (RabGDI) sont également impliquées dans des synaptopathies et des approches thérapeutiques visant à rétablir la balance entre formes actives et inactives des GTPases pourraient être envisagées.

2.4.3) Modulation des voies impliquant les RhoGTPases comme traitement potentiel de la DI

Aujourd'hui, les traitements pharmacologiques de DI chez l'Homme (Trisomie 21 et syndrome X Fragile) n'ont pas montré de résultats concluants. De plus, la spécificité des médicaments connus utilisés pour moduler la voie des RhoGTPases est parfois mal connue ou remise en question. Cependant, des résultats prometteurs dans les modèles de souris nous permettent de penser que la modulation de la voie des RhoGTPases constituent un espoir potentiel de traitements pharmacologiques pouvant traiter un grand nombre de DI. En effet, il existe dans la littérature des travaux montrant une amélioration cellulaire et comportementale des modèles de souris de DI mais aussi des capacités de mémorisation et d'apprentissage plus importante chez les souris sauvages. Des études montrent que l'utilisation du Fasudil, un inhibiteur de ROCK, permet d'améliorer les capacités de mémoire et d'apprentissage des souris âgées de manière dose-dépendante (Huentelman et al., 2009). De plus, l'utilisation du Fasudil sur un modèle de souris de la maladie d'Alzheimer permet d'améliorer leurs capacités de mémorisation (Hou et al., 2012). Même si le modèle de souris de la maladie d'Alzheimer n'est pas à proprement parlé un modèle de souris de DI, il reste tout de même un modèle de problème d'apprentissage dû à des défauts synaptiques. Si l'on se réfère à trois cas de DI très connus et largement étudiés, à savoir le syndrome du X fragile, le syndrome de Rett et la trisomie 21, il est possible d'améliorer le phénotype de leurs souris modèles respectives en modulant la voie des RhoGTPases.

Les problèmes de développement des épines dendritiques ainsi que les problèmes de plasticité synaptique observés chez la souris modèle du X fragile seraient des défauts potentiellement régulés par Rac1. Or, la protéine FMRP responsable du syndrome du X fragile régulerait la synthèse de Rac1. La synthèse est l'activation de Rac1 sont surélevées dans la souris modèle de l'X fragile et l'utilisation d'un inhibiteur de Rac1, le NSC23766 permet de sauver le défaut de plasticité synaptique de LTD (Long Term Depression) (Bongmba, Martinez, Elhardt, Butler, & Tejada-Simon, 2011). De plus, des travaux beaucoup plus récents montrent que l'utilisation du NSC23766 permettait de sauver les défauts de mémorisation conditionnée par la peur, impliquant l'hippocampe, structure spécialisée dans la mémorisation et l'apprentissage (Martinez & Tejada-Simon, 2018).

Les récents travaux de De Filippis sur le syndrome de Rett montrent que la modulation des RhoGTPases permettent de sauver les déficits cognitifs, les défauts de plasticité synaptique, mais aussi les défauts astrocytaires de la souris modèle. D'abord, l'inoculation intra-cérébroventriculaire chez la souris d'une toxine d'Escherichia Coli, la cytotoxic necrotizing factor 1 (CNF1) qui catalyse la désamination d'un résidu glutamine des RhoGTPases, permet d'améliorer le phénotype comportemental à un stade avancé de la maladie, en particulier lors du test de mémorisation conditionnée par la peur ainsi que les phénotypes de plasticité synaptique, et d'atrophie astrocytaire retrouvés dans le modèle Rett. Ensuite, l'utilisation du LP-211, un agoniste sélectif du récepteur 7 à la sérotonine (5-HT7R) pouvant traverser la barrière hémato-encéphalique, joue un rôle sur le niveau d'activation cérébrale des RhoGTPases régulé par 5-HT7R in vivo. Sachant que l'activité de 5-HT7R est impliquée dans les processus de mémorisation dépendants de l'hippocampe, il a été également montré que l'utilisation du LP-211 permettait de retrouver un phénotype normal de mémorisation spatiale à court terme dépendant de l'hippocampe concernant le test de préférence à la nouveauté (novelty preference task) (De Filippis et al., 2012; De Filippis, Romano, & Laviola, 2014; De Filippis et al., 2015).

En ce qui concerne la trisomie 21, il n'existe pas d'étude modulant directement les RhoGTPases pour améliorer le phénotype de DI liée à la trisomie. En revanche, une potentielle voie de signalisation impliquant TTC3 (une protéine codée par un gène située dans la région

63

critique du syndrome de Down positionnée sur le chromosome 21) et RhoA modulerait la différenciation neuronale. Ceci révèle alors une voie de signalisation potentiellement modulable impliquant les RhoGTPases pour améliorer le phénotype neuronal défectueux retrouvé chez les patients trisomiques (Berto et al., 2007).

Les rôles cellulaires des RhoGTPases décrits précédemment ont un impact particulièrement important lors de la mise en place du CNS et pour la plasticité du CNS mature. Ceci implique en particulier la migration neuronale, la croissance et le guidage axonale, la maturation des épines dendritiques, l'arborisation du neurone et les phénomènes pré- et post-synaptiques impliquant un remodelage important du cytosquelette. La modulation de la voie des RhoGTPases pour améliorer les défauts synaptiques et d'apprentissage des modèles de DI montrent des résultats intéressants dans les modèles de souris de DI. Une meilleure connaissance des phénomènes, des molécules et des protéines régulant les RhoGTPases permettraient de trouver de potentiels traitements généraux aux différentes DI.

Chapitre 3 : Les astrocytes, potentiels acteurs dans la DI

3.1) Les astrocytes, cellules gliales partenaires des neurones

3.1.1) Les premières observations historiques

Les astrocytes ont été identifiés pour la première fois en 1846 par Virchow et considérés comme une population homogène ayant une fonction de support pour les neurones. Ce sont les travaux de Ramon y Cajal et Camillo Golgi qui ont permis de mieux les caractériser par la suite (Chaboub & Deneen, 2012). Les techniques de marquages histologiques de l'époque et les dessins de Ramon y Cajal de grande qualité lui ont permis d'émettre des hypothèses sur la physiologie du cerveau. Son travail et ses idées ont aujourd'hui plus d'une centaine d'années mais influencent et inspirent toujours de nombreux scientifiques aujourd'hui (Sotelo, 2003). Les premières observations des astrocytes, qu'il nommait à l'époque « neuroglie », ont fait l'objet de deux publications. L'une en 1897 « Something about the physiological significance of neuroglia » (que l'on pourrait traduire : Quelques idées sur l'importance physiologique de la neuroglie) et l'autre en 1913 "A contribution to the understanding of neuroglia in the human brain" (que l'on pourrait traduire : Contribution à la compréhension de la neuroglie dans le cerveau humain). Contrairement aux idées de l'époque, Ramon y Cajal fut l'un des premiers à émettre l'hypothèse que les astrocytes n'étaient pas de simples cellules de structure : « What could hold these tiny, isolated, flexible, very delicate cells, much more delicate and smaller than the nerve cells ? » (que l'on pourrait traduire: Que pourraient soutenir ces petites cellules isolées, souples et très fragiles, beaucoup plus petites et fragiles que les cellules neuronales ?). Selon lui, les astrocytes étaient des entités qui pouvaient séparer l'activité des différents neurones. Même si cette hypothèse n'a pas été vérifiée, ce fut tout de même l'un des premiers à émettre l'hypothèse d'une possible interaction neurone-astrocyte. Les évolutions techniques (patch-clamp, marquages fluorescents, souris transgéniques et injection de virus, microscopie confocale et multi-photons) ont permis par la suite aux physiologistes d'observer que les astrocytes apportaient un support métabolique et nutritionnel aux neurones, ce qui avait un impact sur les processus de mémorisation à long terme. L'idée que les astrocytes

étaient des cellules principalement passives dans le cerveau venait du fait que ces cellules ne sont pas électriquement actives comme les neurones. En revanche, Cajal fut l'un des premiers à émettre l'hypothèse originale que les astrocytes pouvaient libérer des substances neuroactives pouvant moduler l'activité des neurones: « The gray matter neuroglia would constitute a vast endocrine gland intertwined with neurons and nerve plexus, intended perhaps to produce hormones associated with the brain activity » (que l'on pourrait traduire: La neuroglie de la substance grise pourrait constituer une vaste glande endocrine qui pourrait éventuellement produire des hormones participant à l'activité du cerveau). Cette hypothèse a en effet été validée des années plus tard, les astrocytes pouvant par la libération de gliotransmetteurs réguler le réseau neuronal. Cajal fut également l'un des premiers à émettre l'hypothèse du rôle physiologique des astrocytes dans la régulation de la microcirculation sanguine du cerveau. Ce qui a également été confirmé plus tard, les astrocytes constituant la barrière hémato-encéphalique. Une autre idée intéressante que soulève Ramon y Cajal résidait dans la morphologie astrocytaire: « The human brain cortex differs from that of other animals not only in the huge amount of glandular cells [astrocytes] that contains, but in their smallness and the wealth of the interstitial glial plexus" (que l'on pourrait traduire: Le cerveau humain se démarque de celui des autres animaux, pas seulement par la différences du nombre d'astrocytes qu'il possède, mais aussi par leur finesse et la richesse du plexus interstitiel glial). En effet, on sait aujourd'hui que les astrocytes humains sont beaucoup plus grands et présentent plus de prolongements primaires et de ramifications que dans les autres espèces mammifères. (Fig. 12) De plus, le ratio du nombre d'astrocytes par rapport à celui des neurones augmente selon l'échelle phylogénétique (il est de 0.1 pour les nématodes et de 10 pour les primates), et l'augmentation du volume du cerveau humain lors de l'évolution est beaucoup plus importante que l'augmentation du nombre de neurones. L'idée aujourd'hui est que la complexité morphologique croissante astrocytaire et l'augmentation relative du nombre d'astrocytes a permis une augmentation des capacités cognitives du cerveau humain adulte (Han et al., 2013; Oberheim Bush & Nedergaard, 2017).



<u>Figure 12:</u> Marquage astrocytaire comparant la taille et la complexité d'un astrocyte murin, de primate et humain.

D'après (Oberheim, Goldman, & Nedergaard, 2012).

Les travaux de Ramon y Cajal ont été principalement histologiques et descriptifs, mais ont permis de poser des questions clés et d'émettre des hypothèses novatrices sur le rôle complexe et diversifié des astrocytes.

3.1.2) Une population hétérogène

Les astrocytes représentent chez les Mammifères 20% à 40% des cellules du cerveau (Khakh & Sofroniew, 2015). L'hétérogénéité astrocytaire est connue mais la segmentation des souspopulations astrocytaires n'est pas encore bien définie et sa valeur fonctionnelle pas encore comprise. Aujourd'hui, on sait que les astrocytes diffèrent par :

- Leur morphologie
- Leur origine développementale
- Leurs fonctions
- Leurs propriétés physiologiques

- Leur profil d'expression génétique
- Leurs réponses à la maladie et aux traumatismes cérébraux

En ce qui concerne leur morphologie, des différences ont été observées dès l'époque de Ramon y Cajal avec également les travaux de Camillo Golgi (Fig. 13). Il a été montré plus tard que suivant la région d'origine des cellules précurseurs mis en culture, les astrocytes *in vitro* présentaient une morphologie différente (Bailey & Shipley, 1993; Raff, Abney, Cohen, Lindsay, & Noble, 1983; Yong, Yong, Olivier, Robitaille, & Antel, 1990). De plus, leur capacité à stimuler la croissance de neurites et l'embranchement des neurones *in vitro* était également différente (Denis-Donini, Glowinski, & Prochiantz, 1984; Garcia-Abreu, Moura Neto, Carvalho, & Cavalcante, 1995). Ceci laisse penser que la morphologie différente des astrocytes suivant la zone du cerveau où elles sont observées aurait un impact sur le développement et la fonction des neurones à proximité. La morphologie diversifiée des astrocytes et leurs différentes origines développementales seraient finalement deux phénomènes très liés (Bribián, Figueres-Oñate, Martín-López, & López-Mascaraque, 2016; Y. Zhang & Barres, 2010).



<u>Figure 13:</u> Représentation du marquage de Golgi dans le cervelet humain dessiné par Ramon y Cajal.

Représentation de la glie de Bergmann (b), des astrocytes protoplasmiques lisses (s), des astrocytes velate (v), des astrocytes fibreux (f), de la couche moléculaire (M), de la couche des cellules de Purkinje (P), de la couche des cellules granuleuses (G), et de la matière blanche (W). D'après (Y. Zhang & Barres, 2010).

La morphologie des astrocytes matures chez les Mammifères est très complexe. Des prolongements primaires partant du soma se subdivisent graduellement. Plus l'on s'éloigne du soma, plus ces embranchements sont fins jusqu'à donner un réseau dense de prolongements terminaux extrêmement fins recouvrant des synapses ou les capillaires sanguins. La morphologie des astrocytes a longtemps été étudiée par immunomarquage de la protéine GFAP, qui ne révèle finalement que les prolongements les plus proximaux et sous-évalue considérablement la complexité des embranchements de l'astrocyte. En effet le marquage GFAP, ne représente que 15% du volume astrocytaire réel (Bushong, Martone, Jones, & Ellisman, 2002) (Fig 14).



<u>Figure 14:</u> La morphologie des astrocytes réelle révélée par la transfection d'un plasmide exprimant le marquage membranaire Lck-GFP.

Le marquage membranaire Lck-GFP (en vert) est beaucoup plus complexe que ce que nous révèle le marquage anti-GFAP (en rouge) (Freeman, 2010).

Suivant la région cérébrale, un astrocyte de rongeur peut mesurer de 20 000 à 80 000 µm³ et recouvrir de nombreux neurones, interagissant avec des centaines de dendrites, communiquant avec environ 100 000 synapses. Connaissant la différence de volume et de complexité morphologique entre les rongeurs et les humains, ces chiffres augmentent considérablement chez l'Homme et un astrocyte humain serait capable de recouvrir environ 2 000 000 de synapses (Freeman, 2010). Des techniques de marguage fluorescent des progéniteurs astrocytaires par électroporation in utero ont permis récemment d'identifier plus précisément les différentes populations morphologiques des astrocytes (Bribián et al., 2016). Les astrocytes ont leur propre territoire et ne se chevauchent pas (Bushong et al., 2002). La complexité de la morphologie des astrocytes, le nombre de synapses à proximité et la distance séparant les pieds astrocytaires de ces synapses changent en réponse à une maladie ou un traumatisme cérébral (Sun & Jakobs, 2012). Ceci laisse penser que la morphologie des astrocytes sur le fonctionnement du circuit neuronal dans cette région est importante, et que la morphologie des astrocytes est liée à la fonction qu'ils exercent (Khakh & Sofroniew, 2015; Nimmerjahn & Bergles, 2015). Il a été montré que les synapses à proximité d'un pied astrocytaire avaient tendance à être plus larges que celles sans (Witcher, Kirov, & Harris, 2007). De plus, la mobilité de ces pieds astrocytaires augmente avec l'activité synaptique et serait associée à une augmentation du recouvrement astrocytaire des synapses ainsi qu'à une stabilisation de la synapse (Khakh & Sofroniew, 2015). Tout ceci nous laisse penser que la complexité morphologique de l'astrocyte révèle également une partie de sa fonction, en particulier sur le microcircuit neuronal qu'elle recouvre.

La fonction des astrocytes lève encore aujourd'hui beaucoup de questions. Nous savons tout de même qu'ils sont capables de réguler la concentration du potassium et de neurotransmetteurs extracellulaires au niveau de la synapse, de stimuler la formation des synapses, de constituer la barrière hémato-encéphalique, de répondre à des stimuli neuronaux électriques ou biochimiques par la dynamique de la concentration en calcium cytoplasmique, de communiquer avec les neurones par la libération de glio-transmetteurs, et même de donner naissance à des progéniteurs neuronaux (Götz, Sirko, Beckers, & Irmler, 2015). Cependant, les travaux qui ont été menés jusqu'à aujourd'hui ne nous permettent pas de savoir si toutes ces fonctions sont assurées, ou peuvent être assurées, par tous les astrocytes ou seulement par une sous-population précise.

La physiologie des astrocytes se traduit par un potentiel de membrane basal négatif allant de -85mV à -25mV selon le type d'astrocyte, une résistance d'entrée basse, et un couplage astrocytaire via les jonctions communicantes important (S.-C. Lin & Bergles, 2004; Ransom & Sontheimer, 1992). On remarque que les astrocytes peuvent se démarquer par des propriétés physiologiques, une dynamique du calcium cytoplasmique (Haas et al., 2006; Takata & Hirase, 2008), et une étendue de couplage différentes (Houades, Koulakoff, Ezan, Seif, & Giaume, 2008).

Enfin, il a déjà été remarqué que les profils d'expression génétique des astrocytes étaient différents (Bachoo et al., 2004; Yeh, Lee, Gianino, & Gutmann, 2009). Ceci pose d'ailleurs un problème pour déterminer un marqueur astrocytaire commun à toutes les structures du cerveau. Il n'est pas entièrement spécifique et n'est pas forcément exprimé dans tous les astrocytes. Le meilleur exemple est la protéine GFAP (Glial fibrillary Acidic Protein), que l'on a longtemps considérée comme un marqueur astrocytaire. Cette protéine est exprimée très fortement dans les astrocytes fibreux dans la substance blanche, et très faiblement dans les astrocytes protoplasmiques de la substance grise, et est de plus considérée comme un marqueur astrocytaire aujourd'hui considéré comme le plus « homogène » est le marqueur ALDH1L1 (Tsai et al.,
2012). Les profils d'expression génétique astrocytaires hétérogènes révèlent également des différences de fonctions et de physiologie. De nombreuses protéines ont un impact sur la fonction des astrocytes et montrent une hétérogénéité dans leur expression astrocytaire suivant la région du cerveau (Chaboub & Deneen, 2013; Kimelberg, 2004; Matyash & Kettenmann, 2010; Oberheim et al., 2012). Par exemple:

- Le canal potassique Kir4.1, qui peut faire varier le potentiel de membrane et les courants ioniques astrocytaires (M. L. Olsen, Campbell, & Sontheimer, 2007).
- Les récepteurs au glutamate, qui peuvent faire varier les courants calciques astrocytaires dépendant du glutamate (Müller, Möller, Berger, Schnitzer, & Kettenmann, 1992).
- Les transporteurs du glutamate, qui peuvent faire varier la capture du glutamate extracellulaire et donc l'activité de la synapse voisine (Israel, Schipke, Ohlemeyer, Theodosis, & Kettenmann, 2003; Zhou & Kimelberg, 2001).
- Les connexines 30 et 43, qui peuvent faire varier le couplage des astrocytes et leur communication rapide ainsi que leur coordination via les jonctions communicantes permettant la propagation de vagues calciques lors de l'activité neuronale (Houades et al., 2008).

3.1.3) La notion de synapse tripartite

La notion de synapse tripartite (Fig. 15) a été introduite à la fin des années 90 et s'est développée au début des années 2000 (Allen & Barres, 2009; A. Araque, Parpura, Sanzgiri, & Haydon, 1999).



Figure 15: Interaction neuro-gliale au niveau de la synapse tripartite.

A Dessin de la neuro-glie adulte humaine par Ramon y Cajal. Les labels originaux sont (A) astrocytes recouvrant un neurone pyramidal, (B) astrocytes jumeaux formant un réseau autour d'une cellule, (C) l'un des astrocytes forme un autre réseau, (D-E) cellules montrant des signes « d'autolyse », (F) vaisseau capillaire. B Représentation schématique de la synapse tripartite (entouré par un large cercle en pointillé). Les éléments pré- et post-synaptiques (en bleu) sont entourés par un prolongement astrocytaire (en rouge). Le transfert d'informations se fait par les neurotransmetteurs au niveau de la fente synaptique (points bleus) auxquels les astrocytes sont capables de répondre par une élévation du calcium intracellulaire provoquant la libération de glio-transmetteurs qui modulent l'activité synaptique. D'après (Navarrete & Araque, 2014).

De nombreuses études tendent à montrer un potentiel rôle des astrocytes dans des fonctions régulées par le cerveau comme la mémoire, la vision, la lactation, le sommeil et l'état d'éveil (Ben Achour & Pascual, 2012; Halassa & Haydon, 2010). En effet, la fonction et l'efficacité de la synapse ne repose pas seulement sur les éléments neuronaux pré- et post-synaptiques mais aussi sur le microenvironnement qui englobe la synapse. Parmi les cellules gliales, les astrocytes sont aujourd'hui reconnus comme des cellules particulièrement importantes pour le bon fonctionnement de la synapse. En effet, les observations faites par microscopie

électronique ou par reconstruction tridimensionnelle ont permis d'identifier les astrocytes et leurs interactions avec les neurones (Fig. 16).



(b) (c)

<u>Figure 16:</u> Image de microscopie électronique et reconstruction 3D d'une synapse. Les épines dendritiques sont en jaune, la densité post-synaptique en rouge et le PAP en bleu. D'après (Bernardinelli, Muller, & Nikonenko, 2014).

Du fait de leur proximité avec la synapse, ils sont capables de détecter l'activité neuronale et d'y répondre via des variations de calcium intracellulaires en réponse à des neurotransmetteurs. Au niveau de la synapse, les fonctions identifiées des astrocytes sont variées, ils peuvent (A. Araque, Carmignoto, & Haydon, 2001) :

- Absorber le glutamate au niveau de la synapse, d'une part pour réguler les échanges intra-synaptiques mais aussi les messages inter-synaptiques (Lushnikova, Skibo, Muller, & Nikonenko, 2009).
- Contrôler l'homéostasie ionique et le gradient osmotique par des courants transmembranaires sélectifs de molécules organiques et non organiques (A. Araque et al., 2001).
- Constituer un support métabolique pour les neurones en leur fournissant de l'énergie sous forme de lactate (Patel et al., 2014).
- Moduler la neurotransmission par libération calcium-dépendante de gliotransmetteurs dans la fente synaptique (Agulhon et al., 2012).

La proximité du prolongement astrocytaire péri-synaptique (PAP) avec l'épine dendritique est une composante clé dans les différentes fonctions énoncées. Les PAP sont des structures contenant peu ou pas de mitochondries, de microtubules et de réticulums endoplasmiques. En revanche, elles sont riches en ribosomes, granules de glycogène, filaments d'actine et leurs protéines associées (Ghézali, Dallérac, & Rouach, 2016). Les prolongements astrocytaires ont donc tout l'équipement moléculaire pour capter l'activité neuronale par leurs récepteurs membranaires, et pour remodeler le cytosquelette d'actine en réponse aux stimuli extracellulaires activité-dépendants. Les PAP sont une structure plastique capable de changer leur morphologie en quelques minutes et de changer le recouvrement des éléments pré- et post-synaptiques. Les prolongements fins des astrocytes représentent 70% à 80% de la surface membranaire astrocytaire et le ratio de la surface membranaire par rapport au volume est très important chez les astrocytes. Les PAP entourent les synapses de manière hétérogène, parfois en les recouvrant totalement. Par exemple, la plupart des synapses sont recouvertes par les PAP dans le cervelet, tandis que seulement 29% à 56% des synapses sont recouvertes par des PAP dans le néocortex, et ce de manière hétérogène selon la synapse (Bernardinelli et al., 2014). Le contact avec la synapse est très étroit, parfois même en contact direct avec la partie non-synaptique de l'épine dendritique (Spacek & Harris, 1998). La distribution des PAP dans un domaine astrocytaire donné semble suivre la structure du circuit neuronal compris dans ce domaine. Par exemple dans la région CA1 de l'hippocampe, la polarité astrocytaire acquise lors du développement semble suivre les projections neuronales de cette région (Nixdorf-Bergweiler, Albrecht, & Heinemann, 1994). De plus, les PAP semblent être aussi

plastiques que leurs partenaires neuronaux en réponse à un stimulus extérieur. Par exemple, chez le rongeur au moment de la lactation, les astrocytes au niveau de l'hypothalamus répondent à l'ocytocine en changeant leur structure morphologique en quelques heures, ce qui a pour conséquence un recouvrement moins important des synapses de cette région (Hatton, 2004). De la même manière, les mouvements effectués par les PAP au niveau de l'hippocampe semblent être coordonnés avec l'extension des épines dendritiques, ce qui suggère que les changements morphologiques neuronaux et astrocytaires sont des phénomènes liés au niveau de la synapse. La mémoire est un processus neuronal impliquant des changements morphologiques des synapses mais aussi des astrocytes, et plus particulièrement des PAP (Perez-Alvarez, Navarrete, Covelo, Martin, & Araque, 2014; Theodosis, Poulain, & Oliet, 2008). Les mécanismes et les éléments moteurs de ces changements morphologiques neuro-astrocytaires par des stimuli environnementaux ont été montrés dans plusieurs modèles. Par exemple, les rats élevés dans des conditions environnementales enrichies présentent une augmentation de recouvrement des synapses par les PAP associée à des changements synaptiques fonctionnels et structuraux (Jones & Greenough, 1996). De la même manière, il a aussi été montré que la stimulation chronique des vibrisses induisait également un changement morphologique des PAP dans la région correspondante (Genoud et al., 2006). Enfin, le nombre et la densité des PAP augmentent 8 heures après l'induction d'une LTP au niveau du gyrus denté de l'hippocampe (Bernardinelli et al., 2014). La morphologie plastique des astrocytes serait alors à l'origine en partie du changement morphologique de la synapse, régulant et synchronisant les phénomènes plastiques des circuits neuronaux au sein du cerveau. Certaines études émettent l'hypothèse que la glio-transmission serait à l'origine des mécanismes de régulation de la plasticité synaptique à court et à long terme, et de la redistribution des synapses. Les astrocytes constitueraient en fait les éléments intégrateurs de l'ensemble des messages synaptiques au sein du circuit neuronal et pourraient ainsi synchroniser les événements assurant la fonction neuronale et leur stabilité (De Pittà, Brunel, & Volterra, 2016; Gertrudis Perea & Araque, 2002). Les astrocytes sont des processeurs de l'activité neuronale dans le sens où ils peuvent (Gertrudis Perea, Navarrete, & Araque, 2009; Gertrudis Perea, Sur, & Araque, 2014) :

- recevoir l'information : ils sont capables de réagir électriquement de manière intrinsèque par élévation du calcium cytoplasmique, et ce de manière sélective, étant plus sensible à

certains types d'activité synaptique (Alfonso Araque et al., 2014; Gertrudis Perea & Araque, 2002).

- intégrer et coder cette information : ils répondent de manière non linéaire à l'activité neuronale (G. Perea & Araque, 2005).

 transférer cette information à d'autres cellules : ils libèrent des glio-transmetteurs neuromodulateurs, qui influencent l'information électrique (Santello, Bezzi, & Volterra, 2011; Zorec et al., 2012).

Certaines publications parlent même du concept d'ilots synaptiques (synaptic islands) déterminés par les différents domaines astrocytaires qui constitueraient des « nœuds » de modulation et de coordination synaptique qui n'impacteraient pas le domaine astrocytaire voisin (Halassa, Fellin, Takano, Dong, & Haydon, 2007). Il a d'ailleurs été montré que le blocage de la synthèse de D-sérine dans un seul astrocyte boquait les phénomènes de LTP uniquement dans les synapses comprises dans son domaine et non celles comprises dans les domaines astrocytaires voisins (Papouin, Dunphy, Tolman, Foley, & Haydon, 2017). Même s'il n'est pas entièrement compris, le concept de synapse tripartite est aujourd'hui bien intégré, et on parle même de synapse tetra-partite, en intégrant un quatrième élément, la matrice extracellulaire, sécrétée en partie par les astrocytes (Faissner et al., 2010). Elle serait capable de stocker et diffuser des molécules neuro-actives et de moduler l'activité de certains récepteurs (Dityatev & Rusakov, 2011).

Les astrocytes sont des cellules partenaires des neurones au niveau de la synapse. Les prolongements recouvrant les synapses sont des structures très plastiques. Sachant que les domaines astrocytaires ne se chevauchent pas, il semblerait que la taille et la morphologie astrocytaire reflètent la fonction de l'astrocyte, qui serait différente selon la région cérébrale. Ils reçoivent, intègrent et modulent l'activité des synapses qu'ils recouvrent de manière plus ou moins importante. Le rôle des astrocytes est déterminant pour le bon fonctionnement des synapses, du réseau neuronal et du comportement.

3.2) Plasticité structurale astrocytaire lors de la mise en place des réseaux neuronaux

3.2.1) Formation et élimination des synapses, guidage axonal

Les astrocytes sont impliqués dans la formation du circuit neuronal (Stipursky, Spohr, Sousa, & Gomes, 2012) qui implique (Clarke & Barres, 2013) :

- La formation de synapses immatures entre les axones et les dendrites
- La maturation des synapses qui se traduit par le passage d'une synapse silencieuse à une synapse active
- L'élimination des synapses en excès et l'affinement des connections synaptiques au sein du réseau neuronal

La période de développement où la majorité des synapses sont formées coïncide avec la période de différenciation et de maturation des astrocytes (Fig. 17), entre la deuxième et la troisième semaine post-natale chez la souris. Or, un modèle de souris sans précurseurs d'oligodendrocytes et d'astrocytes ne survit pas après deux semaines post-natales à la suite d'une neuro-dégénération importante (Chung, Allen, & Eroglu, 2015; Li et al., 2012). Ces précurseurs seraient aussi impliqués dans l'organisation de la matrice extracellulaire du cerveau. Or les complexes macromoléculaires des composants de la matrice extracellulaire, ou réseau péri-neuronal, sont impliqués dans la régulation de l'élimination et la formation de synapses, fondamentaux pour les phénomènes de mémoire et d'apprentissage dans le cerveau adulte (Gogolla, Caroni, Lüthi, & Herry, 2009; Pizzorusso et al., 2002). Les composants de la matrice sécrétés par les astrocytes participent également à ces fonctions cellulaires. De plus, des expériences de co-cultures montrent que les molécules libérées par les astrocytes dans le milieu extracellulaire sont nécessaires au maintien, à la maturation et à l'activation des synapses. La purification et l'analyse de la densité post-synaptique chez le mammifère a permis d'identifier des composants de la matrice extracellulaire associés aux synapses, en particulier le brevican, qui est synthétisé par les astrocytes (John et al., 2006). En plus des composants de la matrice, il a été montré que la thrombospondine, secrétée par les astrocytes dans le milieu, induisait la formation et le maintien des synapses, l'augmentation de l'activité pré-synaptique (augmentation de la probabilité de relargage) et post-synaptique (trafic des récepteurs AMPA à la densité post-synaptique) in vitro (Chung, Allen, et al., 2015; Faissner et al., 2010). Les astrocytes expriment donc diverses protéines capables d'inhiber et d'induire la formation des synapses (Allen, 2013). Le rôle des astrocytes dans le développement du CNS implique également la notion de timing. En effet, le milieu conditionné par des astrocytes (MCA) in vitro ne permet pas aux neurones en culture issus de précurseurs des ganglions rétiniens à E17 de former correctement des synapses avec des neurones en culture issu de précurseurs post-natals (Barker, Koch, Reed, Barres, & Ullian, 2008). En revanche, la formation des synapses avec les neurones issus de précurseurs post-natals induite par le MCA se forment correctement avec ceux issus de précurseurs à E19. Cette fenêtre de temps correspond d'ailleurs à l'arrivée des astrocytes dans les ganglions rétiniens. De plus, il a aussi été montré que les astrocytes jouent un rôle important dans le timing de la formation des synapses, les neurones étant incapables de former des synapses s'ils ne sont pas en contact physique avec des astrocytes (Chung, Allen, et al., 2015; Nishida & Okabe, 2007).

Les astrocytes sont également impliqués dans l'élimination des synapses (Chung et al., 2013). L'élimination des synapses est un processus important :

- Pendant le développement : les neurones génèrent un nombre excessif de projections, créant des connections redondantes avec leurs cellules cibles, dont une grande partie est éliminée, les synapses restantes étant renforcées et formant le futur réseau neuronal adulte.
- Pendant la phase adulte : les processus d'apprentissage et de mémoire, à la suite d'une expérience sensorielle par exemple, sont accompagnés de la formation de nouvelles synapses associée à l'élimination d'autres synapses préexistantes.

Les astrocytes contribuent activement à l'élimination des synapses de manière activitédépendante lors du développement et de l'affinage du réseau neuronal (Chung et al., 2013). L'élimination des synapses semble être un processus de plasticité neuronal central dans le remodelage et la réorganisation des neurones lors de l'apprentissage. Les astrocytes sont impliqués indirectement dans la voie de signalisation de phagocytose des synapses par la microglie. En effet, il a été montré que les astrocytes relarguent des molécules permettant l'expression de protéines neuronales qui marqueraient les neurones, éliminés ensuite par la microglie par phagocytose (Stephan, Barres, & Stevens, 2012). Les astrocytes expriment également un grand nombre de gènes impliqués dans le recouvrement et la phagocytose. En particulier la RhoGTPase Rac1, qui contrôle le réarrangement de l'actine nécessaire à la dynamique membranaire lors de la phagocytose, à savoir le recouvrement des débris cellulaires (Kinchen et al., 2005). De façon intéressante, la phagocytose astrocytaire a été observée in vitro et in vivo (al-Ali & al-Hussain, 1996; Kinchen et al., 2005; Park et al., 2007). Les astrocytes ont donc comme la microglie des capacités de phagocytose mais n'utilisent pas les mêmes voies de signalisation. Ils sont capables de recouvrir entièrement et d'éliminer les synapses lors du développement et pendant la phase adulte. Il est aussi intéressant de noter que les mécanismes cellulaires et moléculaires des astrocytes pour pouvoir mettre en place des connections synaptiques appropriées sont des mécanismes très conservés chez les mammifères (Chung, Allen, et al., 2015). Les astrocytes déclenchent des voies de signalisation qui leur sont propres lors de la phagocytose de débris synaptiques de neurones distincts. Il a été montré chez la larve de la Drosophile que les astrocytes sont capables de se « transformer » en cellule phagocytaire englobant un grand nombre de débris neuronaux (Tasdemir-Yilmaz & Freeman, 2014).

Il existe des modèles permettant de déterminer des molécules et les mécanismes moléculaires astrocytaires impliquées dans le guidage axonal (Doucet & Petit, 2002; Hidalgo, 2003). Aussi, le modèle de la drosophile, dont le développement suit un schéma stéréotypé de guidage axonal, de formation et d'élagage des synapses bien précis est un modèle très étudié pour élucider le rôle des astrocytes dans ces processus (J. R. Jacobs, 2000). Le remodelage des neurones est un processus conservé durant l'évolution chez les vertébrés et les invertébrés. Un des phénomènes importants de ce remodelage est l'élagage des axones et des dendrites pour éliminer les connections neuronales aberrantes. Il a été montré que les astrocytes sont les cellules gliales majeures dans l'élagage des axones (Hakim, Yaniv, & Schuldiner, 2014). Les astrocytes sont nombreux dans la matière blanche composée des axones des neurones. Ils y expriment des molécules de la matrice extracellulaire, par exemple les deux glycoprotéines laminine et fibronectine, qui sont impliquées dans le guidage et l'élongation des axones via

contact du cône de croissance avec ces molécules (Reemst, Noctor, Lucassen, & Hol, 2016). Les astrocytes jouent en fait le rôle de cellules cibles intermédiaires lors de la croissance de l'axone en sécrétant des molécules chimio-attractives ou répulsives au cours du développement, et sont impliqués dans la croissance axonale lors d'une lésion du CNS chez les mammifères (Chotard & Salecker, 2004; Learte & Hidalgo, 2007). Les interactions neurogliales sont bidirectionnelles et importantes pour le guidage et l'élagage axonal, mais aussi pour la différenciation et la survie des deux types cellulaires (Parker & Auld, 2004).

L'implication des astrocytes dans la formation et l'élimination des synapse et le guidage axonal est bien établie, cependant les mécanismes moléculaire et cellulaires sous-jacents sont encore mal connus et des questions subsistent aujourd'hui (Bosworth & Allen, 2017):

- Y a-t-il une spécialisation des astrocytes dans une ou plusieurs de ces fonctions ?
- Si tous les astrocytes sont capables de remplir ces fonctions, quels mécanismes régulent la transition fonctionnelle des astrocytes ?
- Quels sont les mécanismes de marquage par les astrocytes des synapses inactives ou « faibles » destinées à être éliminées ?
- Quels sont les mécanismes de libération astrocytaire activité-dépendante de molécules synaptogènes ?

De plus, il est difficile de mettre en place des modèles *in vivo* permettant de présenter simplement les rôles des astrocytes à chaque étape du développement.



<u>Figure 17</u>: Schématisation des interactions neuro-gliales au cours du développement cortical.

D'après (Bosworth & Allen, 2017).

3.2.2) Fonctionnement de la synapse : homéostasie ionique et métabolique de la synapse, gliotransmission

En plus de définir l'architecture du cerveau, les astrocytes sont des éléments primordiaux pour assurer l'homéostasie de la synapse en régulant la concentration des différents ions, le pH, et la concentration et la composition des différents neurotransmetteurs. La glutamine synthétase (GS) est une enzyme exclusivement astrocytaire capable de condenser de l'ammonium et du glutamate de manière ATP-dépendante en glutamine. Le rôle de la GS dans le cycle glutamate/glutamine assure l'homéostasie du glutamate au niveau de la synapse et contrôle la capture du glutamate par les astrocytes. D'ailleurs, des altérations de la protéine GS sont associées à de nombreuses maladies cérébrales comme la schizophrénie ou l'épilepsie. Les astrocytes ont un rôle multi-facette dans l'homéostasie des molécules neuroactives car (C. F. Rose, Verkhratsky, & Parpura, 2013):

- ils empêchent la neurotoxicité de l'ammonium en le capturant
- ils contribuent à l'homéostasie de neurotransmetteurs clés dans la physiologie de la synapse par leur capture (par exemple, 80% du glutamate libéré par le neurone présynaptique est capturé par l'astrocyte, tandis que seulement 20% est capté par les récepteurs post-synaptiques
- ils libèrent les neurotransmetteurs capturés par voie vésiculaire ou non vésiculaire
- ils catabolisent les neuro-transmetteurs en molécules intermédiaires qui sont redirigées aux neurones, où ils seront transformés de nouveau en molécules neuroactives contrôlant la neurotransmission. Par exemple, la synthèse du glutamate prenant principalement source dans la glutamine synthétisée par les astrocytes (Parpura & Verkhratsky, 2012).

En plus de l'homéostasie métabolique, les astrocytes assurent également l'homéostasie ionique en régulant :

 les courants potassiques au niveau de la fente synaptique principalement par le canal potassique Kir4.1. D'ailleurs, la perte de fonction de ce canal est responsable d'un syndrome qui partage beaucoup de similarités avec le syndrome de Rett, en particulier un retard développemental sévère (Michelle L. Olsen et al., 2015; C. R. Rose & Karus, 2013).

 les courants des ions cuivre, les astrocytes constituant un compartiment de stockage du cuivre cérébral, une source de cuivre pour les neurones, une protection contre la neurotoxicité du cuivre (Pal & Prasad, 2014).

Il est évident que le maintien de l'homéostasie synaptique est un élément clé du bon fonctionnement général de la synapse, assuré par les astrocytes. En plus de cela, les astrocytes peuvent également jouer un rôle plus actif au niveau de la transmission neuronale en libérant des molécules neuro-actives par glio-transmission. De nombreuses publications se penchent sur ce phénomène, tentant de le démontrer et de l'expliquer. Le trafic vésiculaire astrocytaire peut certes jouer sur la composition des transporteurs et des récepteurs de la membrane de l'astrocyte à proximité de la synapse pour moduler son action dans l'homéostasie périsynaptique, mais aussi jouer sur la communication inter-cellulaire par libération de gliotransmetteurs auxquels les neurones seraient capables de répondre (Guček, Vardjan, & Zorec, 2012; Potokar et al., 2013; Santello, Calì, & Bezzi, 2012; Q. Zhang & Haydon, 2005). Les gliotransmetteurs seraient de différentes natures (acide aminé, nucléotide, peptide) et seraient synthétisés et stockés par les astrocytes, pour ensuite être libérés dans la fente synaptique par des stimuli physiologiques, déclenchant une réponse neuronale rapide (de l'ordre de la milliseconde). Les défauts de glio-transmission joueraient alors un rôle dans plusieurs pathologies (Parpura & Zorec, 2010). En effet, la glio-transmission serait nécessaire au bon développement du circuit neuronal. La D-sérine, acide aminé sécrété par les astrocytes, joue un rôle important dans le développement des épines dendritiques et dans la mise en place de la LTP (Harada, Kamiya, & Tsuboi, 2015). Plusieurs éléments nous laissent penser que la gliotransmission, la variété des glio-transmetteurs et la diversité de ses actions selon la région du cerveau étudiée jouent un rôle prépondérant dans l'activité du réseau synaptique (Navarrete et al., 2012; Pascual et al., 2005; Takata et al., 2011). Cependant, même si la glio-transmission est considérée comme une cible pharmacologique pour les maladies du SNC (Rossi, Martorana, & Brambilla, 2011), l'implication de la sécrétion de signaux astrocytaires dans la communication inter-neuronale et la plasticité synaptique est aujourd'hui encore très controversée (Alfonso Araque et al., 2014; Sahlender, Savtchouk, & Volterra, 2014; Sloan & Barres, 2014). Les raisons de ce débat résident principalement dans le fait que les principales observations de la glio-transmission ont essentiellement été réalisées *in vitro* et non dans un environnement physiologique, dans des régions du cerveau différentes avec des espèces d'animaux modèles différents et en appliquant différents protocoles (Sahlender et al., 2014). La non-standardisation de l'étude de la glio-transmission n'a pas encore permis de conclure sur cette fonction astrocytaire soumise au débat.

La contribution des astrocytes au bon fonctionnement du réseau neuronal repose sur les interactions physiques avec les neurones pour former le réseau neuronal et les différentes synapses, mais aussi les interactions par diffusion des molécules à proximité de la synapse qui est très dépendante de la distance entre les membranes astrocytaires et neuronales. La plasticité morphologique de l'astrocyte est donc un élément important pour assurer ces fonctions.

3.3) Les astrocytes comme potentiels acteurs dans la DI

3.3.1) Des éléments de réponses en faveur de l'implication des astrocytes dans la DI

L'implication des astrocytes dans différents modèles de DI commence à être sérieusement envisagée et étudiée depuis le début des années 2000 (Dong & Greenough, 2004; Shelley Jacobs, Cheng, & Doering, 2012, p. 201; Sloan & Barres, 2014). Les études qui tendent à démontrer concrètement l'implication des astrocytes dans la DI sont donc relativement récentes. Les DI les plus étudiées de ce point de vue sont le syndrome de Rett, le syndrome du X fragile, et la trisomie 21.

En ce qui concerne le syndrome de Rett, il a été montré que le transcriptome astrocytaire issu des souris déficientes était dérégulé. C'est le cas notamment pour des gènes codant pour des protéines sécrétées qui pourraient avoir une influence négative sur les neurones, en particulier la morphologie de leurs épines (Delépine et al., 2015). *In vivo*, il a pu être observé que la réintroduction conditionnelle astrocytaire (sous le promoteur GFAP) de la protéine impliquée dans le syndrome de Rett, MeCP2, pouvait sauver partiellement les défauts neuronaux de cette pathologie, en particulier les paramètres morphologiques des neurones

(McGann, Lioy, & Mandel, 2012; Molofsky et al., 2012). Très récemment, il a été montré *ex vivo* que la stimulation d'un astrocyte pouvait augmenter l'activité excitatrice d'un neurone voisin (Rakela, Brehm, & Mandel, 2018). Ce phénomène est absent chez les souris déficientes. L'étude d'une souris femelle mosaïque a permis de démontrer que ce phénomène était dépendant de l'expression astrocytaire et non neuronale de MeCP2 (Rakela et al., 2018). Enfin, connaissant l'importance des astrocytes dans l'homéostasie ionique synaptique, il a été montré que le canal potassique Kir4.1 était dérégulé dans les souris modèles Rett (Kahanovitch et al., 2018).

Pour la trisomie 21, la différenciation de cellules souches humaines pluripotentes induites en astrocytes *in vitro* a permis de montrer l'implication des astrocytes humains dans la synaptogénèse et la pathologie neuronale (Araujo et al., 2018). Ces astrocytes montrent une augmentation du niveau moléculaire des espèces réactives de l'oxygène, et une diminution des molécules synaptogènes (Chen et al., 2014). De plus, le milieu conditionné par ce type d'astrocytes est neurotoxique et ne permet pas aux neurones de maturer normalement, comme le ferait un milieu conditionné astrocytaire normal (Chen et al., 2014). La dérégulation des récepteurs au glutamate 5 dans l'hippocampe des patients atteints de trisomie 21, et plus particulièrement dans les astrocytes de la substance blanche, suggère également une potentielle contribution astrocytaire à la pathologie (Iyer et al., 2014).

Concernant le syndrome du X fragile, il a été montré que la protéine impliquée FMRP est exprimée dans des lignées cellulaires gliale et astrocytaire *in vitro* et *in vivo*, qu'elle contribue à la morphologie des épines dendritiques et à la dérégulation du développement synaptique (nombre des synapses) (Cheng, Sourial, & Doering, 2012; S. Jacobs, Cheng, & Doering, 2016; McGann et al., 2012). Ces expériences émettent la possibilité que les défauts neuronaux *in vivo* pourraient être, au moins en partie, liés aux interactions neuro-astrocytaires. Il a été également observé des défauts purement astrocytaires dans les modèles de X fragile, comme par exemple une surexpression de la protéine GFAP sans indice de réactivité, qui se traduirait par une activation de la microglie ou des signes neuro-inflammatoires (Pacey, Guan, Tharmalingam, Thomsen, & Hampson, 2015).

De manière intéressante, d'autres pathologies moins étudiées impliqueraient également les astrocytes dans des problèmes neurodéveloppementaux. La maladie d'Alexander par exemple

est une maladie causée par la perte de fonction de la protéine GFAP qui se traduit par une macrocéphalie, une altération de la substance blanche et un retard développemental chez l'enfant. Cependant, il faut noter que la protéine GFAP est aussi exprimée dans des progéniteurs neuronaux et oligodendrocytaires, impliquant donc d'autres types cellulaires que les astrocytes. De la même manière, certaines Rasopathies se traduisant par un retard de développement neurocognitif, sont à l'origine d'une altération du timing de la gliogénèse. Ceci soulève la possibilité qu'un dysfonctionnement dans le développement des astrocytes contribuerait au handicap mental (Molofsky et al., 2012).

Pour résumer, la plupart des pathologies neurodéveloppementales (syndrome de Rett, syndrome du X fragile, trisomie 21, etc.) montrent des problèmes neuronaux qui se traduisent par une arborisation anormale des dendrites, un nombre anormal de synapses, un problème de maturation des épines dendritiques. Il a été montré *in vitro* que ces défauts pouvaient être supprimés par co-culture des neurones déficients avec des astrocytes normaux (Shelley Jacobs, Nathwani, & Doering, 2010; Torres, Garcia, Tang, & Busciglio, 2018; Williams et al., 2014). Ces expériences *in vitro* suggèrent le rôle critique des astrocytes dans ces pathologies. De plus, le sauvetage partiel des défauts neuronaux dans plusieurs modèles de DI par la culture de neurones anormaux dans un milieu conditionné par des astrocytes normaux, montrent que le contact direct cellulaire n'est pas forcément requis pour voir les effets bénéfiques des astrocytes non-pathologiques (Shelley Jacobs & Doering, 2010). Les modèles *in vivo* des gènes impliqués dans les DI et les modèles de KO conditionnels permettront à l'avenir de mieux comprendre l'implication des astrocytes dans la pathologie et d'offrir de potentielles cibles thérapeutiques.

Un autre élément intéressant qui nous permet de pencher en faveur d'une contribution des astrocytes dans la DI est la fonction des astrocytes dans l'apprentissage et la cognition. En effet, plusieurs indices désignent les astrocytes comme des candidats cellulaires important dans les phénomènes de mémoire. Par la coordination et le couplage des synapses et des neurones qu'ils recouvrent, ils pourraient vraisemblablement moduler et consolider la mémoire (Fields et al., 2014). De plus, une technique de transplantation d'astrocytes humains (plus grands et plus ramifiés) chez la souris a permis de montrer que ces astrocytes augmentait les capacités d'apprentissage en comparaison avec le reste de la portée non transplantée (Han

et al., 2013; Y. Zhang & Barres, 2013). Ces résultats nous permettent de penser que les astrocytes seraient peut-être le type cellulaire à l'origine de la cognition humaine.

3.3.2) Astrocytes et RhoGTPases

Le rôle des RhoGTPases dans les astrocytes est connu, plusieurs études à ce sujet ont été publiées. Une expérience de cicatrisation gliale *in vitro* (wound healing assay) a permis dans un premier temps d'étudier le rôle et la localisation de Cdc42 lors de la migration astrocytaire. Il a été démontré que l'activation de Cdc42 par l'intégrine contrôlait la polarisation astrocytaire au front de migration. L'utilisation d'une technique permettant d'exprimer Cdc42 couplé à une protéine fluorescente GFP a permis de mieux connaitre la localisation de cette RhoGTPase dans la cellule. Cdc42 est localisé dans l'astrocyte au niveau du front de migration, dans certaines régions de contact intercellulaire, et au niveau des vésicules de différentes tailles qui restent immobiles dans les astrocytes confluents et qui sont très dynamiques et se dirigent vers le front de migration dans les astrocytes en migration (Etienne-Manneville, 2006; Osmani, Peglion, Chavrier, & Etienne-Manneville, 2010).

Il a ensuite été observé que RhoA régulait la morphologie et la migration astrocytaire *in vitro* (Höltje et al., 2005). En effet, par une approche pharmacologique, en utilisant un inhibiteur de RhoA (C3bot) et un inhibiteur de ROCK (Y-27632), il a été démontré que RhoA régulait négativement la croissance des prolongements astrocytaires et la migration en réponse à une blessure. En condition basale *in vitro*, les astrocytes ont une forme polygonale. Traités avec le C3bot, ils présentent une élongation et une ramification plus importante de leurs prolongements, c'est la stellation (Fig. 18).



Figure 18: Induction de la stellation des astrocytes in vitro par l'inhibition de RhoA.

L'immunomarquage de la GFAP permet de quantifier ce phénomène. D'après (Höltje et al., 2005).

De la même manière, un traitement des astrocytes avec le Y-27632 en condition basale et au cours d'une expérience de cicatrisation gliale *in vitro* montre une stellation réversible et une accélération de la migration astrocytaire (Fig. 19). Il faut aussi noter que l'influence de ces traitements (C3bot et Y-27632) ne joue pas exclusivement sur RhoA, mais ont aussi des effets indirects ou non sur les autres RhoGTPases comme Rac1 ou Cdc42 (Racchetti, D'Alessandro, & Meldolesi, 2012).



<u>Figure 19:</u> Augmentation de la migration astrocytaire *in vitro* par l'inhibition de la voie RhoA/ROCK.

Le marquage DAPI (en bleu) et GFAP (en rouge) montre une augmentation de la croissance des prolongements des astrocytes en migration vers la région lésée.

Il a également été montré que les RhoGTPases jouaient un rôle sur les fonctions purement astrocytaires. En effet, l'injection intracérébrale de CNF1, qui active les RhoGTPases, améliore la transmission et la plasticité synaptique et renforce les capacités d'apprentissage et de mémoire (Diana et al., 2007). *In vitro*, les neurones cultivés sur des astrocytes, préalablement traités avec CNF1, présentent une arborisation dendritique beaucoup plus abondante formant un réseau beaucoup plus dense. Ceci montre *in vitro* le rôle de l'activation des RhoGTPases astrocytaires sur la maturation neuronale (Malchiodi-Albedi et al., 2012). Une expérience *in vitro* alliant la technologie FRET (Förster resonance energy transfer) et FLIM (Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy), a permis d'observer par fluorescence en temps réel l'augmentation du calcium cytosolique et l'activation des RhoGTPases RhoA et Cdc42 (Nakahata, Nabekura, & Murakoshi, 2016). Il a été notamment été montré que l'augmentation transitoire du calcium cytosolique induite par l'ATP extracellulaire était suivi par une augmentation de l'activation de RhoA et Cdc42 à long terme. L'activation de RhoA est calciumdépendante car activée lors de la phase précoce (moins d'une minute) après l'augmentation du calcium, contrairement à Cdc42 (Fig. 20). Ainsi, les RhoGTPases pourraient jouer un rôle dans la réponse astrocytaire à long terme à la suite d'un pic calcique transitoire (Nakahata et al., 2016, p. 201).



<u>Figure 20:</u> Dynamique du calcium cytosolique et de l'activation de RhoA et Cdc42 dans un astrocyte *in vitro*.

Images représentatives prises à différents intervalles de temps de la fluorescence de G-GECO (Ca²⁺) avec mRuby2 (RhoA ou Cdc42) et la durée de vie de cette fluorescence (troisième ligne) dans un astrocyte *in vitro* après stimulation à 100 μM d'ATP. D'après (Nakahata et al., 2016).

In vivo, il est plus difficile d'identifier le rôle purement astrocytaire des RhoGTPases car elles sont exprimées dans toutes les cellules du cerveau. En revanche, il existe tout de même des études utilisant des KO conditionnels de certains régulateurs des RhoGTPases, ou des activations optogénétiques des RhoGTPases spécifiques des astrocytes qui permettent de mettre en lumière le rôle des RhoGTPases dans les astrocytes *in vivo*. Par exemple, il a été montré grâce à un KO conditionnel de STAT3, que la régulation de RhoA par cette protéine était importante lors de la cicatrisation gliale au niveau de la moelle épinière (Renault-Mihara et al., 2017). En effet, la suractivation de RhoA est accompagnée *in vivo* d'un défaut astrocytaire au niveau de la cicatrice. Les astrocytes activés au niveau de la lésion ne présentent pas d'élongation des prolongements, ni d'orientation préférentielle vers la région lésée (Renault-Mihara et al., 2017). Une autre étude utilisant une technologie d'optogénétique a permis d'activer sélectivement Rac1 dans les astrocytes de l'hippocampe dorsal, ce qui a eu pour conséquence de bloquer l'apprentissage des souris lors de test de mémoire associative. L'activation astrocytaire de Rac1 dans l'hippocampe bloquerait notamment les mécanismes de la mémoire contextuelle (Guo, Liao, Tao, Wang, & Ma, 2017).

3.3.3) Expression astrocytaire d'Oligophrénine-1 dans les astrocytes

Comme nous l'avons vu, le modèle Oligophrénine-1 a été caractérisé d'un point de vue neuronal. Si l'on envisage le rôle des astrocytes dans la DI et le rôle des RhoGTPases dans les astrocytes, il semble pertinent d'envisager une fonction astrocytaire dans le développement de la DI liée à OPHN1. La fonction astrocytaire d'OPHN1 reste aujourd'hui inconnue. Nous savons en revanche que cette protéine est exprimée dans des cellules gliales murines en culture (Fauchereau et al., 2003), mais aussi que, chez l'Homme et la souris, *OPHN1/Ophn1* est plus fortement transcrit dans les astrocytes par rapport aux neurones (Fig. 21).



Ophn1 - Mus musculus



<u>Figure 21:</u>Transcription d'OPHN1 dans les différents types cellulaires du CNS chez la souris et chez l'Homme.

L'unité est exprimée en Fragments Per Kilobase of transcript sequence per Million mapped fragments (FPKM). D'après (Y. Zhang et al., 2014).

Connaissant le rôle de la plasticité morphologique astrocytaire dans le développement et le fonctionnement du réseau neuronal, et sachant que les RhoGTPases jouent un rôle important dans la morphologie et la plasticité astrocytaire, le rôle des astrocytes pourrait être important dans le développement de la DI liée à la protéine RhoGAP OPHN1. Au vu de ces arguments, nous tenterons de répondre à cette problématique en observant si OPHN1 a un rôle dans les astrocytes lié à la voie des RhoGTPases.

Objectifs de la thèse

La contribution astrocytaire à la DI, une maladie neurodéveloppementale, est une question aujourd'hui ouverte et interroge le rôle des astrocytes dans le fonctionnement général du cerveau. Pour explorer cette question, nous nous intéressons dans cette étude au modèle murin de DI KO pour OPHN1 qui a été largement caractérisé d'un point de vue neuronal. L'objectif est de savoir si la protéine RhoGAP OPHN1 responsable de la DI joue un rôle dans les astrocytes. Pour cela nous avons investigué si la perte de fonction d'OPHN1 *in vitro* dans les astrocytes et *in vivo* avait une conséquence sur des caractères cellulaires régulés par les RhoGTPases, à savoir la morphologie, l'adhésion et la migration. Pour identifier l'action cellulaire-autonome de la perte d'OPHN1 dans les astrocytes *in vivo*, nous tentons également de mettre en place et de caractériser un KO conditionnel astrocytaire.

RESULTATS

Chapitre 1 : Le rôle d'Oligophrénine-1 dans les astrocytes

1.1) Modulation de la morphologie, adhésion et migration des astrocytes déficients en OPHN1

1.1.1) Résumé

La DI liée à la protéine RhoGAP OPHN1 a été étudiée pendant de nombreuses années d'un point de vue neuronal. En effet, des défauts neuronaux ont été décrits dans différents modèles murins in vitro ou in vivo, et humains in vitro par la différenciation de cellules souches induites pluripotentes différenciées en neurones. Les principaux défauts décrits sont des défauts de mise en place du réseau neuronal, de maturation des épines dendritiques, de trafic membranaire et de migration des interneurones inhibiteurs du bulbe olfactif. Ces défauts, qui sont en partie régulés par la voie des RhoGTPases, ont pu être dans plusieurs cas sauvés entièrement ou plus ou moins partiellement in vitro et in vivo par la modulation pharmacologique de la voie RhoA/ROCK, notamment grâce au Fasudil. Cependant, les mécanismes sous-jacents à la pathologie ne sont pas entièrement élucidés et certains phénotypes ne sont pas restaurés pharmacologiquement, ce qui suggère que d'autres mécanismes doivent être identifiés afin de définir d'autres potentielles cibles thérapeutiques. Les astrocytes sont des cellules cérébrales impliquées dans les processus de mise en place du réseau neuronal, de maturation et du maintien du réseau synaptique. Il semble donc pertinent d'envisager ce type cellulaire comme potentiel partenaire des neurones dans le développement de la DI. Le lien entre les rôles cellulaires et la plasticité morphologique astrocytaires semble être étroit. La proximité physique entre les fins prolongements astrocytaires et la synapse semblerait jouer un rôle fondamental dans le fonctionnement neuronal. Connaissant le rôle des RhoGTPases, petites protéines G impliquées dans la régulation du cytosquelette, dans la morphologie et la plasticité morphologique, notamment la migration, il parait vraisemblable qu'OPHN1 régulerait des voies RhoGTPases-dépendantes également dans les astrocytes. Pour répondre à cette question, nous avons utilisé le modèle

murin de DI invalidé pour le gène Ophn1. Nous avons d'abord pu démontrer qu'OPHN1 était exprimé in vitro dans les astrocytes murins et humains, ce qui montre que ce modèle est pertinent pour étudier les mécanismes d'action d'OPHN1 dans les astrocytes murins in vitro. Nous avons également pu observer que la phosphorylation de MLC, cible directe de la voie RhoA/ROCK, était plus importante dans les astrocytes déficients en OPHN1 in vitro et que l'augmentation physiologique du niveau de phosphorylation de MLC2 au cours de la migration était supprimée dans les astrocytes KO. Nous avons aussi identifié un retard de migration astrocytaire in vitro en l'absence d'OPHN1, retard qui était supprimé par un traitement d'un inhibiteur de ROCK, le Y-27632. Au front de migration, nous avons pu remarquer que les astrocytes invalidés pour OPHN1 présentaient un défaut morphologique se traduisant par une diminution de l'aire de la cellule et de l'axe majeur de l'astrocyte qui s'allonge au cours de la migration. Enfin, in vivo, un modèle de cicatrisation gliale au niveau du cortex nous a permis d'observer un défaut morphologique des astrocytes recrutés dans la zone distale de la lésion, à savoir une ramification plus simple. Aussi, la zone proximale de la cicatrice, où les astrocytes projettent leurs prolongements vers la zone lésée, était plus restreinte chez les souris invalidées pour OPHN1. Ces résultats nous permettent de conclure que la protéine RhoGAP OPHN1 liée à la DI a un rôle dans la morphologie et la migration des astrocytes, suggérant une contribution astrocytaire dans le développement de cette pathologie jusqu'à présent décrite comme neuronale.

1.1.2) Article (soumis)

The X-linked mental retardation protein Oligophrenin1 controls astrocyte migration and morphology

Astrocyte alterations in OPHN1 knock-out mice

Laure-Elise Pillet^{1,2,4}, Noémie Cresto¹, Yoann Saillour⁴, A. Bemelmans³, Nathalie Rouach^{1,*,¶} Pierre Billuart^{4,5*,¶}

- Center for Interdisciplinary Research in Biology, Collège de France, CNRS UMR 7241, INSERM U1050, Labex Memolife, PSL Research University, Paris 75005, France.
- (2) Doctoral School N°562, Paris Descartes University, Paris 75006, France
- (3) Commissariat à l'Energie Atomique et aux Energies Alternatives (CEA), Département de la Recherche Fondamentale, Institut de biologie François Jacob, MIRCen, and CNRS UMR 9199, Université Paris-Sud, Neurodegenerative Diseases Laboratory, Fontenay-aux-Roses 92260, France.
- (4) Institut Cochin, INSERM U1016, CNRS UMR8104, Paris Descartes University, 75014, Paris
- (5) Present address :Center of Psychiatry and Neuroscience, INSERM UMR 894, Paris 75014, France

*These authors contributed equally to this work

¹Corresponding authors: Pierre Billuart, pierre.billuart@inserm.fr; Nathalie Rouach, nathalie.rouach@college-de-france.fr

Acknowledgment

We thank Chloé Delépine, who provided us with lysats from hiPSC differentiated in astrocytes *in vitro*, and for her kind help. We also thank Pascal Ezan for his help.

Research was supported by the Jerome-Lejeune Foundation (2015b/FJL1415, <u>https://www.fondationlejeune.org</u>) and by the French National Agency for Research (ANR - 15-CE16-0019-01).

Laure-Elise Pillet is a PhD. Student of the BioSPC doctoral school from the Paris Descartes University (<u>http://ecolesdoctorales.parisdescartes.fr/ed157_eng</u>) and was granted by the Educational Ministry in the frame of a double culture program between Paris 5 and 6 Universities.

Word Count

Total: 7024 Abstract: 144 Introduction: 689 Material and Methods: 1211 Results: 1190 Discussion: 1119 References: 2056 Figure legends: 615

Abstract

Astrocytes are involved in several aspects of neuronal development and properties which are altered in intellectual disability. Oligophrenin1 is a RhoGAP protein implicated in actin cytoskeleton regulation, and whose mutations are associated with X-linked intellectual disability. Oligophrenin1 is expressed in neurons, where its functions have been widely reported at the synapse, as well as in glial cells. However, its roles in astrocytes are still largely unexplored. Using *in vitro and in vivo* models of oligophrenin1 disruption in astrocytes, we found that oligophrenin1 regulates at the molecular level the RhoA/ROCK/MLC2 pathway in astroglial cells. We also showed at the cellular level that oligophrenin1 modulates astrocyte morphology and migration both *in vitro* and *in vivo*, and is involved in glial scar formation. Altogether, these data suggest that OPHN1 deficiency alters not only neuronal but also astrocytic functions, which might contribute to the development of intellectual disability.

Keywords

Intellectual disability, Oligophrenin-1, RhoA GTPase, astrocyte, morphology, migration

Main points:

- Loss of function of the OPHN1 Intellectual disability protein increases RhoA GTPase signaling in astrocytes
- OPHN1 controls glial scar formation in vitro and in vivo

MAIN TEXT

Introduction

Intellectual disability (ID) is a neurodevelopmental disorder establishing before the age of 18 and describing problems in intellectual functioning (IQ below 70) and adaptative behavior including social, conceptual and practical abilities (Milani, Ronzoni, and Esposito 2015). The pathology concerns 1% to 2% of the worldwide population, is often misdiagnosed and involves very high costs for the healthcare system (Salvador-Carulla et al. 2011), pointing to the need to develop new therapeutical approaches for this neurological disease.

The causes of ID are complex and include environmental and genetical origins. The second most frequent form of genetic ID in males, after Down syndrome, results from mutations in a chromosome X-linked gene (Ropers and Hamel 2005). A large fraction of ID genes are coding for proteins involved in synapse function and it appears that the common feature of ID, and more specifically X-linked ID (XLID), is a dysfunction of the synapse (Valnegri, Sala, and Passafaro 2012; Pavlowsky, Chelly, and Billuart 2012; Humeau et al. 2009).

Several identified genes implicated in XLID are involved in the regulation of the RhoGTPases (Zamboni et al. 2018)(Ba, van der Raadt, and Nadif Kasri 2013; Zamboni et al. 2018), which are small GTPase proteins of the Rho family that play a critical role in cytoskeleton remodeling. They regulate different cellular processes such as migration, adhesion and morphology (A. J. Ridley 2001; Etienne-Manneville and Hall 2002; Raftopoulou and Hall 2004). RhoGTPases play an important role in neuronal survival, axon formation and dendritic maturation (Stankiewicz and Linseman 2014; Govek, Newey, and Van Aelst 2005; Auer, Hausott, and Klimaschewski 2011) and their implication in synaptopathy is today largely explored (Newey et al. 2005; Nadif Kasri and Van Aelst 2008; San Martín and Pagani 2014). Oligophrenin (OPHN1) is one of the XLID gene implicated in RhoGTPases regulation through its RhoGAP domain and was first identified in a female patient showing mild ID with a balanced X autosome translocation (Billuart et al. 1998). Different case reports were published through the years describing familial OPHN1 mutations leading to a specific syndromic XLID with cerebellar hypoplasy and ventriculomegaly (Moortgat et al. 2018). OPHN1 knockout (KO) mice are today considered as a mouse model for this pathology as they present a human-like syndromic form of XLID. These mice indeed display an enlargement of ventricles, defects in working and spatial memory as well as social interactions and hyperactivity (Khelfaoui et al. 2007). OPHN1 is an ubiquitous protein expressed at high level in neurons, but also in glial cells during development and adulthood. Its role in different steps of neuronal network maturation is today well established. OPHN1 regulates neurogenesis, dendritic spine maturation, axon guidance and synaptic plasticity (Allegra et al. 2017; Nadif Kasri et al. 2009; Compagnucci et al. 2016; Redolfi et al. 2016; Nakano-Kobayashi et al. 2014).

In vitro and *in vivo* pharmacological treatment targeting the RhoGTPase signaling pathway partly rescue the morphological defects of neurons as well as the behavioural alterations in in OPHN1 models of ID, implying that multiple therapeutic approaches may be combined to improve ID conditions (Allegra et al. 2017; Meziane et al. 2016). The emerging view on the development of neurological diseases is that they involve other brain cells than neurons, and in particular astroglia (Chung et al. 2015; Dallérac and Rouach 2016; Dossi, Vasile, and Rouach 2018). Astrocytes are indeed implicated in neuronal maturation, pruning, synaptic activity and plasticity (Vasile, Dossi, and Rouach 2017; Bosworth and Allen 2017). Moreover, their contribution to different synaptic pathologies such as autism or Down

syndrome was already pointed out (Araujo et al. 2018; Petrelli and Bezzi 2018). Studying the role of OPHN1 in astrocytes could thus permit to better describe the astrocytic contribution to XLID and to understand the other underlying cellular mechanisms of this pathology.

For this purpose, we used Ophn1 deficient mice to study astrocytic morphology and migration *in vitro* and *in vivo*. We found that OPHN1 is expressed in human and murine cultured astrocytes and that Rhoa-associated protein kinase (ROCK) activity, dependent of RhoGTPases activation, was higher in astrocytes *in vitro*. Moreover, cellular processes regulated by RhoGTPases such as migration and morphology were dysregulated at the cellular and physiological levels in astrocytes.

Material and Methods

OPHN1 knockout mice

All applicable international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals were followed. Adult mice were housed under a 12 h light/ 12 h dark circle, with ad libitum access to food and water, in accordance with European Community (Directive 2010-63/ EEC) and French regulations (Code Rural R214/87-130). Experimental procedures were approved by the local ethics committee and registered with the French Research Ministry (CEEA, Paris 6).

We used male Ophn1^{-/y} mice (B6.129P-Ophn1^{tm1Bill};(Khelfaoui et al. 2007)) (KO) for all experiments and their control littermates Ophn1^{+/y} or wild type (WT) mice with the same genetic background. (C57BL/6NRj) from Janvier Labs. Genotyping was performed by PCR technique with PCR Kit from Life Technologies as previously reported (Khelfaoui et al. 2007). All procedures were in accordance with the local ethic committee (CEEA, Paris 6).

Primary culture of astrocytes

Primary astrocyte cultures were prepared from 1 to 3-day-old cerebral cortex according to previously described methods (Gebicke-Haerter et al. 1989). Briefly, after dissection and removal of the meninges, the whole cortexes were gently mechanically dissociated with a P1000 pipette in cold PBS supplemented with 1% glucose. Cells were then collected by centrifugation at 800g for 5 min, resuspended in DMEM supplemented with 10% heat-inactivated Fetal Bovine Serum (FBS), plated in Petri dishes coated with polyornithine for molecular biology experiment or glass coverslips with the same coating or polylysine for microscopy and immunostaining. Incubation was at 37°C in a humidified atmosphere of 95% air, 5% CO₂. After reaching confluence, astrocytes were treated with cytosine arabinofuranoside (AraC) for 24h to avoid the development of microglial cells. Medium was changed 2 times per weeks. Around DIV25, confluent astrocytes were starved overnight with DMEM medium without FBS for *in vitro* experiments.

In vitro Scratch-induced migration assay

Confluent astrocytes were wounded by scraping monolayers with a 10 μ l pipette tip at DIV 25 after overnight starvation. To quantify scratch-induced migration of astrocytes, the distance traveled by the cells in 24 hours was measured using phase contrast pictures taken at the beginning and 24 hours after the scratch. To ensure that the pictures taken 24h after the wound were taken at the same place, two perpendicular wounds were performed, and four pictures were taken at the crossing area. To quantify migration, we measured an index based on the difference between areas measured 0h and 24h after migration normalized to the wound length. This index was normalized with mean WT migration index in basal conditions.

Then after 24h, cells were washed with PBS 1X and fixed 15min at room temperature with 4% paraformaldehyde for immunostaining.

For biochemical analysis, several wounds were made in multiple directions (15 vertically and 15 horizontally) on confluent astrocytes. 20min or 24h later, cells were lysed in sample buffer with β-Mercaptoethanol. Samples were then denaturized 10min at 100°C, sonicated during 5min, aliquoted to avoid thawing and freezing cycles and stored at -20°C.

Immunocytochemistry

Cells were washed with PBS at 37°C, fixed with PFA 4% at room temperature for 15min and washed three times with PBS. Glass coverslips were then stored in PBS at 4°C.

For immunocytochemistry, cells where blocked for 30min in PBS-BSA-Triton, incubated overnight with primary antibodies in blocking solution, washed three times with PBS and incubated 1h at room temperature with secondary antibodies in the blocking solution, washed three times with PBS before mounting with Fluoromount.

Western Blot

10 to 20 μ l of total protein extract in sample buffer 1X (Laemli buffer, Biorad) were loaded on a 12 % SDS-PAGE gel and transferred on nitrocellulose membrane before hybridization with various primary antibodies. Data were normalized with WT mean in basal conditions and statistical comparison between WT and KO astrocytes and between different conditions were analyzed.

Antibodies

We used the antibodies against: MLC2 (Cell Signaling, Rabbit, reference 8505S) at 1:500, P-MLC2 (Ser19) (Cell Signaling, Rabbit, reference 3671S) at 1:500, Nestin (Merck-Millipore, Mouse, reference MAB353) at 1:200, GFAP (Sigma-Aldrich, Mouse, reference G3893) at 1:500, Vinculin (Invitrogen, Rabbit, reference 42H89L44) at 1:200, Phospho-histone H3 (Ser10) (Millipore, Rabbit, reference 06-570) at 1:200, cleaved Caspase3 (Cell Signaling, Rabbit, reference 9661) at 1:200, GFP (Abcam, Chicken, reference ab13970) at 1:500, GLT-1 (Frontier Institute, Rabbit, reference Af670) at 1:500, GAPDH (Sigma-Aldrich, reference G9295 at 1:10 000), OPHN1 (crude Rabbit serum (Fauchereau et al. 2003)) at 1:500.

In vivo glial scar formation

Adult mice weighting ~20g were deeply anaesthetized by a mixture of ketamine (75 mg/kg) and xylazine (5mg/kg) and placed in a stereotaxic frame. Injury was bilaterally made in the cortex with a 34-gauge blunt-tipped needle linked to a 2 μ l Hamilton syringe by a polyethylene catheter at the following stereotaxic coordinates: AP:-0.9 mm; L: -2 mm to the bregma at a depth of -2.75 mm to the skull. The needle was left in place for five minutes and was slowly withdrawn. To observe the morphology of astrocytes in the wounded area, the needle used to perform the injury was also used to deliver adeno-associated viruses (AAV) expressing a cytoplasmic GFP protein under the GFAP) (see below. Animals were sacrificed 15 days after injury.

In our *in vivo* model of wound, DAPI, Caspase3 and Phosphohistone3 positive nucleus were counted within an area around the wound that was the same for all pictures. DAPI positive nucleus density was normalized with WT mean. The number of Caspase3 and Phosphohistone3 positive cells was normalized with DAPI positive nucleus number. This ratio was normalized to WT mean. Nestin area was measured by applying the same threshold to all images and normalized to WT mean.

AAV production and injection

For AAV *in vivo* gene transfer, a transgene composed of GFP in a single open reading frame was placed under the control of a GFAP-specific promoter in an AAV shuttle plasmid containing the inverted terminal repeats (ITR) of AAV2. Pseudotyped serotype 9 AAV particles were produced by transient co-transfection of HEK-293T cells, as previously described (Berger et al. 2015). Viral titers were determined by quantitative PCR amplification of the ITR on DNase-resistant particles and expressed as vector genomes vector genome per ml (vg/ml). To assess astroglial morphology in the wounded area, we injected bilaterally in the cortex, at a rate of 0.25 μ l/min with an automatic pump, 1 μ l of AAV at 1x10¹⁰ viral particles into each site.

Immunohistochemistry

For immunohistochemistry, mice were deeply anesthetized with Pentobarbital and perfused intracardially with paraformaldehyde (PFA 2%). The brains were carefully dissected and post-fixed overnight with PFA 2% at 4°C and were sliced with a freezing microtome. 30μ m thick slices where stored in PBS at 4°C. Slices were blocked with PBS-Gelatin-Triton for 1h at room temperature, incubated overnight at 4°C with primary antibodies in the blocking solution, washed three times with PBS, incubated 1h30 with secondary antibodies in the blocking solution and washed three times with PBS before mounting with Fluoromount.

Scholl analysis

Concentric circles were spaced by 5μ m and centered on the cell nucleus. The number of intersections between GFP staining and concentric circles was calculated with ImageJ plugin 'Scholl analysis' (Abramoff et al. 2004).

Statistical analysis

All data are expressed as mean \pm s.e.m. Statistical significance for within-group comparisons was determined by one-way ANOVA, whereas unpaired t-tests were used for between-group comparisons, unless otherwise stated. Frequency distributions were compared using Kolmogorov-Smirnov test (KS test). Statistical analysis was performed using Prism (Graphpad software, CA USA).

Results

OPHN1 regulates in vitro ROCK activity in migrating astrocytes

We first investigated whether OPHN1 is expressed *in vitro* in human and murine astrocytes. We found by Western Blot that human astrocytes differentiated from induced pluripotent stem cells express OPHN1 similarly to rodent astrocytes (Fig. 1a) (Fauchereau et al. 2003). Western blot analysis also showed that OPHN1 was however absent in primary cultures of astrocytes from OPHN1 KO mice (Fig. 1a), indicating that this *in vitro* model of OPHN1 disruption is relevant to study the role of OPHN1 in astrocytes.

Since we and others previously reported that OPHN1 negatively regulated the GTPase RhoA in various cells to control ROCK activity, one of the most studied effector of RhoA, we investigated ROCK activation in astrocytes during migration (Govek et al. 2004; Khelfaoui et al. 2009). To estimate its activation, we quantified by Western Blot the phosphorylation level of Myosin Light Chain 2 (MLC2), one of its direct targets, involved in actin-myosin contraction and migration process (Fig. 1b). First, we confirmed that ROCK activity is increased in basal conditions (Khelfaoui et al. 2009). Similarly to the myosin phosphatase target subunit 1 (MYPT1) (Khelfaoui et al. 2009), another target of RhoA/ROCK pathway implicated in cell migration (Matsumura and Hartshorne 2008), we found that the basal

phosphorylation level of MLC2 in confluent astrocytes was increased by ~ 30% in astrocytes lacking OPHN1 (WT: n=5; KO: n=6, p=0.0192, t-test, Fig. 1d), whereas basal MLC2 content was not different (WT: n=5; KO: n=3, p=0.98, t-test, Fig.1 c). We then tested whether MLC2 phosphorylation level varies during migration in our *in vitro* model of migrating astrocytes (Fig. 1c). We found that MLC2 phosphorylation levels do increase over time in migrating astrocytes from WT mice but not from OPHN1 KO mice (WT: n=5; KO: n=6; p=0.0174, two-way ANOVA, Fig. 1d)).

Taken together, these results suggest that OPHN1 inactivates RhoA in astrocytes, as OPHN1 disruption over-activates RhoA, which alters ROCK phosphorylation pathways stimulated by RhoGTPases in migrating astrocytes.

OPHN1 regulates astroglial migration

Since RhoGTPases are involved in cell migration (Anne J. Ridley 2015; Zegers and Friedl 2014), we investigated whether OPHN1 regulates migration of astrocytes. To evaluate migration *in vitro*, we performed the wound healing assay on confluent astrocytes (Etienne-Manneville 2006). We found that OPHN1 KO astrocytes migrated less than WT astrocytes 24h after the wound, as the scar area was larger in astrocyte cultures lacking OPHN1 in comparison with control conditions (WT: n=9; KO: n=11; p=0.0035, t-test, Fig.2 a-b).

Since we found a higher ROCK activity in astrocytes from OPHN1 KO mice, we then tested whether the alteration in migration could be rescued by inhibiting ROCK activity in OPHN1 KO astrocytes. We found that partial inhibition of ROCK (Y27632, 0.1 μ M) rescued normal migration in OPHN1 KO astrocytes (n=12, p=0.7785 for t-test with WT condition without pharmacological treatment; p=0.0024 for t-test with KO condition without pharmacological treatment, Fig. 2b), while it had no effect in WT astrocytes (n=9, p=0.3370, t-test, Fig. 2b). These data suggest that over-activation of the ROCK pathway is involved in the migration defect of OPHN1 KO astrocytes.

OPHN1 regulates in vitro the morphology of migrating astrocytes

The first stage of cell migration results in an elongation of the cell before actual migration, corresponding to the nucleus movement through the retraction of the filipodia. Since OPHN1 regulates the actin cytoskeleton (Fauchereau et al. 2003), we investigated whether this elongation was altered in astrocytes lacking OPHN1. We labeled migrating astrocytes with vinculin, a protein at the interface of membrane and cytoskeleton, which delineate their contours (Fig. 3a). We found that OPHN1 KO astrocytes at the migration front had a smaller cell area than WT astrocytes (WT: n=320; KO: n=402, p=0.0027, t-test with Welch's correction; p=0.0032, KS test). This effect was specific to migrating astrocytes at the front, since confluent WT and OPHN1 KO astrocytes at the rear showed similar morphology (Fig. S1). OPHN1 KO astrocytes also showed a smaller major axis (WT: n=320; KO: n=402; p=0.0002, t-test with Welch's correction; p=0.012, KS test) with no difference in minor axis length in comparison to WT astrocytes (WT: n=320; KO: n=402; p=0.4358, t-test with Welch's correction; p=0.7009, KS test, Fig. 3b-c). This observation implies that the difference in cell area between WT and OPHN1 KO astrocytes results from an altered elongation of astrocytes at the leading edge.

OPHN1 contributes to astroglial scar formation

To study the effect of OPHN1 on astroglial morphology and migration *in vivo*, we took advantage of a model of glial scar formation after mechanical injury in the cortex (Suzuki et al. 2012; Sofroniew 2009). Focal injury was induced by a needle placed stereotaxically in the somatosensory cortex. To investigate the whole-cell morphology of astrocytes near the scar region, we specifically labeled astrocytes by taking advantage of the needle to simultaneously

micro-inject an AAV expressing GFP under the GFAP promoter (Ghézali et al. 2018). We observed isolated astrocytes expressing the cytoplasmic GFP protein (Fig. 4a). To estimate the morphological complexity of astrocytes through their ramification, we performed Scholl analysis on GFP-positive astrocytes (Fig. 4b). We found that KO astrocytes were less ramified than WT astrocytes, and that this difference essentially concerned the proximal branches between 5µm and 20µm from the nucleus. (WT: n=30; KO: n=30, t-test -, Fig. 4c). As previously described (Suzuki et al. 2012), we defined two specific parts of the astrocytic scar: the proximal region of the wound, where astrocytes are strongly polarized and orientate their processes toward the wounded tissue, and the distal region, where astrocytes are round and extend their processes in all directions. To delimitate the proximal region where fibers of projected astrocytic processes are exclusively labeled, we performed immunohistochemistry for nestin, an intermediate filament protein whose expression is re-induced in the adult during glial scar formation. We focused our observations in the wounded area where astrocytic fibers expressing nestin are present all around the injured tissue (Fig. 5a). We found that the proximal region of the scar defined by nestin expression (Fig. 5b) was smaller in OPHN1 KO mice than in WT mice (WT: n=5; KO: n=5, p=0.0335, t-test, Fig. 5b). Altogether, these data show that the glial scar formation is altered in OPHN1 deficient mice.

We then investigated whether the alteration in glial scar formation resulted from a change in cell density, apoptosis or proliferation. To do so, we performed immunohistochemistry using specific markers of cell nucleus (DAPI), cell apoptosis (caspase 3, a perinuclear protein) or cell proliferation (phopho-histone3, a nuclear protein) (Fig. 5c-d). Cell density was not different in WT and OPHN1 KO mice (WT: n=5; KO: n=4, p=0.2892, t-test, Fig. 5c). The number of caspase3 positive nuclei or phosphohistone3 positive nuclei were also not different in the wounded area of WT and KO mice (WT: n=5; KO: n=4, caspase 3: p=0.5612, t-test; phospho-histone3: p=0.8379, t-test, Fig. 5d), indicating no difference in, apoptosis and proliferation between WT and OPHN1 KO mice in the model of glial scar formation.

Taken together, these results show that OPHN1 plays a role not only in the ramification of astroglial processes in the wound distal zone, but also in the recruitment of astrocytes and elongation of their processes toward the wound proximal zone.

Discussion

We here found that the XLID protein OPHN1 controls the RhoA/ROCK/MLC2 pathway in astrocytes. We also showed that OPHN1 regulates the morphology and migration of astrocytes both *in vitro* and *in vivo* and contributes to glial scar formation in the adult.

RhoA/ROCK/MLC2 pathway dysregulation in astrocytes in ID

Small RhoGTPases are involved in neuronal network formation and synaptic plasticity that contribute to cognitive abilities (Ba, van der Raadt, and Nadif Kasri 2013; Newey et al. 2005; Benarroch 2007; Ramakers 2002; van Galen and Ramakers 2005). The dysregulation of those proteins is widely implicated in ID. It was indeed reported that in most pathological cases, RhoA is hyper-activated (Zamboni et al. 2018; Ramakers et al. 2012), although some cases of ID rather show an hypo-activation of the RhoA/ROCK/MLC2 pathway (Ravindran et al. 2017; Kutsche et al. 2000). These data indicate that this pathway, when unbalanced, leads to a pathological state. Here we found that the hyper-activation of this pathway in our OPHN1 KO mouse model of ID not only affects neurons, but also astrocytes. Remarkably, our results show that in our OPHN1 KO mouse of ID, hyper-activation of the RhoA/ROCK pathway contributes to an alteration of astrocyte migration *in vitro*. These data indicate that this pathway is essential for proper astrocytic behavior. RhoGTPases pathways are considered today as potential therapeutic targets to ameliorate and treat ID. In Rett syndrome, a severe

encephalopathy affecting girls, modulation of RhoGTPases by the toxin CNF1 ameliorates the pathological state of astrocytes. This may contribute to the behavioral benefits of the treatment in the mouse model of the disease (De Filippis et al. 2012; De Filippis, Romano, and Laviola 2014).

RhoGTPases and morphology changes in migrating astrocytes

In addition to the migration deficit of astrocytes in our OPHN1 KO model of ID, we also observed that astrocytes at the migration front did not show a proper elongation. It is difficult to know whether this morphological alteration was a cause or a consequence of the migration defect. Given that the RhoA/ROCK pathway is involved, the answer to this question could be partly related to the role of RhoGTPases in the mechanisms of astrocytic migration and morphology changes. In vitro, RhoGTPases control migration and astrocytic stellation, i.e. the transition from a polygonal state to a branched state (Höltje et al. 2005). Stellation in vitro mimics the astrocytic process outgrowth ex vivo or in vivo (Zeug et al. 2018). It was reported that inhibition of RhoA, by C3 protein, and of ROCK, a downstream effector of RhoA, by Y27632, induces in vitro a reversible stellation of non-migrating astrocytes. Considering that stellation in vitro mimics astrocytic process outgrowth in vivo, this result is consistent with what we observed in vivo. In the absence of OPHN1, leading to an hyper-activation of RhoA, astrocytes display less fine processes in vivo. Moreover, this inhibition accelerates astrocytic migration in vitro. ROCK thus regulates astrocytic morphology and over-activation of this pathway plays a role in the deficit of migration. We can consider that morphological plasticity and migration are in fact two cellular processes that are closely linked. However, it is also possible to explain the migration deficit with an unbalanced temporal activation of RhoGTPases. Indeed, the fine temporal activation and inactivation of the RhoGTPases and their downstream effectors in the cell during migration is essential to promote normal migration (Hanna and El-Sibai 2013). Even if we do not fully understand the underlying mechanisms, we do know that initiation of migration leads to the activation of RhoA to facilitate generation of contractile force (Raftopoulou and Hall 2004; Cao et al. 2015; Lawson and Ridley 2018; A. J. Ridley 2001; Murali and Rajalingam 2014). We found that MLC2 phosphorylation, which reflects RhoA/ROCK activation, increases during astrocytic migration, which is consistent with RhoA activation at the initial phase of migration. This increase is disrupted in OPHN1 KO astrocytes, probably because of the basal hyper-activation of RhoA, which could at the end alters the temporal balance of RhoA activation during the migration process. The migration defect in OPHN1 KO astrocytes in vitro could however also partly occur because of a delayed initiation of migration.

Altered glial scar formation in vivo in the OPHN1 KO mouse model of ID

Scar formation is a common model used to study glial response, including changes in the morphology and recruitment of astrocytes at the wounded area. During glial scar formation, one of the cellular process that impact astrocytes is migration toward the lesion to isolate the wounded area from the healthy tissue (Sofroniew 2009). As previously described, we observed two main regions around the lesion (Suzuki et al. 2012). The proximal region, where recruited astrocytes express nestin and are highly polarized, and the distal region, where astrocytes express GFAP and have no specific polarized shape. With nestin immunohistochemistry, it is possible to observe elongated processes toward the lesion, as found in our model. It was recently shown that RhoA regulation by STAT3 altered glial scar formation in spinal cord injury (Renault-Mihara et al. 2017). Indeed, in the conditional KO mouse for STAT3, the up-regulation of RhoA activation and the hyper-phosphorylation of its downstream effector MLC2 *in vitro* was associated with an alteration of astrocytic migration *in vitro*. Remarkably, our
model shows as well an hyperactivation of RhoA and an hyper-phosphorylation of its downstream effector MLC2. The alteration of the RhoA pathway also affected the establishment of the proximal region, which is smaller, suggesting a migration and formation process defects *in vivo*.

It is tempting to speculate that the alteration in astrocytic migration and morphology in our mouse model of ID may participate to the neuronal defects. Indeed, the contribution of astrocytes to the tripartite synapse relies on the uptake of ions and molecules and the release of gliotransmitters acting on neuronal receptors. The distance between neuronal and astrocytic membrane is important for intercellular communication (Zeug et al. 2018). With this idea, the changes in astrocytic branching could alter signal exchanges between neurons and astrocytes. It was indeed recently shown that the interaction between astrocytic integrin at the membrane and the neuronal transmembrane Thy-1/CBP/Csk/Src complex triggers neurite retraction through the activation of RhoA/ROCK pathway in neurons. The proximity of the astrocyte plays a role in the activation of this pathway that triggers neuronal morphological changes (Maldonado et al. 2017). A simpler ramification of astrocyte, and second on the distance between astrocytic and neuronal membrane proteins. It is thus tempting to propose that alteration in astrocytic morphology could have an important effect on neuronal structure and functions including synaptic activity and plasticity and, consequently, cognitive abilities.

References

- Abramoff M, Magalhaes P, Ram S. «Image processing with ImageJ». Biophotonics International. 2004;11(7):36–43
- Allegra, Manuela, Cristina Spalletti, Beatrice Vignoli, Stefano Azzimondi, Irene Busti, Pierre Billuart, Marco Canossa, and Matteo Caleo. 2017. "Pharmacological Rescue of Adult Hippocampal Neurogenesis in a Mouse Model of X-Linked Intellectual Disability." *Neurobiology of Disease* 100 (April): 75–86. https://doi.org/10.1016/j.nbd.2017.01.003.
- Araujo, Bruno H. S., Carolini Kaid, Janaina S. De Souza, Sérgio Gomes da Silva, Ernesto Goulart, Luiz C. J. Caires, Camila M. Musso, et al. 2018. "Down Syndrome IPSC-Derived Astrocytes Impair Neuronal Synaptogenesis and the MTOR Pathway In Vitro." *Molecular Neurobiology* 55 (7): 5962–75. https://doi.org/10.1007/s12035-017-0818-6.
- Auer, Maria, Barbara Hausott, and Lars Klimaschewski. 2011. "Rho GTPases as Regulators of Morphological Neuroplasticity." Annals of Anatomy = Anatomischer Anzeiger: Official Organ of the Anatomische Gesellschaft 193 (4): 259–66. https://doi.org/10.1016/j.aanat.2011.02.015.
- Ba, Wei, Jori van der Raadt, and Nael Nadif Kasri. 2013. "Rho GTPase Signaling at the Synapse: Implications for Intellectual Disability." *Experimental Cell Research* 319 (15): 2368–74. https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2013.05.033.
- Benarroch, Eduardo E. 2007. "Rho GTPases: Role in Dendrite and Axonal Growth, Mental Retardation, and Axonal Regeneration." *Neurology* 68 (16): 1315–18. https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000259588.97409.8f.
- Berger, Adeline, Stéphanie Lorain, Charlène Joséphine, Melissa Desrosiers, Cécile Peccate, Thomas Voit, Luis Garcia, José-Alain Sahel, and Alexis-Pierre Bemelmans. 2015.
 "Repair of Rhodopsin MRNA by Spliceosome-Mediated RNA Trans-Splicing: A New Approach for Autosomal Dominant Retinitis Pigmentosa." *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 23 (5): 918–30. https://doi.org/10.1038/mt.2015.11.
- Billuart, P., T. Bienvenu, N. Ronce, V. des Portes, M. C. Vinet, R. Zemni, H. Roest Crollius, et al. 1998. "Oligophrenin-1 Encodes a RhoGAP Protein Involved in X-Linked Mental Retardation." *Nature* 392 (6679): 923–26. https://doi.org/10.1038/31940.
- Bosworth, Alexandra P., and Nicola J. Allen. 2017. "The Diverse Actions of Astrocytes during Synaptic Development." *Current Opinion in Neurobiology* 47 (December): 38– 43. https://doi.org/10.1016/j.conb.2017.08.017.
- Cao, Xuan, Tomonori Kaneko, Jenny S. Li, An-Dong Liu, Courtney Voss, and Shawn S. C. Li. 2015. "A Phosphorylation Switch Controls the Spatiotemporal Activation of Rho GTPases in Directional Cell Migration." *Nature Communications* 6 (July): 7721. https://doi.org/10.1038/ncomms8721.
- Chung, Won-Suk, Christina A. Welsh, Ben A. Barres, and Beth Stevens. 2015. "Do Glia Drive Synaptic and Cognitive Impairment in Disease?" *Nature Neuroscience* 18 (11): 1539–45. https://doi.org/10.1038/nn.4142.
- Compagnucci, Claudia, Sabina Barresi, Stefania Petrini, Pierre Billuart, Giorgia Piccini, Pietro Chiurazzi, Paolo Alfieri, Enrico Bertini, and Ginevra Zanni. 2016. "Rho Kinase Inhibition Is Essential During In Vitro Neurogenesis and Promotes Phenotypic Rescue of Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Neurons With Oligophrenin-1 Loss of Function." *Stem Cells Translational Medicine* 5 (7): 860–69. https://doi.org/10.5966/sctm.2015-0303.

- Dallérac, Glenn, and Nathalie Rouach. 2016. "Astrocytes as New Targets to Improve Cognitive Functions." *Progress in Neurobiology* 144 (September): 48–67. https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2016.01.003.
- De Filippis, Bianca, Alessia Fabbri, Daiana Simone, Rossella Canese, Laura Ricceri, Fiorella Malchiodi-Albedi, Giovanni Laviola, and Carla Fiorentini. 2012. "Modulation of RhoGTPases Improves the Behavioral Phenotype and Reverses Astrocytic Deficits in a Mouse Model of Rett Syndrome." *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 37 (5): 1152–63. https://doi.org/10.1038/npp.2011.301.
- De Filippis, Bianca, Emilia Romano, and Giovanni Laviola. 2014. "Aberrant Rho GTPases Signaling and Cognitive Dysfunction: In Vivo Evidence for a Compelling Molecular Relationship." *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 46 Pt 2 (October): 285–301. https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2014.06.007.
- Delépine, Chloé, Hamid Meziane, Juliette Nectoux, Matthieu Opitz, Amos B. Smith, Carlo Ballatore, Yoann Saillour, et al. 2016. "Altered Microtubule Dynamics and Vesicular Transport in Mouse and Human MeCP2-Deficient Astrocytes." *Human Molecular Genetics* 25 (1): 146–57. https://doi.org/10.1093/hmg/ddv464.
- Dossi, Elena, Flora Vasile, and Nathalie Rouach. 2018. "Human Astrocytes in the Diseased Brain." Brain Research Bulletin 136: 139–56. https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2017.02.001.
- Etienne-Manneville, Sandrine. 2006. "In Vitro Assay of Primary Astrocyte Migration as a Tool to Study Rho GTPase Function in Cell Polarization." *Methods in Enzymology* 406: 565–78. https://doi.org/10.1016/S0076-6879(06)06044-7.
- Etienne-Manneville, Sandrine, and Alan Hall. 2002. "Rho GTPases in Cell Biology." *Nature* 420 (6916): 629–35. https://doi.org/10.1038/nature01148.
- Fauchereau, Fabien, Ulrike Herbrand, Philippe Chafey, Alexander Eberth, Annette Koulakoff, Marie-Claude Vinet, Mohammad Reza Ahmadian, Jamel Chelly, and Pierre Billuart. 2003. "The RhoGAP Activity of OPHN1, a New F-Actin-Binding Protein, Is Negatively Controlled by Its Amino-Terminal Domain." *Molecular and Cellular Neurosciences* 23 (4): 574–86.
- Galen, Elly J. M. van, and Ger J. A. Ramakers. 2005. "Rho Proteins, Mental Retardation and the Neurobiological Basis of Intelligence." *Progress in Brain Research* 147: 295–317. https://doi.org/10.1016/S0079-6123(04)47022-8.
- Gebicke-Haerter, P. J., J. Bauer, A. Schobert, and H. Northoff. 1989. "Lipopolysaccharide-Free Conditions in Primary Astrocyte Cultures Allow Growth and Isolation of Microglial Cells." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 9 (1): 183–94.
- Ghézali, Grégory, Charles-Félix Calvo, Laure-Elise Pillet, Flora Llense, Pascal Ezan, Ulrike Pannasch, Alexis-Pierre Bemelmans, Sandrine Etienne Manneville, and Nathalie Rouach. 2018. "Connexin 30 Controls Astroglial Polarization during Postnatal Brain Development." *Development (Cambridge, England)* 145 (4). https://doi.org/10.1242/dev.155275.
- Govek, Eve-Ellen, Sarah E. Newey, Colin J. Akerman, Justin R. Cross, Lieven Van der Veken, and Linda Van Aelst. 2004. "The X-Linked Mental Retardation Protein Oligophrenin-1 Is Required for Dendritic Spine Morphogenesis." *Nature Neuroscience* 7 (4): 364–72. https://doi.org/10.1038/nn1210.
- Govek, Eve-Ellen, Sarah E. Newey, and Linda Van Aelst. 2005. "The Role of the Rho GTPases in Neuronal Development." *Genes & Development* 19 (1): 1–49. https://doi.org/10.1101/gad.1256405.

- Hanna, Samer, and Mirvat El-Sibai. 2013. "Signaling Networks of Rho GTPases in Cell Motility." *Cellular Signalling* 25 (10): 1955–61. https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2013.04.009.
- Höltje, Markus, Anja Hoffmann, Fred Hofmann, Christian Mucke, Gisela Große, Nico Van Rooijen, Helmut Kettenmann, Ingo Just, and Gudrun Ahnert-Hilger. 2005. "Role of Rho GTPase in Astrocyte Morphology and Migratory Response during in Vitro Wound Healing: Astrocyte Morphology during Wound Healing." *Journal of Neurochemistry* 95 (5): 1237–48. https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2005.03443.x.
- Humeau, Yann, Frédéric Gambino, Jamel Chelly, and Nicolas Vitale. 2009. "X-Linked Mental Retardation: Focus on Synaptic Function and Plasticity." *Journal of Neurochemistry* 109 (1): 1–14. https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.05881.x.
- Khelfaoui, Malik, Cécile Denis, Elly van Galen, Frédéric de Bock, Alain Schmitt, Christophe Houbron, Elise Morice, et al. 2007. "Loss of X-Linked Mental Retardation Gene Oligophrenin1 in Mice Impairs Spatial Memory and Leads to Ventricular Enlargement and Dendritic Spine Immaturity." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal* of the Society for Neuroscience 27 (35): 9439–50. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2029-07.2007.
- Khelfaoui, Malik, Alice Pavlowsky, Andrew D. Powell, Pamela Valnegri, Kenneth W. Cheong, Yann Blandin, Maria Passafaro, John G. R. Jefferys, Jamel Chelly, and Pierre Billuart. 2009. "Inhibition of RhoA Pathway Rescues the Endocytosis Defects in Oligophrenin1 Mouse Model of Mental Retardation." *Human Molecular Genetics* 18 (14): 2575–83. https://doi.org/10.1093/hmg/ddp189.
- Kutsche, K., H. Yntema, A. Brandt, I. Jantke, H. G. Nothwang, U. Orth, M. G. Boavida, et al. 2000. "Mutations in ARHGEF6, Encoding a Guanine Nucleotide Exchange Factor for Rho GTPases, in Patients with X-Linked Mental Retardation." *Nature Genetics* 26 (2): 247–50. https://doi.org/10.1038/80002.
- Lawson, Campbell D., and Anne J. Ridley. 2018. "Rho GTPase Signaling Complexes in Cell Migration and Invasion." *The Journal of Cell Biology* 217 (2): 447–57. https://doi.org/10.1083/jcb.201612069.
- Maldonado, H., C. Calderon, F. Burgos-Bravo, O. Kobler, W. Zuschratter, O. Ramirez, S. Härtel, et al. 2017. "Astrocyte-to-Neuron Communication through Integrin-Engaged Thy-1/CBP/Csk/Src Complex Triggers Neurite Retraction via the RhoA/ROCK Pathway." *Biochimica Et Biophysica Acta* 1864 (2): 243–54. https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.11.006.
- Matsumura, Fumio, and David J. Hartshorne. 2008. "Myosin Phosphatase Target Subunit: Many Roles in Cell Function." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 369 (1): 149–56. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.12.090.
- Meziane, Hamid, Malik Khelfaoui, Noemi Morello, Bassem Hiba, Eleonora Calcagno, Sophie Reibel-Foisset, Mohammed Selloum, et al. 2016. "Fasudil Treatment in Adult Reverses Behavioural Changes and Brain Ventricular Enlargement in Oligophrenin-1 Mouse Model of Intellectual Disability." *Human Molecular Genetics* 25 (11): 2314– 23. https://doi.org/10.1093/hmg/ddw102.
- Milani, Donatella, Luisa Ronzoni, and Susanna Esposito. 2015. "Genetic Advances in Intellectual Disability." *Journal of Pediatric Genetics* 4 (3): 125–27. https://doi.org/10.1055/s-0035-1564438.
- Moortgat, Stéphanie, Siren Berland, Ingvild Aukrust, Isabelle Maystadt, Laura Baker, Valerie Benoit, Alfonso Caro-Llopis, et al. 2018. "HUWE1 Variants Cause Dominant X-Linked Intellectual Disability: A Clinical Study of 21 Patients." *European Journal of Human Genetics: EJHG* 26 (1): 64–74. https://doi.org/10.1038/s41431-017-0038-6.
 - 13

- Murali, Arun, and Krishnaraj Rajalingam. 2014. "Small Rho GTPases in the Control of Cell Shape and Mobility." *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 71 (9): 1703–21. https://doi.org/10.1007/s00018-013-1519-6.
- Nadif Kasri, Nael, Akiko Nakano-Kobayashi, Roberto Malinow, Bo Li, and Linda Van Aelst. 2009. "The Rho-Linked Mental Retardation Protein Oligophrenin-1 Controls Synapse Maturation and Plasticity by Stabilizing AMPA Receptors." *Genes & Development* 23 (11): 1289–1302. https://doi.org/10.1101/gad.1783809.
- Nadif Kasri, Nael, and Linda Van Aelst. 2008. "Rho-Linked Genes and Neurological Disorders." *Pflugers Archiv: European Journal of Physiology* 455 (5): 787–97. https://doi.org/10.1007/s00424-007-0385-1.
- Nakano-Kobayashi, Akiko, Yilin Tai, Nael Nadif Kasri, and Linda Van Aelst. 2014. "The X-Linked Mental Retardation Protein OPHN1 Interacts with Homer1b/c to Control Spine Endocytic Zone Positioning and Expression of Synaptic Potentiation." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 34 (26): 8665–71. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0894-14.2014.
- Newey, Sarah E., Vanisree Velamoor, Eve-Ellen Govek, and Linda Van Aelst. 2005. "Rho GTPases, Dendritic Structure, and Mental Retardation." *Journal of Neurobiology* 64 (1): 58–74. https://doi.org/10.1002/neu.20153.
- Pavlowsky, A., J. Chelly, and P. Billuart. 2012. "Major Synaptic Signaling Pathways Involved in Intellectual Disability." *Molecular Psychiatry* 17 (7): 663. https://doi.org/10.1038/mp.2012.79.
- Petrelli, Francesco, and Paola Bezzi. 2018. "MGlu5-Mediated Signalling in Developing Astrocyte and the Pathogenesis of Autism Spectrum Disorders." *Current Opinion in Neurobiology* 48 (February): 139–45. https://doi.org/10.1016/j.conb.2017.12.014.
- Raftopoulou, Myrto, and Alan Hall. 2004. "Cell Migration: Rho GTPases Lead the Way." Developmental Biology 265 (1): 23–32.
- Ramakers, Ger J. A. 2002. "Rho Proteins, Mental Retardation and the Cellular Basis of Cognition." *Trends in Neurosciences* 25 (4): 191–99.
- Ramakers, Ger J. A., David Wolfer, Georg Rosenberger, Kerstin Kuchenbecker, Hans-Jürgen Kreienkamp, Janine Prange-Kiel, Gabriele Rune, et al. 2012. "Dysregulation of Rho GTPases in the APix/Arhgef6 Mouse Model of X-Linked Intellectual Disability Is Paralleled by Impaired Structural and Synaptic Plasticity and Cognitive Deficits." *Human Molecular Genetics* 21 (2): 268–86. https://doi.org/10.1093/hmg/ddr457.
- Ravindran, Ethiraj, Hao Hu, Scott A. Yuzwa, Luis R. Hernandez-Miranda, Nadine Kraemer, Olaf Ninnemann, Luciana Musante, et al. 2017. "Homozygous ARHGEF2 Mutation Causes Intellectual Disability and Midbrain-Hindbrain Malformation." *PLoS Genetics* 13 (4): e1006746. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006746.
- Redolfi, Nelly, Luisa Galla, Andrea Maset, Luca Murru, Eleonora Savoia, Ilaria Zamparo, Angela Gritti, Pierre Billuart, Maria Passafaro, and Claudia Lodovichi. 2016.
 "Oligophrenin-1 Regulates Number, Morphology and Synaptic Properties of Adult-Born Inhibitory Interneurons in the Olfactory Bulb." *Human Molecular Genetics* 25 (23): 5198–5211. https://doi.org/10.1093/hmg/ddw340.
- Renault-Mihara, Francois, Masahiko Mukaino, Munehisa Shinozaki, Hiromi Kumamaru, Satoshi Kawase, Matthieu Baudoux, Toshiki Ishibashi, et al. 2017. "Regulation of RhoA by STAT3 Coordinates Glial Scar Formation." *The Journal of Cell Biology* 216 (8): 2533–50. https://doi.org/10.1083/jcb.201610102.
- Ridley, A. J. 2001. "Rho GTPases and Cell Migration." *Journal of Cell Science* 114 (Pt 15): 2713–22.
- Ridley, Anne J. 2015. "Rho GTPase Signalling in Cell Migration." Current Opinion in Cell Biology 36 (October): 103–12. https://doi.org/10.1016/j.ceb.2015.08.005.

Ropers, H.-Hilger, and Ben C. J. Hamel. 2005. "X-Linked Mental Retardation." Nature Reviews. Genetics 6 (1): 46–57. https://doi.org/10.1038/nrg1501.

- Salvador-Carulla, Luis, Geoffrey M. Reed, Leila M. Vaez-Azizi, Sally-Ann Cooper, Rafael Martinez-Leal, Marco Bertelli, Colleen Adnams, et al. 2011. "Intellectual Developmental Disorders: Towards a New Name, Definition and Framework for 'Mental Retardation/Intellectual Disability' in ICD-11." World Psychiatry: Official Journal of the World Psychiatric Association (WPA) 10 (3): 175–80.
- San Martín, Alvaro, and Mario Rafael Pagani. 2014. "Understanding Intellectual Disability through RASopathies." *Journal of Physiology, Paris* 108 (4–6): 232–39. https://doi.org/10.1016/j.jphysparis.2014.05.003.
- Sofroniew, Michael V. 2009. "Molecular Dissection of Reactive Astrogliosis and Glial Scar Formation." *Trends in Neurosciences* 32 (12): 638–47. https://doi.org/10.1016/j.tins.2009.08.002.
- Stankiewicz, Trisha R., and Daniel A. Linseman. 2014. "Rho Family GTPases: Key Players in Neuronal Development, Neuronal Survival, and Neurodegeneration." Frontiers in Cellular Neuroscience 8: 314. https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00314.
- Suzuki, Takayuki, Honami Sakata, Chiaki Kato, John A. Connor, and Mitsuhiro Morita. 2012. "Astrocyte Activation and Wound Healing in Intact-Skull Mouse after Focal Brain Injury." *The European Journal of Neuroscience* 36 (12): 3653–64. https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2012.08280.x.
- Valnegri, Pamela, Carlo Sala, and Maria Passafaro. 2012. "Synaptic Dysfunction and Intellectual Disability." *Advances in Experimental Medicine and Biology* 970: 433–49. https://doi.org/10.1007/978-3-7091-0932-8 19.
- Vasile, Flora, Elena Dossi, and Nathalie Rouach. 2017. "Human Astrocytes: Structure and Functions in the Healthy Brain." *Brain Structure & Function* 222 (5): 2017–29. https://doi.org/10.1007/s00429-017-1383-5.
- Zamboni, Valentina, Rebecca Jones, Alessandro Umbach, Alessandra Ammoni, Maria Passafaro, Emilio Hirsch, and Giorgio R. Merlo. 2018. "Rho GTPases in Intellectual Disability: From Genetics to Therapeutic Opportunities." *International Journal of Molecular Sciences* 19 (6). https://doi.org/10.3390/ijms19061821.
- Zegers, Mirjam M., and Peter Friedl. 2014. "Rho GTPases in Collective Cell Migration." Small GTPases 5: e28997. https://doi.org/10.4161/sgtp.28997.
- Zeug, Andre, Franziska E. Müller, Stefanie Anders, Michel K. Herde, Daniel Minge, Evgeni Ponimaskin, and Christian Henneberger. 2018. "Control of Astrocyte Morphology by Rho GTPases." *Brain Research Bulletin* 136: 44–53. https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2017.05.003.

Figure Legends:

Fig 1. OPHN1 regulates MLC phosphorylation during *in vitro* **migration of astrocytes. a**, Representative western blot illustrating OPHN1 expression in astrocyte cultures from WT and OPHN1 KO mice (mAstro), and in human control astrocytes differentiated from induced pluripotent stem cells (hAstro) (Delépine et al. 2016). **b**, Schematic drawing illustrating the role of OPHN1 in the RhoA/ROCK/MLC phosphorylation pathway. **c**, Representative western blot illustrating the phosphorylation of MLC in basal conditions, and after 0, 20 minutes and 24 hours following wounds on WT and OPHN1 KO astrocytes. **d**, Quantification of MLC expression and phosphorylation levels in basal and after wound (WT: n=5; KO, n=6). Asterisks indicate statistical significance (*p < 0.05).

Fig 2. Migration of OPHN1 deficient astrocytes is altered and is rescued by treatment with a ROCK inhibitor. a, Phase contrast pictures of 0h and 24h wounded WT and OPHN1 KO astrocytes. Scale bar 100 μ m. B, Quantification of migration of WT and OPHN1 KO astrocytes 24h after the wound in untreated (-) (WT: n=9; KO: n=11) or Y27632 treated (+) (WT: n=9; KO: n=12) conditions. Asterisks indicate statistical significance (*p < 0.05).

Fig 3. Morphology of migrating astrocytes is dysregulated in OPHN1 KO cells. A, Representative pictures illustrating vinculin immunostaining of migrating WT and OPHN1 KO astrocytes at the migration front of the scar. Scale bar: 100μ m. Examples of major and minor axis measured by ImageJ are represented in yellow. **b**, Frequency distribution of area, major and minor axis lengths of WT (n=320) and OPHN1 KO (n=402) migrating astrocytes. **E**, Means of area, major and minor axis lengths of migrating WT (n=320) and OPHN1 KO (n=402) astrocytes. Asterisks indicate statistical significance (**: p<0.01 ***: p<0.001).

Fig 4. Astrocytic morphology is altered in the cortex of adult OPHN1 KO mice after wound *in vivo*. **a**, Schematics illustrating the glial scar formation model in the cortex of 2month- old mice induced by a needle in the cortex, also used to inject AAVs expressing GFP under a GFAP promoter. Scale bar, 150 μ m. Representative pictures illustrating the specificity of the GFP labelling in astrocytes using the GFAP marker (red). **b**, Representative picture illustrating the Scholl analysis based on GFP cytoplasmic staining of astrocytes in the distal zone of the wound. **c**, Quantification of the Scholl analysis in astrocytes from WT (n=30) and OPHN1 KO (n=30) mice. Asterisks indicate statistical significance (*: p<0.05 **: p<0.01).

Fig 5. Glial scar formation is altered in adult OPHN1 deficient mice. a, Schematics and representative pictures illustrating the glial scar model and the nestin immunostaining in the cortex. **b**, Left: Representative pictures illustrating nestin immunostaining of the cortical wounded area in the proximal zone of the scar in WT and OPHN1 KO mice.; Calibration bar: purple=0 white=255. Right: Quantification of normalized proximal zone area in OPHN1 WT (n=5) and KO (n=5) mice. **c**, Left: Representative pictures of DAPI staining near the cortical wound in WT and KO mice. Right: Quantification of DAPI positive nucleus density near the cortical lesion in WT (n=5) and OPHN1 KO (n=4) mice. Asterisks indicate statistical significance (*: p<0.05). Scale bar: 200µm **d**, Left: Representative pictures of Caspase3 and phosphohistone3 immunostainings in the wounded area for identification of cells in apoptosis and proliferative state, respectively. Right: Corresponding quantification of cell proportions in WT (n=5) and OPHN1 KO (n=4) wounded area. The proportions of caspase3 or phosphohistone3 positive cells were normalized to the cell density mean based on DAPI staining.

Fig S1. OPHN1 KO astrocytes in basal conditions, at the rear of the scar, do not show altered cell area. a, Representative picture of vinculin immunostaining of WT and KO astrocytes *in vitro*. Scale bar: 100μ m. b, Quantification of astrocytic area in WT (n=80) and OPHN1 KO (n=80) conditions.

Figure 1



Figure 2:

а







Figure 3:



Figure 4:



Figure 5:



1.1.3) Discussion

Le rôle des astrocytes dans différentes pathologies neuronales est une question de plus en plus étudiée et reste relativement récente. En effet, de nombreuses études sur la maladie d'Alzheimer, la sclérose en plaques, et même des pathologies mentales comme la dépression ou la schizophrénie impliquent les astrocytes. La contribution des astrocytes dans la DI n'est aujourd'hui pas encore bien élucidée ni bien comprise, mais au vu des différents indices et éléments de réponse sur la question, leur rôle semble important. C'est le cas par exemple du syndrome du X fragile, du syndrome de Rett et de la trisomie 21 (Cheng et al., 2012; Dong & Greenough, 2004; Shelley Jacobs et al., 2012; Sloan & Barres, 2014). La voie des RhoGTPases semble être à la fois impliquée dans un grand nombre de cas de DI et dans la morphologie astrocytaire (Zamboni et al., 2018; Zeug et al., 2018). C'est pour cela que la protéine RhoGAP OPHN1 semble être un bon candidat pour aborder la question astrocytaire et les interactions neurogliales dans le développement d'une pathologie qui implique un défaut neuronale altérant la cognition. Nous avons pu démontrer qu'OPHN1 régulait la voie RhoA/ROCK/MLC2 qui pouvait être corrigée en l'absence d'OPHN1 par un inhibiteur de ROCK. L'hyperphosphorylation de la protéine MLC2 in vitro dans les cellules déficientes en OPHN1 est en accord avec l'hypothèse selon laquelle OPHN1 inhiberait la voie RhoA dans les astrocytes et expliquerait en partie le retard de migration astrocytaire. En effet, deux hypothèses peuvent expliquer ce défaut. D'une part, la dérégulation de la voie RhoA/ROCK pourrait avoir un impact sur le changement morphologique des astrocytes qui présentent un défaut d'élongation au front de migration. D'autre part, le décours temporel de l'activation de la voie RhoA au cours de la migration ne serait pas adéquat pour enclencher les mécanismes de migration reposant sur une activation et inhibition temporelle régulées finement (Lawson & Ridley, 2018; Zegers & Friedl, 2014). En effet, une hyperactivation de cette voie dans des conditions basales empêcherait une activation normale de la voie RhoA dans les premières étapes de la migration. In vivo, nous avons remarqué que la zone proximale de la cicatrice où les astrocytes sont recrutés et projettent leurs prolongements vers la région lésée est plus petite, sans montrer de défaut de prolifération ou de mort cellulaire. Ceci illustrerait donc un défaut de migration des astrocytes au niveau de la lésion. En plus d'un défaut de migration, nous avons également abordé le rôle d'OPHN1 dans la morphologie astrocytaire. *In vitro* OPHN1 régulerait la plasticité morphologique des astrocytes en cours de migration, et *in vivo* elle serait impliquée dans la ramification des astrocytes recrutés au niveau de la cicatrice gliale. *In vitro*, l'inhibition de ROCK conduit à la stellation des astrocytes (Höltje et al., 2005), c'est-à-dire le passage d'une morphologie polygonale à une morphologie ramifiée. Sachant que la stellation *in vitro* mimerait la croissance des prolongements astrocytaires *in vivo* (Zeug et al., 2018), une ramification moins complexe des astrocytes dans un modèle où la voie RhoA est suractivée semble logique. La voie RhoA semble donc être une voie de signalisation privilégiée dans les processus cognitifs aussi bien au niveau des neurones que des astrocytes. De plus, il a été montré que l'inhibition de cette voie pouvait améliorer la mémoire chez les souris (Huentelman et al., 2009).

Les défauts astrocytaires de morphologie et de migration *in vitro* et *in vivo* dans un contexte de DILX impliquant une protéine RhoGAP régulant l'inhibition des RhoGTPases nous laissent penser que la morphologie et la plasticité astrocytaires seraient des éléments clés dans les mécanismes liés à la mémoire et la cognition. Plusieurs constats nous permettent de penser que la morphologie des astrocytes est un paramètre impliqué dans le bon fonctionnement du réseau neuronal. En effet, la plasticité morphologique des astrocytes et des neurones au niveau de la synapse est impliquée dans les phénomènes de mémoire, mais aussi dans d'autres processus physiologiques régulés par les neurones comme le sommeil ou la lactation (Ben Achour & Pascual, 2012; Halassa & Haydon, 2010). L'implantation d'astrocytes humains, plus grands et plus ramifiés, améliorerait les capacités de mémoire des souris en comparaison avec les souris n'ayant pas bénéficié de cette transplantation (Y. Zhang & Barres, 2013). La morphologie des astrocytes serait importante car pourrait déterminer le nombre de synapses recouvertes et régulées par un seul astrocyte, rendant les domaines de synchronisation neuronale plus importants. Elle serait également primordiale au niveau de la synapse, où les échanges moléculaires et ioniques entre les neurones et les astrocytes se font par diffusion, phénomène complètement dépendant de la distance entre les membranes neuronales et astrocytaires. L'invasion plus ou moins importante du prolongement astrocytaire à l'intérieur de la synapse serait un moyen de moduler les messages synaptiques et l'activité électrique neuronale, rendant ainsi les cellules astrocytaire actrices dans le passage du message nerveux. Les mécanismes sous-jacents à la DI résideraient non pas dans des défauts purement neuronaux mais dans les interactions neurogliales. Ces interactions reposant en grande partie sur la morphologie des cellules, liée à leur fonction, seraient des éléments fondateurs dans le développement de la cognition. Il est tentant d'imaginer que ces réseaux neuronaux et astrocytaires communiqueraient de manière complexe entre eux afin d'améliorer l'implémentation et la réponse neuronale à des stimuli, et même d'améliorer la communication et le lien entre les différentes parties du cerveau. Ces réseaux interdépendants et plastiques serait à l'origine d'une mémoire et d'une cognition plus complexe et plus performante.

1.2) Modulation de la voie de signalisation moléculaire RhoA/ROCK

1.2.1) Matériels et Méthodes

Culture primaire d'astrocytes

Des cultures primaires d'astrocytes ont été réalisées comme précédemment décrit dans l'article que nous avons soumis. Pour résumer, des cortex de souris entre PO et P3 ont été disséqués puis dissociés dans du PBS 1X froid supplémenté en glucose après avoir précautionneusement enlevé les méninges, puis mis en culture sur les lamelles en verre recouvertes de poly-ornithine DMEM supplémenté dans du avec de la pénicilline/streptomycine et du sérum de veau fœtal. Le milieu a été changé tous les 3 jours. Les cellules ont été traitées à l'AraC pendant 24h une fois confluentes.

Traitement pharmacologique lors de la migration in vitro

Les cellules primaires d'astrocytes ont subi des expériences de migration *in vitro* comme décrit précédemment dans l'article que nous avons soumis. Pour résumer, les cellules ont été placées dans un milieu sans sérum pendant 24h à DIV25 puis dans un milieu avec 0.1µM de Y-27632, 1µM d'acide lysophosphatidique (LPA) ou 1mM de LPA et 0.1mM de Y27632 au moment de réaliser une blessure manuellement à l'aide d'un cône de pipette P10. Des photos en contraste de phase ont été réalisés au moment où la blessure a été faite, puis 24h après.

1.2.2) Résultats

Nous avons découvert précédemment dans l'article que nous avons soumis que le traitement des astrocytes lors de la migration *in vitro* par un inhibiteur de la voie RhoA/ROCK permettait de retrouver un phénotype normal de migration des astrocytes KO pour OPHN1 qui migrent plus que les astrocytes KO sans traitement (n=3, p=0.0049, t-test, Fig. 22). Pour confirmer l'implication de la voie RhoA/ROCK dans la migration astrocytaire et caractériser de manière plus fine les mécanismes RhoGTPases-dépendants régulés par OPHN1 dans les astrocytes lors de la migration, nous avons également utilisé le LPA qui active la voie RhoA. L'objectif de ce traitement était de voir si l'activation de la voie RhoA dans les astrocytes permettait de reproduire le phénotype des astrocytes déficients en OPHN1. Nous avons constaté que l'activation de la voie RhoA par le LPA n'avait pas d'effet sur la migration des astrocytes normaux (n=3, p=0.634, t-test, Fig. 22), contrairement aux astrocytes KO pour OPHN1 qui migraient plus vite (n=3, p=0.0003, t-test, Fig. 22). De plus, la combination du Y-27632 et du LPA a pour effet d'accélérer la migration des astrocytes WT (n=3, p=0.0357, t-test, Fig. 22) et KO (n=3, p=0.03, t-test, Fig. 22).



Figure 22: OPHN1 régule l'effet du LPA sur la migration des astrocytes in vitro.

1.2.3) Discussion

En utilisant un activateur de la voie RhoA lors de la migration in vitro, nous espérions retrouver des résultats similaires aux conditions KO puisque la voie RhoA est suractivée dans les astrocytes déficients en OPHN1 in vitro. Le LPA n'a pas d'effet sur la migration des astrocytes, tandis qu'il accélère la migration des astrocytes invalidés pour OPHN1, alors que cette voie est déjà suractivée en conditions basales KO où les astrocytes migrent plus lentement. Il existe une publication reportant ce phénomène dans des astrocytes en migration in vitro. En effet, le LPA n'a pas d'effet sur la migration des astrocytes sauf si la voie RhoA est inhibée (Sato et al., 2011). L'explication à ce phénomène est que la voie Rac est également activée par les récepteurs au LPA ce qui a pour conséquence une activation de la voie de migration LPAR1/G_{i/o}/Rac, qui est par ailleurs inhibée par la voie ROCK. Ceci explique le fait qu'un inhibiteur de ROCK permettrait d'activer la voie LPAr1/Gi/o/Rac dans les astrocytes. En revanche, le fait que le LPA ait un effet d'accélération de la migration des astrocytes KO pour OPHN1 n'est pas facilement explicable. Un des éléments de réponse serait que la migration astrocytaire in vitro repose sur des mécanismes complexes d'activation et d'inhibition de différentes RhoGTPases qui sont capables de s'activer ou de s'inhiber entre elles. L'activation des processus de migration repose donc sur la balance d'activation des différentes RhoGTPases.

L'ensemble de ces observations ne nous permet pas de conclure sur les mécanismes et les voies faisant intervenir les différentes RhoGTPases et la RhoGAP OPHN1 dans les mécanismes de régulation de la migration. Cependant il nous donne des pistes et des voies potentielles dépendante de Rac lors de la migration. Il serait donc intéressant à l'avenir de vérifier :

- Si l'activation d'autres RhoGTPases est dérégulée en conditions KO
- Si cette dérégulation est bien dépendante d'OPHN1 ou provient indirectement de la dérégulation de RhoA, les voies des RhoGTPases pouvant s'auto-réguler entre elles.

- S'il y aurait aussi lors de la migration un défaut de localisation des RhoGTPases, également importante lors de la mise en place des mécanismes de migration.

<u>Chapitre 2 : La composante astrocytaire cellulaire autonome</u> <u>de la DI liée à Oligophrénine-1</u>

2.1) Mise en place d'un KO conditionnel

2.1.1) Présentation des lignées de souris utilisées

Afin de vérifier si les défauts astrocytaires observés *in vivo* sont bien dépendants de l'absence d'OPHN1 dans les astrocytes et non dû à un environnement où tous les types cellulaires n'expriment pas OPHN1, nous avons mis au point une lignée de souris grâce au croisement de trois lignées :

- la lignée floxée OPHN1 : le gène Ophn1 est délété et remplacé par une cassette comprenant à ses extrémités des sites loxP hémi-mutés en position inversés, le cDNA du gène OPHN1 tagué à son extrémité amino-terminale par une protéine Flag et un gène inversé codant pour la chaine alpha du récepteur CD8, marqueur d'inversion de la cassette et donc de l'inactivation de OPHN1. L'induction de l'activité enzymatique de la protéine CRE catalyse l'inversion de toutes les séquences entre les sites loxP, amenant à l'inactivation fonctionnelle de la protéine OPHN1 et l'expression du gène CD8. Après recombinaison, nous avons observé i) la perte de la protéine OPHN1 et ii) l'absence de l'expression de la chaine CD8 alpha celle-ci étant probablement dégradée lors de sa maturation. Toutefois, nous avons pu vérifier que l'ARNm correspondant à l'ADNc CD8 est bien exprimé. Ce rapporteur est donc inutilisable et nous avons utilisé un autre système rapporteur de l'activité CRE, la lignée mTmG.
- la lignée floxée mTmG ou tomato (Muzumdar, Tasic, Miyamichi, Li, & Luo, 2007;
 Zong, Espinosa, Su, Muzumdar, & Luo, 2005) : cette lignée comporte au locus *Rosa* un transgène qui permet l'expression ubiquitaire du gène *Tomato* sous le contrôle du promoteur CAG. L'ADNc de *Tomato* est floxé et il est délété lorsqu'il est recombiné par la protéine CRE permettant l'expression d'un autre ADNc codant la

GFP situé en aval de la cassette *Tomato* floxée. Ce gène fluorescent nous permet de supposer que les cellules exprimant la GFP ont également recombiné la cassette contenant l'ADNc d'OPHN1. Sachant que l'efficacité de la CRE dépend de son accès à l'ADN et que les loci *Ophn1* et *Rosa* sont différents, nous devons valider ce modèle, à savoir montrer que les cellules GFP n'expriment plus OPHN1.

la lignée GFAP-Cre-ERT2 : sous l'action du Tamoxifène, la protéine recombinante CRE devient active dans les cellules sous le promoteur *Gfap*, comme décrit précédemment (Hirrlinger, Scheller, Braun, Hirrlinger, & Kirchhoff, 2006)

Les souris que nous avons utilisées pour ces expériences sont les souris mâles *Tomato* +/- : *OPHN1* lox/Y : *Gfap-Cre-ERT2* +/-

2.1.2) Protocole d'invalidation du gène

Nous avons injecté en injections intrapéritonéales 100 µL de Tamoxifène (10 mg/ml ; émulsion éthanol-huile) par jour pendant 5 jours à partir de P15, puis une deuxième série d'injections a été réalisée à 2 mois (200µL par jours pendant 5 jours en injections intra-péritonéales). Comme décrit précédemment la souris doit être sacrifiée au minimum 10 jours après la première injection pour être sûr que l'effet de la CRE ait eu le temps de se mettre en place (Chow, Zhang, & Baker, 2008).

2.1.3) Validation du modèle

Nous avons dans un premier temps voulu réaliser des marquages anti-Flag pour localiser l'expression de la protéine OPHN1 qui lui était associée, mais nous n'avons malheureusement pas pu obtenir de marquage satisfaisant. Pour valider notre modèle, nous avons donc, d'une part, vérifié que la protéine GFP rapporteur de la recombinaison génomique était bien exprimée lorsque les souris avaient reçu les injections de Tamoxifène, et d'autre part, vérifié au niveau de l'ADN génomique que le gène *CD8* marqueur de l'inversion de la cassette *OPHN1* floxé était bien présent dans le bon sens transcriptionnel chez les souris traitées au Tamoxifène.

Contrairement aux souris ayant reçu les injections du véhicule seul (émulsion d'éthanol et d'huile), nous avons observé chez les souris traitées au Tamoxifène la présence de cellules vertes dans toutes les parties du cerveau, de manière homogène sur un axe antéro-postérieur. Les cellules vertes ont été identifiées comme étant des astrocytes grâce à un co-marquage de la protéine GFAP. Des PCR réalisées sur des lysats d'ADNg extraits de l'hippocampe ou des biopsies de queues de souris nous montrent que le gène CD8 est bien recombiné après injections de tamoxifène, et absent après injections du véhicule (Fig. 23A).





A : Représentation des trois lignées de souris utilisées et vérification du modèle après injections de Tamoxifène.
 B : Schéma expérimental de cicatrisation gliale dans le KO conditionnel.

Ces résultats sont les premiers éléments nous permettant de constater que l'action du Tamoxifène permet bien d'exprimer le gène GFP dans les astrocytes et qu'il y a bien inversion de la cassette *OPHN1* floxée. En revanche, dans la possibilité où la protéine CRE aurait une

action sur un seul des deux gènes floxés au sein d'une même cellule, plusieurs points doivent être abordés pour pouvoir valider entièrement notre modèle :

- Les cellules vertes sont-elles toutes invalidées pour le gène OPHN1 ?
- Les cellules rouges, qui n'ont pas recombiné le gène *Tomato*, expriment-elles bien
 le gène *OPHN1* et n'ont pas inversé la cassette correspondante ?

Pour répondre à ces questions, un tri cellulaire par FACS nous a permis d'isoler les cellules vertes et les cellules rouges, à partir d'hippocampes de souris traitées au Tamoxifène, sur lesquelles nous projetons d'isoler les ARN. A partir de ces ARN, nous pensons réaliser des PCRq pour les ARN codant pour la GFAP et CD8 dans le but de démontrer que la fraction des cellules vertes présente un enrichissement en astrocytes et en cellules ayant recombiné la cassette *OPHN1* floxé.

2.2) Des défauts morphologiques identifiés propres aux astrocytes

2.2.1) Résultats

Dans notre modèle KO conditionnel partiellement validé, nous avons réalisé les mêmes expériences de cicatrisation gliale que dans le modèle de KO total, mais sans injecter de virus (Fig.23B). Pour vérifier l'impact de l'invalidation du gène *OPHN1* dans les astrocytes sur la taille de la zone proximale de la cicatrice corticale, nous avons utilisé deux types de souris ayant reçu des injections au Tamoxifène pour éviter tous résultats qui seraient dus uniquement à une potentielle action du Tamoxifène sur les cellules :

- des souris mâles Tomato +/- : OPHN1 lox/Y : Gfap-Cre-ERT2 +
- des souris mâles *Tomato* +/- : *OPHN1* lox/Y : *Gfap-Cre-ERT2* (souris contrôles)

Nous avons montré que la zone proximale de la cicatrice corticale (délimité par le marquage NESTIN) chez les souris KO conditionelles astrocytaires pour *OPHN1* avait tendance à être plus petite que chez les souris contrôles (n=4, p=0.0759, t-test, Fig.24).





A : Immunomarquage de la protéine NESTIN au niveau de la cicatrice gliale dans un modèle de KO conditionnel astrocytaire pour *OPHN1* exprimant la CRE (CRE+) ou non (CRE-) permettant de mesurer la taille de la zone proximale de la cicatrice gliale. **B** : Quantification de la taille de la zone proximale dans des conditions KO conditionnel astrocytaire (CRE+) ou contrôle (CRE-) (n=4).

Pour la morphologie cellulaire nous avons décidé de comparer les astrocytes + GFP (dépourvus d'OPHN1) et les astrocytes voisins -GFP (exprimant OPHN1) au sein du même animal grâce au marquage GFAP (en rouge sur les figures 25 et 26). Nous avons préalablement démontré que ce marquage, même s'il sous-estime la ramification réelle des astrocytes, permettait tout de même de retrouver le résultat différentiel de ramification des astrocytes WT et des astrocytes des souris KO total pour OPHN1 observé grâce à l'expression d'une protéine GFP cytoplasmique sous le promoteur *Gfap* obtenu précédemment (WT n=29, KO n=27, p= 0.0266, p=0.0390, multiple t-tests, Fig. 25).



Figure 25: Comparaison de deux analyses de Scholl basée sur la protéine GFP ou GFAP.

Parallèlement aux analyses de Scholl, réalisées précédemment, basées sur l'expression d'une GFP cytoplasmique dans le modèle WT ou KO total *OPHN1*, nous avons réalisé un immunomarquage GFAP sur ces mêmes cellules pour faire une autre analyse de Scholl basée sur ce marquage (WT n=29, KO n=27).

Nous avons démontré par une analyse de Scholl que la ramification des astrocytes GFP+/GFAP+ en comparaison avec les astrocytes voisins GFP-/GFAP+ avaient un cytosquelette de filaments intermédiaires moins ramifié (n=40, p= 0.00167, p=0.00183, p=0.000230, p=0.000252, multiple t-tests, Fig.26).





Figure 26: OPHN1 régule la morphologie astrocytaire de manière cellulaire autonome.

A : Immunomarquage de la protéine GFAP sur des astrocytes distaux à la cicatrice gliale ayant recombiné (GFP+) ou non (GFP-) la cassette *Tomato* floxée. **B** : Quantification de l'analyse de Scholl sur le marquage GFAP dans les astrocytes GFP+ et GFP- (n=40).

2.2.2) Discussion

Nous avons montré que la zone proximale de la cicatrice corticale chez les souris KO conditionnelles astrocytaires pour *OPHN1* avait tendance à être plus petite que chez les souris contrôles. Cependant cette tendance n'est pas significative. Cela pourrait s'expliquer de deux manières :

- L'efficacité de la recombinase n'est pas totale et il existe une proportion d'astrocytes autour de la cicatrice exprimant OPHN1. Ces cellules seraient en nombre suffisant pour compenser le défaut de recrutement des astrocytes OPHN1 au niveau de la zone proximale de la lésion.
- L'allèle floxé *OPHN1* est peut-être un allèle hypomorphe, comme il a pu être décrit dans d'autre modèle de gène loxé (Kerr, Alvarez-Saavedra, Sáez, Saona, & Young, 2008)
- D'autres types cellulaires pourraient participer au phénotype de cicatrisation gliale,
 comme la microglie par exemple

Il faudrait donc :

- Réaliser la même expérience sur un nombre de souris plus important pour pouvoir conclure sur le caractère cellulaire autonome de ce défaut de migration *in vivo*.
- Faire un immunomarquage et une acquisition dans les mêmes conditions du marqueur NESTIN dans des souris WT et les souris contrôles *Tomato* +/- : *OPHN1* lox/Y : *Gfap-Cre-ERT2* – pour vérifier l'effet possiblement délétère du gène loxé *OPHN1*
- Faire un immunomarquage dans les différents modèles de souris pour OPHN1 de la microglie pour observer d'éventuels mécanismes de compensation de la perte d'OPHN1 dans les astrocytes

Dans les souris KO conditionnelles astrocytaires pour *OPHN1* nous avons pu observer que la ramification du cytosquelette marqué par la GFAP était plus simple dans les astrocytes GFP+ par rapport au contrôle GFP-. De manière surprenante, la différence de ramification du cytosquelette de GFAP après l'inactivation conditionnelle d'OPHN1 dans les astrocytes (GFP+ vs GFP-) est plus importante en comparaison avec celle observée dans le KO constitutif (KO vs WT). Ceci pourrait s'expliquer de plusieurs manières :

 Le Tamoxifène pourrait avoir un effet sur une voie que nous n'avions pas identifiée qui accentuerait le déficit de ramification dû à OPHN1

- L'expression de la protéine GFP ou TOMATO aurait un effet sur la physiologie de la cellule qui serait absent dans les souris WT et KO total
- Des mécanismes de compensation surviennent au cours du développement dans le modèle constitutif et atténuerait l'effet de la perte « aigue » d'OPHN1 dans le cas de l'inactivation conditionnelle restreinte aux astrocytes
- La variabilité inter-individus atténue la différence observée entre les populations d'astrocytes exprimant OPHN1 ou non : les populations de cellules contrôles proviennent des mêmes souris dans les expériences de KO conditionnel, tandis qu'elles proviennent de souris différentes dans les expériences de KO total

Dans notre cas, les expériences d'immunomarquages, les acquisitions au microscope confocal et les analyses d'images n'ont pas été faites de la même manière dans les expériences KO total et KO astrocytaire conditionnel. Ainsi il serait intéressant de réitérer ces marquages et analyses des expériences en comparant directement la morphologie des astrocytes dans le modèle WT, KO total et KO conditionnel (astrocytes verts et rouges). Il faudrait aussi tenir compte du fait que le contrôle est mesuré dans différents animaux dans le cas du KO total, alors qu'il est interne dans le cas du KO conditionnel astrocytaire.

Ces résultats nous permettent tout de même de conclure sur le caractère cellulaire autonome de l'action d'OPHN1 sur la ramification du cytosquelette de GFAP des astrocytes distaux à la cicatrice gliale corticale.

Nous avons prévu dans un deuxième temps de mettre au point une acquisition et une analyse d'images assez fine, nous permettant d'appréhender le volume occupé par les astrocytes, basée sur le marquage membranaire de GFP dans le modèle mTmG (Figure 26A). Si une telle analyse est possible, il serait alors également intéressant de comparer les astrocytes GFP positifs des souris traitées au tamoxifène mâles :

- Tomato +/- : OPHN1 lox/Y : Gfap-Cre-ERT2 +
- Tomato +/- : OPHN1 WT/Y : Gfap-Cre-ERT2 +

Même si dans ce cas nous perdons l'avantage d'avoir une population d'astrocytes contrôles internes pour chaque souris, il parait plus pertinent de comparer un marqueur qui ne sousestime pas la morphologie des astrocytes comme le cytosquelette de GFAP.

<u>Chapitre 3 : la connexine 30, une protéine impliquée dans la</u> <u>plasticité astrocytaire</u>

3.1) Connexine 30 et polarisation astrocytaire au cours du développement postnatal

3.1.1) Résumé

La maturation des astrocytes au cours du développement se traduit par des changements morphologiques importants, passant de cellules éparses et peu ramifiées à des cellules polarisées et une ramification très dense. La protéine connexine30 (Cx30) exprimée pendant la période post-natale et formant des jonctions communicantes entre les astrocytes (GAP), joue un rôle dans l'extension et la ramification des prolongements astrocytaires. Cependant, son rôle dans la polarisation des astrocytes, qui est un élément important de la morphologie cellulaire, n'est pas connu. Nous avons démontré que la Cx30, indépendamment de sa fonction GAP de couplage intercellulaire, altérait l'orientation des protrusions, du centrosome et de l'appareil de Golgi dans un modèle de migration in vitro. L'orientation des protrusions astrocytaires par la Cx30 se fait via la voie de polarisation laminin/beta1integrine/cdc42. En effet, la Cx30 réduit le niveau de laminine, inhibe la redistribution des récepteurs extracellulaires à la ß1integrin et inhibe le recrutement à la membrane et l'activation de la RhoGTPase Cdc42 au front de migration des astrocytes en migration in vitro. In vivo, Cx30 contribue à a mise en place de la polarité astrocytaire au cours de la maturation au niveau de l'hippocampe. L'ensemble de ces résultats montrent que Cx30 régule la polarité astrocytaire au cours du développement.

3.1.2) Article

© 2018. Published by The Company of Biologists Ltd | Development (2018) 145, dev155275. doi:10.1242/dev.155275



RESEARCH ARTICLE

Connexin 30 controls astroglial polarization during postnatal brain development

Grégory Ghézali^{1,2}, Charles-Félix Calvo^{1,*}, Laure-Elise Pillet^{1,3,*}, Flora Llense⁴, Pascal Ezan¹, Ulrike Pannasch¹, Alexis-Pierre Bemelmans⁵, Sandrine Etienne Manneville⁴ and Nathalie Rouach^{1,‡}

ABSTRACT

Astrocytes undergo intense morphological maturation during development, changing from individual sparsely branched cells to polarized and tremendously ramified cells. Connexin 30, an astroglial gap-junction channel-forming protein expressed postnatally, regulates in situ the extension and ramification of astroglial processes. However, the involvement of connexin 30 in astroglial polarization, which is known to control cell morphology, remains unexplored. We found that connexin 30, independently of gap-junction-mediated intercellular biochemical coupling, alters the orientation of astrocyte protrusion, centrosome and Golgi apparatus during polarized migration in an in vitro wound-healing assay. Connexin 30 sets the orientation of astroglial motile protrusions via modulation of the laminin/ß1 integrin/ Cdc42 polarity pathway. Connexin 30 indeed reduces laminin levels, inhibits the redistribution of the β 1-integrin extracellular matrix receptors, and inhibits the recruitment and activation of the small Rho GTPase Cdc42 at the leading edge of migrating astrocytes. In vivo, connexin 30, the expression of which is developmentally regulated, also contributes to the establishment of hippocampal astrocyte polarity during postnatal maturation. This study thus reveals that connexin 30 controls astroalial polarity during development.

KEY WORDS: Astrocytes, Connexin, Polarity, Development, Hippocampus, Mouse

INTRODUCTION

During early postnatal stages, individual sparsely branched astrocytes mature into extremely ramified cells to form interconnected cellular networks. The establishment of astrocytic networks relies especially on the timely tuned expression of gapjunction (GJ) subunit proteins, the so-called connexins (Cxs).

¹Center for Interdisciplinary Research in Biology, Collège de France, CNRS UMR 7241, INSERM U1050, Labex Memolife, PSL Research University, Paris 75005, France. ²Doctoral School N*562, Paris Descartes University, Paris 75006, France. ⁴Institut Pasteur, CNRS UMR 3691, Cell Polarity, Migration and Cancer Unit, 25 Rue du Dr Roux, 75724 Paris Cedex 15, France. ⁶Commissariat à l'Energie Atomique et aux Energies Alternatives (CEA), Département de la Recherche Fondamentale, Institut de biologie François Jacob, MIRCen, and CNRS UMR 9199, Université Paris-Sud, Neurodegenerative Diseases Laboratory, Fontenay-aux-Roses 92260, France.

*These authors contributed equally to this work

^{*}Author for correspondence (nathalie.rouach@college-de-france.fr)

G.G., 0000-0001-8161-2241; C.-F.C., 0000-0003-1327-7722; L.-E.P., 0000-0002-5023-8274; U.P., 0000-0001-6502-1046; S.E.M., 0000-0001-6651-3675; N.R., 0000-0002-5574-888X

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/3.0), which permits unrestricted use, distribution and reproduction in any medium provided that the original work is properly attributed.

Received 23 May 2017; Accepted 21 January 2018

Remarkably, the two main astroglial Cxs, Cx43 and Cx30, show different developmental expression patterns: in mice, expression of Cx43 starts around embryonic day 12, whereas that of Cx30 is detectable from postnatal day 16 (P16) (Kunzelmann et al., 1999). Strikingly, along with their well-known role in gap-junction (GJ)mediated intercellular coupling, the functions of Cxs also include the formation of hemichannels (HCs) at the single cell level, which enables bidirectional exchanges with the extracellular space, as well as non-channel functions, which are mediated by Cx protein interactions or intracellular signaling. The isoform-specific sequence of the Cx intracellular C-terminal tail indeed contains multiple protein-binding motifs and thus serves as a multi-modal signaling platform for Cx-interacting partners (Herve et al., 2007). Consistently, proteomic analysis revealed that Cx43 functionally interacts with various cytoskeletal proteins, including actin and tubulin, which are involved in vitro in the formation of astroglial protrusions (Olk et al., 2010). Interestingly, Cx43 locally interacts with actin at the tip of astrocyte processes during the early stage of adhesion, as shown by combining atomic force microscopy with immunolabeling (Yamane et al., 1999). In addition, the non-channel functions of Cx43 and Cx26 are essential in vivo during embryonic neurodevelopment, notably by mediating intercellular adhesion between migrating cortical neurons and radial glia fibers (Elias et al., 2007). Such adhesion may rely on cross-junctional interactions between Cx-containing GJs and adhesion complexes (Xu et al., 2001, 2006).

In contrast and despite the late postnatal onset of Cx30 expression, little is known about the contribution of Cx30 to astroglial maturation during brain development. Similar to other Cxs, Cx30 interacts with the actin and tubulin cytoskeletons (He et al., 2009; Qu et al., 2009). In addition, our recent work shows that Cx30, via an unconventional function involving its C-terminal domain, controls postnatally in the hippocampus the extension and ramification of astroglial processes independently of GJ biochemical coupling and hemichannel activity (Pannasch et al., 2014). Remarkably, such regulation occurs at the whole-cell level as well as at perisynaptic sites, where it regulates the insertion of astroglial protrusions into synaptic clefts, and thereby directly sets synaptic glutamate levels through clearance. As local extension and ramification of fine processes relies on motility and polarity (Parsons et al., 2010), we here explored a role for Cx30 in the polarization of migrating astrocytes. We found that Cx30 expressed early on in astrocytes alters the reorientation of their protrusions, the microtubule organizing center (MTOC) and Golgi apparatus during polarized migration in the in vitro scratch assay. This effect is independent of GJ-mediated biochemical coupling and is mediated by modulation of a laminin/β1-integrin/Cdc42 signaling pathway (Etienne-Manneville and Hall, 2001; Peng et al., 2008). Cx30 indeed perturbed laminin levels and distribution in migrating astrocytes, the redistribution of \$1-integrin receptors at leading

RESEARCH ARTICLE

edges of astroglial protrusions, and the polarized recruitment and activation of the polarity protein Cdc42 (Etienne-Manneville, 2008). Importantly, we also found that Cx30, the expression of which is developmentally regulated, contributed *in vivo* to the establishment of astrocyte polarity in the hippocampus during postnatal maturation, by setting the orientation of *stratum radiatum* (*s.r.*) astroglial processes. This study thus identifies Cx30 as an important regulator of astrocyte polarization during development.

RESULTS

Cx30 regulates the polarization of migrating astrocytes

To investigate a role for Cx30 in the polarization of migrating astrocytes, we first used the scratch-induced migration assay in cultured astrocytes (Etienne-Manneville, 2006) transfected with a construct encoding Cx30 fused to the Venus YFP mutant protein (Cx30-Venus) (Beltramello et al., 2003). Cx30-Venus displayed proper cellular distribution and channel function, as it was targeted to cell membranes, formed gap junctional plaques and functional GJ channels, as shown by immunocytochemistry and the scrape loading tracer transfer technique (Fig. S1). Following scratching of the cell monolayer, wound-edge control astrocytes polarized and initiated directed migration by extending tubulin-rich protrusions perpendicularly to the wound $(\pm 11.2^{\circ} \pm 1.2, n=48 \text{ cells}, \text{Fig. 1A,B})$. Strikingly, expressing Cx30 impaired the proper orientation of migrating astroglial protrusions (with a mean variation of 32.2°±4.2, n=30 cells, Fig. 1A,B). This astrocyte polarization is also associated with the relocalization of the centrosome and the Golgi apparatus in front of the nucleus in the direction of the developing protrusion (Etienne-Manneville and Hall, 2001), as assessed by immunostaining for y-tubulin and GM130, respectively (Fig. 1C). We found that Cx30 expression also altered the scratchinduced reorientation of the centrosome [% of polarized; Ct (control astrocytes): 65.9 \pm 1%, n=313 cells; Cx30 (Cx30 expressing astrocytes): 40.7 \pm 4%, n=187 cells, Fig. 1D,E] and Golgi apparatus (Ct: 64.7±2%, n=352 cells; Cx30: 35.4±4%, n=153 cells, Fig. 1F,G). Cx30-mediated regulation of astrocyte polarization did not involve GJ-mediated intercellular biochemical coupling, as the defect in cell polarity still occurred in astrocytes expressing the Cx30T5M construct (% of polarized cells assessed by reorientation of the centrosome: 49.9±3.7%, n=418 cells; Golgi apparatus: 40.7±4.8%, n=503 cells, Fig. 1D-G), a mutated form of Cx30 in which the replacement of a threonine by a methionine at position 5 of Cx30 inhibits intercellular biochemical coupling mediated by Cx30 GJ channels (Grifa et al., 1999; Schütz et al., 2010) (Fig. S1). These data demonstrate that Cx30 alters the polarization of migrating astrocytes independently of GJ-mediated intercellular biochemical coupling.

Cx30 regulates the expression and distribution of laminin and sets the polarized distribution of β 1 integrin in migrating astrocytes

Migrating astrocytes contribute to the deposition of extracellular matrix (ECM) molecules, including laminins, which are essential for integrin-mediated cell polarization (Peng et al., 2008). We thus investigated whether astroglial Cx30 regulates the expression of laminin upon wounding. Immunoblotting confirmed that laminin expression was upregulated in control migrating astrocytes after wounding (Fig. 2A,B), as previously reported (Peng et al., 2008). We found that Cx30 expression inhibited the wound-induced upregulation of laminin expression in cultured astrocytes after (normalized laminin expression value in astrocytes after) wounding compared with before wounding; Ct: 1.47 ± 0.20 , n=6;

Development (2018) 145, dev155275. doi:10.1242/dev.155275

Cx30: 1.06±0.08, n=6 cultures, Fig. 2A,B). Consistent with these data, immunocytochemistry revealed that Cx30 reduced total laminin levels in wounded astrocytes (Fig. 2C,D) through a decrease in both the number (Ct: 0.125±0.08 per μ m², n=14 cells; Cx30: 0.074±0.011 per μ m², n=15 cells, Mann–Whitney, P<0.01) and size of laminin puncta (Ct: 2.068±0.078 μ m², n=14 cells; Cx30: 1.603±0.197 μ m², n=15 cells, Mann–Whitney, P<0.05). Remarkably, during polarized migration, laminin puncta extended up to the leading edge of astroglial protrusions where they accumulated, as shown by immunocytochemistry in GFP-labeled cells (Fig. 2C). We found that Cx30 not only decreased total laminin puncta toward the leading edge of migrating astrocytes (Fig. 2C,D).

Laminin locally binds receptors, including $\beta 1$ integrins, which are trafficked to the cell leading edge where they are essential for proper astrocyte polarization (Peng et al., 2013). To explore whether Cx30 regulates the translocation of $\beta 1$ integrin to the leading edge, we transfected astrocytes with both GFP-tagged $\beta 1$ integrin and Cx30. Cx30 prevented the polarized recruitment of $\beta 1$ integrin-GFP at the cell wound edge [$\beta 1$ integrin-GFP intensity at the protrusion edge (a.u.): Ct: 11.9 ± 1.7 , n=15 cells; Cx30: 5.2 ± 0.7 , n=9 cells, Fig. 3A,B]. Moreover, Cx30 occasionally induced accumulation of $\beta 1$ integrin-GFP in the perinuclear area. Altogether, these data demonstrate that Cx30 controls the level of laminin expression and distribution, as well as the subcellular trafficking of $\beta 1$ integrin during astrocyte polarization.

$\label{eq:cx30} \mbox{ controls the activation and polarized recruitment} of \mbox{ Cdc42}$

Integrin-mediated signaling promotes astrocyte polarization through the rapid activation and polarized recruitment of the small Rho-GTPase Cdc42 at the leading edge of migrating astrocytes (Etienne-Manneville and Hall, 2001). We thus assessed whether Cx30 modulates the recruitment and activation of Cdc42 in astrocytes expressing a green fluorescent protein (GFP)-tagged Cdc42 together with the Cx30 protein (Etienne-Manneville and Hall, 2001). We found that GFP-Cdc42 accumulated at the leading edge of control migrating astrocytes (Fig. 4A,B), as previously reported (Osmani et al., 2006). In contrast, Cx30 expression prevented the accumulation of Cdc42 at cell front (Ct: 188.5±11.9 a.u., n=19 cells; Cx30: 89.3±7.6 a.u., n=15 cells; Fig. 4A,B). The activation of the Rho-GTPase Cdc42 is mediated by the switch from a GDP-bound to a GTP-bound state (Sinha and Yang, 2008). We found that Cx30 also inhibited the wound-induced activation of Cdc42 by ~25%, as assessed by a pull-down activation assay (GTP-Cdc42 as % of the total Cdc42 detected: GFP: 18.3±3.7%: Cx30: 13.8±2.9, n=3 cultures, Fig. 4C,D). These data suggest that Cx30 influences astrocyte polarization by altering the recruitment and activation of Cdc42 at cell wound edge.

Synaptic levels of laminin are set by astroglial Cx30

During early postnatal development, protoplasmic astrocytes extend countless fine protruding processes that migrate to virtually fill the entire neuropil and thus reach the vicinity of synapses. The ECM component laminin β_2 , which is deposited on the surface of synapses and is essential for building-up and maintaining the proper synapse architecture (Egles et al., 2007), has been reported to be locally released by astrocyte processes (Hunter et al., 1992). As we found Cx30 to negatively regulate the deposition of laminin proteins in cultured astrocytes, we explored the possibility that Cx30 may also control *in vivo* the expression of laminins at synaptic sites. To do so, we prepared synaptosomal extracts from hippocampi of wildtype juvenile mice (+/+, Fig. 5A) or mice lacking the Cx30 protein

Development (2018) 145, dev155275. doi:10.1242/dev.155275



Fig. 1. Cx30 regulates the orientation or migrating astrocytes. Primary astrocyte cultures were transfected with the Cx30-vertus plasmid. (A) 6 in arter wounding, control and Cx30-expressing cells were immunolabeled for tubulin and the orientation of their tubulin fibers were measured. Scale bar: 20 μ m. (B) The orientation of tubulin fibers was quantified in transfected and non-transfected cells as the mean angular variation to the perpendicular in relation to the wound [control (Ct), *n=*48 cells; Cx30, *n=*30 cells]. Cx30-expressing cells showed a greater angular deviation than control cells, suggesting that their cytoskeletal orientation was impaired. (C) Schematic depicting centrosome (red) reorientation of wound edge astrocytes (green) in front of the nucleus (blue) in the control condition. (D) 8 h after wounding, cells were immunolabeled for γ -tubulin (red) to mark the centrosome. The orientation of the nucleus (blue) in the control condition. (C) Schematic depicting centrosome (els). Cx30 and Cx30TSM decreased the proportion of astrocytes with their centrosome property reoriented. (F) 8 h after wounding, cells were immunolabeled for GM130 and the orientation of the nucleus-Golgi axis was measured. Scale bar: 20 μ m. Arrows indicate the direction of the nucleus-Golgi axis. (G) Percentage of cells with their Golgi apparatus oriented perpendicularly (±60") to the wound (Ct, *n=*352 cells; Cx30, *n=*187 cells; Cx30 and Cx30TSM decreased the proportion of astrocytes with their controsome property orientated. Asterisks indicate the direction of the nucleus-Golgi axis. (G) Percentage of cells with their Golgi apparatus oriented perpendicularly (±60") to the wound (Ct, *n=*352 cells; Cx30, *n=*187 cells; Cx30 and Cx30TSM decreased the proportion of astrocytes with their Golgi property orientated. Asterisks indicate statistical significance (***P<0.001; **P<0.01).

 $(Cx30^{-/-}, -/-)$, and further performed laminin proteins immunoblot assays. We observed that control hippocampal synaptosomal extracts contained laminins, especially laminin β_2 (Fig. 5B,D) as previously demonstrated (Egles et al., 2007). Interestingly, we observed that the absence of Cx30 induced a net increase in the synaptic level of laminins [normalized protein levels (a.u.): +/+: 0.63±0.07; -/-: 0.92±0.02, *n*=3 mice, Fig. 5B,C], notably laminin β_2 [normalized protein levels (a.u.): +/+: 0.44 ±0.05; -/-: 0.68±0.05, *n*=3 mice, Fig. 5D,E]. In all, these data demonstrate that Cx30 mediates hippocampal synaptic laminin downregulation *in vivo*.

RESEARCH ARTICLE

Cx30 contributes *in vivo* to the morphological and functional polarity of astrocytes during postnatal development

Starting at the third week of postnatal development, i.e. at the time of hippocampal synaptogenesis, CA1 astrocytes of the *s.r.* change the orientation of their glial fibrillary acidic protein (GFAP)-rich stem processes to polarize perpendicularly to the pyramidal cell layer (Nixdorf-Bergweiler et al., 1994). As we show here *in vitro* that Cx30 regulates the orientation of astrocyte motile protrusions (Fig. 1A), we took advantage of the developing hippocampus to investigate whether Cx30 controls the *in vivo* reorientation of astroglial processes occurring during postnatal maturation. To do so,



Fig. 2. Cx30 regulates the secretion of laminin in migrating astrocytes. (A) Immunoblot detection of laminin expression in control (Ct) or Cx30-expressing (Cx30) astrocytes before (no treatment, NT) or after wounding (wound, 6 h). GAPDH was used as a loading control. (B) Quantitative analysis of laminin expression (*n*=6 cultures). Laminin expression values after wounding were normalized to levels before wounding (NT) in Ct and Cx30-expressing astrocytes. Cx30 prevented the increase in relative laminin levels after wounding. (C) Primary astrocytes were transfected with GFP (control) or Cx30-expressing astrocytes. Cx30 prevented were immunolabeled for laminin. Scale bar: 20 µm. (D) Quantitative analysis of laminin expression (area occupied by laminin puncta normalized to leading edge normalized to cell length). Cx30 impaired the proper recruitment of laminin toward the leading edge (Ct, *n*=14 cells; Cx30, *n*=15 cells). Asterisks indicate statistical significance (**P*<0.05, ***P*<0.01).

we performed GFAP immunohistochemistry in the hippocampus of Cx30 knockout mice $(Cx30^{-/-})$ at two developmental stages [postnatal day 10 (P10) and 30 (1 month)]. Moreover, to estimate the preferential orientation of *s.r.* astrocytes with regards to the pyramidal layer, we measured a polarity index corresponding to the ratio of crossing points between GFAP-positive processes and

parallel or perpendicular axis to the pyramidal layer (Fig. 6A). We found in wild-type mice that P10 astrocytes did not show any preferential orientation (polarity index: 1.01 ± 0.02 , n=44 cells, Fig. 6A,B), whereas astroglial cells from 1-month-old mice preferentially displayed an axial orientation (polarity index: $1.28\pm$ 0.04, n=43 cells, Fig. 6A,B), thereby confirming previous



Fig. 3. Cx30 controls the polarized distribution of β 1 integrin receptors in migrating astrocytes. (A) Primary astrocytes were transfected with β 1 integrin-GFP and Cx30. 8 h after wounding, cells were immunolabeled for Cx30 and the intensity of the β 1 integrin-GFP signal at the leading edge was measured. Scale bar: 20 µm. (B) Quantitative analysis of the β 1 integrin-GFP signal intensity at the leading edge. Cx30 sharply reduced the recruitment of β 1 integrin-GFP at the leading edge (Ct, *n*=15 cells; Cx30, *n*=9 cells). Asterisks indicate statistical significance (**P*<0.01).




Fig. 4. Cx30 controls the recruitment and activation of Cdc42 in migrating astrocytes. (A) Primary astrocyte cultures were transfected with Cx30 and GFP-Cdc42. 8 h after wounding, cells were immunostained for Cx30 and the intensity of the GFP-Cdc42 signal at the leading edge was measured. Scale bar: 20 µm. (B) Quantitative analysis of the linear intensity profile of GFP-Cdc42 at the leading edge. Cx30 reduced significantly the recruitment of GFP-Cdc42 at the leading edge. Cx30 reduced significantly the recruitment of GFP-Cdc42 at the leading edge (Ct, *n*=19 cells; Cx30, *n*=15 cells). (C) Cdc42 pull-down activation assay in astrocytes transfected with Cx30 or GFP 30 min after wounding. Immunoblots showing Cdc42 protein levels in the total (Input) and GTP-bound fractions (GST-PAK-PBD). GAPDH (total) and Ponceau staining (GTP) were used as loading controls. (D) Quantitative analysis of Cdc42 activation (*n*=3 cultures). Cdc42-GTP values were normalized to Cdc42 levels in the total fractions. Cx30 inhibited Cdc42 activation. Asterisk indicates statistical significance (*P<0.05, paired Hest).

observations (Nixdorf-Bergweiler et al., 1994). Strikingly, we observed in 1-month-old $Cx30^{-/-}$ mice that astrocytes lost their preferential orientation regarding the pyramidal layer (polarity index: 1.05±0.02, n=49 cells). This modulation of astroglial cell polarity was independent of GJ-mediated intercellular biochemical coupling, as astroglial polarity was intact in astrocytes from 1-month-old Cx30T5M mutant mice with defective Cx30 channels (Fig. 6B). Remarkably, we found that restoring in vivo Cx30 expression selectively in astrocytes from the hippocampus of $Cx30^{-/-}$ mice at P15 using adenoviral vectors (Fig. 6C,D and Fig. S3) was sufficient to fully rescue a normal polarity phenotype in s.r. astrocytes from 1-month-old animals, whereas GFP infection alone had no effect (polarity index: -/-+GFP: 0.99±0.02, n=34 cells; +Cx30: 1.36±0.07, n=32 cells, Fig. 6E). These data indicate that postnatal Cx30 expression contributes to the establishment of astroglial polarity in the developing hippocampus. We also performed analysis of CA1 s.r. astrocyte orientation by immunohistochemistry of the Golgi marker GM130 in 1-month-old wild-type and $Cx30^{-/-}$ mice. We found that the Golgi apparatus of astrocytes formed bundles of stretched and polarized vesicular compartments, having eventual small branches that filled the base of GFAP+ astrocyte processes (Fig. 6F). Similarly, we observed that disruption of Cx30 reduced the percentage of cells that properly orientated their Golgi perpendicularly to the pyramidal layer (+/-62.2±5.0, n=262 cells; -/-: 44.2±2.0%, n=266 cells, Fig. 6F,G). These findings show that Cx30 is a crucial factor that regulates the orientation of hippocampal astrocytes in vivo during postnatal

development. Interestingly, it has recently been postulated that the radial orientation of CA1 astrocytes may control the spatial properties of GJ-mediated intercellular coupling (Anders et al., 2014). As Cx30 regulates the orientation of CA1 s.r. astrocytes established during development in the hippocampus, we investigated whether this translated at the functional level into the anisotropy of intercellular communication in astroglial networks. To do so, we dialyzed a GJ channel-permeable dye (sulforhodamine-B) in CA1 s.r. astrocytes from hippocampal slices via patch-clamp whole-cell recording. We found that wild-type CA1 astroglial GJ-mediated networks were preferentially oriented perpendicularly to stratum pyramidale (s.p.) (with a polarity index of 1.27±0.10, n=8 slices, Fig. 7A,B). In contrast, Cx30-deficient astrocyte networks extended with no preferential orientation (polarity index: 1.08±0.04, n=10 slices, Fig. 7A,B). This indicates that Cx30 functionally regulates the spatial properties of intercellular communication in astroglial networks. Altogether, these data show that Cx30 controls in vivo the establishment of astrocyte polarity during postnatal development.

DISCUSSION

The present study shows that Cx30 modulates a laminin/ β 1 integrinmediated signaling cascade that controls the reorientation of astroglial migrating protrusions, especially contributing to the postnatal morpho-functional maturation of hippocampal astrocytes.

Here, we have found *in vitro* that Cx30 expression sets the polarization of astroglial protrusions independently of GJ-mediated biochemical coupling. This is reminiscent of an unconventional

5



Fig. 5. Cx30 regulates hippocampal synaptic levels of laminin proteins. (A) Western blot detection of pre- (synapsin I, SYN1) and post- (PSD95) synaptic proteins showed an enrichment of plasma membrane synaptic proteins in crude synaptosomal membrane fraction (S) compared with total hippocampal fraction (T), whereas actin protein levels were clearly similar in both fractions. (B) Immunoblot detection of laminin expression in synaptosomal membrane fractions from mouse hippocampi. (C) Histogram showing the quantitative analysis of normalized laminin expression levels (+/+, n=3 mice; -/-, n=3 mice). The loss of Cx30 expression increased significantly the synaptic levels of laminin. (D) Immunoblot detection of laminin β 2 protein levels in crude hippocampal membrane fractions. (E) Quantitative analysis of laminin β 2 normalized expressions. Hippocampal synapses lacking Cx30 upregulated laminin β 2 expression. In both experiments, actin was used as a loading control. Asterisks indicate statistical significance (**P*<0.05). S+/+, wildtype mice; S-/-, *Cx30^{-/-}* mice.

function of Cx30 that we recently identified in the hippocampus, and which regulates excitatory synaptic transmission by controlling the ramification and insertion of astroglial processes into synaptic clefts (Pannasch et al., 2014). Indeed, by showing that perisynaptic astroglial processes lacking Cx30 literally penetrate synaptic clefts, we revealed that Cx30, via its C-terminal domain and independently of its hemichannel activity and GJ biochemical coupling, is a molecular determinant of astroglial synapse coverage controlling synaptic efficacy and hippocampal-based memory (Pannasch et al., 2014). As Cx30 interacts with elements of the cytoskeleton, such as actin and tubulin (He et al., 2009; Qu et al., 2009), it most likely regulates the dynamic and local changes in astroglial polarity and morphology through its participation in intracellular molecular complexes. Here, we have found in vitro that Cx30 inhibits the upregulation of laminin expression, as well as its polarized distribution toward the leading edge of migrating astrocytes. Remarkably, knocking down Cx43 in human fibroblasts also alters expression of ECM molecules, including laminins, as shown by transcriptional and immunoblot analysis (Esseltine et al., 2015). Interestingly, local regulation of laminin expression has been shown to be the priming event of the B1 integrin-mediated polarity pathway (Frank and Carter, 2004), and we also here reveal that Cx30 regulates the polarized targeting of B1 integrin to the cell wound edge. In addition, our data show that Cx30 controls the recruitment and activation of Cdc42 at the cell leading edge. This finding is consistent with previous studies, showing that Cxs, in particular Cx43, control the activation of small Rho GTPases, such as RhoA, Rac1 and Rap1 (Machtaler et al., 2011; Mendoza-Naranjo et al., 2012). The control of Cdc42 activity by Cx30 may dictate the reorientation of the astrocyte centrosome and Golgi. Noteworthy, Cx30 inhibits the rapid activation of Cdc42 shortly after wounding. Therefore, the lack of laminin deposition observed in Cx30overexpressing astrocytes may actually result from the early

Development (2018) 145, dev155275. doi:10.1242/dev.155275

downregulation of Rho GTPase activity, as previously reported (Wu et al., 2006).

Cx30 starts being expressed around postnatal day 16 in mouse hippocampus, which is exactly the time of synaptogenesis and synaptic pruning (Kunzelmann et al., 1999). The remodeling of the neuropil ECM meshwork, especially laminins, has been associated with long-term synaptic plasticity (Calabresi et al., 2000; Nakagami et al., 2000) and activity-dependent remodeling of pyramidal cell dendrites (Mataga et al., 2004). Here, we report that Cx30 downregulates the deposition of laminins in hippocampal synaptosomal extracts, and particularly the synapse-enriched isoform laminin β 2. Our data thus suggest that Cx30 regulates the ECM-mediated plasticity of neuroglial synaptic circuits in the developing hippocampus. This hypothesis is consistent with the fact that Cx30mice display impaired hippocampal long-term synaptic plasticity and hippocampus-based contextual fear memory (Pannasch et al., 2014). Noteworthy, we demonstrate that Cx30, independently of GJ-mediated biochemical coupling, is also necessary during hippocampal development for the reorientation of CA1 s.r. astrocyte processes along pyramidal cell apical dendrites: the locus of excitatory synapses. Cx30 modulation of laminin signaling likely sets the reorientation of migrating protrusions by regulating astroglial polarization. Noteworthy, we identify that Cx30-mediated regulation of astroglial polarity is multifaceted, as Cx30 overexpression in vitro inhibited the polarity in migrating astrocytes in response to a scratch, whereas Cx30 disruption in vivo abolished the establishment of hippocampal astrocyte polarity during postnatal development. One can hypothesize that astrocyte polarity may be tightly regulated by Cx30 protein levels, implying an expression level-dependent mechanism. It is indeed possible that a defined and 'optimal' Cx30 expression level is necessary for proper astroglial polarity, as is the case for Cdc42 or aPKC, which perturb polarity when inhibited as well as when overactivated (Etienne-Manneville and Hall, 2001). Such a general feature applies for several other cellular processes, such as membrane extension and migration, which are tightly regulated by defined level of adhesion molecules (DeMali and Burridge, 2003). Cx30 may also be required for the pruning of astroglial processes, which sets proper cell polarity. Astrocytes lacking Cx30 have indeed been shown to display larger GFAP domain area, elongated processes and enhanced ramification (Pannasch et al., 2014), all of which may be due to a reduced developmental pruning. Interestingly, we found that the developmental reorientation of CA1 astrocyte processes is accompanied by a similar Cx30-dependent alignment of the Golgi apparatus along the axis of pyramidal cell dendrites. Therefore, it may be hypothesized that this subcellular reorganization supports the acquisition of polarized secretory competence by mature astroglial cells. Interestingly, the loss of radial orientation in s.r. astrocytes from juvenile $Cx30^{-/-}$ mice has functional consequences, as it is associated with a defect in the spatial properties of astroglial networks. This suggests that Cx30, by allowing proper astrocyte orientation, shapes the spatial properties of functional GJ coupling in CA1 s.r. astrocytic networks. This observation corroborates a previous study proposing that the preferential anisotropic coupling of CA1 hippocampal astrocytes relies upon the polarized orientation of their processes (Anders et al., 2014). Remarkably, signaling molecules regulating cell polarity, such as laminin/B1integrin/Rho GTPases also modulate in vitro the permeability of GJ channels and thus the extent of astroglial networks (Derangeon et al., 2008; Rouach et al., 2006). Noteworthy, several physiological and pathological conditions alter the polarity of astrocytes in the s.r. of the hipppocampal CA1



Development (2018) 145, dev155275. doi:10.1242/dev.155275

Fig. 6. Cx30 sets the polarity of hippocampal astrocytes in vivo. (A) Schematic representation of grid-baseline analysis for orientation quantification of GFAP-labeled CA1 s.r astrocytes. Scale bar: 20 µm. (B) Quantitative analysis of astrocytes polarity with respect to the analysis of astrocytes potanty with respect to the pyramidal cell layer. CX30 was found to be required for the proper perpendicular orientation of developing astrocytes (+/+ P10, n=43 cells; +/+ 1 month, n=44 cells; -/- 1 month, n=49 cells; CX30T5M 1 month, n=47 cells). (C,D) CX30 expression in astrocytes from the hippocampal CA1 *s.r.* region of $Cx30^{-l-}$ mice (1-month-old) infected with AAV-GFP (C) or AAV-GFP-Cx30 (D), as shown by GFAP, GFP and Cx30 labeling in hippocampal sections. Scale bar: 15 µm. (E) Quantitative analysis of astrocytes polarity in $-\!/$ – mice showing that wild-type polarity is rescued in *s.r.* astrocytes by restoring Cx30 expression (*n*=32 cells), but not by expressing GFP alone (*n*=34 cells). (F) Immunohistochemical labeling of GM130 (green) and GFAP (red) in the CA1 area of the hippocampus. The diagram illustrates the quantification used to estimate the angular orientation of astrocyte Golgi with regards to the pyramidal layer. Scale bar: 30 µm. (G) Percentage of cells with their Golgi apparatus oriented perpendicularly (±30°) to the pyramidal layer (+/+, n=216 cells; -/-, n=262 cells). Cx30 deficiency decreased the proportion of CA1 astrocytes with their Golgi oriented perpendicularly to the pyramidal layer. Asterisks indicate statistical significance (****P*<0.001; ***P*<0.01).

region. In particular, opposite changes in astrocyte polarity occur with physical exercise (Saur et al., 2014) or enriched environment (Viola et al., 2009) and post-traumatic stress disorder (Saur et al., 2016), suggesting that polarity likely plays an important role in the function of astrocytes during physiological and pathological processes.

Altogether, these data reveal the role of Cx30 in the polarity of astrocytes through a laminin-mediated signaling pathway. Interestingly, wiring of synaptic networks during postnatal stages relies on the remodeling of the extracellular matrix, and concurs with the onset of Cx30 expression. Cx30 thus likely contributes in the hippocampus to the structural maturation of local astroglial circuits within neuronal functional units.

MATERIALS AND METHODS

RESEARCH ARTICLE

Animals

Experiments were carried out according to the guidelines of the European Community Council Directives of January 1st 2013 (2010/63/EU) and of the local animal welfare committee (certificate A751901, Ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation). All efforts were made to minimize the number of animals used and their suffering. Mice (*Mus musculus*) were group housed on a 12 h light/dark cycle. $Cx30^{-/-}$ (Teubner et al., 2003) and $Cx30^{TSM/TSM}$ mice (Schütz et al., 2010) were generated as previously described. All mice were backcrossed to the C57BL6 background. Juvenile mice of both sexes and littermates were used at postnatal days 21-30, unless otherwise stated.

Antibodies, immunohistochemistry and immunoblotting

All the antibodies used in this study are commercially available and have been validated in previous studies, as reported by the suppliers. The following primary antibodies were used: Cx30 rabbit polyclonal (1:500, 610-062, BD Biosciences), GFAP rabbit polyclonal (1:2000, G3893, Sigma), GFP chicken polyclonal (1:500, AB13970, Abcam), α-tubulin rabbit polyclonal (1:10,000, T6199, Sigma), β-actin mouse monoclonal (1:10,000, A5316, Sigma), PSD95 mouse monoclonal (1:500, 610495, BD Biosciences), synapsin I mouse monoclonal (1:500, 610495, BD Biosciences), GM130 mouse monoclonal (1:500, 610822, BD Biosciences), γ-tubulin mouse monoclonal (1:500, 76575, Sigma), laminin rabbit polyclonal

7



Fig. 7. Cx30 sets the spatial properties of intercellular communication in astroglial networks. (A) Representative images of GJ-mediated coupling between CA1 astrocytes visualized by diffusion of sulforhodamine B via patch clamp whole-cell recording. Schematic showing the method used for

estimating the spatial properties of CA1 astroglial networks. Scale bar: 100 μ m. (B) Graph summarizing the spatial properties of CA1 astroglial networks in the form of polarity indexes. Cx30 is required for the anisotropic coupling of CA1 *s.r.* astrocytes (+/+, *n*=8 slices; -/-, *n*=10 slices). Polarity index ratio larger than one indicates preferential perpendicular orientation towards the pyramidal layer. Asterisk indicates statistical significance (*P<0.05).

(1:1000, L9393, Sigma), laminin $\beta 2$ mouse monoclonal (1:1000, sc-59980, Santa Cruz), Cdc42 mouse monoclonal (1:150, ACD03, Cytoskeleton), paxillin mouse monoclonal (1:200, 610569, BD Biosciences), vinculin (1:200, ab18058, Abcam), MAP2 mouse monoclonal (1:400, M4403, Sigma), IB4-647 (1:100, I32450, Invitrogen). The HRP-conjugated primary rabbit anti-GAPDH antibody (1:10,000, ab9385, Abcam) has been used as loading control. The following HRP-conjugated secondary antibodies were used: goat anti-rabbit IgG (1:2500, sc-2004, Santa Cruz) and goat antimouse IgG (1:2500, sc-2005, Santa Cruz). The following fluorescent dyconjugated secondary antibodies were used in appropriate combinations: goat anti-mouse IgG conjugated to Alexa 488 or 647 (1:2000, A-11001, A-21235, Thermo Fisher), goat anti-rabbit IgG conjugated to Alexa 488 or 555 (1:2000, A-11034 or A-21429, Thermo Fisher) and goat anti-chicken conjugated to Alexa 488 (1/2000; X-11039, Thermo Fisher).

Immunohistochemistry and quantifications were performed as previously described (Koulakoff et al., 2008). Briefly, cryostat brain slices were fixed for 10 min at room temperature with 4% paraformaldehyde (PFA) then washed three times with phosphate buffered saline (PBS) and pre-incubated 1 h with PBS-1% gelatin in the presence of 1% Triton-X100. Brain slices were then stained overnight at 4°C with primary antibodies and washed in PBS three times. Appropriate secondary antibodies were finally applied for 1-2 h at room temperature.

After several washes, brain slices were mounted in fluoromount and examined with an inverted confocal laser-scanning microscope (TCS SP5, Leica). Stacks of consecutive confocal images taken with a 63× objective at 600-1000 nm intervals were acquired sequentially with two lasers (argon

Development (2018) 145, dev155275. doi:10.1242/dev.155275

488 nm and helium/neon 543 nm) and z projections were reconstructed using ImageJ software. Alternatively, primary astrocyte cultures were fixed at room temperature with 4% paraformaldehyde for 10 min, washed three times with PBS and incubated 1 h with 10% non-immune goat serum (Zymed) in the presence of 0.1% Triton-X100 before proceeding as described previously.

Western blotting and quantification were performed as previously described (Pannasch et al., 2011). Shortly, cells were collected with a folded pipette tip (200 µl) in a small volume of PBS containing a cocktail of protease inhibitors (Boehringer), phosphatases inhibitors (Boehringer), phosphatases inhibitors (Boehringer), phosphatases inhibitors (Boehringer), phosphatases inhibitors buffer was added. Samples were sonicated, boiled for 5 min and loaded on 10% or 4-12% polyacrylamide gels. Proteins were separated by electrophoresis and transferred onto nitrocellulose membranes. They were then washed and exposed to peroxidase-conjugated secondary antibodies. Specific signals were revealed with the chemiluminescence detection kit (ECL, GE Healtheare). Semi-quantitative densitometric analysis was performed after scanning the bands with ImageJ software.

Primary astrocyte cultures and scratch-induced migration assay

Primary cortical astrocyte cultures (Fig. S2A) were prepared as previously described (Koulakoff et al., 2008). Briefly, brains were removed from OF1 newborn pups (P1-P3) and the cortices were dissected in cold PBS-glucose (33 mM). Meninges were carefully withdrawn and cortices were mechanically dissociated with a flame-polished Pasteur pipette in PBS-glucose. Cells were seeded onto poly-ornithine-coated glass coverslips in DMEM containing 10% fetal calf serum, 10 U/ml penicillin and 10 µg/ml streptomycin (Gibco), and incubated at 37°C, 5% CO₂. After 1 week, once cells have reached confluency, 1 µM of cytosine-arabinoside was added to the cell culture for 3 days to eliminate proliferating microglial cells. Medium was then changed every 3 days and cells were used after 2-3 weeks in culture. Astrocytes maintained for 2-3 weeks in culture express Cx43, but not Cx30 (Fig. S2B,C), as previously shown (Kunzelmann et al., 1999; Koulakoff et al., 2008).

Astrocytes were transfected 24 h before wounding with plasmids for either GFP or Cx30, Cx30-venus (Beltramello et al., 2003), Cdc42-GFP (Etienne-Manneville and Hall, 2001) or β 1 integrin-GFP (human β 1 integrin, provided by F. Coumailleau, Pasteur Institute, Paris, France). The medium was changed 12 h before performing scratch-induced migration assays. Confluent astrocytes were wounded by tidily scraping monolayers with a 200 µl pipette tip (\approx 300 µm in width). For biochemical analysis, several wounds were made in multiple directions. Cells were then fixed with 4% PFA and washed three times in PBS before proceeding with immunostaining as described above.

Imaging analysis of astrocytes reorientation

In vitro tubulin fibers reorientation was assessed 8 h after wounding. Wounded astrocyte cultures were fixed with PFA and immunostained for tubulin. Confocal z-stack images of individual wound-edge astrocytes were analyzed using the ImageJ plug-in FibrilTool (Boudaoud et al., 2014). Briefly, regions of interest were drawn around a single-cell tubulin cytoskeleton and the average fibril orientation provided by the plug-in was compared with the actual angle of the axis perpendicular to the scratch (with regard to the horizontal plane).

In vitro centrosome and Golgi apparatus reorientation was determined as previously described (Etienne-Manneville, 2006). Shortly, 8 h after scratching, astrocytes were fixed with 4% PFA and immunolabeled for γ -tubulin (centrosome) or GM130 (Golgi), and DAPI was added to the secondary antibodies to label the nuclei. Wound-edge astrocytes with their centrosome or Golgi orientated perpendicularly (±45° and ±60°, respectively) to the scratch were considered properly polarized. Random orientation was thus scored at 25% for the centrosome and 33% for the Golgi.

In vivo GFAP-positive process reorientation was analyzed as previously described (Nixdorf-Bergweiler et al., 1994). Confocal z-stacks images of GFAP-labeled CA1 s.r. subfields were processed for grid-base line analysis using the ImageJ software. In short, the pyramidal cell layer was laid down

on the top side of the image before setting up an overlay grid made of horizontal/vertical lines delimitating $100\,\mu m^2$ squares. The number of intersections between GFAP-expressing astrocytic processes and grid lines was then measured. Intersections with horizontal lines reflected processes orientated perpendicularly to the pyramidal layer (thus displaying the socalled axial orientation), whereas processes crossing vertical lines were scored with a lateral orientation towards the pyramidal cell layer. A ratio between axial/lateral processes was finally measured, which reflects the polarity index of the cell. A polarity index of 1 indicates no polarity, whereas an index larger than 1 indicates preferential perpendicular orientation toward the pyramidal layer.

The protocol used for analysis of in vivo Golgi apparatus reorientation was directly adapted from the method of scoring Golgi repositioning upon scratching (Etienne-Manneville, 2006). Confocal z-stack images of GM130labeled CA1 s.r. subfields were processed for angular orientation analysis using the orientation ImageJ plug-in. Succinctly, regions of interest were drawn around individual Golgi apparatus from CA1 astrocytes facing the pyramidal layer, and the orientation values provided were compared with those perpendicular to the pyramidal cell layer. Astrocytes that had their Golgi aligned with this axis (±30°, in both directions) to the scratch were considered properly polarized. Random orientation was thus scored at 33%.

The spatial properties of GJ-mediated inter-astrocytic coupling were analyzed using the ImageJ software. Confocal z-stack thresholded images of the sulforhodamine-B-labeled CA1 s.r. astrocyte networks were manually delimited with best-fit ellipses. The length of the major/minor ellipse axis were measured and its ratio (major/minor) provided an estimation of the polarity (or anisotropy) of astroglial networks. A polarity index value larger than one indicated preferential perpendicular orientation with respect to the pyramidal layer.

Imaging analysis of protein relocalization

Analysis of Cdc42 relocalization was adapted from Osmani et al. (2010). In short, primary astrocytes were transfected with GFP-Cdc42 (together with Cx30), given that no Cdc42 antibody is currently available for immunolabeling. Eight hours after scratching, astrocytes were fixed with 4% PFA and immunostained for Cx30. The linear intensity profile of GFP-Cdc42 at the leading edge of migrating astrocytes was quantified using

ImageJ software, and compared between control and Cx30-expressing cells. Similarly, astrocyte monolayers were transfected with β1 integrin-GFP (provided by F. Coumailleau) and Cx30. 8 h after wounding, then cells were fixed with 4% PFA and immunolabeled for Cx30. Regions of interest were drawn at the leading edge of migrating astrocytes and the intensity of $\beta 1$ integrin-GFP was quantified using ImageJ software and compared with control cells.

Imaging analysis of laminin puncta

The analysis of laminin puncta number and size, as well as axial distribution was adapted from a previous study (Camand et al., 2012). Briefly, confocal images of laminin immunostained astrocyte cultures were binarized and thresholded using the ImageJ software. Regions of interest encompassing laminin puncta up to the leading edge were then drawn in front of the nucleus of individual cells such that the average number of laminin puncta could be measured using the Analyze Particle tools of ImageJ. The pixel size values (min/max) were especially set to include most laminin puncta. Similarly, the mean area occupied by laminin puncta was quantified after thresholding of laminin immunofluorescence confocal images using the ImageJ software. Finally, each laminin puncta centroid was projected on an axis running from the nucleus to the cell leading edge and the normalized mean projected distances were calculated using the ImageJ software.

Cdc42 pull-down activation assay

The Cdc42 pull-down assay was adapted from a commercial kit (Cytoskeleton) (Tang and Gunst, 2004). Briefly, 30 min after wounding, astrocyte monolayers (5.5 cm²) were washed once in ice-cold PBS and rapidly mixed with 1 ml of ice-cold lysis buffer [50 mM Tris, 10 mM MgCl₂, 0.5 M NaCl and 2% Igepal, protease inhibitor cocktail (pH 7.5)] to yield a protein concentration of 400-600 µg/ml. An aliquot was further taken

Development (2018) 145, dev155275. doi:10.1242/dev.155275

to perform both BCA protein assay and Cdc42 immunoblot on the total Cdc42 fraction. The mix was then clarified by ultracentrifugation (100,000 g at 4°C for 1 min), and the supernatant was incubated with GST-p21activated kinase (PAK) binding domain (PBD) affinity beads at 4°C for 1 h on a rotator. The beads were next ultracentrifugated (30,000-50,000 g at 4°C for 1 min), washed and resuspended in wash buffer [25 mM Tris, 30 mM MgCl₂, 40 mM NaCl, protease inhibitor cocktail (pH 7.5)]. After a second step of ultracentrifugation (30,000-50,000 g at 4°C for 3 min), 10-20 μ l of Laemmli 2× was added to resuspend the beads, and the proteins were boiled for 2 min. A western blot for Cdc42 was finally performed on the total and BD-bound sample fractions with an appropriate dilution of Cdc42 antibodies (1:150). The intensity of activated GTP-bound Cdc42 was normalized to the total Cdc42 levels, and GAPDH (total) as well as Ponceau staining (GTP) were used as loading controls

Isolation of synaptosomal crude membrane fraction

For the isolation of synaptosomal crude membrane fractions, freshly dissected hippocampi were first lysed in 500 µl of ice-cold homogenization buffer (0.32 M sucrose, 10 mM HEPES, 2 mM EDTA, containing a freshly prepared cocktail of protease inhibitors) using a mechanical Potter-Elvehjem homogenizer. The homogenates were then centrifuged at 1000 g for 15 min at 4°C and the pelleted nuclear fractions discarded. The supernatants were further centrifuged at 200,000 g for 30 min at 4°C and the new pellets were washed and resuspended in ice-cold homogenization buffer, while the supernatant crude cytosols were withdrawn. Finally, crude membrane pellets were centrifuged one last time at 200,000 g for 30 min at 4°C and resuspended in 100 μ l of HEPES lysis buffer [50 mM HEPES, 2 mM EDTA (pH 7.4), containing a freshly prepared cocktail of protease inhibitors]. Samples were briefly sonicated and the protein concentration of synaptosomal crude membrane fraction was next determined using a Bradford protein assay, and further processed for immunoblot as described above

AAV production and injection

For AAV in vivo gene transfer, a transgene composed of GFP and Cx30 cDNA separated by a P2A sequence in a single open reading frame was placed under the control of a GFAP-specific promoter in an AAV shuttle plasmid containing the inverted terminal repeats (ITR) of AAV2. The control vector expressed GFP only. Pseudotyped serotype 9 AAV particles were produced by transient co-transfection of HEK-293T cells, as previously described (Berger et al., 2015). Viral titers were determined by quantitative PCR amplification of the ITR on DNase-resistant particles and expressed as vector genomes vector genome per ml (vg/ml).

 $Cx30^{-/-}$ mice (2-week-old) were anesthetized with a mixture of ketamine (95 mg/kg; Merial) and xylazine (10 mg/kg; Bayer) in 0.9% NaCl and placed on a stereotaxic frame under body temperature monitoring. AAVs were diluted in PBS with 1% BSA at a concentration of AAV-GFP 1.2×10^{13} vg/ml and AAV-GFP-Cx30 0.5 x10¹³ vg/ml, and 1 µl of virus was stereotaxically injected bilaterally into the hippocampi at a rate of 0.2 µl/ min, using a 29-gauge blunt-tip needle linked to a 2 µl Hamilton syringe (Phymep). The stereotaxic coordinates to Bregma were: antero-posterior, -1.7 mm; lateral: ± 1.5 mm; and dorso-ventral, -1.7 mm. At the end of the injection, the needle was left in place for 5 min before being slowly removed. The skin was sutured, and mice recovery was checked for the next 24 h. After 2 weeks, the mice were sacrificed and processed for immunohistochemistry

With the dose of AAVs and injection conditions used in this study, no astrogliosis was observed. Astroglial morphology was analyzed at a distance of ~150–200 μm from the injection site and the images were taken at the same distance

Gap-junction coupling in hippocampal slices Acute transverse hippocampal slices (400 µm) were prepared as previously described (Pannasch et al., 2014). Slices were transferred to storage chamber containing artificial cerebrospinal fluid (aCSF) (in mM: 119 NaCl, 2.5 KCl, 2.5 CaCl₂, 1.3 MgSO₄, 1 NaH₂PO₄, 26.2 NaHCO₃ and 11 glucose, saturated with 95% O2 and 5% CO2) for at least 1 h at room temperature before the

experiments. Slices were transferred in a submerged recording chamber mounted on an Olympus BX51WI microscope equipped for infrareddifferential interference (IR-DIC) microscopy and were perfused with aCSF (2 ml/min). Whole-cell patch-clamp recordings were obtained from s.r. astrocytes using 4-6 MQ glass pipettes filled with (in mM) 105 K-gluconate, 30 KCl, 10 HEPES, 10 phosphocreatine, 4 ATP-Mg, 0.3 GTP-Tris and 0.3 EGTA (pH 7.4, 280 mOsm). Astrocytes were patched at similar distances from the stratum pyramidale (~200 µm) and were identified by their small somata, low input resistance and resting membrane potential, passive membrane properties (linear IV relationship), lack of action potential and extensive gap junctional coupling. For intercellular dye coupling experiments, the internal solution contained biocytin (7 mg/ml), which diffused passively in astrocytes patched in current-clamp mode for 30 min. Recordings were acquired using a MultiClamp 700B amplifier (Molecular Devices), digitized at 10 kHz, filtered at 2 kHz, stored and analyzed on a computer using Clampex10.3 and Clampfit10.3 Software (Molecular Devices). Biocytin was obtained from Sigma, and all other chemicals were from Tocris.

Statistics

All data are expressed as mean±s.e.m. Data were obtained from at least three independent experiments that were performed in astrocyte cultures. hippocampal slices or mice, according to the type of experiment performed (in vitro, ex vivo and in vivo, respectively). For cellular analysis performed in astrocyte cultures or in vivo, n refers to the number of cells analyzed from five fields per independent experiment. For biochemical experiments performed in astrocyte cultures, *n* refers to the number of cultures; when performed *in vivo*, *n* refers to the number of mice. For intercellular coupling experiments in astrocyte cultures, n refers to the number of cultures; when performed *ex vivo*, *n* refers to the number of hippocampal slices. Statistical significance for within-group comparisons was determined by one-way ANOVA (followed by Dunnett's post-test), whereas unpaired t-tests were used for between-group comparisons, unless otherwise stated. Statistical analysis was performed in GraphPad InStat.

Acknowledgements

We thank Franck Coumailleau, Cécile Leduc, Bertille Bance, Giullia Crispino and Fabio Mammano for constructive discussions and technical assistance

Competing interests

The authors declare no competing or financial interests.

Author contributions

Conceptualization: G.G., C.-F.C., S.E.M., N.R.; Methodology: G.G., C.-F.C., F.L., P.E., A.-P.B., N.R.: Software: F.L.: Validation: G.G., F.L., S.E.M., N.R.: Forma analysis: G.G., C.-F.C., L.-E.P., S.E.M., N.R.; Investigation: G.G., C.-F.C., L.-E.P., P.E., U.P., N.R.; Resources: A.-P.B.; Writing - original draft: G.G., N.R.; Writing review & editing: G.G., C.-F.C., L.-E.P., S.E.M., N.R.; Supervision: S.E.M., N.R.; Project administration: N.R.; Funding acquisition: N.R.

Funding

This work was supported by grants from the European Research Council (consolidator grant 683154 to N.R.), from the Paris 6 University doctoral school ED3C and Labex Memolife to G.G., from the Paris Descartes university doctoral school Bio Sorbonne Paris Cité to L.-E. P., from the Centre National de la Recherche Scientifique, and from the Institut Pasteur to S.E.-M. and F.L. Deposited in PMC for immediate release

Supplementary information

Supplementary information available online at http://dev.biologists.org/lookup/doi/10.1242/dev.155275.supplemental

References

- Anders, S., Minge, D., Griemsmann, S., Herde, M. K., Steinhauser, C. and Henneberger, C. (2014). Spatial properties of astrocyte gap junction coupling in the rat hippocampus. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 369, 20130600.
- Beltramello, M., Bicego, M., Piazza, V., Ciubotaru, C. D., Mammano, F. and D'Andrea, P. (2003). Permeability and gating properties of human connexins 26 and
- 30 expressed in HeLa cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 305, 1024-1033. Berger, A., Lorain, S., Josephine, C., Desrosiers, M., Peccate, C., Voit, T., Garcia, L., Sahel, J.-A. and Bemelmans, A.-P. (2015). Repair of rhodopsin

Development (2018) 145, dev155275. doi:10.1242/dev.155275

mRNA by spliceosome-mediated RNA trans-splicing: a new approach for

- mKNA by spiceosome-mediated KNA trans-spicing: a new approach tor autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Mol. Ther.* 23, 918-930.
 Boudaoud, A., Burian, A., Borowska-Wykręt, D., Uyttewaal, M., Wrzalik, R., Kwiatkowska, D. and Hamant, O. (2014). FibrilTool, an ImageJ plug-in to quantify fibrillar structures in raw microscopy images. *Nat. Protoc.* 9, 457-463.
 Calabresi, P., Napolitano, M., Centonze, D., Marfia, G. A., Gubellini, P., Teule, M. A., Berratta, N., Bernardi, G., Frati, L., Tolu, M. et al. (2000). Tissue plasminogen activator controls multiple forms of synaptic plasticity and memory. *Euc. J. Neurosci.* 12, 1002-1012. Eur. J. Neurosci. 12, 1002-1012.
- Camand, E., Peglion, F., Osmani, N., Sanson, M. and Etienne-Manneville, S. (2012). N-cadherin expression level modulates integrin-mediated polarity and strongly impacts on the speed and directionality of glial cell migration. J. Cell Sci. 125. 844-857.
- DeMali, K. A. and Burridge, K. (2003). Coupling membrane protrusion and cell adhesion. J. Cell Sci. 116, 2389-2397.
 Derangeon, M., Bourreyster, N., Plaisance, I., Pinet-Charvet, C., Chen, Q., Duthe, F., Popoff, M. R., Sarrouilhe, D. and Hervé, J.-C. (2008). RhoA GTPase
- and F-actin dynamically regulate the permeability of Cx43-made channels in rat cardiac myocytes. J. Biol. Chem. 283, 30754-30765.
 Egles, C., Claudepierre, T., Manglapus, M. K., Champliaud, M.-F., Brunken, W. J. and Hunter, D. D. (2007). Laminins containing the beta2 chain modulate the
- ecise organization of CNS synapses. Mol. Cell. Neurosci. 34, 288-298.
- Elias, L. A. B., Wang, D. D. and Kriegstein, A. R. (2007). Gap junction adhesion is necessary for radial migration in the neocortex. *Nature* 448, 901-907. Essettine, J. L., Shao, Q., Huang, T., Kelly, J. J., Sampson, J. and Laird, D. W.
- (2015). Manipulating Cx43 expression triggers gene reprogramming events in dermal fibroblasts from oculodentodigital dysplasia patients. *Biochem. J.* 472,
- Etienne-Manneville, S. (2006). In vitro assay of primary astrocyte migration as a tool to study Rho GTPase function in cell polarization. Methods Enzymol. 406, 565-578
- Etienne-Ma eville, S. (2008). Polarity proteins in glial cell functions. Curr. Opin. Neurobiol. 18, 488-494.
- Etienne-Manneville, S. and Hall, A. (2001). Integrin-mediated activation of Cdc42 Erank, D. E. and Carter, W. G. (2004). Laminin 5 deposition regulates keratinocyte polarization and persistent migration. J. Cell Sci. **117**, 1351-1363.
- Grifa, A., Wagner, C. A., D'Ambrosio, L., Melchionda, S., Bernardi, F., Lopez-Bigas, N., Rabionet, R., Arbones, M., Monica, M. D., Estivili, X. et al. (1999). Mutations in GJB6 cause nonsyndromic autosomal dominant deafness at DFNA3 locus. Nat. Genet. 23, 16-18.
- He, D. H., Feng, Y., Mei, L. Y. and He, C. F. (2009). [Screening and identification The Diff, The Perg, Tr., Mer, L. T. and The C. T. (2004). [Closening and identification interaction proteins of connexin 30]. Zhonghua Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi 44, 758-761.
 Herve, J. C., Bourmeyster, N., Sarrouilhe, D. and Duffy, H. S. (2007). Gap
- junctional complexes: from partners to functions. Prog. Biophys. Mol. Biol. 94, 29-65
- Hunter, D. D., Llinas, R., Ard, M., Merlie, J. P. and Sanes, J. R. (1992). Expression of s-laminin and laminin in the developing rat central nervous system. J. Comp. Neurol. 323, 238-251.
- Koulakoff, A., Ezan, P. and Giaume, C. (2008). Neurons control the expression of connexin 30 and connexin 43 in mouse cortical astrocytes. *Glia* 56, 1299-1311. Kunzelmann, P., Schröder, W., Traub, O., Steinhäuser, C., Dermietzel, R. and
- Willecke, K. (1999). Late onset and increasing expression of the gap junction xin30 in adult murine brain and long-term cultured astrocytes. Glia
- Machtaler, S., Dang-Lawson, M., Choi, K., Jang, C., Naus, C. C. and Matsuuchi,
- L. (2011). The gap junction protein Cx43 regulates B-lymphocyte spreading and adhesion. J. Cell Sci. 124, 2611-2621.
 Mataga, N., Mizuguchi, Y. and Hensch, T. K. (2004). Experience-dependent pruning of dendritic spines in visual cortex by tissue plasminogen activator
- Neuron 44, 1031-1041. Mendoza-Naranjo, A., Cormie, P., Serrano, A. E., Hu, R., O'Neill, S., Wang, C. M., Thrasivoulou, C., Power, K. T., White, A., Serena, T. et al. (2012). Targeting Cx43 and N-cadherin, which are abnormally upregulated in venous leg ulcers,
- influences migration, adhesion and activation of Rho GTPases, PLoS ONE 7. e37374.
- Nakagami, Y., Abe, K., Nishiyama, N. and Matsuki, N. (2000). Laminin degradation by plasmin regulates long-term potentiation. J. Neurosci. 20, 2003-2010.
- Nixdorf-Bergweiler, B. E., Albrecht, D. and Heinemann, U. (1994). Developmental changes in the number, size, and orientation of GFAP-positive cells in the CA1 region of rat hippocampus. *Glia* 12, 180-195. Olk, S., Turchinovich, A., Grzendowski, M., Stuhler, K., Meyer, H. E., Zoidl, G.
- and Dermietzel, R. (2010). Proteomic analysis of astroglial connexin43 silencing uncovers a cytoskeletal platform involved in process formation and migration. *Glia* 58, 494-505.
- Osmani, N., Vitale, N., Borg, J.-P. and Etienne-Manneville, S. (2006). Scrib controls Cdc42 localization and activity to promote cell polarization during astrocyte migration. *Curr. Biol.* 16, 2395-2405.

10

Development (2018) 145, dev155275. doi:10.1242/dev.155275

- Osmani, N., Peglion, F., Chavrier, P. and Etienne-Manneville, S. (2010). Cdc42 localization and cell polarity depend on membrane traffic. J. Cell Biol. 191, 1261-1269
- Pannasch, U., Vargova, L., Reingruber, J., Ezan, P., Holcman, D., Giaume, C., Sykova, E. and Rouach, N. (2011). Astroglial networks scale synaptic activity and plasticity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 108, 8467-8472.
 Pannasch, U., Freche, D., Dallérac, G., Ghézali, G., Escartin, C., Ezan, P.,
- Cohen-Salmon, M., Benchenane, K., Abudara, V., Dufour, A. et al. (2014). Connexin 30 sets synaptic strength by controlling astroglial synapse invasion. *Nat. Neurosci.* **17**, 549-558.
- Parsons, J. T., Horwitz, A. R. and Schwartz, M. A. (2010). Cell adhesion: integrating cytoskeletal dynamics and cellular tension. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 11, 633-643.
- Peng, H., Shah, W., Holland, P. and Carbonetto, S. (2008). Integrins and dystroglycan regulate astrocyte wound healing: the integrin beta1 suburit is necessary for process extension and orienting the microtubular network. Dev. Neurobiol. 68, 559-574
- Preng, H., Ong, Y. M., Shah, W. A., Holland, P. C. and Carbonetto, S. (2013). Integrins regulate centrosome integrity and astrocyte polarization following a wound. *Dev. Neurobiol.* **73**, 333-353.
- Qu, C., Gardner, P. and Schrijver, I. (2009). The role of the cytoskeleton in the formation of gap junctions by Connexin 30. *Exp. Cell Res.* 315, 1683-1692.
 Rouach, N., Pebay, A., Meme, W., Cordier, J., Ezan, P., Etienne, E., Giaume, C.
- and Tencé, M. (2006). S1P inhibits gap junctions in astrocytes: involvement of G and Rho GTPase/ROCK. *Eur. J. Neurosci.* 23, 1453-1464.
 Saur, L., Baptista, P. P. A., de Senna, P. N., Paim, M. F., do Nascimento, P., Ilha,
- J., Bagatini, P. B., Achaval, M. and Xavier, L. L. (2014). Physical exercise increases GFAP expression and induces morphological changes in hippocampal astrocytes. *Brain Struct. Funct.* **219**, 293-302.
- Saur, L., Baptista, P. P. A., Bagatini, P. B., Neves, L. T., de Oliveira, R. M., Vaz, S. P., Ferreira, K., Machado, S. A., Mestriner, R. G. and Xavier, L. L. (2016). Experimental post-traumatic stress disorder decreases astrocyte density and

- changes astrocytic polarity in the CA1 hippocampus of male rats. Neurochem. Res. 41, 892-904.
- Schütz, M., Szimemi, P., Majumder, P., De Siati, R. D., Crispino, G., Rodriguez, L., Bortolozzi, M., Santarelli, R., Seydel, A., Sonntag, S. et al. (2010). The human deafness-associated connexin 30 T5M mutation causes mild hearing loss
- and reduces biochemical coupling among cochlear non-sensory cells in knock-in mice. *Hum. Mol. Genet.* **19**, 4759-4773.
 Sinha, S. and Yang, W. (2008). Cellular signaling for activation of Rho GTPase Cdc42. *Cell. Signal.* **20**, 1927-1934.
- Tang, D. D. and Gunst, S. J. (2004). The small GTPase Cdc42 regulates actin polymerization and tension development during contractile stimulation of smooth muscle. *J. Biol. Chem.* **279**, 51722-51728.
 Teubner, B., Michel, V., Pesch, J., Lautermann, J., Cohen-Salmon, M., Sohl, G.,
- Teubner, B., Michel, V., Pesch, J., Lautermann, J., Cohen-Salmon, M., Sohl, G., Jahnke, K., Winterhager, E., Herberhold, C., Hardelin, J. P. et al. (2003). Connexin30 (Gib6)-deficiency causes severe hearing impairment and lack of endocochiear potential. *Hum. Mol. Genet.* **12**, 13-21.
 Viola, G. G., Rodrigues, L., Americo, J. C., Hansel, G., Vargas, R. S., Biasibetti, R., Swarowsky, A., Goncalves, C. A., Xavier, L. L., Achaval, M. et al. (2009). Morphological changes in hippocampal astrocytes induced by environmental enrichment in mice. *Brain Res.* **1274**, 47-54.
 Wu, X., Quondamatteo, F. and Brakebusch, C. (2006). Cdc42 expression in kertinocytes is required for the maintenance of the basement membrane is skin
- keratinocytes is required for the maintenance of the basement membrane in skin. Matrix Biol. 25, 466-474.
- MaillX Biol. 23, 400-47.4.
 Xu, X., Francis, R., Wei, C. J., Linask, K. L. and Lo, C. W. (2006). Connexin 43-mediated modulation of polarized cell movement and the directional migration of cardiac neural crest cells. *Development* 133, 3629-3639.
- cardiac neural crest cells. *Development* 133, 3629-3639.
 Xu, X., Li, W. E. I., Huang, G. Y., Meyer, R., Chen, T., Luo, Y., Thomas, M. P., Radice, G. L. and Lo, C. W. (2001). Modulation of mouse neural crest cell motility by N-cadherin and connexin 43 gap junctions. *J. Cell Biol.* 154, 217-230.
 Yamane, Y., Shiga, H., Asou, H., Haga, H., Kawabata, K., Abe, K. and Ito, E. (1999). Dynamics of astrocyte adhesion as analyzed by a combination of atomic force microscopy and immuno-cytochemistry: the involvement of actin filaments and connexin 43 in the early stage of adhesion. *Arch. Histol. Cytol.* 62, 355-361.

'ELOPMEN'

3.2) La Cx30 et OPHN1

3.2.1) Matériels et méthodes

Immunoprécipitation

Des cultures primaires d'astrocytes ont été infectées après 20 jours de culture (DIV20) par un lentivirus dilué dans le milieu de culture et exprimant un gène codant pour la Cx30 (Pannasch et al., 2014). Après 4 jours d'incubation, le milieu a été changé. A DIV30, les cellules confluentes ont été lavées 3 fois avec du PBS 1X puis lysées dans un tampon (10mM HEPES, 5mM MgCl2, 150 mM KCl, 0.1% Triton, 1mM DTT). Le lysat a été centrifugé 15min à 15 000g à 4°C puis le surnageant a été incubé 30min à 4°C sous agitation avec des billes d'agarose pour éviter toutes interactions non spécifiques. Ensuite le lysat a été récupéré pour être incubé 1h à 4°C sous agitation avec des billes d'agaroses couplées avec un anticorps lapin anti Cx30 ou de l'immunoglobuline de lapin. Après trois lavages des billes avec le tampon, les protéines ont été récupérées dans du Leamni 1X en chauffant 4min à 56°C.

Migration

Des cultures primaires d'astrocytes ont été transfectées avec un plasmide exprimant la protéine Cx30 couplée à une GFP ou exprimant seulement une GFP, sur lesquelles des expériences de migration *in vitro* ont été réalisée comme décrit précédemment (Ghézali et al., 2018) et filmées pendant 28h.

Adhésion

Des cultures primaires d'astrocytes ont été infectées après 20 jours de culture (DIV20) par un lentivirus dilué dans le milieu de culture et exprimant un gène codant pour la Cx30 (Pannasch et al., 2014). Après 4 jours d'incubation, le milieu a été changé. Les capacités d'adhésion des astrocytes ont été testées entre DIV25 et DIV30, après un traitement à la trypsine et resuspension dans du milieu de culture, sur différentes matrices extracellulaires grâce au kit CytoSelect 48-Well Cell Adhesion Assay de Cell Biolabs. Le kit a été utilisé selon les instructions données par le fournisseur. Pour résumer, les cellules ayant adhéré 1h après ensemencement sont fixées et colorées. L'absorbance mesurée rend compte du nombre de cellules ayant adhéré.

XCelligence

Des expériences d'adhésion *in vitro* ont également été réalisés grâce à la technologie XCelligence. Cette technologie repose sur une plaque 96-puits, au fond desquels se trouvent des électrodes en or. Lorsqu'une cellule adhère à cette électrode au fond du puit, la résistance provoquée par la cellule au courant électrique peut être mesurée au cours du temps. Un cell index est alors calculé à partir de cette résistance. Plus le cell index est élevé, plus la résistance électrique au niveau de l'électrode est importante. Nous avons réalisé cette expérience à partir de cultures primaires d'astrocytes confluentes dans des boites de pétrie d'environ 5cm de diamètre à DIV 25, traitées à l'AraC et mis préalablement dans un milieu sans sérum pendant 24h la veille de l'expérience. Les cellules ont ensuite été détachées dans 1mL de trypsine et lavée 3 fois au PBS 1X (un lavage correspondant à une centrifugation de 5 min à 800rpm et une resuspension dans 2mL de PBS 1X). Les cellules en suspension ont été comptées puis 20 000 cellules par puits ont été ensemencées dans un milieu sans sérum.

3.2.2) Cx30 et OPHN1 impliquées dans des processus cellulaires astrocytaires similaires.

Sachant que la Cx30 forme des canaux voltage-dépendant, sa fonction pouvant ainsi être régulée par l'activité neuronale (Pereira & Furlan, 2010), et sachant que la Cx30 contrôle la transmission synaptique excitatrice via la régulation de l'invasion de la synapse par les PAP (Pannasch et al., 2014), il semblerait donc que la Cx30 participe à une régulation bidirectionnelle entre les astrocytes et les neurones. Ceci pourrait avoir un impact sur les différentes fonctions de la synapse, se traduisant notamment par des perturbations des capacités de mémoire et de cognition. Par ailleurs, la déficience intellectuelle liée à OPHN1, où des défauts synaptiques et électrophysiologiques ont été reportés, pourrait être associé à une altération de l'expression de la Cx30 au niveau astrocytaire.

De manière surprenante, des similarités entre ces deux protéines qui n'ont pas la même fonction sont observées dans les astrocytes. Ces deux protéines sont capables :

- d'interagir avec le cytosquelette d'actine
- de réguler la migration et l'adhésion des astrocytes in vitro.

La colocalisation de l'actine avec OPHN1 dans les cellules gliales in vitro et l'interaction directe entre ces deux protéines est connue (Fauchereau et al., 2003). De la même manière, l'interaction entre la Cx30 et l'actine a été démontrée dans des cellules HeLa (Qu, Gardner, & Schrijver, 2009) mais pas dans les astrocytes. Pour vérifier que cette interaction existait dans réalisé également les astrocytes, nous avons donc une expérience d'immunoprécipitation sur des astrocytes primaires transfectés à la Cx30. Nous avons ainsi mis en évidence une interaction entre la Cx30 et l'actine (Fig. 27).





Images du Western Blot de l'expérience d'immunoprécipitation réalisée sur des cultures primaires d'astrocytes infectées avec un lentivirus possédant un gène exprimant la Cx30. L'actine astrocytaire (Total) co-immunoprécipite avec des billes d'agarose couplées avec un anticorps lapin anti Cx30 (Cx30) mais pas avec des billes couplées avec l'immunoglobuline de lapin (IgG).

Nous avons démontré précédemment qu'en l'absence d'OPHN1, les astrocytes *in vitro* migraient moins que les astrocytes normaux. Nous avons aussi démontré que la Cx30 était impliquée dans la polarité des astrocytes en migration *in vitro* (Ghézali et al., 2018). Nous avons donc regardé dans un deuxième temps si ce défaut de polarisation était aussi associé à un retard de migration. Pour cela, nous avons réalisé des expériences de migration astrocytaire *in vitro*. Nous avons montré que la Cx30 régulait la vitesse de migration des

astrocytes, et que les astrocytes surexprimant la Cx30 migraient mois rapidement que les astrocytes normaux (contrôle n=27, Cx30 n=22, p<0.0001, two-way ANOVA, Fig. 28).





A : Chemins représentatifs réalisés en 28h par les astrocytes en cours de migration exprimant la Cx30 (Cx30-Venus) ou non (GFP). **B** : Quantification de la vitesse de migration des astrocytes exprimant la Cx30 (en gris) ou non (en blanc) au bout de 16h, 24h et 28h de migration (control n= 27, Cx30 n=22).

L'adhésion étant également une propriété cellulaire régulée par les RhoGTPases, nous avons réalisé des expériences d'adhésion astrocytaire *in vitro* avec notre modèle OPHN1 en utilisant la technologie XCelligence. Pour résumer, des cellules ensemencées adhèrent au fond d'un puit sur lequel se trouve une électrode, ce qui crée une résistance au courant électrique à partir de laquelle est calculé un Cell Index qui augmente au cours de l'adhésion. Ces expériences nous ont permis de montrer que les astrocytes KO pour OPHN1 avait un Cell index plus élevé que les astrocytes normaux (n=3, p=0.0264, two-way ANOVA, Fig. 29a) et que cette différence résidait essentiellement dans les premières heures d'adhésion où la pente de la courbe (le delta cell index) est significativement plus grande au cours de la première heure après l'ensemencement des cellules (n=3, p=0.024, p=0.0094, p=0.019, p=0.007, p=0.009, p=0.018, multiple t-tests, Fig. 29b). Ceci montre que cette différence entre les conditions WT et KO réside dans les premières d'adhésion lorsque l'astrocyte entre en contact avec le substrat.



Figure 29: OPHN1 régule l'adhésion des astrocytes in vitro.

A : Evolution du Cell Index au cours du temps après ensemencement des astrocytes WT ou KO pour OPHN1 (n=3). **B** : Quantification de la pente de la courbe du Cell Index au cours du temps (n=3).

Parallèlement, nous avons réalisé des expériences d'adhésion avec le kit CytoSelect 48-Well Cell Adhesion Assay de Cell Biolabs sur des astrocytes transfectés avec la Cx30 ou non (Fig. 30 A). Ceci nous a permis de démontrer que la Cx30 régule l'adhésion astrocytaire et qu'elle est significativement plus importante sur le collagène (n=3, p=0.0113, two-way ANOVA, Fig. 30 B).



Figure 30: Cx30 contrôle l'adhésion des astrocytes sur des matrices extracellulaires de collagène *in vitro*.

A : Représentation schématique d'une expérience réalisée avec le kit CytoSelect 48-Well Cell
Adhesion Assay de Cell Biolabs sur des astrocytes exprimant la Cx30 (Cx30) ou non (Control).
B : Quantification de l'adhésion des astrocytes exprimant la Cx30 (Cx30) ou non (Control) sur différents éléments de la matrice extracellulaire. (n=3).

De manière intéressante, si l'on observe l'ensemble de ces résultats, la déficience en OPHN1 et la surexpression de Cx30 entrainent des défauts similaires de migration et d'adhésion *in vitro*. Il a été précédemment discuté (Ghézali et al., 2018) qu'une surexpression *in vitro* ou une sous-expression *in vivo* de la Cx30 entraînait des défauts de polarité des astrocytes, suggérant une concentration optimale de la Cx30 pour réguler correctement la polarité astrocytaire. Les similitudes fonctionnelles (voie des RhoGTPases, interactions avec l'actine) et phénotypiques (migration et adhésion) entre les deux protéines Cx30 et OPHN1 nous ont amené à tester l'hypothèse selon laquelle la perte d'OPHN1 conduirait à une dérégulation de l'expression de Cx30 par un mécanisme inconnu.

3.2.3) Régulation de l'expression de la Cx30 par OPHN1 au niveau de la cicatrice gliale

Par immunomarquage contre la protéine Cx30, nous avons pu remarquer au niveau de la cicatrice corticale des animaux WT et KO total pour OPHN1 que la protéine Cx30 était surexprimée à proximité de cette cicatrice et qu'en l'absence d'OPHN1, cette expression était plus faible (n=4, p=0.0475, two-way ANOVA, Fig 31). Ces résultats montrent qu'*in vivo*, la

dérégulation d'OPHN1 amène à une altération de la Cx30 qui régule la migration, la morphologie et l'adhésion astrocytaire, pouvant avoir un impact sur la pathologie neuronale.



Figure 31: OPHN1 régule l'expression de la Cx30 au niveau de la cicatrice gliale.

A : Immunomarquage de la Cx30 au niveau de la cicatrice gliale corticale dans des souris WT ou KO pour OPHN1. Echelle : $100\mu m$. **B** : Quantification de la moyenne de gris du marquage Cx30 au niveau de la cicatrice gliale (wound) dans les souris WT ou KO pour OPHN1 (n=4).

3.2.4) Discussion

Le rôle non-canal de la protéine Cx30 nous intéresse particulièrement dans cette étude car il a été montré et publié que cette protéine spécifique des astrocytes matures avait un rôle dans les modalités de migration et de polarité de ce type cellulaire via des voies de signalisation faisant intervenir les RhoGTPases (Ghézali et al., 2018). La perte de fonction de Cx30 chez l'Homme a été décrite et associée à des pathologies de la peau, ainsi qu'à des problèmes de surdité (Nickel & Forge, 2008; Scott, Tattersall, O'Toole, & Kelsell, 2012), mais n'a jamais été directement liée à la DI. En revanche, l'idée d'impliquer les connexines dans les phénomènes de mémoire et de comportement émerge depuis plusieurs années. En effet, il a été montré chez des souris double KO astrocytaires Cx43 et Cx30 que ces pertes de fonctions altéraient les phénomènes de mémoire spatiale. (Lutz et al., 2009). Il a également été montré que les souris KO pour la Cx30 présentent des altérations de comportement lié à l'anxiété (Dere et al., 2003). De plus, les fonctions canal astrocytaires de ces protéines régulent deux éléments impliqués possiblement dans la plasticité synaptique au cours de l'apprentissage et de l'établissement de la mémoire : le couplage astrocytaire et l'approvisionnement en glucose au niveau de la barrière hémato-encéphalique où la Cx30 est très exprimée (Pannasch & Rouach, 2013). En effet, la signalisation calcique du réseau astrocytaire serait à l'origine de la dépression hétérosynaptique au niveau de l'hippocampe et contribuerait à la mise en place des phénomènes d'apprentissage et de mémoire (Serrano, Haddjeri, Lacaille, & Robitaille, 2006). Le lactate, issu de la métabolisation du glucose par les astrocytes serait la source d'énergie principale utilisée par les neurones et serait particulièrement nécessaire pour la formation de la mémoire au niveau de l'hippocampe (Suzuki et al., 2011). Ainsi, de nombreuses études précurseurs dans ce domaine émettent l'hypothèse d'un rôle du circuit astroglial formé par les jonctions gap dans la neurotransmission et la cognition. De plus, des expériences réalisées au sein du laboratoire qui n'ont pas été publiées montrent qu'une augmentation de l'activité neuronale par la déplétion en magnésium extra-cellulaire et l'application de picrotoxine, un antagoniste des récepteurs GABA, augmente la complexité de ramification des astrocytes dans l'hippocampe, mais pas dans les souris KO pour Cx30. Nous pouvons donc émettre l'hypothèse qu'il pourrait exister une coopération ou une interaction plus ou moins indirecte entre OPHN1 et Cx30. Ces deux protéines sont en effet capables d'interagir avec le cytosquelette d'actine, et de moduler la vitesse de migration et l'adhésion des astrocytes in vitro.

In vivo, nous avons observé dans les souris WT une augmentation de l'immunomarquage de la Cx30 dans la région proximale de la lésion, très similaire à celui du marquage de la NESTIN. Il a été montré de la même manière qu'au niveau d'une lésion effectuée avec une aiguille dans le striatum que le marquage Cx43 était plus important à proximité de la lésion 15 jours après la blessure et que la Cx43 était coexprimée avec la NESTIN au niveau de cette lésion, permettant de conclure que cette protéine est un marqueur de lésion cérébrale *in vivo* (Theodoric, Bechberger, Naus, & Sin, 2012). En revanche, ce résultat n'a pas été retrouvé pour la Cx30. Il est possible que la régulation des connexines au niveau du tissu cérébral lésé soit différente selon la région du cerveau observée, et que la cicatrisation gliale au niveau du cortex implique la Cx30, nous permettant de retrouver un profil d'expression au niveau de la cicatrice très semblable à celui décrit avec la Cx43 dans le striatum. La diminution de l'expression de la Cx30 au niveau de la zone lésée en l'absence d'OPHN1 serait liée à un défaut général de cicatrisation gliale dans ce modèle. Une coopération entre OPHN1 et Cx30 dans les astrocytes au cours de la cicatrisation gliale serait donc envisageable.

Discussion et perspectives

Nous nous sommes concentrés dans cette étude sur la morphologie des astrocytes dans le modèle OPHN1, et sur leur plasticité, c'est-à-dire leur capacité à changer de morphologie en réponse à un stimulus, comme lors de la migration par exemple. Il est déjà établi que la morphologie et la plasticité des neurones sont des aspects importants pour la mise en place de la mémoire (Banks, Warburton, Brown, & Bashir, 2014; Takeuchi, Duszkiewicz, & Morris, 2014). Les interactions neuro-astrocytaires au niveau de la synapse entrent également en jeu. En effet, les changements morphologiques des prolongements au niveau de la synapse seraient coordonnés avec ceux des épines dendritiques lors de la mise en place de la mémoire (Perez-Alvarez et al., 2014; Theodosis et al., 2008). Parallèlement, le nombre de synapses qu'il recouvrent et coordonnent serait un élément clé dans la consolidation de la mémoire (Sun & Jakobs, 2012). La plasticité cellulaire dans la mémoire et la cognition ne serait donc pas seulement un processus neuronal mais aussi en grande partie astrocytaire. Pourtant, la morphologie des astrocytes est une question très peu abordée dans les différents cas de DI. Il serait intéressant d'observer si le nombre de ramifications, la taille du domaine astrocytaire ou même la polarité sont des paramètres altérés dans ces différents modèles. Un des indices nous permettant de penser que la morphologie des astrocytes serait une caractéristique de la pathologie, est la large implication des voies RhoGTPases dans la DI. Nous avons montré dans cette étude que la voie RhoA/ROCK/MLC2 impliquée dans la migration cellulaire était suractivée dans notre modèle OPHN1. Or on remarque également que dans d'autres pathologies de DI très étudiées, les voies de RhoGTPases sont également altérées comme dans le syndrome de Rett ou du X fragile (Bonaccorso et al., 2015; De Filippis et al., 2012). On remarque également que STAT3 est dérégulée dans un modèle murin de trisomie 21 (Kurabayashi, Nguyen, & Sanada, 2015), protéine qui régule la voie RhoA dans un modèle de cicatrisation gliale au niveau de la moelle épinière (Renault-Mihara et al., 2017, p. 3).

Dans cette étude, nous nous sommes également intéressés à la protéine Cx30, une des principales protéines astrocytaires impliquées dans la formation de jonctions communicantes et dont nous avons démontré la fonction dans la polarité astrocytaire au cours du développement (Ghézali et al., 2018). Nous avons montré que cette protéine avait une

fonction non-canal qui régule, comme OPHN1, la polarité, la migration et l'adhésion cellulaire. De plus, dans le modèle de cicatrisation gliale OPHN1, l'expression de la Cx30 est moins importante que dans les souris WT. La dérégulation de la Cx30 serait donc aussi un élément participant à la DI liée à OPHN1. Ici aussi il serait intéressant d'étudier l'expression astrocytaire de la Cx30 dans différents modèles de DI. Le rôle de la Cx30 astrocytaire dans la DI est inconnu, mais il serait intéressant de voir si cette protéine est dérégulée dans d'autres modèles, et si elle contribuerait à un défaut astrocytaire, notamment développemental, à l'origine de la DI. L'étude des astrocytes et de leur contribution dans la DI n'est pas une question simple à aborder, en grande partie parce que la gliogénèse est une période du développement qui intervient après la neurogénèse. Il est difficile de savoir si les défauts astrocytaires observés dans un modèle de DI sont intrinsèques à ce type cellulaire ou s'ils sont dus à un environnement cellulaire déficient. C'est pour cela que différents modèles permettant de déterminer l'effet purement astrocytaire dans différentes DI sont mis en place, comme par exemple des expériences de co-cultures ou de neurones dans des milieux conditionnés par des astrocytes (Chen et al., 2014; S. Jacobs et al., 2016; Williams et al., 2014; Yang et al., 2012), l'utilisation de virus spécifique des astrocytes, la greffe de cellules ou des modèles astrocytaires de KO conditionnel (Chen et al., 2014; Higashimori et al., 2016; Hodges et al., 2017; Lioy et al., 2011). Lors de notre étude, nous avons mis en place un KO conditionnel astrocytaire d'OPHN1 permettant d'invalider le gène exclusivement dans les astrocytes après injection de Tamoxifène par un système CRE-lox. Nous avons pu en partie valider ce modèle et montrer que les défauts astrocytaires observés dans le modèle de KO total était aussi observés partiellement ou de manière beaucoup plus marquée dans le KO conditionnel, suggérant une fonction cellulaire autonome d'OPHN1 dans les astrocytes. Il faut aussi savoir que ce modèle doit être idéalement étudié parallèlement au modèle de KO total. En effet, des mécanismes de compensation, qui se mettraient vraisemblablement en place lors du développement, atténueraient les conséquences de la perte de fonction de cette protéine dans certains types cellulaires ou même certaines parties du cerveau.

Si l'on se réfère aux trois modèles animaux de DI les plus largement étudiés (trisomie 21, syndrome du X fragile et syndrome de Rett), les fonctions astrocytaires unanimement altérées sont liées à la mise en place du réseau neuronal et synaptique et à l'homéostasie du glutamate au niveau de la synapse (Cheng et al., 2012; Higashimori et al., 2013; Iyer et al., 2014; Lioy et

al., 2011; Okabe et al., 2012; Zdaniuk, Wierzba-Bobrowicz, Szpak, & Stępień, 2011). Ces fonctions sont altérées notamment par une diminution de la sécrétion de molécules, comme la trobonspondine-1 par exemple, qui sont impliquées dans la formation et la maturation des neurones et leur faculté à former des synapses fonctionnelles (Cheng, Lau, & Doering, 2016; Garcia, Torres, Helguera, Coskun, & Busciglio, 2010). L'homéostasie du glutamate au niveau de la synapse serait aussi une composante modifiée par l'altération de la capture du glutamate par les astrocytes. Ces éléments n'ont pas été abordés dans cette étude, mais il a déjà été publié qu'OPHN1 était impliqué dans des phénomènes d'internalisation de la membrane (Houy et al., 2015; Khelfaoui et al., 2007, 2009; Nakano-Kobayashi et al., 2009, 2014). Le trafic membranaire pouvant altérer la sécrétion et la composition de la membrane astrocytaire en transporteurs ou récepteurs, il serait intéressant de vérifier s'il y a un défaut de maturation des neurones et de capture du glutamate synaptique dans des modèles impliquant des neurones normaux et des astrocytes déficients en OPHN1. Ces résultats pourraient potentiellement appuyer l'hypothèse selon laquelle cette fonction astrocytaire est impliquée de manière générale dans la DI.

L'implication des astrocytes dans la DI, et même plus généralement dans les différentes pathologies du cerveau, est une question qui prend de plus en plus d'ampleur (Chung, Welsh, Barres, & Stevens, 2015). Cette tendance vient sûrement du fait que les fonctions astrocytaires, qui se révèlent être bien plus nombreuses et diversifiées que celles des neurones, sont de mieux en mieux connues. L'étude des modèles animaux in vivo ou in vitro de DI sont un moyen de définir l'implication pathologique des astrocytes, mais aussi l'occasion de mieux comprendre leur rôle physiologique. Ces connaissances seraient d'ailleurs aussi utiles pour comprendre leur rôle dans d'autres modèles de pathologies cérébrales. Enfin, une meilleure connaissance des interactions neuro-gliales dans la DI seraient aussi l'opportunité d'explorer le rôle des autres types cellulaires gliaux et leurs interactions avec les neurones mais aussi avec les astrocytes dans la DI. Par exemple, les gènes impliqués dans le syndrome de Rett, du X fragile ou la trisomie 21 sont également exprimés dans la microglie ou les oligodendrocytes (Derecki, Cronk, & Kipnis, 2013; Gholizadeh, Halder, & Hampson, 2015; Kanaumi, Milenkovic, Adle-Biassette, Aronica, & Kovacs, 2013; Nguyen et al., 2013). Nous pouvons alors imaginer à l'avenir décliner le KO conditionnel d'OPHN1 à d'autres types cellulaires afin d'explorer la potentielle contribution des différentes cellules gliales à la DI,

162

permettant également de définir les interactions qui existeraient entre elles, mais aussi avec le réseau neuronal.

Bibliographie

- Agulhon, C., Sun, M.-Y., Murphy, T., Myers, T., Lauderdale, K., & Fiacco, T. A. (2012).
 Calcium Signaling and Gliotransmission in Normal vs. Reactive Astrocytes. *Frontiers in Pharmacology*, *3*, 139. https://doi.org/10.3389/fphar.2012.00139
- al-Ali, S. Y., & al-Hussain, S. M. (1996). An ultrastructural study of the phagocytic activity of astrocytes in adult rat brain. *Journal of Anatomy*, *188 (Pt 2)*, 257–262.
- Allegra, M., Spalletti, C., Vignoli, B., Azzimondi, S., Busti, I., Billuart, P., ... Caleo, M.
 (2017). Pharmacological rescue of adult hippocampal neurogenesis in a mouse model of X-linked intellectual disability. *Neurobiology of Disease*, *100*, 75–86. https://doi.org/10.1016/j.nbd.2017.01.003
- Allen, N. J. (2013). Role of glia in developmental synapse formation. *Current Opinion in Neurobiology*, 23(6), 1027–1033. https://doi.org/10.1016/j.conb.2013.06.004
- Allen, N. J., & Barres, B. A. (2009). Neuroscience: Glia more than just brain glue. *Nature*, *457*(7230), 675–677. https://doi.org/10.1038/457675a
- Al-Owain, M., Kaya, N., Al-Zaidan, H., Al-Hashmi, N., Al-Bakheet, A., Al-Muhaizea, M., ...
 Milunsky, A. (2011). Novel intragenic deletion in OPHN1 in a family causing XLMR with cerebellar hypoplasia and distinctive facial appearance. *Clinical Genetics*, 79(4), 363–370. https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2010.01462.x
- Angelova, M. T., Dimitrova, D. G., Dinges, N., Lence, T., Worpenberg, L., Carré, C., & Roignant, J.-Y. (2018). The Emerging Field of Epitranscriptomics in Neurodevelopmental and Neuronal Disorders. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *6*, 46. https://doi.org/10.3389/fbioe.2018.00046

- Araque, A., Carmignoto, G., & Haydon, P. G. (2001). Dynamic signaling between astrocytes and neurons. *Annual Review of Physiology*, 63, 795–813. https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.63.1.795
- Araque, A., Parpura, V., Sanzgiri, R. P., & Haydon, P. G. (1999). Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends in Neurosciences*, 22(5), 208–215.
- Araque, Alfonso, Carmignoto, G., Haydon, P. G., Oliet, S. H. R., Robitaille, R., & Volterra,
 A. (2014). Gliotransmitters travel in time and space. *Neuron*, 81(4), 728–739.
 https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.02.007
- Araujo, B. H. S., Kaid, C., De Souza, J. S., Gomes da Silva, S., Goulart, E., Caires, L. C. J.,
 ... Cavalheiro, E. A. (2018). Down Syndrome iPSC-Derived Astrocytes Impair
 Neuronal Synaptogenesis and the mTOR Pathway In Vitro. *Molecular Neurobiology*, 55(7), 5962–5975. https://doi.org/10.1007/s12035-017-0818-6
- Auer, M., Hausott, B., & Klimaschewski, L. (2011). Rho GTPases as regulators of morphological neuroplasticity. *Annals of Anatomy = Anatomischer Anzeiger: Official Organ of the Anatomische Gesellschaft*, 193(4), 259–266. https://doi.org/10.1016/j.aanat.2011.02.015
- Ba, W., van der Raadt, J., & Nadif Kasri, N. (2013). Rho GTPase signaling at the synapse:
 implications for intellectual disability. *Experimental Cell Research*, *319*(15), 2368–2374. https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2013.05.033
- Bachoo, R. M., Kim, R. S., Ligon, K. L., Maher, E. A., Brennan, C., Billings, N., ... DePinho,
 R. A. (2004). Molecular diversity of astrocytes with implications for neurological disorders. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(22), 8384–8389. https://doi.org/10.1073/pnas.0402140101

 Bailey, M. S., & Shipley, M. T. (1993). Astrocyte subtypes in the rat olfactory bulb:
 morphological heterogeneity and differential laminar distribution. *The Journal of Comparative Neurology*, 328(4), 501–526. https://doi.org/10.1002/cne.903280405

- Bakel, M. van, Einarsson, I., Arnaud, C., Craig, S., Michelsen, S. I., Pildava, S., ... Cans, C. (n.d.). Monitoring the prevalence of severe intellectual disability in children across
 Europe: feasibility of a common database. *Developmental Medicine & Child Neurology*, 56(4), 361–369. https://doi.org/10.1111/dmcn.12281
- Balboni, G., Tassé, M. J., Schalock, R. L., Borthwick-Duffy, S. A., Spreat, S., Thissen, D., ...
 Navas, P. (2014). The Diagnostic Adaptive Behavior Scale: Evaluating its diagnostic sensitivity and specificity. *Research in Developmental Disabilities*, 35(11), 2884–2893. https://doi.org/10.1016/j.ridd.2014.07.032
- Banks, P. J., Warburton, E. C., Brown, M. W., & Bashir, Z. I. (2014). Mechanisms of synaptic plasticity and recognition memory in the perirhinal cortex. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, *122*, 193–209. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420170-5.00007-6
- Bardoni, B., Abekhoukh, S., Zongaro, S., & Melko, M. (2012). Intellectual disabilities, neuronal posttranscriptional RNA metabolism, and RNA-binding proteins: three actors for a complex scenario. *Progress in Brain Research*, 197, 29–51. https://doi.org/10.1016/B978-0-444-54299-1.00003-0
- Barker, A. J., Koch, S. M., Reed, J., Barres, B. A., & Ullian, E. M. (2008). Developmental control of synaptic receptivity. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 28(33), 8150–8160. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1744-08.2008
- Barresi, S., Tomaselli, S., Athanasiadis, A., Galeano, F., Locatelli, F., Bertini, E., ... Gallo, A. (2014). Oligophrenin-1 (OPHN1), a gene involved in X-linked intellectual disability,

undergoes RNA editing and alternative splicing during human brain development. *PloS One*, *9*(3), e91351. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091351

- Bassani, S., Zapata, J., Gerosa, L., Moretto, E., Murru, L., & Passafaro, M. (2013). The neurobiology of X-linked intellectual disability. *The Neuroscientist: A Review Journal Bringing Neurobiology, Neurology and Psychiatry*, 19(5), 541–552. https://doi.org/10.1177/1073858413493972
- Battaglia, A., & Carey, J. C. (2003). Diagnostic evaluation of developmental delay/mental retardation: An overview. American Journal of Medical Genetics. Part C, Seminars in Medical Genetics, 117C(1), 3–14. https://doi.org/10.1002/ajmg.c.10015
- Bedeschi, M. F., Novelli, A., Bernardini, L., Parazzini, C., Bianchi, V., Torres, B., ... Lalatta,
 F. (2008). Association of syndromic mental retardation with an Xq12q13.1 duplication encompassing the oligophrenin 1 gene. *American Journal of Medical Genetics. Part*A, 146A(13), 1718–1724. https://doi.org/10.1002/ajmg.a.32365
- Ben Achour, S., & Pascual, O. (2012). Astrocyte-neuron communication: functional consequences. *Neurochemical Research*, 37(11), 2464–2473. https://doi.org/10.1007/s11064-012-0807-0
- Benarroch, E. E. (2007). Rho GTPases: role in dendrite and axonal growth, mental retardation, and axonal regeneration. *Neurology*, 68(16), 1315–1318. https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000259588.97409.8f
- Bergmann, C., Zerres, K., Senderek, J., Rudnik-Schoneborn, S., Eggermann, T., Häusler, M.,
 ... Ramaekers, V. T. (2003). Oligophrenin 1 (OPHN1) gene mutation causes
 syndromic X-linked mental retardation with epilepsy, rostral ventricular enlargement
 and cerebellar hypoplasia. *Brain: A Journal of Neurology*, *126*(Pt 7), 1537–1544.
 https://doi.org/10.1093/brain/awg173

- Bernardinelli, Y., Muller, D., & Nikonenko, I. (2014). Astrocyte-synapse structural plasticity. *Neural Plasticity*, 2014, 232105. https://doi.org/10.1155/2014/232105
- Berry-Kravis, E. M., Lindemann, L., Jønch, A. E., Apostol, G., Bear, M. F., Carpenter, R. L.,
 ... Jacquemont, S. (2018). Drug development for neurodevelopmental disorders:
 lessons learned from fragile X syndrome. *Nature Reviews. Drug Discovery*, *17*(4),
 280–299. https://doi.org/10.1038/nrd.2017.221
- Berto, G., Camera, P., Fusco, C., Imarisio, S., Ambrogio, C., Chiarle, R., ... Di Cunto, F.
 (2007). The Down syndrome critical region protein TTC3 inhibits neuronal
 differentiation via RhoA and Citron kinase. *Journal of Cell Science*, *120*(Pt 11), 1859–
 1867. https://doi.org/10.1242/jcs.000703
- Bilder, D. A., Pinborough-Zimmerman, J., Bakian, A. V., Miller, J. S., Dorius, J. T., Nangle,
 B., & McMahon, W. M. (2013). Prenatal and perinatal factors associated with intellectual disability. *American Journal on Intellectual and Developmental Disabilities*, *118*(2), 156–176. https://doi.org/10.1352/1944-7558-118.2.156
- Billuart, P., Bienvenu, T., Ronce, N., des Portes, V., Vinet, M. C., Zemni, R., ... Chelly, J. (1998). Oligophrenin-1 encodes a rhoGAP protein involved in X-linked mental retardation. *Nature*, 392(6679), 923–926. https://doi.org/10.1038/31940
- Billuart, P., Chelly, J., Carrié, A., Vinet, M., Couvert, P., McDonell, N., ... Bienvenu, T. (2000). Determination of the gene structure of human oligophrenin-1 and identification of three novel polymorphisms by screening of DNA from 164 patients with non-specific X-linked mental retardation. *Annales De Genetique*, 43(1), 5–9.
- Bleijerveld, O. B., van Holten, T. C., Preisinger, C., van der Smagt, J. J., Farndale, R. W.,Kleefstra, T., ... Scholten, A. (2013). Targeted phosphotyrosine profiling ofglycoprotein VI signaling implicates oligophrenin-1 in platelet filopodia formation.

Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 33(7), 1538–1543. https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.112.300916

- Boda, B., Dubos, A., & Muller, D. (2010). Signaling mechanisms regulating synapse
 formation and function in mental retardation. *Current Opinion in Neurobiology*, 20(4),
 519–527. https://doi.org/10.1016/j.conb.2010.03.012
- Bonaccorso, C. M., Spatuzza, M., Di Marco, B., Gloria, A., Barrancotto, G., Cupo, A., ...
 Catania, M. V. (2015). Fragile X mental retardation protein (FMRP) interacting
 proteins exhibit different expression patterns during development. *International Journal of Developmental Neuroscience: The Official Journal of the International Society for Developmental Neuroscience*, 42, 15–23.
 https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2015.02.004
- Bongmba, O. Y. N., Martinez, L. A., Elhardt, M. E., Butler, K., & Tejada-Simon, M. V.
 (2011). Modulation of dendritic spines and synaptic function by Rac1: a possible link to Fragile X syndrome pathology. *Brain Research*, *1399*, 79–95. https://doi.org/10.1016/j.brainres.2011.05.020
- Bosworth, A. P., & Allen, N. J. (2017). The diverse actions of astrocytes during synaptic development. *Current Opinion in Neurobiology*, 47, 38–43. https://doi.org/10.1016/j.conb.2017.08.017
- Bribián, A., Figueres-Oñate, M., Martín-López, E., & López-Mascaraque, L. (2016).
 Decoding astrocyte heterogeneity: New tools for clonal analysis. *Neuroscience*, 323, 10–19. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.04.036
- Bushong, E. A., Martone, M. E., Jones, Y. Z., & Ellisman, M. H. (2002). Protoplasmic Astrocytes in CA1 Stratum Radiatum Occupy Separate Anatomical Domains. *Journal* of Neuroscience, 22(1), 183–192. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-01-00183.2002

- Cappello, S. (2013). Small Rho-GTPases and cortical malformations: fine-tuning the cytoskeleton stability. *Small GTPases*, *4*(1), 51–56. https://doi.org/10.4161/sgtp.23093
- Carulla, L. S., Reed, G. M., Vaez-Azizi, L. M., Cooper, S.-A., Leal, R. M., Bertelli, M., ...
 Saxena, S. (n.d.). Intellectual developmental disorders: towards a new name, definition and framework for "mental retardation/intellectual disability" in ICD-11. *World Psychiatry*, 10(3), 175–180. https://doi.org/10.1002/j.2051-5545.2011.tb00045.x
- Casson, I., Broda, T., Durbin, J., Gonzales, A., Green, L., Grier, E., ... Sue, K. (2018). Health checks for adults with intellectual and developmental disabilities in a family practice.
 Canadian Family Physician Medecin De Famille Canadien, 64(Suppl 2), S44–S50.
- Castagnola, S., Bardoni, B., & Maurin, T. (2017). The Search for an Effective Therapy to Treat Fragile X Syndrome: Dream or Reality? *Frontiers in Synaptic Neuroscience*, 9, 15. https://doi.org/10.3389/fnsyn.2017.00015
- Chaboub, L. S., & Deneen, B. (2012). Developmental origins of astrocyte heterogeneity: the final frontier of CNS development. *Developmental Neuroscience*, 34(5), 379–388. https://doi.org/10.1159/000343723
- Chaboub, L. S., & Deneen, B. (2013). Astrocyte form and function in the developing central nervous system. *Seminars in Pediatric Neurology*, 20(4), 230–235. https://doi.org/10.1016/j.spen.2013.10.003
- Chechlacz, M., & Gleeson, J. G. (2003). Is mental retardation a defect of synapse structure and function? *Pediatric Neurology*, *29*(1), 11–17.
- Chen, C., Jiang, P., Xue, H., Peterson, S. E., Tran, H. T., McCann, A. E., ... Deng, W. (2014). Role of astroglia in Down's syndrome revealed by patient-derived human-induced pluripotent stem cells. *Nature Communications*, *5*, 4430. https://doi.org/10.1038/ncomms5430

- Cheng, C., Lau, S. K. M., & Doering, L. C. (2016). Astrocyte-secreted thrombospondin-1 modulates synapse and spine defects in the fragile X mouse model. *Molecular Brain*, 9(1), 74. https://doi.org/10.1186/s13041-016-0256-9
- Cheng, C., Sourial, M., & Doering, L. C. (2012). Astrocytes and developmental plasticity in fragile X. *Neural Plasticity*, 2012, 197491. https://doi.org/10.1155/2012/197491
- Cherfils, J., & Zeghouf, M. (2013). Regulation of Small GTPases by GEFs, GAPs, and GDIs. *Physiological Reviews*, *93*(1), 269–309. https://doi.org/10.1152/physrev.00003.2012
- Chiurazzi, P., & Pirozzi, F. (2016). Advances in understanding genetic basis of intellectual disability. *F1000Research*, 5. https://doi.org/10.12688/f1000research.7134.1
- Chokroborty-Hoque, A., Alberry, B., & Singh, S. M. (2014). Exploring the complexity of intellectual disability in fetal alcohol spectrum disorders. *Frontiers in Pediatrics*, 2, 90. https://doi.org/10.3389/fped.2014.00090
- Chotard, C., & Salecker, I. (2004). Neurons and glia: team players in axon guidance. *Trends in Neurosciences*, 27(11), 655–661. https://doi.org/10.1016/j.tins.2004.09.001
- Chow, L. M. L., Zhang, J., & Baker, S. J. (2008). Inducible Cre recombinase activity in mouse mature astrocytes and adult neural precursor cells. *Transgenic Research*, 17(5), 919–928. https://doi.org/10.1007/s11248-008-9185-4
- Chung, W.-S., Allen, N. J., & Eroglu, C. (2015). Astrocytes Control Synapse Formation, Function, and Elimination. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(9). https://doi.org/10.1101/cshperspect.a020370
- Chung, W.-S., Clarke, L. E., Wang, G. X., Stafford, B. K., Sher, A., Chakraborty, C., ...
 Barres, B. A. (2013). Astrocytes mediate synapse elimination through MEGF10 and
 MERTK pathways. *Nature*, 504(7480), 394–400. https://doi.org/10.1038/nature12776

- Chung, W.-S., Welsh, C. A., Barres, B. A., & Stevens, B. (2015). Do glia drive synaptic and cognitive impairment in disease? *Nature Neuroscience*, 18(11), 1539–1545. https://doi.org/10.1038/nn.4142
- Citi, S., Guerrera, D., Spadaro, D., & Shah, J. (2014). Epithelial junctions and Rho family GTPases: the zonular signalosome. *Small GTPases*, *5*(4), 1–15. https://doi.org/10.4161/21541248.2014.973760
- Clarke, L. E., & Barres, B. A. (2013). Emerging roles of astrocytes in neural circuit development. *Nature Reviews. Neuroscience*, 14(5), 311–321. https://doi.org/10.1038/nrn3484
- Compagnucci, C., Barresi, S., Petrini, S., Billuart, P., Piccini, G., Chiurazzi, P., ... Zanni, G. (2016). Rho Kinase Inhibition Is Essential During In Vitro Neurogenesis and Promotes Phenotypic Rescue of Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Neurons With Oligophrenin-1 Loss of Function. *Stem Cells Translational Medicine*, 5(7), 860–869. https://doi.org/10.5966/sctm.2015-0303
- Cook, F., & Oliver, C. (2011). A review of defining and measuring sociability in children with intellectual disabilities. *Research in Developmental Disabilities*, 32(1), 11–24. https://doi.org/10.1016/j.ridd.2010.09.021
- Coppus, A. M. W. (2013). People with intellectual disability: what do we know about adulthood and life expectancy? *Developmental Disabilities Research Reviews*, 18(1), 6–16. https://doi.org/10.1002/ddrr.1123
- Crespi, B., Summers, K., & Dorus, S. (2010). Evolutionary genomics of human intellectual disability. *Evolutionary Applications*, 3(1), 52–63. https://doi.org/10.1111/j.1752-4571.2009.00098.x
- De Filippis, B., Fabbri, A., Simone, D., Canese, R., Ricceri, L., Malchiodi-Albedi, F., ... Fiorentini, C. (2012). Modulation of RhoGTPases improves the behavioral phenotype

and reverses astrocytic deficits in a mouse model of Rett syndrome. Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of

Neuropsychopharmacology, 37(5), 1152–1163. https://doi.org/10.1038/npp.2011.301

- De Filippis, B., Romano, E., & Laviola, G. (2014). Aberrant Rho GTPases signaling and cognitive dysfunction: in vivo evidence for a compelling molecular relationship. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *46 Pt 2*, 285–301. https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2014.06.007
- De Filippis, B., Valenti, D., Chiodi, V., Ferrante, A., de Bari, L., Fiorentini, C., ... Laviola, G. (2015). Modulation of Rho GTPases rescues brain mitochondrial dysfunction, cognitive deficits and aberrant synaptic plasticity in female mice modeling Rett syndrome. *European Neuropsychopharmacology: The Journal of the European College of Neuropsychopharmacology*, 25(6), 889–901. https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2015.03.012
- de Ligt, J., Willemsen, M. H., van Bon, B. W. M., Kleefstra, T., Yntema, H. G., Kroes, T., ... Vissers, L. E. L. M. (2012). Diagnostic exome sequencing in persons with severe intellectual disability. *The New England Journal of Medicine*, 367(20), 1921–1929. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1206524
- De Pascalis, C., & Etienne-Manneville, S. (2017). Single and collective cell migration: the mechanics of adhesions. *Molecular Biology of the Cell*, 28(14), 1833–1846. https://doi.org/10.1091/mbc.E17-03-0134
- De Pittà, M., Brunel, N., & Volterra, A. (2016). Astrocytes: Orchestrating synaptic plasticity? *Neuroscience*, *323*, 43–61. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.04.001
- Delépine, C., Nectoux, J., Letourneur, F., Baud, V., Chelly, J., Billuart, P., & Bienvenu, T. (2015). Astrocyte Transcriptome from the Mecp2(308)-Truncated Mouse Model of

Rett Syndrome. *Neuromolecular Medicine*, *17*(4), 353–363. https://doi.org/10.1007/s12017-015-8363-9

- Denis-Donini, S., Glowinski, J., & Prochiantz, A. (1984). Glial heterogeneity may define the three-dimensional shape of mouse mesencephalic dopaminergic neurones. *Nature*, 307(5952), 641–643.
- Dere, E., De Souza-Silva, M. A., Frisch, C., Teubner, B., Söhl, G., Willecke, K., & Huston, J. P. (2003). Connexin30-deficient mice show increased emotionality and decreased rearing activity in the open-field along with neurochemical changes. *The European Journal of Neuroscience*, 18(3), 629–638.
- Derecki, N. C., Cronk, J. C., & Kipnis, J. (2013). The role of microglia in brain maintenance: implications for Rett syndrome. *Trends in Immunology*, *34*(3), 144–150. https://doi.org/10.1016/j.it.2012.10.002
- Devreotes, P., & Horwitz, A. R. (2015). Signaling networks that regulate cell migration. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(8), a005959. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a005959
- Diana, G., Valentini, G., Travaglione, S., Falzano, L., Pieri, M., Zona, C., ... Fiorentini, C. (2007). Enhancement of learning and memory after activation of cerebral Rho
 GTPases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(2), 636–641. https://doi.org/10.1073/pnas.0610059104
- Dityatev, A., & Rusakov, D. A. (2011). Molecular signals of plasticity at the tetrapartite synapse. *Current Opinion in Neurobiology*, 21(2), 353–359. https://doi.org/10.1016/j.conb.2010.12.006
- Dong, W. K., & Greenough, W. T. (2004). Plasticity of nonneuronal brain tissue: roles in developmental disorders. *Mental Retardation and Developmental Disabilities Research Reviews*, 10(2), 85–90. https://doi.org/10.1002/mrdd.20016

- Doucet, G., & Petit, A. (2002). Seeking axon guidance molecules in the adult rat CNS. *Progress in Brain Research*, 137, 453–465.
- Dovas, A., & Couchman, J. R. (2005). RhoGDI: multiple functions in the regulation of Rho family GTPase activities. *The Biochemical Journal*, 390(Pt 1), 1–9. https://doi.org/10.1042/BJ20050104
- Duman, J. G., Mulherkar, S., Tu, Y.-K., X Cheng, J., & Tolias, K. F. (2015). Mechanisms for spatiotemporal regulation of Rho-GTPase signaling at synapses. *Neuroscience Letters*, 601, 4–10. https://doi.org/10.1016/j.neulet.2015.05.034
- Duquette, P. M., & Lamarche-Vane, N. (2014). Rho GTPases in embryonic development. Small GTPases, 5(2), 8. https://doi.org/10.4161/sgtp.29716
- Dykens, E. M. (2013). Aging in rare intellectual disability syndromes. *Developmental Disabilities Research Reviews*, *18*(1), 75–83. https://doi.org/10.1002/ddrr.1130
- Ellison, J. W., Rosenfeld, J. A., & Shaffer, L. G. (2013). Genetic basis of intellectual disability. *Annual Review of Medicine*, 64, 441–450. https://doi.org/10.1146/annurevmed-042711-140053
- Etienne-Manneville, S. (2006). In vitro assay of primary astrocyte migration as a tool to study Rho GTPase function in cell polarization. *Methods in Enzymology*, *406*, 565–578. https://doi.org/10.1016/S0076-6879(06)06044-7
- Etienne-Manneville, S., & Hall, A. (2002). Rho GTPases in cell biology. *Nature*, 420(6916), 629–635. https://doi.org/10.1038/nature01148
- Faissner, A., Pyka, M., Geissler, M., Sobik, T., Frischknecht, R., Gundelfinger, E. D., & Seidenbecher, C. (2010). Contributions of astrocytes to synapse formation and maturation Potential functions of the perisynaptic extracellular matrix. *Brain Research Reviews*, 63(1–2), 26–38. https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2010.01.001

Fauchereau, F., Herbrand, U., Chafey, P., Eberth, A., Koulakoff, A., Vinet, M.-C., ... Billuart,
P. (2003). The RhoGAP activity of OPHN1, a new F-actin-binding protein, is
negatively controlled by its amino-terminal domain. *Molecular and Cellular Neurosciences*, 23(4), 574–586.

Faundez, V., De Toma, I., Bardoni, B., Bartesaghi, R., Nizetic, D., de la Torre, R., ... Down Syndrome and Other Genetic Developmental Disorders ECNP Network. (2018).
Translating molecular advances in Down syndrome and Fragile X syndrome into therapies. *European Neuropsychopharmacology: The Journal of the European College of Neuropsychopharmacology*, 28(6), 675–690. https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2018.03.006

Fields, R. D., Araque, A., Johansen-Berg, H., Lim, S.-S., Lynch, G., Nave, K.-A., ... Wake,
H. (2014). Glial biology in learning and cognition. *The Neuroscientist: A Review Journal Bringing Neurobiology, Neurology and Psychiatry*, 20(5), 426–431.
https://doi.org/10.1177/1073858413504465

- Flore, L. A., & Milunsky, J. M. (2012). Updates in the genetic evaluation of the child with global developmental delay or intellectual disability. *Seminars in Pediatric Neurology*, 19(4), 173–180. https://doi.org/10.1016/j.spen.2012.09.004
- Fotinos, A., Klier, M., Gowert, N. S., Münzer, P., Klatt, C., Beck, S., ... Elvers, M. (2015).
 Loss of oligophrenin1 leads to uncontrolled Rho activation and increased thrombus formation in mice. *Journal of Thrombosis and Haemostasis: JTH*, *13*(4), 619–630.
 https://doi.org/10.1111/jth.12834

Freeman, M. R. (2010). Specification and morphogenesis of astrocytes. *Science (New York, N.Y.)*, *330*(6005), 774–778. https://doi.org/10.1126/science.1190928

Fritz, R. D., & Pertz, O. (2016). The dynamics of spatio-temporal Rho GTPase signaling: formation of signaling patterns. *F1000Research*, 5. https://doi.org/10.12688/f1000research.7370.1

- Gandhi, P. N., Gibson, R. M., Tong, X., Miyoshi, J., Takai, Y., Konieczkowski, M., ...
 Wilson-Delfosse, A. L. (2004). An activating mutant of Rac1 that fails to interact with Rho GDP-dissociation inhibitor stimulates membrane ruffling in mammalian cells. *The Biochemical Journal*, *378*(Pt 2), 409–419. https://doi.org/10.1042/BJ20030979
- Garcia, O., Torres, M., Helguera, P., Coskun, P., & Busciglio, J. (2010). A role for thrombospondin-1 deficits in astrocyte-mediated spine and synaptic pathology in Down's syndrome. *PloS One*, 5(12), e14200. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014200
- Garcia-Abreu, J., Moura Neto, V., Carvalho, S. L., & Cavalcante, L. A. (1995). Regionally specific properties of midbrain glia: I. Interactions with midbrain neurons. *Journal of*

Neuroscience Research, 40(4), 471–477. https://doi.org/10.1002/jnr.490400406

- Genoud, C., Quairiaux, C., Steiner, P., Hirling, H., Welker, E., & Knott, G. W. (2006).
 Plasticity of astrocytic coverage and glutamate transporter expression in adult mouse cortex. *PLoS Biology*, *4*(11), e343. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040343
- Ghézali, G., Calvo, C.-F., Pillet, L.-E., Llense, F., Ezan, P., Pannasch, U., ... Rouach, N. (2018). Connexin 30 controls astroglial polarization during postnatal brain development. *Development (Cambridge, England)*, 145(4). https://doi.org/10.1242/dev.155275
- Ghézali, G., Dallérac, G., & Rouach, N. (2016). Perisynaptic astroglial processes: dynamic processors of neuronal information. *Brain Structure & Function*, 221(5), 2427–2442. https://doi.org/10.1007/s00429-015-1070-3

- Gholizadeh, S., Halder, S. K., & Hampson, D. R. (2015). Expression of fragile X mental retardation protein in neurons and glia of the developing and adult mouse brain. *Brain Research*, 1596, 22–30. https://doi.org/10.1016/j.brainres.2014.11.023
- Gibson, R. M., Gandhi, P. N., Tong, X., Miyoshi, J., Takai, Y., Konieczkowski, M., ...
 Wilson-Delfosse, A. L. (2004). An activating mutant of Cdc42 that fails to interact with Rho GDP-dissociation inhibitor localizes to the plasma membrane and mediates actin reorganization. *Experimental Cell Research*, 301(2), 211–222. https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2004.07.033
- Gogolla, N., Caroni, P., Lüthi, A., & Herry, C. (2009). Perineuronal nets protect fear memories from erasure. *Science (New York, N.Y.)*, 325(5945), 1258–1261. https://doi.org/10.1126/science.1174146
- Golden, C. E., Buxbaum, J. D., & De Rubeis, S. (2018). Disrupted circuits in mouse models of autism spectrum disorder and intellectual disability. *Current Opinion in Neurobiology*, 48, 106–112. https://doi.org/10.1016/j.conb.2017.11.006
- Gonçalves, T. F., Gonçalves, A. P., Fintelman Rodrigues, N., dos Santos, J. M., Pimentel, M. M. G., & Santos-Rebouças, C. B. (2014). KDM5C mutational screening among males with intellectual disability suggestive of X-Linked inheritance and review of the literature. *European Journal of Medical Genetics*, *57*(4), 138–144. https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2014.02.011
- Goto, K., Oue, N., Hayashi, T., Shinmei, S., Sakamoto, N., Sentani, K., ... Yasui, W. (2014).
 Oligophrenin-1 is associated with cell adhesion and migration in prostate cancer. *Pathobiology: Journal of Immunopathology, Molecular and Cellular Biology*, 81(4), 190–198. https://doi.org/10.1159/000363345

- Götz, M., Sirko, S., Beckers, J., & Irmler, M. (2015). Reactive astrocytes as neural stem or progenitor cells: In vivo lineage, In vitro potential, and Genome-wide expression analysis. *Glia*, 63(8), 1452–1468. https://doi.org/10.1002/glia.22850
- Govek, E.-E., Newey, S. E., Akerman, C. J., Cross, J. R., Van der Veken, L., & Van Aelst, L. (2004). The X-linked mental retardation protein oligophrenin-1 is required for dendritic spine morphogenesis. *Nature Neuroscience*, 7(4), 364–372. https://doi.org/10.1038/nn1210
- Govek, E.-E., Newey, S. E., & Van Aelst, L. (2005). The role of the Rho GTPases in neuronal development. *Genes & Development*, 19(1), 1–49. https://doi.org/10.1101/gad.1256405
- Greenspan, S., & Woods, G. W. (2014). Intellectual disability as a disorder of reasoning and judgement: the gradual move away from intelligence quotient-ceilings. *Current Opinion in Psychiatry*, 27(2), 110–116.
 https://doi.org/10.1097/YCO.00000000000037
- Guček, A., Vardjan, N., & Zorec, R. (2012). Exocytosis in astrocytes: transmitter release and membrane signal regulation. *Neurochemical Research*, 37(11), 2351–2363. https://doi.org/10.1007/s11064-012-0773-6
- Guedj, F., Bianchi, D. W., & Delabar, J.-M. (2014). Prenatal treatment of Down syndrome: a reality? *Current Opinion in Obstetrics & Gynecology*, 26(2), 92–103. https://doi.org/10.1097/GCO.000000000000056
- Guo, X.-M., Liao, Z.-H., Tao, Y.-Z., Wang, F.-F., & Ma, L. (2017). [Optogenetic activation of dorsal hippocampal astrocytic Rac1 blocks the learning of associative memory]. *Sheng Li Xue Bao: [Acta Physiologica Sinica]*, 69(3), 241–251.
- Haas, B., Schipke, C. G., Peters, O., Söhl, G., Willecke, K., & Kettenmann, H. (2006). Activity-dependent ATP-waves in the mouse neocortex are independent from
astrocytic calcium waves. *Cerebral Cortex (New York, N.Y.: 1991)*, *16*(2), 237–246. https://doi.org/10.1093/cercor/bhi101

Hakim, Y., Yaniv, S. P., & Schuldiner, O. (2014). Astrocytes play a key role in Drosophila mushroom body axon pruning. *PloS One*, 9(1), e86178.
https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086178

Halassa, M. M., Fellin, T., Takano, H., Dong, J.-H., & Haydon, P. G. (2007). Synaptic islands defined by the territory of a single astrocyte. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 27(24), 6473–6477.
https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1419-07.2007

- Halassa, M. M., & Haydon, P. G. (2010). Integrated Brain Circuits: Astrocytic Networks
 Modulate Neuronal Activity and Behavior. *Annual Review of Physiology*, 72, 335–355. https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021909-135843
- Hall, A. (1998). Rho GTPases and the Actin Cytoskeleton. *Science*, 279(5350), 509–514. https://doi.org/10.1126/science.279.5350.509
- Hall, A. (2012). Rho family GTPases. *Biochemical Society Transactions*, 40(6), 1378–1382. https://doi.org/10.1042/BST20120103
- Han, X., Chen, M., Wang, F., Windrem, M., Wang, S., Shanz, S., ... Nedergaard, M. (2013).
 Forebrain engraftment by human glial progenitor cells enhances synaptic plasticity and learning in adult mice. *Cell Stem Cell*, *12*(3), 342–353.
 https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.12.015
- Hansen, M. D., & Nelson, W. J. (2001). Serum-activated assembly and membrane translocation of an endogenous Rac1:effector complex. *Current Biology: CB*, 11(5), 356–360.

- Harada, K., Kamiya, T., & Tsuboi, T. (2015). Gliotransmitter Release from Astrocytes:
 Functional, Developmental, and Pathological Implications in the Brain. *Frontiers in Neuroscience*, *9*, 499. https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00499
- Hatton, G. I. (2004). Morphological plasticity of astroglial/neuronal interactions: functional implications. In G. I. Hatton & V. Parpura (Eds.), *Glial ⇔ Neuronal Signaling* (pp. 99–124). Boston, MA: Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-7937-5_4
- Helsmoortel, C., Vandeweyer, G., Ordoukhanian, P., Van Nieuwerburgh, F., Van der Aa, N., & Kooy, R. F. (2015). Challenges and opportunities in the investigation of unexplained intellectual disability using family-based whole-exome sequencing. *Clinical Genetics*, 88(2), 140–148. https://doi.org/10.1111/cge.12470
- Heulens, I., & Kooy, F. (2011). Fragile X syndrome: from gene discovery to therapy. *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)*, *16*, 1211–1232.
- Hidalgo, A. (2003). Neuron-glia interactions during axon guidance in Drosophila.*Biochemical Society Transactions*, *31*(Pt 1), 50–55. https://doi.org/10.1042/
- Higashimori, H., Morel, L., Huth, J., Lindemann, L., Dulla, C., Taylor, A., ... Yang, Y.
 (2013). Astroglial FMRP-dependent translational down-regulation of mGluR5
 underlies glutamate transporter GLT1 dysregulation in the fragile X mouse. *Human Molecular Genetics*, 22(10), 2041–2054. https://doi.org/10.1093/hmg/ddt055
- Higashimori, H., Schin, C. S., Chiang, M. S. R., Morel, L., Shoneye, T. A., Nelson, D. L., & Yang, Y. (2016). Selective Deletion of Astroglial FMRP Dysregulates Glutamate
 Transporter GLT1 and Contributes to Fragile X Syndrome Phenotypes In Vivo. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *36*(27), 7079–7094. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1069-16.2016
- Hirrlinger, P. G., Scheller, A., Braun, C., Hirrlinger, J., & Kirchhoff, F. (2006). Temporal control of gene recombination in astrocytes by transgenic expression of the tamoxifen-

inducible DNA recombinase variant CreERT2. *Glia*, 54(1), 11–20. https://doi.org/10.1002/glia.20342

Hodge, R. G., & Ridley, A. J. (2016). Regulating Rho GTPases and their regulators. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 17(8), 496–510. https://doi.org/10.1038/nrm.2016.67

Hodges, J. L., Yu, X., Gilmore, A., Bennett, H., Tjia, M., Perna, J. F., ... Zuo, Y. (2017).
Astrocytic Contributions to Synaptic and Learning Abnormalities in a Mouse Model of Fragile X Syndrome. *Biological Psychiatry*, 82(2), 139–149.
https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2016.08.036

- Höltje, M., Hoffmann, A., Hofmann, F., Mucke, C., Große, G., Van Rooijen, N., ... Ahnert-Hilger, G. (2005). Role of Rho GTPase in astrocyte morphology and migratory response during in vitro wound healing: Astrocyte morphology during wound healing. *Journal of Neurochemistry*, 95(5), 1237–1248. https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2005.03443.x
- Homan, C. C., Kumar, R., Nguyen, L. S., Haan, E., Raymond, F. L., Abidi, F., ... Jolly, L. A. (2014). Mutations in USP9X are associated with X-linked intellectual disability and disrupt neuronal cell migration and growth. *American Journal of Human Genetics*, 94(3), 470–478. https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2014.02.004
- Hoon, J. L., Tan, M. H., & Koh, C.-G. (2016). The Regulation of Cellular Responses to Mechanical Cues by Rho GTPases. *Cells*, 5(2). https://doi.org/10.3390/cells5020017
- Hou, Y., Zhou, L., Yang, Q. D., Du, X. P., Li, M., Yuan, M., & Zhou, Z. W. (2012). Changes in hippocampal synapses and learning-memory abilities in a streptozotocin-treated rat model and intervention by using fasudil hydrochloride. *Neuroscience*, 200, 120–129. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.10.030

Houades, V., Koulakoff, A., Ezan, P., Seif, I., & Giaume, C. (2008). Gap junction-mediated astrocytic networks in the mouse barrel cortex. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 28(20), 5207–5217.
https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5100-07.2008

Houy, S., Estay-Ahumada, C., Croisé, P., Calco, V., Haeberlé, A.-M., Bailly, Y., ... Gasman,
S. (2015). Oligophrenin-1 Connects Exocytotic Fusion to Compensatory Endocytosis in Neuroendocrine Cells. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *35*(31), 11045–11055. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4048-14.2015

- Huang, J., Zhu, T., Qu, Y., & Mu, D. (2016). Prenatal, Perinatal and Neonatal Risk Factors for Intellectual Disability: A Systemic Review and Meta-Analysis. *PloS One*, 11(4), e0153655. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153655
- Huentelman, M. J., Stephan, D. A., Talboom, J., Corneveaux, J. J., Reiman, D. M., Gerber, J. D., ... Bimonte-Nelson, H. A. (2009). Peripheral delivery of a ROCK inhibitor improves learning and working memory. *Behavioral Neuroscience*, *123*(1), 218–223. https://doi.org/10.1037/a0014260
- Innes, A., McCabe, L., & Watchman, K. (2012). Caring for older people with an intellectual disability: a systematic review. *Maturitas*, 72(4), 286–295. https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2012.05.008
- Iqbal, Z., & van Bokhoven, H. (2014). Identifying genes responsible for intellectual disability in consanguineous families. *Human Heredity*, 77(1–4), 150–160. https://doi.org/10.1159/000360539
- Israel, J.-M., Schipke, C. G., Ohlemeyer, C., Theodosis, D. T., & Kettenmann, H. (2003). GABAA receptor-expressing astrocytes in the supraoptic nucleus lack glutamate uptake and receptor currents. *Glia*, 44(2), 102–110. https://doi.org/10.1002/glia.10272

- Ito, H., Morishita, R., Tabata, H., & Nagata, K. (2014). Roles of Rho small GTPases in the tangentially migrating neurons. *Histology and Histopathology*, 29(7), 871–879. https://doi.org/10.14670/HH-29.871
- Iyer, A. M., van Scheppingen, J., Milenkovic, I., Anink, J. J., Lim, D., Genazzani, A. A., ... Aronica, E. (2014). Metabotropic glutamate receptor 5 in Down's syndrome hippocampus during development: increased expression in astrocytes. *Current Alzheimer Research*, 11(7), 694–705.
- Jacobs, J. R. (2000). The midline glia of Drosophila: a molecular genetic model for the developmental functions of glia. *Progress in Neurobiology*, *62*(5), 475–508.
- Jacobs, P., MacMahon, K., & Quayle, E. (2018). Transition from school to adult services for young people with severe or profound intellectual disability: A systematic review utilizing framework synthesis. *Journal of Applied Research in Intellectual Disabilities: JARID*. https://doi.org/10.1111/jar.12466
- Jacobs, S., Cheng, C., & Doering, L. C. (2016). Hippocampal neuronal subtypes develop abnormal dendritic arbors in the presence of Fragile X astrocytes. *Neuroscience*, 324, 202–217. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.03.011
- Jacobs, Shelley, Cheng, C., & Doering, L. C. (2012). Probing astrocyte function in fragile X syndrome. *Results and Problems in Cell Differentiation*, 54, 15–31. https://doi.org/10.1007/978-3-642-21649-7_2
- Jacobs, Shelley, & Doering, L. C. (2010). Astrocytes prevent abnormal neuronal development in the fragile x mouse. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 30(12), 4508–4514. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5027-09.2010

- Jacobs, Shelley, Nathwani, M., & Doering, L. C. (2010). Fragile X astrocytes induce developmental delays in dendrite maturation and synaptic protein expression. *BMC Neuroscience*, 11, 132. https://doi.org/10.1186/1471-2202-11-132
- John, N., Krügel, H., Frischknecht, R., Smalla, K.-H., Schultz, C., Kreutz, M. R., ... Seidenbecher, C. I. (2006). Brevican-containing perineuronal nets of extracellular matrix in dissociated hippocampal primary cultures. *Molecular and Cellular Neurosciences*, 31(4), 774–784. https://doi.org/10.1016/j.mcn.2006.01.011
- Jones, T. A., & Greenough, W. T. (1996). Ultrastructural evidence for increased contact between astrocytes and synapses in rats reared in a complex environment. *Neurobiology of Learning and Memory*, 65(1), 48–56. https://doi.org/10.1006/nlme.1996.0005
- Kahanovitch, U., Cuddapah, V. A., Pacheco, N. L., Holt, L. M., Mulkey, D. K., Percy, A. K.,
 & Olsen, M. L. (2018). MeCP2 Deficiency Leads to Loss of Glial Kir4.1. *ENeuro*, 5(1). https://doi.org/10.1523/ENEURO.0194-17.2018
- Kanaumi, T., Milenkovic, I., Adle-Biassette, H., Aronica, E., & Kovacs, G. G. (2013). Nonneuronal cell responses differ between normal and Down syndrome developing brains. *International Journal of Developmental Neuroscience: The Official Journal of the International Society for Developmental Neuroscience*, 31(8), 796–803. https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2013.09.011
- Karam, S. M., Riegel, M., Segal, S. L., Félix, T. M., Barros, A. J. D., Santos, I. S., ... Black, M. (2015). Genetic causes of intellectual disability in a birth cohort: a population-based study. *American Journal of Medical Genetics. Part A*, *167*(6), 1204–1214. https://doi.org/10.1002/ajmg.a.37011

- Katz, G., & Lazcano-Ponce, E. (2008). Intellectual disability: definition, etiological factors, classification, diagnosis, treatment and prognosis. *Salud Pública de México*, 50, s132– s141. https://doi.org/10.1590/S0036-36342008000800005
- Kerr, B., Alvarez-Saavedra, M., Sáez, M. A., Saona, A., & Young, J. I. (2008). Defective body-weight regulation, motor control and abnormal social interactions in Mecp2 hypomorphic mice. *Human Molecular Genetics*, *17*(12), 1707–1717. https://doi.org/10.1093/hmg/ddn061
- Khakh, B. S., & Sofroniew, M. V. (2015). Diversity of astrocyte functions and phenotypes in neural circuits. *Nature Neuroscience*, 18(7), 942–952. https://doi.org/10.1038/nn.4043
- Khelfaoui, M., Denis, C., van Galen, E., de Bock, F., Schmitt, A., Houbron, C., ... Billuart, P. (2007). Loss of X-linked mental retardation gene oligophrenin1 in mice impairs spatial memory and leads to ventricular enlargement and dendritic spine immaturity. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 27(35), 9439–9450. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2029-07.2007
- Khelfaoui, M., Gambino, F., Houbaert, X., Ragazzon, B., Müller, C., Carta, M., ... Humeau,
 Y. (2014). Lack of the presynaptic RhoGAP protein oligophrenin1 leads to cognitive disabilities through dysregulation of the cAMP/PKA signalling pathway. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 369(1633), 20130160. https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0160
- Khelfaoui, M., Pavlowsky, A., Powell, A. D., Valnegri, P., Cheong, K. W., Blandin, Y., ...
 Billuart, P. (2009). Inhibition of RhoA pathway rescues the endocytosis defects in
 Oligophrenin1 mouse model of mental retardation. *Human Molecular Genetics*, *18*(14), 2575–2583. https://doi.org/10.1093/hmg/ddp189
- Kimelberg, H. K. (2004). The problem of astrocyte identity. *Neurochemistry International*, 45(2–3), 191–202. https://doi.org/10.1016/j.neuint.2003.08.015

Kinchen, J. M., Cabello, J., Klingele, D., Wong, K., Feichtinger, R., Schnabel, H., ... Hengartner, M. O. (2005). Two pathways converge at CED-10 to mediate actin rearrangement and corpse removal in C. elegans. *Nature*, 434(7029), 93–99. https://doi.org/10.1038/nature03263

Kolarova, J., Tangen, I., Bens, S., Gillessen-Kaesbach, G., Gutwein, J., Kautza, M., ...
Caliebe, A. (2015). Array-based DNA methylation analysis in individuals with developmental delay/intellectual disability and normal molecular karyotype. *European Journal of Medical Genetics*, 58(8), 419–425.
https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2015.05.001

- Kurabayashi, N., Nguyen, M. D., & Sanada, K. (2015). DYRK1A overexpression enhances STAT activity and astrogliogenesis in a Down syndrome mouse model. *EMBO Reports*, 16(11), 1548–1562. https://doi.org/10.15252/embr.201540374
- Kutsche, K., Yntema, H., Brandt, A., Jantke, I., Nothwang, H. G., Orth, U., ... Gal, A. (2000).
 Mutations in ARHGEF6, encoding a guanine nucleotide exchange factor for Rho
 GTPases, in patients with X-linked mental retardation. *Nature Genetics*, 26(2), 247–250. https://doi.org/10.1038/80002
- Kvarnung, M., & Nordgren, A. (2017). Intellectual Disability & Rare Disorders: A Diagnostic Challenge. Advances in Experimental Medicine and Biology, 1031, 39–54. https://doi.org/10.1007/978-3-319-67144-4_3
- Kwan, K. M., & Kirschner, M. W. (2005). A microtubule-binding Rho-GEF controls cell
 morphology during convergent extension of Xenopus laevis. *Development* (*Cambridge, England*), 132(20), 4599–4610. https://doi.org/10.1242/dev.02041
- Labouesse, M. (2004). Epithelium-mesenchyme: a balancing act of RhoGAP and RhoGEF. *Current Biology: CB*, *14*(13), R508-510. https://doi.org/10.1016/j.cub.2004.06.039

- Larizza, L., & Finelli, P. (2018). Developmental disorders with intellectual disability driven by chromatin dysregulation: Clinical overlaps and molecular mechanisms. *Clinical Genetics*. https://doi.org/10.1111/cge.13365
- Lawson, C. D., & Burridge, K. (2014). The on-off relationship of Rho and Rac during integrin-mediated adhesion and cell migration. *Small GTPases*, 5, e27958. https://doi.org/10.4161/sgtp.27958
- Lawson, C. D., & Ridley, A. J. (2018). Rho GTPase signaling complexes in cell migration and invasion. *The Journal of Cell Biology*, 217(2), 447–457. https://doi.org/10.1083/jcb.201612069
- Learte, A. R., & Hidalgo, A. (2007). The role of glial cells in axon guidance, fasciculation and targeting. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, *621*, 156–166. https://doi.org/10.1007/978-0-387-76715-4_12
- Lelieveld, S. H., Reijnders, M. R. F., Pfundt, R., Yntema, H. G., Kamsteeg, E.-J., de Vries, P.,
 ... Gilissen, C. (2016). Meta-analysis of 2,104 trios provides support for 10 new genes for intellectual disability. *Nature Neuroscience*, *19*(9), 1194–1196.
 https://doi.org/10.1038/nn.4352
- Levenga, J., de Vrij, F. M. S., Oostra, B. A., & Willemsen, R. (2010). Potential therapeutic interventions for fragile X syndrome. *Trends in Molecular Medicine*, 16(11), 516–527. https://doi.org/10.1016/j.molmed.2010.08.005
- Li, X., Newbern, J. M., Wu, Y., Morgan-Smith, M., Zhong, J., Charron, J., & Snider, W. D.
 (2012). MEK Is a Key Regulator of Gliogenesis in the Developing Brain. *Neuron*, 75(6), 1035–1050. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.08.031
- Liddelow, S. A., & Barres, B. A. (2017). Reactive Astrocytes: Production, Function, and Therapeutic Potential. *Immunity*, 46(6), 957–967. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.06.006

- Lin, Q., Fuji, R. N., Yang, W., & Cerione, R. A. (2003). RhoGDI Is Required for Cdc42-Mediated Cellular Transformation. *Current Biology*, 13(17), 1469–1479. https://doi.org/10.1016/S0960-9822(03)00613-4
- Lin, S.-C., & Bergles, D. E. (2004). Synaptic signaling between neurons and glia. *Glia*, 47(3), 290–298. https://doi.org/10.1002/glia.20060
- Lin, Y., & Zheng, Y. (2015). Approaches of targeting Rho GTPases in cancer drug discovery. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 10(9), 991–1010. https://doi.org/10.1517/17460441.2015.1058775
- Linseman, D. A., & Loucks, F. A. (2008). Diverse roles of Rho family GTPases in neuronal development, survival, and death. *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library*, 13, 657–676.
- Lioy, D. T., Garg, S. K., Monaghan, C. E., Raber, J., Foust, K. D., Kaspar, B. K., ... Mandel,
 G. (2011). A role for glia in the progression of Rett's syndrome. *Nature*, 475(7357),
 497–500. https://doi.org/10.1038/nature10214
- Lopez-Atalaya, J. P., Valor, L. M., & Barco, A. (2014). Epigenetic factors in intellectual disability: the Rubinstein-Taybi syndrome as a paradigm of neurodevelopmental disorder with epigenetic origin. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 128, 139–176. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800977-2.00006-1
- 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), 579–590. https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2012.02.018
- Luo, J., Norris, R. H., Gordon, S. L., & Nithianantharajah, J. (2018). Neurodevelopmental synaptopathies: Insights from behaviour in rodent models of synapse gene mutations.
 Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry, 84(Pt B), 424–439.
 https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2017.12.001

- Lushnikova, I., Skibo, G., Muller, D., & Nikonenko, I. (2009). Synaptic potentiation induces increased glial coverage of excitatory synapses in CA1 hippocampus. *Hippocampus*, 19(8), 753–762. https://doi.org/10.1002/hipo.20551
- Lutz, S. E., Zhao, Y., Gulinello, M., Lee, S. C., Raine, C. S., & Brosnan, C. F. (2009).
 DELETION OF ASTROCYTE CONNEXIN 43 AND 30 LEADS TO A
 DYSMYELINATING PHENOTYPE AND HIPPOCAMPAL CA1 VACUOLATION. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 29(24), 7743–7752. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0341-09.2009
- Madrigal, I., Rodríguez-Revenga, L., Badenas, C., Sánchez, A., & Milà, M. (2008). Deletion of the OPHN1 gene detected by aCGH. *Journal of Intellectual Disability Research: JIDR*, 52(Pt 3), 190–194. https://doi.org/10.1111/j.1365-2788.2007.00997.x
- Malan, V., & Romana, S. (2012). Analyse chromosomique sur puce à ADN (CGH array) : principe et application en diagnostic prénatal. *Revue de médecine périnatale*, 4(2), 67– 73. https://doi.org/10.1007/s12611-012-0181-9
- Malchiodi-Albedi, F., Paradisi, S., Di Nottia, M., Simone, D., Travaglione, S., Falzano, L., ...
 Fiorentini, C. (2012). CNF1 Improves Astrocytic Ability to Support Neuronal Growth and Differentiation In vitro. *PLoS ONE*, 7(4).
 https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034115
- Maris, A. F., Barbato, I. T., Trott, A., & Montano, M. A. E. (2013). Familial mental retardation: a review and practical classification. *Ciencia & Saude Coletiva*, 18(6), 1717–1729.
- Marjoram, R. J., Lessey, E. C., & Burridge, K. (2014). Regulation of RhoA activity by adhesion molecules and mechanotransduction. *Current Molecular Medicine*, *14*(2), 199–208.

- Martinez, L. A., & Tejada-Simon, M. V. (2018). Pharmacological Rescue of Hippocampal Fear Learning Deficits in Fragile X Syndrome. *Molecular Neurobiology*, 55(7), 5951– 5961. https://doi.org/10.1007/s12035-017-0819-5
- Martin-Vilchez, S., Whitmore, L., Asmussen, H., Zareno, J., Horwitz, R., & Newell-Litwa, K.
 (2017). RhoGTPase Regulators Orchestrate Distinct Stages of Synaptic Development.
 PloS One, 12(1), e0170464. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170464
- Matyash, V., & Kettenmann, H. (2010). Heterogeneity in astrocyte morphology and physiology. *Brain Research Reviews*, 63(1–2), 2–10. https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2009.12.001
- McCormack, J., Welsh, N. J., & Braga, V. M. M. (2013). Cycling around cell-cell adhesion with Rho GTPase regulators. *Journal of Cell Science*, 126(Pt 2), 379–391. https://doi.org/10.1242/jcs.097923
- McGann, J. C., Lioy, D. T., & Mandel, G. (2012). Astrocytes conspire with neurons during progression of neurological disease. *Current Opinion in Neurobiology*, 22(5), 850– 858. https://doi.org/10.1016/j.conb.2012.03.009
- Mefford, H. C., Batshaw, M. L., & Hoffman, E. P. (2012). Genomics, intellectual disability, and autism. *The New England Journal of Medicine*, 366(8), 733–743. https://doi.org/10.1056/NEJMra1114194
- Ménager, C., & Kaibuchi, K. (2003). [Rho proteins: their function in neurons]. *Medecine Sciences: M/S*, *19*(3), 358–363. https://doi.org/10.1051/medsci/2003193358
- Menke, A., & Giehl, K. (2012). Regulation of adherens junctions by Rho GTPases and p120catenin. Archives of Biochemistry and Biophysics, 524(1), 48–55. https://doi.org/10.1016/j.abb.2012.04.019
- Menten, B., Buysse, K., Vermeulen, S., Meersschaut, V., Vandesompele, J., Ng, B. L., ... Speleman, F. (2007). Report of a female patient with mental retardation and tall

stature due to a chromosomal rearrangement disrupting the OPHN1 gene on Xq12. *European Journal of Medical Genetics*, *50*(6), 446–454. https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2007.07.003

- Meziane, H., Khelfaoui, M., Morello, N., Hiba, B., Calcagno, E., Reibel-Foisset, S., ...
 Billuart, P. (2016). Fasudil treatment in adult reverses behavioural changes and brain ventricular enlargement in Oligophrenin-1 mouse model of intellectual disability. *Human Molecular Genetics*, 25(11), 2314–2323. https://doi.org/10.1093/hmg/ddw102
- Miclea, D., Peca, L., Cuzmici, Z., & Pop, I. V. (2015). Genetic testing in patients with global developmental delay / intellectual disabilities. A review. *Clujul Medical (1957)*, 88(3), 288–292. https://doi.org/10.15386/cjmed-461
- Moeschler, J. B., Shevell, M., & Committee on Genetics. (2014). Comprehensive evaluation of the child with intellectual disability or global developmental delays. *Pediatrics*, *134*(3), e903-918. https://doi.org/10.1542/peds.2014-1839
- Molofsky, A. V., Krencik, R., Krenick, R., Ullian, E. M., Ullian, E., Tsai, H., ... Rowitch, D.
 H. (2012). Astrocytes and disease: a neurodevelopmental perspective. *Genes & Development*, 26(9), 891–907. https://doi.org/10.1101/gad.188326.112
- Momboisse, F., Houy, S., Ory, S., Calco, V., Bader, M.-F., & Gasman, S. (2011). How important are Rho GTPases in neurosecretion? *Journal of Neurochemistry*, *117*(4), 623–631. https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2011.07241.x
- Moortgat, S., Berland, S., Aukrust, I., Maystadt, I., Baker, L., Benoit, V., ... Newbury-Ecob,
 R. A. (2018). HUWE1 variants cause dominant X-linked intellectual disability: a clinical study of 21 patients. *European Journal of Human Genetics: EJHG*, 26(1), 64–74. https://doi.org/10.1038/s41431-017-0038-6

Morisse, F., Vandemaele, E., Claes, C., Claes, L., & Vandevelde, S. (2013). Quality of Life in Persons with Intellectual Disabilities and Mental Health Problems: An Explorative Study [Research article]. https://doi.org/10.1155/2013/491918

Moysés-Oliveira, M., Guilherme, R. S., Meloni, V. A., Di Battista, A., de Mello, C. B.,
Bragagnolo, S., ... Melaragno, M. I. (2015). X-linked intellectual disability related
genes disrupted by balanced X-autosome translocations. *American Journal of Medical Genetics. Part B, Neuropsychiatric Genetics: The Official Publication of the International Society of Psychiatric Genetics*, 168(8), 669–677.
https://doi.org/10.1002/ajmg.b.32355

- Müller, T., Möller, T., Berger, T., Schnitzer, J., & Kettenmann, H. (1992). Calcium entry through kainate receptors and resulting potassium-channel blockade in Bergmann glial cells. *Science (New York, N.Y.)*, 256(5063), 1563–1566.
- Munir, K. M. (2016). The co-occurrence of mental disorders in children and adolescents with intellectual disability/intellectual developmental disorder. *Current Opinion in Psychiatry*, 29(2), 95–102. https://doi.org/10.1097/YCO.00000000000236
- Murali, A., & Rajalingam, K. (2014). Small Rho GTPases in the control of cell shape and mobility. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 71(9), 1703–1721. https://doi.org/10.1007/s00018-013-1519-6
- Muzumdar, M. D., Tasic, B., Miyamichi, K., Li, L., & Luo, L. (2007). A global doublefluorescent Cre reporter mouse. *Genesis (New York, N.Y.: 2000)*, 45(9), 593–605. https://doi.org/10.1002/dvg.20335
- Nakahata, Y., Nabekura, J., & Murakoshi, H. (2016). Dual observation of the ATP-evoked small GTPase activation and Ca2+ transient in astrocytes using a dark red fluorescent protein. *Scientific Reports*, *6*, 39564. https://doi.org/10.1038/srep39564

Nakano-Kobayashi, A., Kasri, N. N., Newey, S. E., & Van Aelst, L. (2009). The Rho-linked mental retardation protein OPHN1 controls synaptic vesicle endocytosis via endophilin A1. *Current Biology: CB*, *19*(13), 1133–1139. https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.05.022

Nakano-Kobayashi, A., Tai, Y., Nadif Kasri, N., & Van Aelst, L. (2014). The X-linked mental retardation protein OPHN1 interacts with Homer1b/c to control spine endocytic zone positioning and expression of synaptic potentiation. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 34(26), 8665–8671. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0894-14.2014

- Narumiya, S., & Thumkeo, D. (2018). Rho signaling research: history, current status and future directions. *FEBS Letters*, 592(11), 1763–1776. https://doi.org/10.1002/1873-3468.13087
- National Research Council (US) Committee on Disability Determination for Mental Retardation. (2002). *Mental Retardation: Determining Eligibility for Social Security Benefits*. (D. J. Reschly, T. G. Myers, & C. R. Hartel, Eds.). Washington (DC): National Academies Press (US). Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK207536/
- Navarrete, M., & Araque, A. (2014). The Cajal school and the physiological role of astrocytes: a way of thinking. *Frontiers in Neuroanatomy*, *8*, 33. https://doi.org/10.3389/fnana.2014.00033

Navarrete, M., Perea, G., Fernandez de Sevilla, D., Gómez-Gonzalo, M., Núñez, A., Martín,
E. D., & Araque, A. (2012). Astrocytes mediate in vivo cholinergic-induced synaptic plasticity. *PLoS Biology*, *10*(2), e1001259.
https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001259

- Newey, S. E., Velamoor, V., Govek, E.-E., & Van Aelst, L. (2005). Rho GTPases, dendritic structure, and mental retardation. *Journal of Neurobiology*, 64(1), 58–74. https://doi.org/10.1002/neu.20153
- Nguyen, M. V. C., Felice, C. A., Du, F., Covey, M. V., Robinson, J. K., Mandel, G., & Ballas, N. (2013). Oligodendrocyte lineage cells contribute unique features to Rett syndrome neuropathology. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 33(48), 18764–18774. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2657-13.2013
- Nickel, R., & Forge, A. (2008). Gap junctions and connexins in the inner ear: their roles in homeostasis and deafness. *Current Opinion in Otolaryngology & Head and Neck Surgery*, 16(5), 452–457. https://doi.org/10.1097/MOO.0b013e32830e20b0
- Nimmerjahn, A., & Bergles, D. E. (2015). Large-scale recording of astrocyte activity. *Current Opinion in Neurobiology*, *32*, 95–106. https://doi.org/10.1016/j.conb.2015.01.015
- Niranjan, T. S., Skinner, C., May, M., Turner, T., Rose, R., Stevenson, R., ... Wang, T.
 (2015). Affected kindred analysis of human X chromosome exomes to identify novel
 X-linked intellectual disability genes. *PloS One*, *10*(2), e0116454.
 https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116454
- Nishida, H., & Okabe, S. (2007). Direct astrocytic contacts regulate local maturation of dendritic spines. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 27(2), 331–340. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4466-06.2007
- Nixdorf-Bergweiler, B. E., Albrecht, D., & Heinemann, U. (1994). Developmental changes in the number, size, and orientation of GFAP-positive cells in the CA1 region of rat hippocampus. *Glia*, *12*(3), 180–195. https://doi.org/10.1002/glia.440120304

Oberheim Bush, N. A., & Nedergaard, M. (2017). Do Evolutionary Changes in Astrocytes Contribute to the Computational Power of the Hominid Brain? *Neurochemical Research*, 42(9), 2577–2587. https://doi.org/10.1007/s11064-017-2363-0

- Oberheim, N. A., Goldman, S. A., & Nedergaard, M. (2012). Heterogeneity of astrocytic form and function. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 814, 23–45. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-452-0_3
- Okabe, Y., Takahashi, T., Mitsumasu, C., Kosai, K., Tanaka, E., & Matsuishi, T. (2012).
 Alterations of gene expression and glutamate clearance in astrocytes derived from an MeCP2-null mouse model of Rett syndrome. *PloS One*, 7(4), e35354.
 https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035354
- Olsen, M. L., Campbell, S. L., & Sontheimer, H. (2007). Differential distribution of Kir4.1 in spinal cord astrocytes suggests regional differences in K+ homeostasis. *Journal of Neurophysiology*, 98(2), 786–793. https://doi.org/10.1152/jn.00340.2007
- Olsen, Michelle L., Khakh, B. S., Skatchkov, S. N., Zhou, M., Lee, C. J., & Rouach, N. (2015). New Insights on Astrocyte Ion Channels: Critical for Homeostasis and Neuron-Glia Signaling. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 35(41), 13827–13835.
 https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2603-15.2015
- Olson, M. F. (2018). Rho GTPases, their post-translational modifications, disease-associated mutations and pharmacological inhibitors. *Small GTPases*, 9(3), 203–215. https://doi.org/10.1080/21541248.2016.1218407
- Osmani, N., Peglion, F., Chavrier, P., & Etienne-Manneville, S. (2010). Cdc42 localization and cell polarity depend on membrane traffic. *The Journal of Cell Biology*, *191*(7), 1261–1269. https://doi.org/10.1083/jcb.201003091

- Pacey, L. K. K., Guan, S., Tharmalingam, S., Thomsen, C., & Hampson, D. R. (2015).
 Persistent astrocyte activation in the fragile X mouse cerebellum. *Brain and Behavior*, 5(10), e00400. https://doi.org/10.1002/brb3.400
- Pal, A., & Prasad, R. (2014). Recent discoveries on the functions of astrocytes in the copper homeostasis of the brain: a brief update. *Neurotoxicity Research*, 26(1), 78–84. https://doi.org/10.1007/s12640-013-9453-9
- Palsuledesai, C. C., Surviladze, Z., Waller, A., Miscioscia, T. F., Guo, Y., Wu, Y., ... Sklar,
 L. A. (2018). Activation of Rho Family GTPases by Small Molecules. ACS Chemical Biology, 13(6), 1514–1524. https://doi.org/10.1021/acschembio.8b00038
- Pandey, U. B., & Mittal, B. (2004). Molecular basis of X-linked non-specific mental retardation. *Indian Journal of Experimental Biology*, *42*(6), 549–557.
- Pannasch, U., Freche, D., Dallérac, G., Ghézali, G., Escartin, C., Ezan, P., ... Rouach, N.
 (2014). Connexin 30 sets synaptic strength by controlling astroglial synapse invasion. *Nature Neuroscience*, 17(4), 549–558. https://doi.org/10.1038/nn.3662
- Pannasch, U., & Rouach, N. (2013). Emerging role for astroglial networks in information processing: from synapse to behavior. *Trends in Neurosciences*, 36(7), 405–417. https://doi.org/10.1016/j.tins.2013.04.004
- Papouin, T., Dunphy, J., Tolman, M., Foley, J. C., & Haydon, P. G. (2017). Astrocytic control of synaptic function. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*. *Series B, Biological Sciences*, 372(1715). https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0154

Park, D., Tosello-Trampont, A.-C., Elliott, M. R., Lu, M., Haney, L. B., Ma, Z., ... Ravichandran, K. S. (2007). BAI1 is an engulfment receptor for apoptotic cells upstream of the ELMO/Dock180/Rac module. *Nature*, 450(7168), 430–434. https://doi.org/10.1038/nature06329 Parker, R. J., & Auld, V. J. (2004). Signaling in glial development: differentiation migration and axon guidance. *Biochemistry and Cell Biology = Biochimie Et Biologie Cellulaire*, 82(6), 694–707. https://doi.org/10.1139/o04-119

- Parpura, V., & Verkhratsky, A. (2012). Astrocytes revisited: concise historic outlook on glutamate homeostasis and signaling. *Croatian Medical Journal*, *53*(6), 518–528.
- Parpura, V., & Zorec, R. (2010). Gliotransmission: Exocytotic release from astrocytes. *Brain Research Reviews*, 63(1–2), 83–92. https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2009.11.008
- Pascual, O., Casper, K. B., Kubera, C., Zhang, J., Revilla-Sanchez, R., Sul, J.-Y., ... Haydon,
 P. G. (2005). Astrocytic purinergic signaling coordinates synaptic networks. *Science* (*New York, N.Y.*), *310*(5745), 113–116. https://doi.org/10.1126/science.1116916
- Patel, A. B., Lai, J. C. K., Chowdhury, G. M. I., Hyder, F., Rothman, D. L., Shulman, R. G., & Behar, K. L. (2014). Direct evidence for activity-dependent glucose phosphorylation in neurons with implications for the astrocyte-to-neuron lactate shuttle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(14), 5385–5390. https://doi.org/10.1073/pnas.1403576111
- Peck, J., Douglas, G., Wu, C. H., & Burbelo, P. D. (2002). Human RhoGAP domaincontaining proteins: structure, function and evolutionary relationships. *FEBS Letters*, 528(1–3), 27–34.
- Peng, J.-P., Liu, F., Xie, H., & Chen, X.-L. (2017). The pathogenicity of genomic/genetic variant of X-chromosomal genes in males with intellectual disability. *Yi Chuan = Hereditas*, 39(6), 455–468. https://doi.org/10.16288/j.yczz.16-407
- Pengelly, R. J., Greville-Heygate, S., Schmidt, S., Seaby, E. G., Jabalameli, M. R., Mehta, S. G., ... Baralle, D. (2016). Mutations specific to the Rac-GEF domain of TRIO cause intellectual disability and microcephaly. *Journal of Medical Genetics*, *53*(11), 735–742. https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2016-103942

Perea, G., & Araque, A. (2005). Synaptic regulation of the astrocyte calcium signal. *Journal of Neural Transmission (Vienna, Austria: 1996)*, 112(1), 127–135. https://doi.org/10.1007/s00702-004-0170-7

- Perea, Gertrudis, & Araque, A. (2002). Communication between astrocytes and neurons: a complex language. *Journal of Physiology, Paris*, 96(3–4), 199–207.
- Perea, Gertrudis, Navarrete, M., & Araque, A. (2009). Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. *Trends in Neurosciences*, 32(8), 421–431. https://doi.org/10.1016/j.tins.2009.05.001
- Perea, Gertrudis, Sur, M., & Araque, A. (2014). Neuron-glia networks: integral gear of brain function. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 8, 378. https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00378
- Pereira, A., & Furlan, F. A. (2010). Astrocytes and human cognition: modeling information integration and modulation of neuronal activity. *Progress in Neurobiology*, 92(3), 405–420. https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2010.07.001
- Perez-Alvarez, A., Navarrete, M., Covelo, A., Martin, E. D., & Araque, A. (2014). Structural and functional plasticity of astrocyte processes and dendritic spine interactions. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 34(38), 12738–12744. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2401-14.2014
- Picker, J. D., & Walsh, C. A. (2013). New innovations: therapeutic opportunities for intellectual disabilities. *Annals of Neurology*, 74(3), 382–390. https://doi.org/10.1002/ana.24002
- Pirozzi, F., Di Raimo, F. R., Zanni, G., Bertini, E., Billuart, P., Tartaglione, T., ... Chiurazzi,
 P. (2011). Insertion of 16 amino acids in the BAR domain of the oligophrenin 1
 protein causes mental retardation and cerebellar hypoplasia in an Italian family. *Human Mutation*, 32(11), E2294-2307. https://doi.org/10.1002/humu.21567

Piton, A., Redin, C., & Mandel, J.-L. (2013). XLID-causing mutations and associated genes challenged in light of data from large-scale human exome sequencing. *American Journal of Human Genetics*, 93(2), 368–383. https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2013.06.013

Pizzorusso, T., Medini, P., Berardi, N., Chierzi, S., Fawcett, J. W., & Maffei, L. (2002).
Reactivation of ocular dominance plasticity in the adult visual cortex. *Science (New York, N.Y.)*, 298(5596), 1248–1251. https://doi.org/10.1126/science.1072699

- Plutoni, C., Bazellières, E., & Gauthier-Rouvière, C. (2016). P-cadherin-mediated Rho GTPase regulation during collective cell migration. *Small GTPases*, 7(3), 156–163. https://doi.org/10.1080/21541248.2016.1173772
- Pop, A. S., Gomez-Mancilla, B., Neri, G., Willemsen, R., & Gasparini, F. (2014). Fragile X syndrome: a preclinical review on metabotropic glutamate receptor 5 (mGluR5) antagonists and drug development. *Psychopharmacology*, 231(6), 1217–1226. https://doi.org/10.1007/s00213-013-3330-3
- Potokar, M., Vardjan, N., Stenovec, M., Gabrijel, M., Trkov, S., Jorgačevski, J., ... Zorec, R.
 (2013). Astrocytic vesicle mobility in health and disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(6), 11238–11258. https://doi.org/10.3390/ijms140611238
- Powell, A. D., Gill, K. K., Saintot, P.-P., Jiruska, P., Chelly, J., Billuart, P., & Jefferys, J. G.
 R. (2012). Rapid reversal of impaired inhibitory and excitatory transmission but not spine dysgenesis in a mouse model of mental retardation. *The Journal of Physiology*, *590*(4), 763–776. https://doi.org/10.1113/jphysiol.2011.219907
- Pozo, M. A. D., Kiosses, W. B., Alderson, N. B., Meller, N., Hahn, K. M., & Schwartz, M. A. (2002). Integrins regulate GTP-Rac localized effector interactions through dissociation of Rho-GDI. *Nature Cell Biology*, 4(3), 232–239. https://doi.org/10.1038/ncb759

Puri, R. D., Tuteja, M., & Verma, I. C. (2016). Genetic Approach to Diagnosis of Intellectual Disability. *Indian Journal of Pediatrics*, 83(10), 1141–1149. https://doi.org/10.1007/s12098-016-2205-0

- Qu, C., Gardner, P., & Schrijver, I. (2009). The role of the cytoskeleton in the formation of gap junctions by Connexin 30. *Experimental Cell Research*, 315(10), 1683–1692. https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2009.03.001
- Racchetti, G., D'Alessandro, R., & Meldolesi, J. (2012). Astrocyte stellation, a process dependent on Rac1 is sustained by the regulated exocytosis of enlargeosomes. *Glia*, 60(3), 465–475. https://doi.org/10.1002/glia.22280
- Raff, M. C., Abney, E. R., Cohen, J., Lindsay, R., & Noble, M. (1983). Two types of astrocytes in cultures of developing rat white matter: differences in morphology, surface gangliosides, and growth characteristics. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 3(6), 1289–1300.
- Rakela, B., Brehm, P., & Mandel, G. (2018). Astrocytic modulation of excitatory synaptic signaling in a mouse model of Rett syndrome. *ELife*, 7. https://doi.org/10.7554/eLife.31629
- Ramakers, G. J. A. (2002). Rho proteins, mental retardation and the cellular basis of cognition. *Trends in Neurosciences*, 25(4), 191–199.
- Ransom, B. R., & Sontheimer, H. (1992). The neurophysiology of glial cells. Journal of Clinical Neurophysiology: Official Publication of the American Electroencephalographic Society, 9(2), 224–251.
- Ratheesh, A., Priya, R., & Yap, A. S. (2013). Coordinating Rho and Rac: the regulation of Rho GTPase signaling and cadherin junctions. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, *116*, 49–68. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394311-8.00003-0

Redolfi, N., Galla, L., Maset, A., Murru, L., Savoia, E., Zamparo, I., ... Lodovichi, C. (2016).
Oligophrenin-1 regulates number, morphology and synaptic properties of adult-born inhibitory interneurons in the olfactory bulb. *Human Molecular Genetics*, 25(23), 5198–5211. https://doi.org/10.1093/hmg/ddw340

- Reemst, K., Noctor, S. C., Lucassen, P. J., & Hol, E. M. (2016). The Indispensable Roles of Microglia and Astrocytes during Brain Development. *Frontiers in Human Neuroscience*, 10. https://doi.org/10.3389/fnhum.2016.00566
- Reichenberg, A., Cederlöf, M., McMillan, A., Trzaskowski, M., Kapra, O., Fruchter, E., ... Lichtenstein, P. (2016). Discontinuity in the genetic and environmental causes of the intellectual disability spectrum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *113*(4), 1098–1103. https://doi.org/10.1073/pnas.1508093112
- Renault-Mihara, F., Mukaino, M., Shinozaki, M., Kumamaru, H., Kawase, S., Baudoux, M.,
 ... Okano, H. (2017). Regulation of RhoA by STAT3 coordinates glial scar formation. *The Journal of Cell Biology*, 216(8), 2533–2550.

https://doi.org/10.1083/jcb.201610102

- Renieri, A., Pescucci, C., Longo, I., Ariani, F., Mari, F., & Meloni, I. (2005). Non-syndromic X-linked mental retardation: from a molecular to a clinical point of view. *Journal of Cellular Physiology*, 204(1), 8–20. https://doi.org/10.1002/jcp.20296
- Reppermund, S., & Trollor, J. N. (2016). Successful ageing for people with an intellectual disability. *Current Opinion in Psychiatry*, 29(2), 149–154. https://doi.org/10.1097/YCO.00000000000228
- Ridley, A. J. (2012). Historical overview of Rho GTPases. *Methods in Molecular Biology* (*Clifton, N.J.*), 827, 3–12. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-442-1_1

- Rocas, D., Alix, E., Michel, J., Cordier, M.-P., Labalme, A., Guilbert, H., ... Sanlaville, D. (2013). Neuropathological features in a female fetus with OPHN1 deletion and cerebellar hypoplasia. *European Journal of Medical Genetics*, 56(5), 270–273. https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2013.01.014
- Rose, C. F., Verkhratsky, A., & Parpura, V. (2013). Astrocyte glutamine synthetase: pivotal in health and disease. *Biochemical Society Transactions*, 41(6), 1518–1524. https://doi.org/10.1042/BST20130237
- Rose, C. R., & Karus, C. (2013). Two sides of the same coin: sodium homeostasis and signaling in astrocytes under physiological and pathophysiological conditions. *Glia*, 61(8), 1191–1205. https://doi.org/10.1002/glia.22492
- Roselló, M., Martínez, F., Monfort, S., Mayo, S., Oltra, S., & Orellana, C. (2014). Phenotype profiling of patients with intellectual disability and copy number variations. *European Journal of Paediatric Neurology: EJPN: Official Journal of the European Paediatric Neurology Society*, 18(5), 558–566. https://doi.org/10.1016/j.ejpn.2014.04.010
- Rossi, D., Martorana, F., & Brambilla, L. (2011). Implications of gliotransmission for the pharmacotherapy of CNS disorders. *CNS Drugs*, 25(8), 641–658. https://doi.org/10.2165/11593090-000000000-00000
- Sahlender, D. A., Savtchouk, I., & Volterra, A. (2014). What do we know about gliotransmitter release from astrocytes? *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 369(1654), 20130592. https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0592
- Sanchez-Mut, J. V., Huertas, D., & Esteller, M. (2012). Aberrant epigenetic landscape in intellectual disability. *Progress in Brain Research*, 197, 53–71. https://doi.org/10.1016/B978-0-444-54299-1.00004-2

- Santello, M., Bezzi, P., & Volterra, A. (2011). TNFα controls glutamatergic gliotransmission in the hippocampal dentate gyrus. *Neuron*, 69(5), 988–1001. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.02.003
- Santello, M., Calì, C., & Bezzi, P. (2012). Gliotransmission and the tripartite synapse. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 970, 307–331. https://doi.org/10.1007/978-3-7091-0932-8_14
- Sato, K., Horiuchi, Y., Jin, Y., Malchinkhuu, E., Komachi, M., Kondo, T., & Okajima, F. (2011). Unmasking of LPA1 receptor-mediated migration response to lysophosphatidic acid by interleukin-1β-induced attenuation of Rho signaling pathways in rat astrocytes. *Journal of Neurochemistry*, *117*(1), 164–174. https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2011.07188.x
- Schmitz, A. A., Govek, E. E., Böttner, B., & Van Aelst, L. (2000). Rho GTPases: signaling, migration, and invasion. *Experimental Cell Research*, 261(1), 1–12. https://doi.org/10.1006/excr.2000.5049
- Schwartz, T. S., Wojcik, M. H., Pelletier, R. C., Edward, H. L., Picker, J. D., Holm, I. A., ... Agrawal, P. B. (2018). Expanding the phenotypic spectrum associated with OPHN1 variants. *European Journal of Medical Genetics*. https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2018.06.015
- Scott, C. A., Tattersall, D., O'Toole, E. A., & Kelsell, D. P. (2012). Connexins in epidermal homeostasis and skin disease. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1818(8), 1952–1961. https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2011.09.004
- Serrano, A., Haddjeri, N., Lacaille, J.-C., & Robitaille, R. (2006). GABAergic network activation of glial cells underlies hippocampal heterosynaptic depression. *The Journal* of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience, 26(20), 5370– 5382. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5255-05.2006

Sit, S.-T., & Manser, E. (2011). Rho GTPases and their role in organizing the actin cytoskeleton. *Journal of Cell Science*, 124(5), 679–683. https://doi.org/10.1242/jcs.064964

- Sloan, S. A., & Barres, B. A. (2014). Mechanisms of astrocyte development and their contributions to neurodevelopmental disorders. *Current Opinion in Neurobiology*, 27, 75–81. https://doi.org/10.1016/j.conb.2014.03.005
- Sotelo, C. (2003). Viewing the brain through the master hand of Ramon y Cajal. *Nature Reviews Neuroscience*, 4(1), 71–77. https://doi.org/10.1038/nrn1010
- Spacek, J., & Harris, K. M. (1998). Three-dimensional organization of cell adhesion junctions at synapses and dendritic spines in area CA1 of the rat hippocampus. *The Journal of Comparative Neurology*, 393(1), 58–68.
- Spiering, D., & Hodgson, L. (2011). Dynamics of the Rho-family small GTPases in actin regulation and motility. *Cell Adhesion & Migration*, 5(2), 170–180.
- Spillane, M., & Gallo, G. (2014). Involvement of Rho-family GTPases in axon branching. Small GTPases, 5, e27974. https://doi.org/10.4161/sgtp.27974
- Srivastava, A. K., & Schwartz, C. E. (2014). Intellectual disability and autism spectrum disorders: causal genes and molecular mechanisms. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 46 Pt 2, 161–174. https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2014.02.015
- Srour, M., & Shevell, M. (2014). Genetics and the investigation of developmental delay/intellectual disability. Archives of Disease in Childhood, 99(4), 386–389. https://doi.org/10.1136/archdischild-2013-304063
- Stankiewicz, T. R., & Linseman, D. A. (2014). Rho family GTPases: key players in neuronal development, neuronal survival, and neurodegeneration. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 8, 314. https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00314

- Stephan, A. H., Barres, B. A., & Stevens, B. (2012). The complement system: an unexpected role in synaptic pruning during development and disease. *Annual Review of Neuroscience*, 35, 369–389. https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-061010-113810
- Stevenson, R. E., & Schwartz, C. E. (2009). X-linked intellectual disability: unique vulnerability of the male genome. *Developmental Disabilities Research Reviews*, 15(4), 361–368. https://doi.org/10.1002/ddrr.81
- Stipursky, J., Spohr, T. C. L. de S. E., Sousa, V. O., & Gomes, F. C. A. (2012). Neuronastroglial interactions in cell-fate commitment and maturation in the central nervous system. *Neurochemical Research*, *37*(11), 2402–2418. https://doi.org/10.1007/s11064-012-0798-x
- Sun, D., & Jakobs, T. C. (2012). Structural remodeling of astrocytes in the injured CNS. *The Neuroscientist: A Review Journal Bringing Neurobiology, Neurology and Psychiatry*, 18(6), 567–588. https://doi.org/10.1177/1073858411423441
- Suzuki, A., Stern, S. A., Bozdagi, O., Huntley, G. W., Walker, R. H., Magistretti, P. J., & Alberini, C. M. (2011). Astrocyte-neuron lactate transport is required for long-term memory formation. *Cell*, 144(5), 810–823. https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.018
- Takata, N., & Hirase, H. (2008). Cortical layer 1 and layer 2/3 astrocytes exhibit distinct calcium dynamics in vivo. *PloS One*, 3(6), e2525. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002525
- Takata, N., Mishima, T., Hisatsune, C., Nagai, T., Ebisui, E., Mikoshiba, K., & Hirase, H.
 (2011). Astrocyte calcium signaling transforms cholinergic modulation to cortical plasticity in vivo. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *31*(49), 18155–18165. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5289-11.2011

- Takeuchi, T., Duszkiewicz, A. J., & Morris, R. G. M. (2014). The synaptic plasticity and memory hypothesis: encoding, storage and persistence. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 369(1633), 20130288. https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0288
- Taniguchi, H., & Moore, A. W. (2014). Chromatin regulators in neurodevelopment and disease: Analysis of fly neural circuits provides insights: Networks of chromatin regulators and transcription factors underlie Drosophila neurogenesis and cognitive defects in intellectual disability and neuropsychiatric disorder models. *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology, 36*(9), 872–883. https://doi.org/10.1002/bies.201400087
- Tasdemir-Yilmaz, O. E., & Freeman, M. R. (2014). Astrocytes engage unique molecular programs to engulf pruned neuronal debris from distinct subsets of neurons. *Genes & Development*, 28(1), 20–33. https://doi.org/10.1101/gad.229518.113
- Tcherkezian, J., & Lamarche-Vane, N. (2007). Current knowledge of the large RhoGAP family of proteins. *Biology of the Cell*, 99(2), 67–86. https://doi.org/10.1042/BC20060086
- Tejada-Simon, M. V. (2015). Modulation of actin dynamics by Rac1 to target cognitive function. *Journal of Neurochemistry*, 133(6), 767–779. https://doi.org/10.1111/jnc.13100
- Tentler, D., Gustavsson, P., Leisti, J., Schueler, M., Chelly, J., Timonen, E., ... Dahl, N. (1999). Deletion including the oligophrenin-1 gene associated with enlarged cerebral ventricles, cerebellar hypoplasia, seizures and ataxia. *European Journal of Human Genetics: EJHG*, 7(5), 541–548. https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5200320

- Theodosis, D. T., Poulain, D. A., & Oliet, S. H. R. (2008). Activity-dependent structural and functional plasticity of astrocyte-neuron interactions. *Physiological Reviews*, 88(3), 983–1008. https://doi.org/10.1152/physrev.00036.2007
- Thumkeo, D., Watanabe, S., & Narumiya, S. (2013). Physiological roles of Rho and Rho effectors in mammals. *European Journal of Cell Biology*, 92(10–11), 303–315. https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2013.09.002
- Tolias, K. F., Duman, J. G., & Um, K. (2011). Control of synapse development and plasticity by Rho GTPase regulatory proteins. *Progress in Neurobiology*, 94(2), 133–148. https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2011.04.011
- Toma, I. D., Gil, L. M., Ossowski, S., & Dierssen, M. (2016). Where Environment Meets Cognition: A Focus on Two Developmental Intellectual Disability Disorders. *Neural Plasticity*, 2016, 4235898. https://doi.org/10.1155/2016/4235898
- Torres, M. D., Garcia, O., Tang, C., & Busciglio, J. (2018). Dendritic spine pathology and thrombospondin-1 deficits in Down syndrome. *Free Radical Biology & Medicine*, 114, 10–14. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.09.025
- Tranfaglia, M. R., Thibodeaux, C., Mason, D. J., Brown, D., Roberts, I., Smith, R., ...
 Cogram, P. (2018). Repurposing available drugs for neurodevelopmental disorders:
 The fragile X experience. *Neuropharmacology*.
 https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2018.05.004
- Tsai, H.-H., Li, H., Fuentealba, L. C., Molofsky, A. V., Taveira-Marques, R., Zhuang, H., ...
 Rowitch, D. H. (2012). Regional Astrocyte Allocation Regulates CNS Synaptogenesis and Repair. *Science (New York, N.Y.)*, *337*(6092), 358–362.
 https://doi.org/10.1126/science.1222381

Tse, M. M., Kwan, R. Y., & Lau, J. L. (2018). Ageing in individuals with intellectual disability: issues and concerns in Hong Kong. *Hong Kong Medical Journal = Xianggang Yi Xue Za Zhi*, 24(1), 68–72. https://doi.org/10.12809/hkmj166302

Tzschach, A., Grasshoff, U., Beck-Woedl, S., Dufke, C., Bauer, C., Kehrer, M., ... Bauer, P. (2015). Next-generation sequencing in X-linked intellectual disability. *European Journal of Human Genetics: EJHG*, 23(11), 1513–1518.

https://doi.org/10.1038/ejhg.2015.5

- Vaillend, C., Poirier, R., & Laroche, S. (2008). Genes, plasticity and mental retardation. Behavioural Brain Research, 192(1), 88–105. https://doi.org/10.1016/j.bbr.2008.01.009
- Valnegri, P., Sala, C., & Passafaro, M. (2012). Synaptic dysfunction and intellectual disability. Advances in Experimental Medicine and Biology, 970, 433–449. https://doi.org/10.1007/978-3-7091-0932-8_19
- van Bokhoven, H. (2011). Genetic and epigenetic networks in intellectual disabilities. *Annual Review of Genetics*, *45*, 81–104. https://doi.org/10.1146/annurev-genet-110410-132512
- van Galen, E. J. M., & Ramakers, G. J. A. (2005). Rho proteins, mental retardation and the neurobiological basis of intelligence. *Progress in Brain Research*, 147, 295–317. https://doi.org/10.1016/S0079-6123(04)47022-8
- Verpelli, C., Galimberti, I., Gomez-Mancilla, B., & Sala, C. (2014). Molecular basis for prospective pharmacological treatment strategies in intellectual disability syndromes. *Developmental Neurobiology*, 74(2), 197–206. https://doi.org/10.1002/dneu.22093
- Verpelli, C., & Sala, C. (2012). Molecular and synaptic defects in intellectual disability syndromes. *Current Opinion in Neurobiology*, 22(3), 530–536. https://doi.org/10.1016/j.conb.2011.09.007

- Vigil, D., Cherfils, J., Rossman, K. L., & Der, C. J. (2010). Ras superfamily GEFs and GAPs: validated and tractable targets for cancer therapy? *Nature Reviews. Cancer*, 10(12), 842–857. https://doi.org/10.1038/nrc2960
- Vissers, L. E. L. M., Gilissen, C., & Veltman, J. A. (2016). Genetic studies in intellectual disability and related disorders. *Nature Reviews. Genetics*, 17(1), 9–18. https://doi.org/10.1038/nrg3999
- von Bohlen Und Halbach, O. (2010). Dendritic spine abnormalities in mental retardation. *Cell* and Tissue Research, 342(3), 317–323. https://doi.org/10.1007/s00441-010-1070-9
- Wieland, I., Weidner, C., Ciccone, R., Lapi, E., McDonald-McGinn, D., Kress, W., ...
 Wieacker, P. (2007). Contiguous gene deletions involving EFNB1, OPHN1, PJA1 and EDA in patients with craniofrontonasal syndrome. *Clinical Genetics*, 72(6), 506–516. https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2007.00905.x
- Williams, E. C., Zhong, X., Mohamed, A., Li, R., Liu, Y., Dong, Q., ... Chang, Q. (2014).
 Mutant astrocytes differentiated from Rett syndrome patients-specific iPSCs have adverse effects on wild-type neurons. *Human Molecular Genetics*, 23(11), 2968–2980.
 https://doi.org/10.1093/hmg/ddu008
- Witcher, M. R., Kirov, S. A., & Harris, K. M. (2007). Plasticity of perisynaptic astroglia during synaptogenesis in the mature rat hippocampus. *Glia*, 55(1), 13–23. https://doi.org/10.1002/glia.20415
- Yang, Q., Feng, B., Zhang, K., Guo, Y., Liu, S., Wu, Y., ... Zhao, M. (2012). Excessive astrocyte-derived neurotrophin-3 contributes to the abnormal neuronal dendritic development in a mouse model of fragile X syndrome. *PLoS Genetics*, 8(12), e1003172. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003172
- Yeh, T.-H., Lee, D. Y., Gianino, S. M., & Gutmann, D. H. (2009). Microarray analyses reveal regional astrocyte heterogeneity with implications for neurofibromatosis type 1 (NF1)-

regulated glial proliferation. *Glia*, 57(11), 1239–1249. https://doi.org/10.1002/glia.20845

- Yong, V. W., Yong, F. P., Olivier, A., Robitaille, Y., & Antel, J. P. (1990). Morphologic heterogeneity of human adult astrocytes in culture: correlation with HLA-DR expression. *Journal of Neuroscience Research*, 27(4), 678–688. https://doi.org/10.1002/jnr.490270428
- Zamboni, V., Jones, R., Umbach, A., Ammoni, A., Passafaro, M., Hirsch, E., & Merlo, G. R.
 (2018). Rho GTPases in Intellectual Disability: From Genetics to Therapeutic
 Opportunities. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(6).
 https://doi.org/10.3390/ijms19061821
- Zanni, G., Saillour, Y., Nagara, M., Billuart, P., Castelnau, L., Moraine, C., ... Chelly, J. (2005). Oligophrenin 1 mutations frequently cause X-linked mental retardation with cerebellar hypoplasia. *Neurology*, 65(9), 1364–1369. https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000182813.94713.ee
- Zdaniuk, G., Wierzba-Bobrowicz, T., Szpak, G. M., & Stępień, T. (2011). Astroglia disturbances during development of the central nervous system in fetuses with Down's syndrome. *Folia Neuropathologica*, *49*(2), 109–114.
- Zegers, M. M., & Friedl, P. (2014). Rho GTPases in collective cell migration. *Small GTPases*, 5, e28997. https://doi.org/10.4161/sgtp.28997
- Zeug, A., Müller, F. E., Anders, S., Herde, M. K., Minge, D., Ponimaskin, E., & Henneberger,
 C. (2018). Control of astrocyte morphology by Rho GTPases. *Brain Research Bulletin*, 136, 44–53. https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2017.05.003
- Zhang, C.-L., Aime, M., Laheranne, E., Houbaert, X., El Oussini, H., Martin, C., ... Humeau,Y. (2017). Protein Kinase A Deregulation in the Medial Prefrontal Cortex ImpairsWorking Memory in Murine Oligophrenin-1 Deficiency. *The Journal of*

Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience, *37*(46), 11114–11126. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0351-17.2017

- Zhang, J., Neal, J., Lian, G., Hu, J., Lu, J., & Sheen, V. (2013). Filamin A Regulates Neuronal Migration through Brefeldin A-Inhibited Guanine Exchange Factor 2-Dependent Arf1 Activation. *The Journal of Neuroscience*, *33*(40), 15735–15746. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1939-13.2013
- Zhang, Q., & Haydon, P. G. (2005). Roles for gliotransmission in the nervous system. Journal of Neural Transmission (Vienna, Austria: 1996), 112(1), 121–125. https://doi.org/10.1007/s00702-004-0119-x
- Zhang, Y., & Barres, B. A. (2010). Astrocyte heterogeneity: an underappreciated topic in neurobiology. *Current Opinion in Neurobiology*, 20(5), 588–594. https://doi.org/10.1016/j.conb.2010.06.005
- Zhang, Y., & Barres, B. A. (2013). A smarter mouse with human astrocytes: Prospects & Overviews. *BioEssays*, n/a-n/a. https://doi.org/10.1002/bies.201300070
- Zhang, Y., Chen, K., Sloan, S. A., Bennett, M. L., Scholze, A. R., O'Keeffe, S., ... Wu, J. Q. (2014). An RNA-Sequencing Transcriptome and Splicing Database of Glia, Neurons, and Vascular Cells of the Cerebral Cortex. *The Journal of Neuroscience*, *34*(36), 11929–11947. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1860-14.2014
- Zhou, M., & Kimelberg, H. K. (2001). Freshly isolated hippocampal CA1 astrocytes comprise two populations differing in glutamate transporter and AMPA receptor expression. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 21(20), 7901–7908.
- Zong, H., Espinosa, J. S., Su, H. H., Muzumdar, M. D., & Luo, L. (2005). Mosaic analysis with double markers in mice. *Cell*, 121(3), 479–492. https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.02.012

Zorec, R., Araque, A., Carmignoto, G., Haydon, P. G., Verkhratsky, A., & Parpura, V. (2012). Astroglial excitability and gliotransmission: an appraisal of Ca2+ as a signalling route. ASN Neuro, 4(2). https://doi.org/10.1042/AN20110061

Résumé de la thèse

La synapse est le lieu de communication entre les neurones à l'origine de nos capacités cognitives. Les mutations des gènes codant pour des protéines synaptiques sont responsables des maladies neurodéveloppementales appelées synaptopathies, recouvrant un large spectre de pathologies, de la déficience intellectuelle aux troubles du spectre autistique. Cependant, il est actuellement établi que les neurones ne sont pas les seuls acteurs au niveau de la synapse. Les astrocytes jouent également un rôle essentiel dans la mise en place du réseau neuronal et le fonctionnement de la synapse. Ils assurent aussi l'homéostasie ionique synaptique et sont capables de sécréter des glio-transmetteurs qui modulent l'activité synaptique. Oligophrénine-1 (OPHN1) est un gène associé à la déficience intellectuelle liée à I'X chez l'Homme. OPHN1 est une protéine synaptique dont les fonctions neuronales sont bien connues. La protéine peut directement interagir avec le cytosquelette d'actine et joue un rôle dans la formation et la maturation des épines dendritiques. Cette protéine est aussi exprimée dans les astrocytes mais sa fonction astrocytaire n'est pas connue. A l'aide d'un modèle KO de souris pour Ophn1, nous avons mis en évidence les conséquences de l'absence d'Ophn1 dans les astrocytes. Nous avons démontré que la délétion d'OPHN1 altère la migration et la morphologie des astrocytes in vitro. Sachant qu'OPHN1 est capable d'inactiver la GTPase RhoA, nous avons utilisé un inhibiteur de la voie RhoA/ROCK pour retrouver un phénotype de migration normal. In vivo nous avons choisi un modèle de cicatrisation gliale cortical afin de pouvoir observer la migration et la morphologie des astrocytes au niveau de la cicatrice. Nous avons observé que la délétion d'Ophn1 altérait la cicatrisation gliale et que les astrocytes à proximité de la cicatrice étaient moins ramifiés. L'ensemble de ces résultats nous permet de constater que les astrocytes sont altérés dans notre modèle murin de déficience intellectuelle liée à l'X. De plus, le KO conditionnel astrocytaire mis en place nous permettra à l'avenir d'étudier les conséquences de la perte d'OPHN1 uniquement dans les astrocytes, et de comprendre la contribution astrocytaire dans la physiopathologie de cette maladie neurodéveloppementale.

<u>Summary</u>

The synapse mediates the inter-neuron communication that forms the basis of all cognitive activities. Mutations in genes encoding for synaptic proteins are responsible for neurodevelopmental disorders called synaptopathies, covering a large clinical spectrum from intellectual disability (ID) to autism spectrum disorders. However, it is currently established that neurons are not the only active cells at the synapse. Astrocytes play as an essential role as well for its development and functioning. They maintain synaptic ionic homeostasis and are capable of secreting gliotransmitters, which can modulate synaptic activity. Oligophrenin-1 gene (OPHN1) was identified and associated with X-linked human ID. OPHN1 is a synaptic protein, of which neuronal function is well known. It can directly interact with the actincytoskeleton and plays a role in the formation and maturation of dendritic spines. This protein is also expressed in astrocytes, but its astrocytic function is still unknown. Using the Ophn1 KO mouse model, we were able to highlight in vitro the consequences induced by its deletion in astrocytes. We demonstrated that the absence of OPHN1 disturbed astrocytic migration and morphology in vitro. Since OPHN1 negatively regulates RhoA GTPase, we used an inhibitor of the RhoA/ROCK pathway to rescue the phenotype back to control. In vivo we took advantage of the cortical glial scar formation to observe astrocytic migration and morphology in KO mice. We found that *Ophn1* deletion disrupted glial scar formation and that astrocytes near the wound were less ramified. Taken together, these results show that astrocytes are altered in our mouse model of X-linked ID. Moreover, the development of an astrocytic conditional KO for Ophn1 will allow us to study the consequences of astrocytic loss of OPHN1 and determine the astrocytic contribution in the pathophysiology of this neurodevelopmental disease.