



Etude du développement des neurones granulaires du gyrus denté: morphogénèse et régulation par Rnd2

Thomas Kerloch

► To cite this version:

Thomas Kerloch. Etude du développement des neurones granulaires du gyrus denté: morphogénèse et régulation par Rnd2. Sciences agricoles. Université de Bordeaux, 2018. Français. NNT: 2018BORD0254 . tel-03204542

HAL Id: tel-03204542

<https://theses.hal.science/tel-03204542>

Submitted on 21 Apr 2021

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.

Thèse pour l'obtention du

Doctorat de l'Université de Bordeaux

Mention : Sciences, Technologies, Santé

Option : Neurosciences

Etude du développement des neurones granulaires du gyrus denté: morphogénèse et régulation par Rnd2

Présentée et soutenue publiquement par

Thomas Kerloch

Le 26 novembre 2018

Membres du jury

Dr. Violaine MOREAU	Université de Bordeaux	Présidente
Dr. Olivier RAINETEAU	Université de Lyon	Rapporteur
Pr. Nicolas TONI	Université de Lausanne	Rapporteur
Dr. François GUILLEMOT	Université de Londres	Examineur
Dr. Emilie PACARY	Université de Bordeaux	Directrice de thèse
Dr. Djoher Nora ABROUS	Université de Bordeaux	Invitée

Abstract

In most areas of the brain, neurons are born during embryogenesis. In contrast, the majority of granule neurons in the dentate gyrus (DG) of the hippocampus are born postnatally and their generation continues throughout adulthood. This finding that new neurons are generated in the adult mammalian brain has opened novel avenues for brain repair and has initiated, in the last 20 years, tremendous efforts to characterize how new neurons differentiate and integrate into adult neural circuitries. However, further studies are needed to better understand the mechanisms and signaling cascades involved in this process. In this context, we focused on Rnd2, a Rho GTPase particularly enriched in the adult neurogenic DG and described as a key player in the regulation of embryonic cortical neurogenesis. We found, *in vivo*, that the deletion of *Rnd2* specifically in adult-born hippocampal neurons decreases the survival of these cells, and in the surviving ones, leads to soma hypertrophy, increases dendritic arborization and induces mispositioning. Importantly, this deletion also increases anxiety-like behavior in mice, thus identifying Rnd2 as a critical regulator of adult newborn neuron development and function. In addition, our data show that Rnd2 does not play the same functions in granule neurons born at P0, highlighting a differential regulation of developmental and adult neurogenesis in the DG. In the same vein, we also demonstrate that perinatally-born granule neurons, especially the embryonic ones, are morphologically distinct compared with later-born neurons. Altogether, this PhD work provides new insights into the development of the different populations of granule neurons in the DG, further emphasizing the peculiarity of this brain structure.

Résumé

Dans la plupart des régions cérébrales, les neurones sont générés pendant l'embryogénèse. A l'inverse, dans le gyrus denté (GD) de l'hippocampe, la majorité des neurones granulaires (NGs) est générée en période postnatale et cette production neuronale se poursuit tout au long de la vie adulte. Cette découverte selon laquelle de nouveaux neurones sont générés dans le cerveau des mammifères adultes a ouvert de nouvelles perspectives pour réparer le cerveau et a conduit de nombreuses recherches, au cours des 20 dernières années, à caractériser comment les nouveaux neurones se différencient et s'intègrent aux circuits neuronaux adultes. Cependant, d'autres études sont nécessaires pour mieux comprendre les mécanismes et les cascades de signalisation impliqués dans ce processus. Dans ce contexte, nous nous sommes concentrés sur Rnd2, une Rho GTPase particulièrement enrichie dans le GD adulte et décrite comme une actrice clé dans la régulation de la neurogénèse corticale embryonnaire. Nous avons montré, *in vivo*, que la suppression de *Rnd2* spécifiquement dans les néo-neurones hippocampiques diminue la survie de ces cellules, et dans les cellules survivantes, conduit à une hypertrophie du soma, augmente l'arborisation dendritique et induit un mauvais positionnement. De façon intéressante cette suppression augmente également le comportement de type anxieux des souris, identifiant ainsi Rnd2 comme un régulateur critique de la neurogénèse adulte hippocampique. De plus, nos données montrent que Rnd2 ne joue pas les mêmes fonctions dans les NGs nés à P0, mettant en évidence une régulation différentielle de la neurogénèse développementale et adulte dans la GD. Dans le même ordre d'idées, nous démontrons également que les NGs nés en période périnatale, en particulier les neurones embryonnaires, sont morphologiquement distincts par rapport aux NGs nés plus tard. L'ensemble de ces travaux de thèse apporte donc de nouvelles connaissances sur le développement des différentes populations de NGs dans la GD, soulignant davantage la particularité de cette structure cérébrale.

Remerciements

Je remercie tout d'abord les membres du jury, le Professeur Nicolas Toni et les Docteurs Olivier Raineteau, François Guillemot et Violaine Moreau d'avoir accepté d'évaluer mes travaux de thèse. Je suis également reconnaissant au Docteur Violaine Moreau d'avoir accepté de présider le jury de thèse lors de la soutenance de cette thèse.

Je remercie également le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, ainsi que le LabEX Brain et l'INSERM pour avoir permis le financement de ce projet de thèse.

Le travail présenté dans ce mémoire de thèse a été réalisé au sein du laboratoire Neurogenèse et Physiopathologie dirigé par le Docteur Nora D. Abrous, appartenant au Neurocentre Magendie, INSERM U1215, dirigé par le Docteur Stéphane Olié.

Je tiens à remercier le Docteur Nora D. Abrous qui m'a accueilli au sein de son équipe de recherche en stage de Master 2 et qui m'a aidé à obtenir le concours de l'école doctorale de Bordeaux. Je la remercie également de m'avoir accompagné au cours de cette thèse, notamment dans la conception des différents projets et la rédaction des articles scientifiques et de ce manuscrit de thèse. Le Dr Abrous m'a aussi permis de participer à de nombreux congrès scientifiques, nationaux et internationaux, qui ont grandement participé à ma formation scientifique. Enfin je lui dois de m'avoir fait découvrir l'étude du comportement animal, pour laquelle j'ai pris goût malgré ma réticence initiale.

Je veux remercier plus particulièrement le Docteur Émilie Pacary, ma directrice de thèse. Émilie m'a accueilli en stage de Master 2 pour l'étude du rôle de Rnd2 dans le développement de nouveaux neurones au sein du GD chez l'adulte, un projet que j'ai pu poursuivre lors de ma thèse grâce à la bourse fléchée qu'elle a obtenu. Je la remercie sincèrement de m'avoir fait confiance pour réaliser cette thèse et ce projet. Émilie a été présente tout au long de ma thèse, elle m'a initié aux différentes techniques nécessaires pour le projet, notamment les immunos Rnd2 et les injections de tous ces rétrovirus! Émilie a toujours été disponible pour discuter du projet et répondre aux différentes questions que je me posais, jusqu'aux derniers moments de la rédaction de ce mémoire de thèse. Émilie m'a inculqué la rigueur et la persévérance que requiert le travail de recherche, sa passion et son abnégation me poussent à donner le meilleur de moi-même et représentent une grande source de motivation pour continuer dans la recherche. Je la remercie chaleureusement de m'avoir permis de réaliser cette thèse dans les meilleures conditions possibles et de m'avoir permis de publier ce premier article scientifique! Au-delà de

l'encadrement professionnel, ce fut un réel plaisir de pouvoir discuter et rire de tout, cela a rendu ces années de thèse bien plus faciles.

Je tiens également à remercier "l'équipe neurogenèse", qui m'a accompagné tout au long de la thèse et qui a contribué au bon déroulement de ces travaux de recherche. Je tiens à remercier le Docteur Sophie Tronel pour sa bonne humeur, son humour et les nombreuses discussions que nous avons pu avoir avec Marie; je la remercie également pour sa patience quant à mes "retards" dans le suivi de consommation des anesthésiants! Je remercie le Docteur Muriel Koehl qui a été d'une très grande aide pour l'étude du comportement des souris, la réalisation de chaque test et l'analyse des résultats. Je remercie aussi le Docteur Guillaume Lucas pour son ouverture d'esprit et les discussions "foot", que les Canaris et les Girondins retrouvent leurs gloires passées! Je tiens à remercier chacun des chercheurs de l'équipe pour leur aide dans l'analyse des résultats obtenus tout au long de cette thèse et leur aide à la préparation des différents oraux, particulièrement celui de l'école doctorale!

Je remercie aussi les membres de l'équipe qui m'ont aidé pour toutes les manip de la thèse, Pauline et Élodie qui m'ont appris toutes les techniques et les "ficèles" du métier, qui m'ont également aidé à maîtriser la chirurgie stéréotaxique et surtout l'anesthésie à la xylazine/kétamine! Merci à Adeline et Fanny sans qui je n'aurai jamais pu injecter tous ces rétrovirus et tester autant de constructions différentes! Merci à Mylène pour son aide précieuse et ses conseils pour les tests comportementaux. Merci également à Vanessa pour son aide au quotidien et sa gestion du laboratoire. Je remercie aussi Nuria pour sa bonne humeur et les discussions sur la recherche et la science, ainsi que les discussions moins sérieuses aux neurosocials!

Je remercie également les étudiants que j'ai eu la chance d'encadrer lors de cette thèse: la petite Tifenn qui m'a aidé pour l'étude des mécanismes d'action de Rnd2, étudiant notamment le rôle de RhoA, Tifenn toujours souriante malgré ce qu'on dit et qui est restée une amie malgré son départ vers un autre laboratoire (la déchirure); et Umami qui a étudié le rôle de Rnd1 dans la régulation du développement des nouveaux NGs au sein du GD chez l'adulte, une étudiante très gentille, appliquée et volontaire. Je remercie aussi les autres étudiants de Master qui animent nos débuts d'année et font également vivre ce laboratoire. Ce fut un vrai plaisir de faire partie et de travailler avec cette équipe, je souhaite le meilleur à tous pour l'avenir.

Je tiens également à remercier Vincent qui fut le premier à me conseiller d'intégrer cette équipe pour le stage de Master. Je le remercie pour son aide et ses conseils, il a été un vrai guide pour nos premières années au laboratoire et son perfectionnisme pour les chirurgies a été un

modèle pour moi. Vincent a également été un collègue du bureau exceptionnel pour les diverses discussions que nous avons pu avoir mais surtout pour les rires, les mauvaises et les bonnes blagues (plus rares), les jeux et les chansons ("depuis le temps que je patiente dans cette chambre froide ..."). Pauline et Vincent ont été de bons amis au sein de l'équipe et je les remercie pour cela.

Je remercie également nos collaborateurs des plateformes techniques, notamment Marlène Maître et Hélène Doat pour les jours/semaines passés à la microdissection. Je remercie aussi Thierry Lesté-Lasserre pour les PCR quantitatives et pour ses explications sur les protocoles appropriés. De même je remercie Delphine Gonzales pour le génotypage de nos différentes lignées de souris. Je remercie également les membres du BIC qui ont aidé aux différentes acquisitions confocales, notamment Sébastien Marais et Fabrice Cordelieres.

Je souhaite remercier Cédric Dupuis pour le grand soin qu'il apporte aux souris que j'ai pu utiliser au cours de cette thèse et pour ses conseils quant au bien être de celles-ci. Je remercie également le Docteur François Guillemot pour nous avoir permis d'utiliser les souris *Rnd2^{flox/flox}* générées au sein de son laboratoire.

Je remercie tous les membres de l'institut Magendie qui permettent au quotidien de travailler dans les meilleures conditions. Je remercie en particulier Franck Burglen (pour cette superbe victoire au handball) et son équipe administrative, notamment Dania Prendin pour avoir géré tous les congrès malgré mon temps de réaction un peu long et pour avoir organisé toute la soutenance de thèse.

Cette thèse aurait été bien difficile sans le soutien de mes amis et ma famille. Merci à Geoffrey qui est là depuis le début, depuis notre premier article sur les précogs! Merci Geogeo d'être si fou, de m'avoir fait découvrir Bayonne, Dominique et les grumeaux, d'avoir révélé mon manque de talent d'acteur, surtout pour la souris et le loup, et merci d'être ce super thésard, ça motive de fou! Bordel! Merci à Eva qui m'a tendu la main quand dans ma vie il faisait faim, elle qui m'a fait découvrir Bordeaux à moi l'Nantais! Eva qui est toujours être si positive, rieuse et joyeuse, même quand les souris ne dorment pas! Haahaa putain de toi! Haahaa pauvre de moi! Je vous remercie tous les deux d'avoir toujours été là. Je remercie aussi Ben et Hortense d'avoir accepté de former ce couple à 4 avec Marie et moi! Hortense pour toutes les discussions de pause clope, merci d'être cette révolution constante avec qui on peut toujours refaire le monde, avec quelques lupinos et une petite bière bien sûr! Merci Ben pour ta bonne humeur, pour tous ces rires, merci d'avoir été parfois témoin de la folie de Marie et d'avoir compatit à ma peine d'y comprendre quoi que ce soit! Merci à vous deux pour les superbes vacances, les quizz, les jeux,

merci pour tous ces super moments ensemble! Je remercie également les collègues de Magendie, Dylan pour sa foi en la victoire des Gunners (toujours!), Arnau, Edgar, Bastien, Julien, les "Nutri" Quentin, Fabien et Roman pour toutes ces bières renversées au café des moines, merci aussi à Mélissa, Sarah, merci à Filipe pour son amour du rap, when I see you again.

J'aimerai également remercier les amis Nantais, Lou celui qu'on ne présente plus, l'ami de toujours, merci de rendre Nantes toujours aussi magique, merci à Sylvain et Alex. Je remercie les anciens de la Fac, avec qui l'amour de la bio a commencé, merci Hugo, Max, Amine et Clémence.

Je souhaite remercier tout particulièrement ma famille qui m'a accompagné tout au long de cette thèse. Je remercie mes parents de m'avoir toujours poussé à continuer et avoir toujours cru en moi. Je remercie mon petit frère Willy, mon gosse, mon frangin, mon poteau, mon copain tu me tiens chaud. Je remercie également Maryvonne, Bernard, Cécile et Jacques ainsi que tous les membres de la famille.

Enfin je remercie Marie, mon amie, ma collègue de thèse, mon amour, avec qui je partage tout, les moments difficiles et les moments heureux. Je l'aime et je la remercie de faire partie de ma vie, que Busta Rhymes, Perez et Eddy Mitchell en soient témoins.

Publications et communications

Publications

Roberta Azzarelli, **Thomas Kerloch**, Emilie Pacary. Regulation of cerebral cortex development by Rho GTPases: insights from in vivo studies. *Front Cell Neurosci.* (2015) 7;8:445 doi: 10.3389/fncel.2014.00445 (revue).

Thomas Kerloch, Solène Clavreul, Adeline Goron, Djoher Nora Abrous, Emilie Pacary. Dentate granule neurons generated during perinatal life display distinct morphological features compared with later-born neurons in the mouse hippocampus. *Cereb. Cortex.* (2018) doi: 10.1093/cercor/bhy224.

Thomas Kerloch, Fanny Farrugia, Marlène Maître, Muriel Koehl, Mylène Blanchard, Hélène Doat, Thierry Leste-Lasserre, Julian Ik-Tsen Heng, Adeline Goron, Delphine Gonzales, Djoher Nora Abrous, Emilie Pacary. Rnd2 is essential for granule neuron development in the adult hippocampus and serves a critical role in anxiety-like behavior. En préparation.

Communications orales

Thomas Kerloch "The Rho GTPase Rnd2 is critical for the survival and maturation of newly generated neurons in the adult hippocampus". (2017) Hottopics du Neurocentre Magendie, Bordeaux, France.

Thomas Kerloch "The Rho GTPase Rnd2 is critical for newly generated neurons in the adult hippocampus". (2016) 15ème meeting du Club "Développement des Réseaux Neuronaux", Paris, France.

Communications affichées

2018:

Thomas Kerloch, Solène Clavreul, Adeline Goron, Djoher Nora Abrous, Emilie Pacary. "Dentate granule neurones generated during perinatal life display distinct morphological features compared to later-born neurons"

- Adult Neurogenesis 2018 meeting, Dresden, Germany
- 7ème Symposium du Neurocentre Magendie, Bordeaux, France

Thomas Kerloch, Fanny Farrugia, Marlène Maître, Mylène Blanchard, Hélène Doat, Thierry Leste-Lasserre, Muriel Koehl, Adeline Goron, Djoher Nora Abrous, Emilie Pacary. "The atypical Rho GTPase Rnd2 is critical for the development and function of newborn neurones in the adult hippocampus"

- Adult Neurogenesis 2018 meeting, Dresden, Germany.
- 7ème Symposium du Neurocentre Magendie, Bordeaux, France - Prix du 3^{ème} poster.

2017:

Thomas Kerloch, Adeline Goron, Djoher Nora Abrous, Emilie Pacary. "The atypical Rho GTPase Rnd2 is critical for newly generated neurons in the adult hippocampus"

- Colloque International NeuroFrance, Bordeaux, France.
- 6ème Symposium du Neurocentre Magendie, Bordeaux, France - Prix du 2^{ème} poster.
- 17ème journée annuelle de l'école doctorale, Bordeaux, France – Prix du 1^{er} poster.
- Journée Bordeaux Neurocampus, Bordeaux, France.

2016:

Thomas Kerloch, Adeline Goron, Djoher Nora Abrous, Emilie Pacary. "The atypical Rho GTPase Rnd2 is critical for newly generated neurons in the adult hippocampus"

- Society for Neuroscience 46th annual meeting, San Diego, USA.
- 3ème meeting Eurogenesis, Bordeaux, France.
- 16ème journée annuelle de l'école doctorale, Arcachon, France.
- Journée Bordeaux Neurocampus, Bordeaux, France.

2015:

Thomas Kerloch, Adeline Goron, Djoher Nora Abrous, Emilie Pacary. "The atypical Rho GTPase Rnd2 is critical for newly generated neurons in the adult hippocampus"

- Adult Neurogenesis: Evolution, Regulation and Function, Dresden, Germany.
- 5ème Symposium du Neurocentre Magendie, Bordeaux, France.

Table des matières

Table des matières	9
Liste des figures	14
Abréviations	16
Chapitre I. Introduction	19
A. Le gyrus denté : une structure cérébrale au développement singulier	20
B. Organisation anatomique du gyrus denté	22
1. Le gyrus denté dans la formation hippocampique	22
2. Cyto-architecture du gyrus denté	24
3. Les neurones du gyrus denté	24
4. Connectivité du gyrus denté	26
a) Afférences	26
b) Efférences	29
C. La neurogénèse embryonnaire et postnatale dans le gyrus denté	30
1. Morphogénèse du gyrus denté	30
2. Matrice primaire du gyrus denté et mise en place de l'échafaud de glie radiaire	31
3. Formation de la matrice secondaire et migration des progéniteurs	33
4. Etablissement de la matrice tertiaire au sein du hile	34
5. Transformation radiaire de la matrice tertiaire	35
6. Différenciation des neurones granulaires	36
D. La neurogénèse dans le gyrus denté adulte	37
1. Découverte et mise en évidence	37
2. Les différentes méthodes d'étude de la neurogénèse adulte	39
a) Etudes basées sur l'utilisation de rétrovirus	39
b) Etudes basées sur l'utilisation de souris transgéniques	40
1) Les souris transgéniques reproductrices	40
2) Les souris transgéniques conditionnelles et inducibles	40

3. Développement des néo-neurones dans le GD adulte	42
a) Les cellules souches neuronales du cerveau adulte	42
b) Lignage neuronal et différenciation	44
c) Maturation morphologique	45
d) Intégration fonctionnelle des néo-neurones.....	45
e) Sélection neuronale	47
4. Fonctions des néo-neurones dans la FH.....	48
a) Neurogénèse adulte hippocampique et cognition	48
b) Neurogénèse adulte hippocampique et émotions.....	50
5. Régulation de la neurogénèse adulte hippocampique.....	51
E. Protéines Rnds et développement neuronal	53
1. Les GTPases de la famille Rho.....	53
a) Membres de la famille des Rho GTPases	53
b) Rho GTPases classiques et atypiques	54
c) Rho GTPases et neurogénèse adulte hippocampique	56
2. Structure et expression des protéines Rnds	57
a) Structure	57
b) Expression	58
1) Au niveau tissulaire et cellulaire	58
2) Au niveau subcellulaire	59
3. Régulation des protéines Rnds	60
a) Régulation transcriptionnelle	60
b) Modifications post-traductionnelles	61
4. Les fonctions biologiques des protéines Rnds	62
a) Fonctions des Rnds dans les cellules non-neuronales.....	62
1) Régulation du cytosquelette d'actine	62
2) Régulation du cycle cellulaire et de la survie	64

b) Fonctions des Rnds dans le développement neuronal.....	65
1) Rnds et progéniteurs neuronaux.....	65
2) Rnds et migration neuronale.....	65
3) Rnds et maturation morphologique.....	67
Neurites	67
Dendrites et épines	68
Axone	68
Chapitre II. Objectifs de la thèse	69
Chapitre III. Méthodes.....	72
A. Animaux.....	73
1. Souris <i>Rnd2</i> ^{flox/flox}	73
2. Souris <i>Rnd1</i> ^{flox/flox}	73
3. Souris CD1 et C57Bl6/J	73
4. Conditions d'élevage et géotypage.....	74
B. Préparation de l'ADN	74
1. Transformation, Amplification et Extraction de l'ADN.....	74
2. Clonage	75
C. Production de rétrovirus	75
D. Injection stéréotaxique de rétrovirus dans le GD de souris adultes	77
E. Injection stéréotaxique de rétrovirus dans le GD à P21	77
F. Injection de rétrovirus dans le GD à P0	78
G. Électroporation postnatale du GD à P0.....	78
H. Électroporation <i>in utero</i> du GD	78
I. Traitement au tamoxifène.....	79
J. Tests comportementaux évaluant un état anxieux	79
1. Champ libre (Open-field).....	79
2. Emergence.....	80

3. Labyrinthe en croix surélevé (Elevated plus maze)	80
4. Compartiment illuminé / Compartiment sombre (Light/Dark test).....	80
K. Tests comportementaux évaluant un état dépressif.....	81
1. La préférence au sucrose.....	81
2. Test de nage forcée.....	81
L. Labyrinthe aquatique de Morris (Morris water maze)	81
M. Conditionnement de peur au contexte	82
N. Quantification de l'expression des ARNm.....	83
1. Microdissection et PCR quantitative	83
a) Préparation des tissus.....	83
b) Microdissection.....	83
c) PCR quantitative.....	85
2. Hybridation in situ (HIS)	87
O. Immunohistochimie.....	88
1. Préparation des coupes.....	88
2. Marquage immunohistochimique de Rnd2	88
3. Marquage immunohistochimique fluorescent	89
4. Marquage immunohistochimique peroxydasique de la GFP	90
P. Analyse anatomique	91
1. Etude de l'expression de marqueurs moléculaires	91
2. Evaluation quantitative des cellules d'intérêt	91
3. Analyse de la position relative des néo-neurones dans le GD	91
4. Etude morphométrique des néo-neurones	92
Q. Analyses statistiques	92
Chapitre IV. Résultats.....	93
A. Etude du rôle joué par Rnd2 dans la neurogénèse adulte hippocampique	94
1. Présentation Générale	94

2. Article 1: Rnd2 is essential for granule neuron development in the adult hippocampus and serves a critical role in anxiety-like behavior	95
3. Résultats complémentaires	143
a) Voies de signalisation mises en jeu par Rnd2 dans les néo-neurones hippocampiques..	143
b) Impact d'une surexpression de Rnd2 sur la survie des néo-neurones.....	148
c) Rôle des trois protéines Rnds dans la neurogénèse adulte hippocampique.....	150
1) Interchangeabilité des protéines Rnd	150
2) Rôle de Rnd1 dans les étapes de la neurogénèse adulte régulées par Rnd2	152
d) Rôle(s) joué(s) par Rnd2 lors du développement des neurones granulaires générés en période postnatale	155
B. Analyse de la morphogénèse des neurones granulaires du gyrus denté, générés en période embryonnaire et postnatale	159
1. Présentation générale.....	159
2. Article 2 : Dentate granule neurons generated during perinatal life display distinct morphological features compared with later-born neurons in the mouse hippocampus	160
Chapitre V. Discussion générale.....	174
A. Les NGs issus des différentes périodes de neurogénèse sont-ils morphologiquement identiques ?	175
B. Le développement des différentes populations de NGs est-il régulé de manière similaire?	179
C. Une délétion de <i>Rnd2</i> dans les NGs générés chez l'animal adulte ou le nouveau-né a-t-elle le même impact fonctionnel ?	180
D. Conclusion générale.....	181
Chapitre VI. Publication supplémentaire.....	183
Chapitre VII. Références	202

Liste des figures

Figure 1. Position de la formation hippocampique dans le cerveau de rongeur.	23
Figure 2. Organisation cyto-architecturale du gyrus denté.....	24
Figure 3. Les différentes cellules du gyrus denté.	25
Figure 4. Les interneurons du gyrus denté.....	28
Figure 5. Le pallium médian, les origines du gyrus denté.	31
Figure 6. Développement embryonnaire du gyrus denté de souris	33
Figure 7. Développement postnatal du gyrus denté de souris.....	35
Figure 8. Création de nouvelles cellules dans le gyrus denté postnatal de rongeurs.	38
Figure 9. Le développement de nouveaux neurones granulaires au sein du gyrus denté chez l'animal adulte	43
Figure 10. Arbre phylogénique de la famille des Rho GTPases	54
Figure 11. Le cycle de régulation des Rho GTPases classiques	55
Figure 12. Structure des Rho GTPases	58
Figure 13 : Génération de l'allèle mutant conditionnel pour <i>Rnd1</i> et <i>Rnd2</i>	73
Tableau 1. Liste des constructions virales utilisées pour la production de rétrovirus	76
Figure 14. Coupes de souris adultes colorées avec le violet de Crésyl montrant la région microdisséquée (CG et ZSG).....	85
Tableau 2. Liste des gènes quantifiés par PCRq et séquences des amorces spécifiques.....	87
Tableau 3. Liste des anticorps utilisés pour les révélations immunohistochimiques	90
Figure 15. Etude de la voie de signalisation impliquée dans la régulation de la survie des néo-neurones par <i>Rnd2</i>	144
Figure 16. Etude de l'impact d'une surexpression de <i>Rnd2</i> sur la survie des néo-neurones....	148
Figure 17. <i>Rnd1</i> et <i>Rnd3</i> peuvent restaurer certains défauts de neurogénèse induits par la délétion de <i>Rnd2</i>	151
Figure 18. La délétion de <i>Rnd1</i> n'affecte pas la survie et la migration des néo-neurones hippocampiques.	153

Figure 19. La délétion de <i>Rnd1</i> n'a pas d'impact sur la morphologie des néo-neurones hippocampiques.	154
Figure 20. La délétion de <i>Rnd2</i> n'affecte pas la mort cellulaire et la migration des neurones granulaires générés en période postnatale.	155
Figure 21. Une augmentation de la ramification est induite par la délétion de <i>Rnd2</i> dans les neurones granulaires générés en période postnatale.	157

Abréviations

ADN:	Acide désoxyribonucléique
ADNc:	ADN complémentaire
Acl:	Anticorps primaire
Acll:	Anticorps secondaire
ANOVA:	Analysis of the variance
AP:	Antéro-Postérieur
ARN:	Acide ribonucléique
BMP:	Bone morphogenetic proteins
BrdU:	5-bromo-2'-désoxyuridine
BSA:	Bovine serum albumin
CAG:	CMV early enhancer/chicken β actin promoter
CA:	Corne d'Ammon
Caspase-3a:	Caspase 3 activée
CE:	Cortex entorhinal
CG:	Couche granulaire
CGRs:	Cellules gliales radiaires
CH:	Cortical hem
CM:	Couche moléculaire
Cre:	Recombinase cre
Cs:	Collatérales de Schaffer
CSNs:	Cellules souches neuronales
Ct:	Cycle threshold
DAB:	3,3-diaminobenzidine
DCX:	Doublecortine
DMEM:	Dulbecco minimum essential medium

DNE:	Dentate neuroepithelium
E14.5:	Jour embryonnaire 14.5
FC:	Fold change
FH:	Formation hippocampique
fh:	Fissure hippocampique
GABA:	Acide γ -aminobutyrique
GAG:	Group specific antigen
GAPs:	GTPase Activating Proteins
GD:	Gyrus denté
GDP:	Guanosine diphosphate
GDI:	GDP Dissociation Inhibitors
GEFs:	Guanine nucleotide Exchanging Factors
GFP:	Green fluorescent protein
GFAP:	Glial fibrillary acidic protein
GTP:	Guanosine triphosphate
H2O2:	Peroxyde d'hydrogène
HEK293:	Human embryonic kidney cells 293
HH3:	Histone phosphorylé
HNE:	Hippocampal neuroepithelium
i.p:	Intrapéritonéale
IR:	Immuno-réactive
IRES:	Internal ribosome entry site
Jpi:	Jours post injection
MEM NEAA:	Minimum essential medium supplemented with non-essential amino acids
MuLV:	Murine leukemia virus
MWM:	Morris Water Maze
NGs:	Neurones granulaires

Neurog2:	Neurogenine 2
NMDA:	Acide N-méthyl-D-aspartique
P0:	Jour postnatal 0
PB:	Phosphate buffer
PBS:	Phosphate buffered saline
pCAG:	Promoteur CAG
PEN:	Polyéthylène naphthalate
PFA:	Paraformaldéhyde
PNIs:	Progéniteurs neuronaux intermédiaires
POL:	Polymérase
Prox1:	Prospero-related homeobox 1
PSA-NCAM:	Polysialylated-neural cell adhesion molecule
RFP:	Red fluorescent Protein
RIN:	RNA integrity number
RNase:	Ribonucléase
S.E.M.:	Standard error of mean
SN:	Sérum normal
SNC:	Sérum normal de chèvre
Sox2:	Sex determining region Y)-box 2
SVF:	Sérum de veau fœtal
TAPs:	Transit-amplifying progenitors
VSVg:	Vesicular stomatitis virus glycoprotein
ZSG:	Zone sous granulaire
ZSV:	Zone sous ventriculaire
ZV:	Zone ventriculaire

Chapitre I. Introduction

A. Le gyrus denté : une structure cérébrale au développement singulier

Le développement du cerveau des mammifères est un processus fascinant. À partir d'une population de cellules immatures et indifférenciées émerge un organe complexe dont le fonctionnement dépend des interconnexions de milliards de neurones possédant des caractéristiques très diverses, par l'intermédiaire de billions de synapses. La construction de cet organe, qui est entre autres le siège de notre pensée et de nos raisonnements, de notre mémoire et nos capacités d'apprentissage, ainsi que de la genèse de nos émotions, reste parmi les questions les plus énigmatiques et stimulantes de la recherche en Neurosciences.

La neurogénèse, ou l'ensemble du processus de formation d'un neurone fonctionnel à partir d'une cellule souche neurale, est un long voyage. En effet, les cellules souches précurseurs des neurones, après une phase intense de prolifération, se différencient en un type neuronal bien précis. Les neurones nouvellement générés migrent ensuite, parfois sur de longues distances, vers leur destination finale. Une fois leur migration achevée, les neurones initient l'étape de formation des connexions. Les neurones sont interconnectés au niveau de leurs différents compartiments subcellulaires. Ainsi, les dendrites, qui sont des extensions relativement courtes, sont dédiées à la réception des signaux, tandis que les axones, des prolongements longs, véhiculent aux autres neurones les signaux reçus. Certains axones sont capables de se développer sur des distances considérables pour connecter leurs neurones cibles. Lors de cette étape, le cône de croissance, une structure amiboïde à l'extrémité des axones, explore l'environnement pour s'orienter précisément en direction des neurones cibles. A l'issue de cette phase de navigation, les axones parviennent à leurs cibles et établissent des contacts, les synapses, sur les dendrites de ces neurones cibles. Ainsi les neurones naissants sont connectés, peuvent transmettre un signal et ainsi contribuer aux fonctions cérébrales.

Cette séquence développementale, permettant la mise en place des réseaux neuronaux, se déroule en majeure partie au cours de la vie embryonnaire. En effet, à la naissance, les neurones ont atteint leur position finale et ont commencé à développer leurs prolongements spécialisés. La formation des connexions nerveuses proprement dite se fait dans les premières semaines après la naissance chez le rongeur. Cependant, toute règle a son exception. En effet si la neurogénèse reste confinée à l'embryogénèse et aux premières semaines postnatales pour la plupart des structures du cerveau, le processus est différent dans le gyrus denté (GD) de la formation hippocampique. En effet, les neurones principaux du GD, les neurones granulaires

(NGs), sont générés via trois vagues de neurogénèse. Ainsi, une partie des NGs est générée pendant l'embryogénèse comme l'ensemble des autres populations neuronales. En revanche la plus grande partie de cette population neuronale est générée pendant les premières semaines de vie. De façon plus extraordinaire, cette production neuronale se poursuit à l'âge adulte et perdure tout au long de la vie chez la plupart des mammifères, faisant du GD une structure singulière du cerveau.

La compréhension des mécanismes qui gouvernent la génération des neurones, leur migration vers leur lieu de résidence définitive, leur différenciation en cellules spécialisées, et la mise en place de leur connectivité est un enjeu majeur de la neurobiologie développementale. Ceci est d'autant plus vrai pour le GD, car la découverte d'une neurogénèse chez le mammifère adulte, a ouvert de nouveaux espoirs pour réparer le cerveau et les fonctions qu'il soutient. Aussi je me suis intéressé au cours de cette thèse à mieux comprendre les mécanismes présidant la formation et l'intégration des NGs du GD. Dans cette introduction, après avoir présenté les caractéristiques anatomiques du GD, je présenterai les différentes vagues de neurogénèse et leurs spécificités, enfin je conclurai par la présentation de la famille des protéines Rnds, des régulateurs majeurs du cytosquelette et du développement neuronal.

B. Organisation anatomique du gyrus denté

1. Le gyrus denté dans la formation hippocampique

La région hippocampique est composée de deux ensembles d'aires corticales: la formation hippocampique (FH) d'un côté et la région para-hippocampique de l'autre. La FH comporte 3 structures cyto-architecturales différentes: le gyrus denté (GD), l'hippocampe proprement dit, qui est sous-divisé en 3 champs CA1, CA2, CA3, et le subiculum. Chacune des structures de la FH possède 3 couches, ce qui est caractéristique des aires corticales de l'allocortex. De plus leur connectivité est principalement unidirectionnelle. En effet les NGs du GD projettent, grâce aux fibres moussues, vers les neurones pyramidaux du CA3. Ces derniers projettent vers le CA1 par le biais des collatérales de Schaffer. Enfin les neurones pyramidaux du CA1 projettent vers le subiculum (**Figure 1A**). A son tour le subiculum projette vers le présubiculum et le parasubiculum; ensemble ces trois structures projettent vers le cortex entorhinal (CE) (Köhler, 1985) et vers un grand nombre d'aire corticales et sous corticales (Swanson and Cowan, 1975; O'Mara et al., 2001). La connectivité unidirectionnelle ainsi que le nombre de couches de ces 3 structures permettent de les regrouper en une entité anatomique fonctionnelle appelée FH. Les projections unidirectionnelles du cortex entorhinal vers le GD pourrait justifier l'appartenance de cette structure à la FH mais des connexions réciproques existent également entre le CE, le CA1 et le subiculum. De plus le CE possède plus de 3 couches corticales, le rapprochant davantage d'autres aires corticales comme le cortex perirhinal et le cortex postrhinal. Ces caractéristiques sont également partagées par le présubiculum et le parasubiculum. L'ensemble de ces structures forment donc la deuxième aire corticale de la région hippocampique: le para-hippocampe (**Figure 1**).

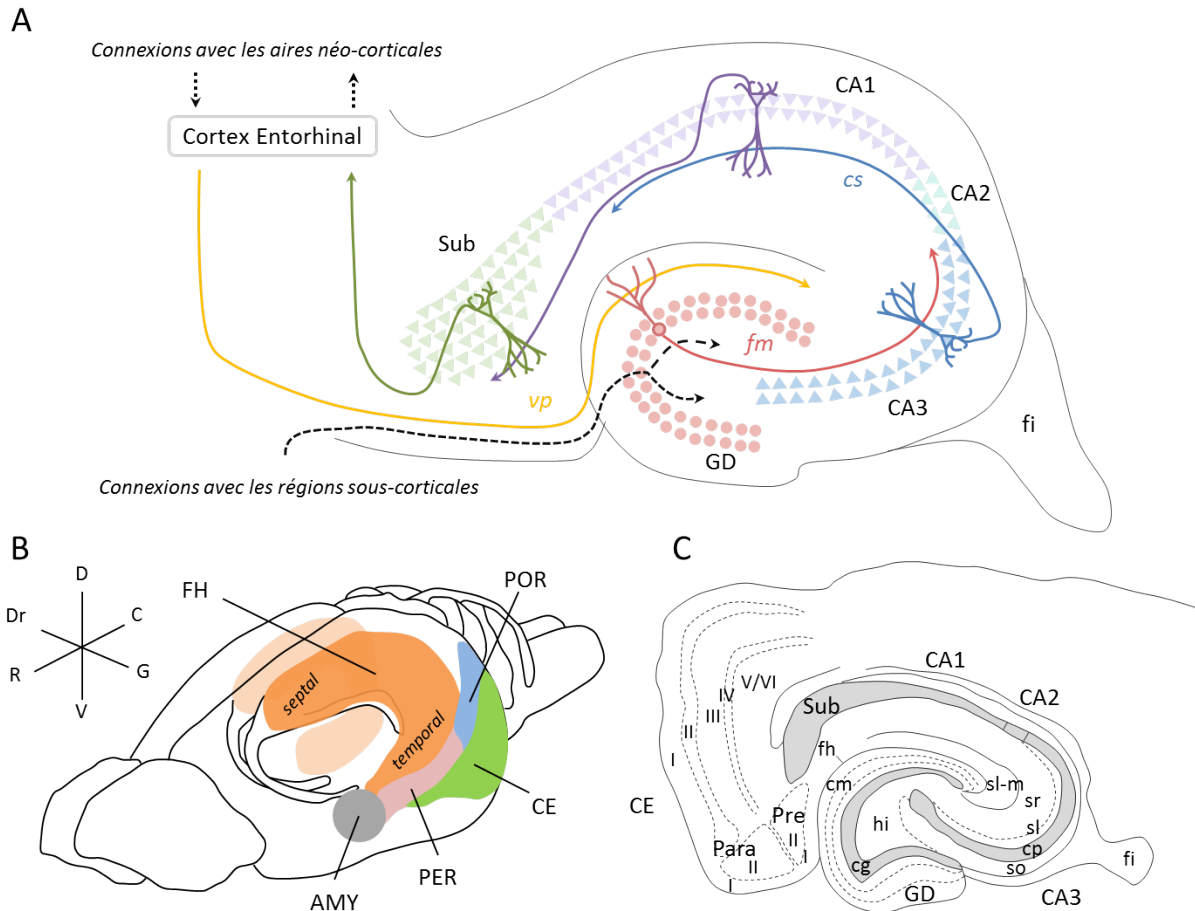


Figure 1. Position de la formation hippocampique dans le cerveau de rongeur.

A. Représentation des composants principaux de la connectivité de la formation hippocampique et des régions associées. Notamment la projection du cortex entorhinal vers les cellules granulaires du gyrus denté, appelée voie perforante (vp); les fibres moussues (fm) issues des neurones granulaires contactant les cellules pyramidales du champ CA3 de l'hippocampe; et les collatérales de Schaffer (cs) des cellules pyramidales du CA3 innervant les cellules pyramidales du CA1. Les connexions intrinsèques à la région hippocampique sont représentées par des traits pleins tandis que les connexions extrinsèques sont représentées par des traits pointillés. **B.** Position de la formation hippocampique (FH) dans le cerveau de rat. La FH est indiquée en orange, entourée des différentes structures associées. Le pôle septal et le pôle temporal sont également indiqués. **C.** Dessin d'une coupe horizontale d'hippocampe de rat représentant les différentes régions et couches. Les chiffres romains représentent les couches corticales. AMY: Amygdale; C: caudal; CA1: champs CA1 de l'hippocampe; CA2: champs CA2 de l'hippocampe; CA3: champs CA3 de l'hippocampe; CE: cortex entorhinal; cg: couche granulaire; cm: couche moléculaire; cs: collatérales de Schaffer; D: dorsal; Dr: droit; fh: fissure hippocampique; fi: fimbria; fm: fibres moussues; G: gauche; GD: gyrus denté; hi: hile; Para: parasubiculum; PER: cortex perirhinal; POR: cortex postérieur; Pre: presubiculum; R: rostral; sl: stratum lucidum; sl-m: stratum lacunosum moleculare; so: stratum oriens; sr: stratum radiatum; Sub: subiculum; V: ventral; vp: voie perforante. Adapté d'après (Amaral and Lavenex, 2006; Furtak et al., 2007).

La FH apparaît comme une structure allongée en forme de C qui s'étend des noyaux septaux du prosencéphale basal vers le lobe temporal en passant au-dessus du diencephale (**Figure 1B**). L'axe longitudinal est appelé "axe septo-temporal" et l'axe orthogonal est appelé "axe transversal". En position rostro-dorsal, au niveau du pôle septal, on retrouve uniquement le GD et les champs CA1-3 de l'hippocampe. En progressant le long de l'axe septo-temporal, le subiculum apparaît. La région para-hippocampique se situe elle dans la partie la plus caudale et ventrale du manteau cortical et enrobe les portions caudo-ventrales de la FH. L'axe transversal

de la FH s'étend du pôle proximal représenté par le GD, au pôle distal représenté par le subiculum (**Figure 1C**).

2. Cyto-architecture du gyrus denté

Le GD est une structure composée de 3 couches (**Figure 2**). La couche la plus superficielle et la plus proche de la fissure hippocampique est une couche possédant peu de cellules, appelée la couche moléculaire (CM). Plus profondément est retrouvée la couche granulaire (CG) qui est composée de NGs densément regroupés. La CM et la CG forment une structure en forme de V ou de U (en fonction de l'axe septo-temporal) qui entoure la troisième couche du GD, la couche polymorphique (CP). Le terme hile est également employé pour désigner la CP. La partie de la CG la plus proche du CA1 est appelée la lame suprapyramidale et la partie opposée est appelée lame infrapyramidale. La région du V ou du U qui réunit les deux lames est nommée la crête (**Figure 2**).

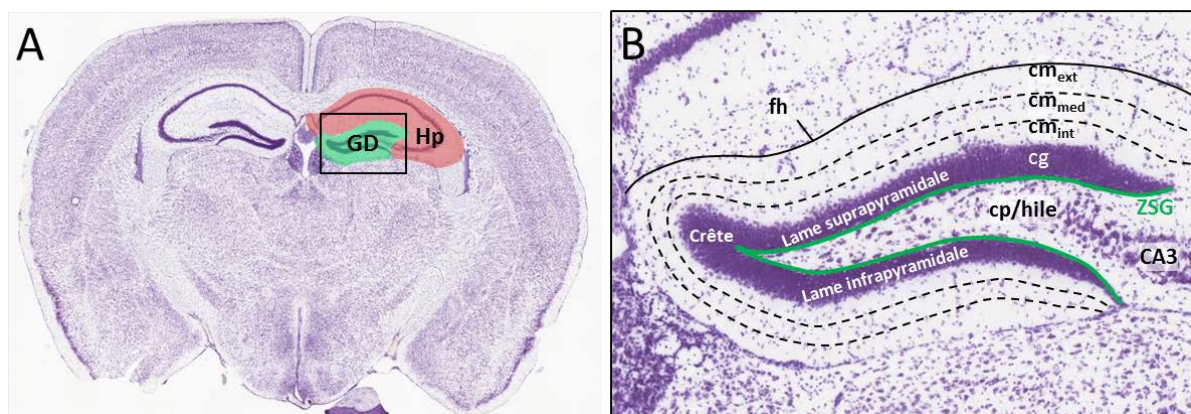


Figure 2. Organisation cyto-architecturale du gyrus denté.

A. Position de la région hippocampique au sein d'une coupe coronale de cerveau de souris adulte. Le gyrus denté (GD) est indiqué en vert et l'hippocampe proprement dit (Hp) est indiqué en rouge. **B.** Grossissement de l'encadré en A montrant les trois couches du GD. La zone sous granulaire (ZSG) est représentée en vert. Les lames suprapyramidale, infrapyramidale et la crête sont indiquées. CA3: champs CA3 de l'hippocampe; cg: couche granulaire; cm_{ext}: couche moléculaire externe; cm_{int}: couche moléculaire interne; cm_{med}: couche moléculaire médiale; cp/hile: couche polymorphique ou hile; fh: fissure hippocampique; GD: gyrus denté; Hp: hippocampe proprement dit; ZSG : zone sous granulaire.

3. Les neurones du gyrus denté

Les neurones principaux du GD sont les **neurones granulaires** (NGs), appelés encore cellules granulaires, qui sont étroitement accolés les uns aux autres et dont les corps cellulaires forment la CG. Ces neurones sont glutamatergiques. Leur nombre total est estimé à approximativement $0,5 \times 10^6$ par hémisphère chez la souris (Amrein et al., 2004) mais ce chiffre dépend de la lignée des souris et du sexe. La densité des NGs est plus grande au niveau septal (Amaral and Lavenex, 2006). Puisque la densité des neurones pyramidaux du CA3 est, à l'inverse, plus faible au niveau

septal; le nombre de NGs divisé par le nombre de neurones pyramidaux du CA3 donne un ratio de 12:1 au niveau septal et de 2:3 au niveau temporal.

Les NGs possèdent un corps cellulaire elliptique d'une largeur d'environ 10 μm et d'une hauteur de 18 μm chez le rat (Claiborne et al., 1990). Ils ont un arbre dendritique en forme de cône, dont les branches sont dirigées vers la portion superficielle de la CM et dont la plupart des extrémités distales se terminent au niveau de la fissure hippocampique ou au niveau de la surface du ventricule (Claiborne et al., 1990) (**Figure 3**). Les arbres dendritiques des NGs de la lame suprapyramidale sont généralement plus grands (Rahimi and Claiborne, 2007). Les dendrites possèdent des épines dont la densité est également plus élevée chez les NGs de la lame suprapyramidale (Desmond and Levy, 1985). Leur axone aussi appelé fibre moussue, innerve les cellules du hile pour ensuite s'étendre et en passant contacter les neurones pyramidaux du CA3.

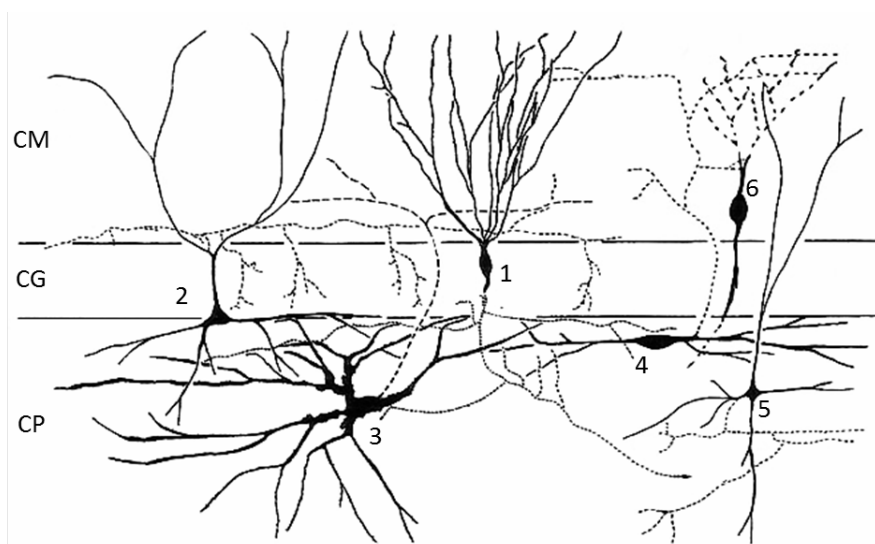


Figure 3. Les différentes cellules du gyrus denté.

Représentation des différentes cellules du GD et de leur morphologie. **(1)** Neurone granulaire; **(2)** cellule en panier; **(3)** cellule moussue; **(4)** cellule fusiforme; **(5)** cellule polymorphique; **(6)** cellule en chandelier; CG: couche granulaire; CM: couche moléculaire; CP: couche polymorphique ou hile. Modifié d'après Amaral and Witter, 1995.

Bien que la majorité des cellules granulaires soit localisée dans la CG, certaines ont également été observées dans la partie interne de la CM par Ramón y Cajal (Ramón y Cajal, 1995): les "grains déplacés" ou **cellules granulaires semilunaires**. Ces cellules possèdent un arbre dendritique caractéristique, en forme de demi-lune, qui couvre une plus grande distance latérale que les NGs de la CG externe (Williams et al., 2007). Il existe également des **cellules granulaires ectopiques** dans le hile, qui possèdent une morphologie similaire à celle des NGs de la CG à l'exception du nombre de nœuds et de l'orientation des dendrites qui est davantage aléatoire (Pierce et al., 2011).

Outre les cellules granulaires, la partie la plus interne de la CG, appelée zone sous granulaire (ZSG), est peuplée d'interneurones inhibiteurs appelés **cellules en panier** ou « Basket cells » (**Figure 3**). Leur nombre varie également le long de l'axe septo-temporal, les cellules en panier étant plus nombreuses au pôle septal. Ces différences sur les axes transverse et septo-temporal soulignent qu'en dépit de son apparente homogénéité, le GD présente des différences régionales dans sa composition (Seress and Pokorny, 1981).

Le hile contient une grande variété de types de neurones, mais peu d'entre eux sont étudiés. Les plus connus sont les **cellules moussues** (**Figure 3**). Une des caractéristiques les plus notables des cellules moussues est la présence de grosses épines complexes au niveau des dendrites proximales appelées "thorny excrescences". Ces épines particulières sont les sites de terminaison des fibres moussues des NGs.

Quant à la CM, elle est principalement occupée par les dendrites des NGs, des cellules en panier et des cellules du hile ainsi que par les axones et terminaisons axonales provenant du CE et autres sources. Il existe cependant dans la CM des interneurones appelée les "**MOPP cells**" (molecular layer perforant path-associated cells) (Han et al., 1993) qui sont associés à la voie perforante et les **cellules en chandelier** (Soriano and Frotscher, 1989). Ces cellules expriment le GABA (acide γ -aminobutyrique) et sont localisées à la limite entre la CM et la CG (**Figure 3**).

4. Connectivité du gyrus denté

a) Afférences

Le GD reçoit la majorité de ses afférences depuis le CE via la voie perforante (Ramón y Cajal, 1893). La projection vers le GD vient principalement de cellules situées dans la couche II du CE, bien que certaines projections proviennent également des couches IV et VI (Steward and Scoville, 1976). Dans la CM du GD, les projections du CE sont confinées aux deux-tiers externes, où elles forment des synapses asymétriques (Hjorth-Simonsen and Jeune, 1972). Ces contacts se font principalement sur les épines dendritiques des NGs bien qu'une faible proportion des projections du CE forme des contacts asymétriques avec les interneurones GABAergiques de la CM. Le CE est fortement innervé par le néocortex et joue le rôle de relais entre les aires néocorticales et la FH (**Figure 1A**).

La voie perforante peut être divisée en deux parties en fonction de la région d'origine et de l'organisation des terminaisons. Les deux divisions sont appelées les voies perforantes latérale et médiane car elles proviennent du CE latéral et médian respectivement. Les fibres de la voie

perforante provenant du CE latéral projettent vers la partie la plus superficielle de la CM quand les fibres provenant du CE médian terminent dans le tiers intermédiaire de la CM. Les projections des deux aires corticales innervent la totalité de l'étendue transversale de la CM, de la crête aux extrémités des lames suprapyramidale et infrapyramidale.

Si les projections du CE vers le GD sont les connexions principales, d'autres sous-régions du para-hippocampe projettent également vers le GD. Ainsi le présubiculum et le parasubiculum projettent vers la CM du GD, tout comme les cortex perirhinal et postrhinal (Köhler, 1985; Furtak et al., 2007; Vivar et al., 2012). Le GD reçoit également des projections issues de régions sous-corticales, provenant principalement des noyaux septaux, de la région supra-mammillaire de l'hypothalamus et de noyaux mono-aminergiques du tronc cérébral, notamment les noyaux du raphé et le locus coeruleus.

Outre les afférences provenant d'aires cérébrales lointaines, le GD reçoit également des afférences provenant de neurones localisés au sein même de cette structure. Ainsi, la partie interne de la CM reçoit des projections excitatrices importantes provenant des cellules moussues (Blackstad, 1956; Laurberg, 1979). Les cellules moussues possèdent un axone qui projette vers la partie interne de la CM, de façon ipsilatérale et contralatérale, effectuant des connexions asymétriques avec les dendrites proximales des NGs. Les cellules moussues innervent faiblement les NGs positionnés sur le même plan septo-temporal, elles projettent préférentiellement sur de grandes étendues, vers d'autres NGs (Amaral and Witter, 1989). Outre les NGs, les cellules moussues innervent également les cellules en panier qui à leur tour contactent les NGs. Ces cellules en panier, situées au-dessous de la CG, développent un plexus terminal extrêmement dense, restreint à la CG (Sik et al., 1997) (**Figure 4**).

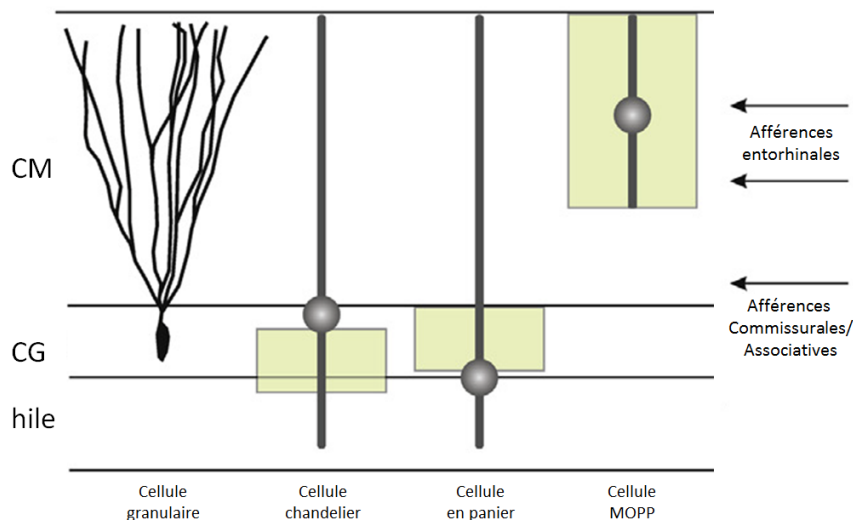


Figure 4. Les interneurones du gyrus denté.

Les cercles pleins représentent la localisation des corps cellulaires, les lignes verticales indiquent l'orientation prédominante et la distribution laminaire des arbres dendritiques des interneurones. Sur la gauche est illustré l'arbre dendritique d'une cellule granulaire, donnant une indication des différents domaines innervés par les interneurones. Sur la droite est représentée la distribution laminaire de différentes afférences. Les rectangles verts indiquent la distribution préférentielle des axones pour chaque type cellulaire. CG: couche granulaire; CM; couche moléculaire. Adapté d'après (Cappaert et al., 2015).

Les terminaisons des cellules en panier sont GABAergiques et forment des contacts inhibiteurs symétriques avec le corps cellulaire et la partie proximale des dendrites apicales des NGs (**Figure 4**). Les cellules en panier étant peu nombreuses comparé au nombre de NGs, leur plexus axonal s'étend sur de grandes distances. Cette large distribution du plexus axonal permettrait à une simple cellule en panier d'innervier jusqu'à 10 000 NGs (environ 1%; (Amaral and Lavenex, 2006).

Outre les cellules en panier, les cellules en chandelier forment des contacts synaptiques symétriques avec le segment initial de l'axone des NGs (**Figure 4**) (Soriano and Frotscher, 1989; Freund and Buzsáki, 1998). Une variété de neurones du hile donne lieu à un dense plexus de fibres et terminaisons dans les deux-tiers externe de la CM, terminaisons qui coïncident avec celles de la voie perforante. Ces neurones sont également GABAergiques et semblent distribuer leur axone sur une grande étendue le long de l'axe septo-temporal. Ils forment des contacts symétriques avec les dendrites distales des NGs (Halasy and Somogyi, 1993). Ce système de fibres qui contacte les dendrites apicales des CGs constitue donc un autre moyen de contrôle de l'activité des CGs.

Enfin, les MOPP cells possèdent des axones répartis dans les deux-tiers externes de la CM qui forment des synapses symétriques avec les dendrites distales des NGs et servent également de modulateurs de la voie perforante en inhibant les NGs (**Figure 4**) (Halasy and Somogyi, 1993).

b) Efférences

La seule projection du GD vers l'extérieur est la projection depuis les NGs vers les neurones du champ CA3 de l'hippocampe. Les NGs possèdent un axone non-myélinisé particulier que Ramón y Cajal appela fibre moussue. Ces fibres moussues présentent de gros boutons peu communs qui forment des synapses avec les neurones pyramidaux du CA3. Une partie des fibres moussues entre dans le CA3 en passant par une région appelée la couche infrapyramidale (au niveau des dendrites basales des neurones pyramidaux) tandis que la majorité des projections progresse dans la zone superficielle appelée couche suprapyramidale (au niveau des dendrites proximales) qui fait partie de la stratum lucidum. Toutes les fibres moussues arrivent finalement dans la stratum lucidum et s'arrêtent à la limite entre le CA3 et le CA2.

Les boutons ou varicosités présynaptiques (3-6 μm de diamètre) caractéristiques des fibres moussues sont distribuées tout au long de l'axone (Claiborne et al., 1986). Les extensions présynaptiques des fibres moussues forment un complexe synaptique unique avec les prolongements postsynaptiques appelés "thorny excrescences" (Amaral, 1978). Une simple extension présynaptique de fibre moussue peut effectuer environ 40 contacts synaptiques avec une seule dendrite de neurones pyramidaux du CA3 (Gonzales et al., 2001). Chaque cellule granulaire est susceptible d'influencer seulement 14 à 28 neurones pyramidaux (Acsady et al., 1998) alors qu'il est estimé que chaque neurone pyramidal est contacté par 50 NGs.

L'axone des NGs est principalement perpendiculaire à l'axe longitudinal de la FH. Durant la majorité de leur trajectoire au travers du stratum lucidum, les axones des fibres moussues restent au même niveau septo-temporal que les NGs d'origine. Cependant à l'approche de la limite entre le CA3 et le CA2, les fibres moussues dévient leur trajectoire et s'étendent sur plus d'1 mm en direction du pôle temporal (Swanson et al., 1978).

Les fibres moussues développent un ensemble de collatérales qui innervent également les cellules du hile. Chaque fibre moussue principale donne lieu, dans le hile, à environ 7 collatérales avant d'atteindre le champ du CA3 où les ramifications sont rares. Dans le hile, les fibres moussues présentent deux types de varicosités synaptiques. Premièrement, de petites varicosités ($\sim 2 \mu\text{m}$) sont distribuées tout au long du plexus collatéral d'un seul neurone granulaire. Ces petites varicosités forment soit des extensions ressemblant à des filopodes, soit des contacts en passant sur des épines dendritiques ou directement sur les dendrites d'interneurones du hile (Claiborne et al., 1986). Deuxièmement, aux extrémités de chaque branche collatérale, de plus grosses varicosités irrégulières se forment (3-5 μm), qui contactent les cellules moussues du hile. Les terminaisons des fibres moussues contactent les dendrites

proximales d'environ 7 à 12 cellules moussues et les dendrites basales d'un nombre conséquent d'interneurones GABAergiques (Ribak and Seress, 1983).

C. La neurogénèse embryonnaire et postnatale dans le gyrus denté

Une grande partie de notre connaissance sur le développement de la FH provient des études pionnières d'Angevine (Angevine, 1965) et d'Altman et collègues (Altman, 1966; Altman and Das, 1966; Altman and Bayer, 1975; Bayer, 1980) basées sur la technique d'autoradiographie. Cette technique est basée sur l'utilisation de la thymidine tritiée (thymidine- $[^3\text{H}]$), un analogue radio-marqué de la thymidine, qui est incorporé lors de la réplication de l'ADN dans les cellules en division et transmis aux cellules filles (Sidman et al., 1959). Ces études apportèrent les premières descriptions des différentes étapes du développement des neurones pyramidaux et des NGs de la FH. Ces données ont depuis été confirmées et affinées par des techniques plus modernes. Ainsi la création de lignées de souris transgéniques par exemple, a permis d'améliorer notre compréhension du développement du GD, structure à laquelle nous nous intéressons particulièrement.

1. Morphogenèse du gyrus denté

Le développement du GD est un processus très complexe qui commence durant la période embryonnaire et contrairement aux autres aires corticales, perdure après la naissance (Angevine, 1965; Altman and Bayer, 1990a, 1990b). Le GD trouve ses origines dans le neuro-épithélium denté (dentate neuroepithelium, DNE ; **Figure 5**) qui fait partie de la zone ventriculaire (ZV) du pallium médian et qui se situe à proximité d'un renforcement ventriculaire appelé "dentate notch". Les cellules à l'origine du GD sont donc concentrées dans le DNE, proches du neuro-épithélium de l'hippocampe (HNE, **Figure 5**) qui donne naissance aux neurones pyramidaux des cornes d'Ammon. En position ventrale du DNE se trouve une des structures primordiales au développement du GD: l'ourlet cortical ou "cortical hem" (CH ; **Figure 5**). Cette structure est un centre de signalisation sécrétant différentes molécules morphogéniques nécessaires à l'initiation du développement de la FH. Un mauvais développement de cet ourlet se traduit par une absence totale ou partielle de la FH.

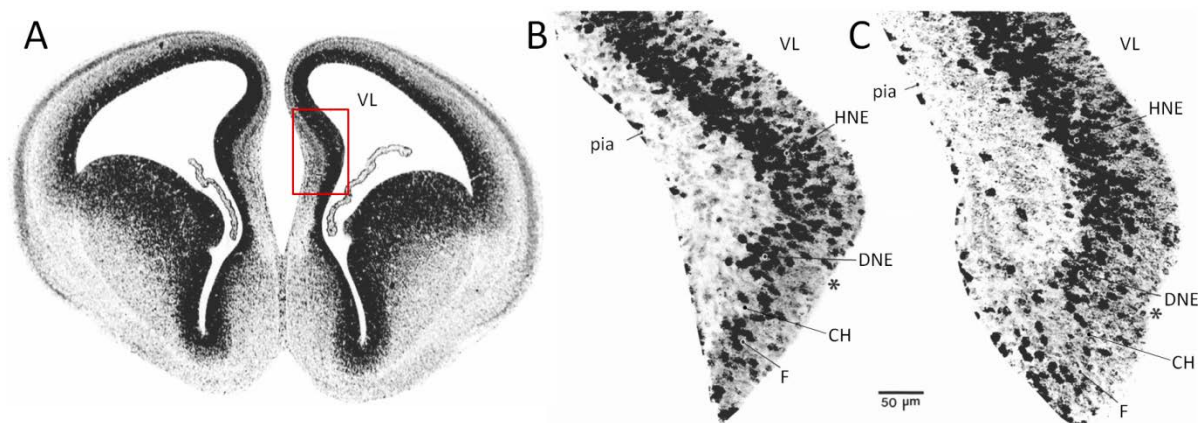


Figure 5. Le pallium médian, les origines du gyrus denté.

(A) Autoradiographie de la thymidine tritiée sur des coupes coronales de cerveaux de rats à E17. (B) et (C) sont des grossissements de l'encadré rouge, à E16 et E17 respectivement. CH: cortical hem; DNE: dentate neuroepithelium; F: fimbria; HNE: hippocampal neuroepithelium; pia: surface piaie du cortex; VL: ventricule latéral. L'astérisque représente la « dentate notch ». Modifié d'après Altman and Bayer, 1990a.

Parmi les facteurs produits par le CH, on retrouve notamment la famille des glycoprotéines Wnts qui agissent à différentes étapes du développement (Grove et al., 1998). Les souris mutantes pour Wnt3A sont dépourvues de FH en raison principalement d'un défaut de prolifération de précurseurs précoces de la FH, nécessaire à l'expansion du cortex médian (Lee et al., 2000). Les protéines BMP (bone morphogenetic proteins) également sécrétées par le CH sont essentielles pour l'initiation de la neurogénèse au sein des progéniteurs du GD. Une perte de la signalisation des BMPs empêche le développement de certaines structures telles que le plexus choroïde et le CH, provoquant l'absence totale de FH (Cheng et al., 2006). Outre la sécrétion de Wnts et des BMPs, le CH se caractérise par l'absence d'expression du facteur de transcription Lhx2 (LIM homebox 2), absence nécessaire à l'induction d'une identité hippocampique (Mangale et al., 2008).

2. Matrice primaire du gyrus denté et mise en place de l'échafaud de glie radiaire

Les cellules souches/progéniteurs du DNE à l'origine du GD, forment ce qui fût appelée par Altman et Bayer, la matrice germinale primaire ou "primary matrix" (Altman and Bayer, 1990a, 1990b), matrice qui se distingue vers E14.5 chez la souris. Au sein de cette matrice primaire se trouve des cellules gliales radiaires (CGRs) qui constituent les cellules souches neurales (CSNs) et donneront naissance aux premiers NGs du GD. Dans le DNE, les CSNs sont caractérisées par l'expression de facteurs de transcriptions spécifiques tels que Sox2 (sex determining region Y)-box 2) qui est primordial pour l'auto-renouvellement des cellules souches. La délétion de Sox2 dans le cerveau embryonnaire de souris à E12.5 bloque le développement du GD en période

postnatale, ainsi qu'une perte des CGRs (Favaro et al., 2009). Le facteur de transcription Pax6 est également exprimé par les CGRs du DNE et joue un rôle de déterminant neuronal, donnant aux cellules souches leur potentiel neurogénique (Heins et al., 2002; Sugiyama et al., 2013). Les CGRs se divisent asymétriquement donnant naissance à une autre CGR et à un neurone immature ou un progéniteur intermédiaire. Une régulation fine de la balance prolifération/ différenciation des cellules souches et des progéniteurs neuronaux intermédiaires (PNIs) est essentielle au bon développement du GD.

Les CGRs, outre leur rôle de cellules souches, ont un rôle d'échafaud, nécessaire à la future migration des PNIs. La glie radiaire du GD a été largement étudiée à l'aide de différentes techniques comme le marquage de Golgi, la microscopie électronique et le marquage de différents protéines spécifiques tels que la protéine GFAP (glial fibrillary acidic protein) et la vimentine (Rickmann et al., 1987). Ainsi des fibres radiaires exprimant la vimentine ont été détectées dans le GD de rat au jour embryonnaire 13 (E13) tandis que des fibres plus matures, exprimant la GFAP, ont été observées à E17 (Rickmann et al., 1987). A E14.5, ces fibres de CGRs possèdent un corps cellulaire au niveau de la ZV, s'étendent vers la surface piaie du GD (**Figure 6**) et forment un réseau complexe, établissant ainsi une route migratoire pour les futurs progéniteurs du GD. Cette structure précoce est progressivement modifiée en réponse aux changements morphogénétiques associés à l'invagination de la FH et la formation de la fissure hippocampique (Xu et al., 2015). De cette façon on retrouve lors de la dernière semaine de vie embryonnaire, deux regroupements majeurs de fibres radiaires: le premier est appelé le regroupement supra-granulaire (supragranular bundle), on le retrouve en dessous de la fissure hippocampique et est formé de fibres tangentes à la surface piaie; le deuxième est le regroupement fimbrial (fimbrial bundle), il s'étend de la fimbria, traverse le hile et se termine à la surface piaie du GD naissant (**Figure 6-7**) (Rickmann et al., 1987).

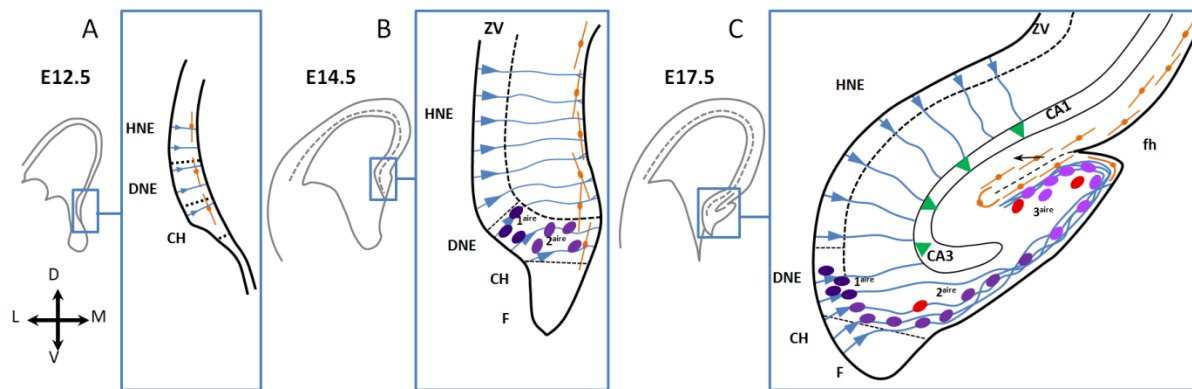


Figure 6. Développement embryonnaire du gyrus denté de souris.

Représentation schématique du télencéphale dorsal à différents jours embryonnaires. L'aire encadrée correspond à la région hippocampique et est agrandie dans le panneau à droite (rectangle bleu). **A.** A E12.5 le dentate neuroepithelium (DNE) naissant est localisé entre le hippocampal neuroepithelium (HNE) et le cortical hem (CH), d'où sont originaires les cellules de Cajal-Retzius (orange) qui longent la surface piale du cortex. Les cellules de la glie radiaire (CGRs, représentées en bleu clair et un corps cellulaire en triangle) s'étendent de la ZV vers la surface piale du cortex **B.** A E14.5 les progéniteurs neuronaux de la matrice germinale primaire (ovales violet foncé) se trouvent dans la zone ventriculaire (ZV) et migrent le long de l'échafaud de CGR vers la surface piale du cortex et forment la matrice germinale secondaire (ovales violets). **C.** A E17.5 la fissure hippocampique (fh) se forme et les précurseurs du GD migrent et s'accumulent dans le primordium du GD, formant la matrice germinale tertiaire (ovales violet clair). Les cellules de Cajal-Retzius suivent la pliure du GD et longent la fh. A ce stade l'échafaud de CGRs s'étend du CH jusqu'à la fissure hippocampique et à la surface piale du GD, guidant la migration des précurseurs neuronaux et des CG du GD (ovales rouges). Les cellules pyramidales de l'hippocampe (triangles verts) sont formées dans le HNE et migrent le long des CGRs vers les champs de l'hippocampe. CA1: champs CA1 de l'hippocampe; CA3: champs CA3 de l'hippocampe; CH: cortical hem; DNE: dentate neuroepithelium; F: fimbria; fh: fissure hippocampique; HNE: hippocampal neuroepithelium; ZV: zone ventriculaire; 1aire: matrice germinale primaire; 2aire: matrice germinale secondaire; 3aire: matrice germinale tertiaire; D: dorsal; L: latéral; M: médial; V: ventral. Adapté d'après Urbán and Guillemot, 2014.

3. Formation de la matrice secondaire et migration des progéniteurs

Chez la souris, à partir de E14.5, les progéniteurs issus des premières divisions au sein du DNE commencent à migrer le long de l'échafaud de glie radiaire, s'éloignant de la ZV et se dirigent vers la surface piale du cortex. Les progéniteurs et précurseurs du GD s'amassent donc à la surface piale du pallium médian, adjacents à la fimbria et forment la matrice germinale secondaire (**Figure 6B-C**).

A mesure que la FH se plie, le primordium du GD apparaît et s'écarte des matrices germinales primaires et secondaires. Les précurseurs neuronaux des deux matrices viennent alors peupler le primordium du GD. Deux flux migratoires ont été identifiés. Le premier est formé par la migration des précurseurs neuronaux le long de la surface piale, qui suivent le regroupement supra-granulaire des fibres radiaires et forment la partie la plus externe de la CG naissante. On retrouve alors dans le futur GD, un mélange de cellules prolifératives, de progéniteurs intermédiaires et de cellules post-mitotiques différenciées en NGs immatures (Nakahira and Yuasa, 2005). Le second flux de migration est observé lors des derniers jours de

vie embryonnaire et des premiers jours postnataux, les cellules migrent alors principalement le long du regroupement fimbrial et rejoignent la matrice tertiaire (Hayashi et al., 2015).

Les premiers NGs produits, émergeant de la matrice primaire et secondaire, migrent donc en suivant le premier flux de migration décrit et établissent en dessous de la fissure hippocampique, les prémices de la lame suprapyramidale de la CG. A partir du 18^{ème} jour de gestation la lame suprapyramidale devient réellement visible chez le rat et des NGs continuent de s'y amasser (Rickmann et al., 1987). Contrairement au néocortex, les premières cellules générées s'accumulent dans la partie la plus externe de la CG, alors que les cellules produites plus tardivement constituent les parties plus internes, formant ainsi un gradient (Rickmann et al., 1987; Hayashi et al., 2015).

La mise en place de l'échafaud de glie radiaire ainsi que la migration des précurseurs neuronaux pour former les différentes couches du GD, sont des processus finement régulés. La réeline notamment qui est synthétisée et sécrétée par les cellules de Cajal-Retzius (voir **Figure 6**)(D'Arcangelo et al., 1997) a un rôle majeur dans ces processus. En effet, l'absence de réeline chez les "reeler mice" (Falconer, 1951) empêche l'échafaud de glie radiaire de se former correctement conduisant les NGs naissants à se disperser au sein du GD (Frotscher et al., 2003).

4. Etablissement de la matrice tertiaire au sein du hile

Lors des derniers jours de gestation chez le rat, les NGs issus des matrices germinales primaire et secondaire continuent de migrer vers le GD pour former la crête de la CG et les prémices de la lame infrapyramidale naissante; en revanche on observe une forte diminution du nombre de cellules en migration vers la lame suprapyramidale (Rickmann et al., 1987). A ce stade du développement, un nombre croissant de cellules mitotiques s'accumulent dans le hile, cette nouvelle niche de cellules progénitrices est désignée comme étant la matrice germinale tertiaire (**Figure 7**) (Altman and Bayer, 1990a, 1990b). Aux premiers jours de développement postnatal, des précurseurs venant des trois matrices germinales viennent constituer la lame infrapyramidale. Il a été estimé qu'un mois après la naissance, 80% des neurones du GD présents ont été générés postnatalement chez le rat (Altman and Bayer, 1975).

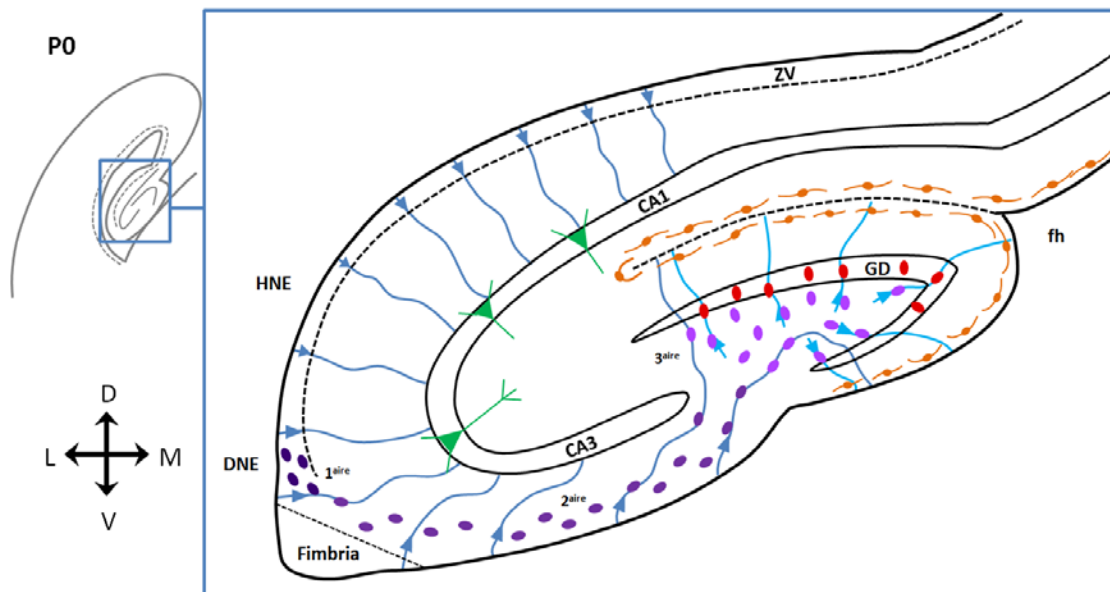


Figure 7. Développement postnatal du gyrus denté de souris.

Représentation schématique du télencéphale dorsal à la naissance. Au jour postnatal 0 (P0) les lames de la couche granulaire ont commencé à se former, les neurones granulaires (ovales rouges) s'accumulent premièrement dans la lame suprapyramidale sous la fissure hippocampique (fh). La migration continue des cellules de Cajal-Retzius vers la surface piaie favorise la formation de la lame infrapyramidale du gyrus denté (GD). Les cellules précurseurs des matrices germinales primaire et secondaire (ovales violet foncé et violets) commencent à disparaître mais les cellules de la matrice tertiaire (ovales violet clair) continuent de proliférer et de produire de nouveaux NGs. L'échafaud primaire de CGRs (représenté en bleu, au corps cellulaire triangulaire) disparaît également, on observe la mise en place de l'échafaud secondaire (bleu clair), qui aide à la formation des différentes couches du GD. CA1: champs CA1 de l'hippocampe; CA3: champs CA3 de l'hippocampe; CH: cortical hem; DNE: dentate neuroepithelium; fh: fissure hippocampique; GD: gyrus denté; HNE: hippocampal neuroepithelium; ZV: zone ventriculaire; 1aire: matrice germinale primaire; 2aire: matrice germinale secondaire; 3aire: matrice germinale tertiaire; D: dorsal; L: latéral; M: médial; V: ventral. Adapté d'après Urbán and Guillemot, 2014.

5. Transformation radiaire de la matrice tertiaire

A la naissance, le hile est constitué d'un mélange de NGs nouvellement formés et de précurseurs neuronaux qui composent la matrice germinale tertiaire. Ils forment un amas cellulaire non ordonné qui progressivement va se transformer en une structure radiaire hautement organisée. A cette période, le nombre de fibres radiaires de l'échafaud primaire diminue tandis que des cellules du hile possédant des fibres plus courtes exprimant la GFAP, couvrent le GD (Rickmann et al., 1987). Au troisième jour postnatal (P3), l'échafaud primaire a disparu et les prolongements de la glie radiaire émergente traversent la CG en formation et s'étendent vers la CM (**Figure 7**) (Brunner et al., 2010). Progressivement les CGRs quittent le hile et lors de la deuxième semaine postnatale, se restreignent à la zone directement sous-jacente à la CG, qui formera plus tard la ZSG.

La réeline contrôle la morphologie et l'organisation de la glie radiaire, permettant notamment l'orientation de leurs fibres vers la zone marginale du GD (Weiss et al., 2003). De plus elle joue le rôle de signal d'arrêt de migration, les neurones migrants le long des fibres de la

glie radiaire se détachent de ces dernières en présence de la réeline, arrêtant donc leur migration au niveau de la CG (Zhao et al., 2004). Ces données mettent de nouveau en avant l'importance de la sécrétion de réeline par les cellules Cajal-Retzius dans l'organisation du développement du GD. Une autre étape importante de la morphogenèse du GD est l'interaction du "end feet" de la glie radiaire avec la membrane basale de la surface piaie. Une perturbation de cette interaction conduit à la déformation du contour du GD et une désorganisation de l'échafaud de la glie radiaire. Chez les souris mutantes pour l'intégrine β -1 du cerveau, la capacité des prolongements des cellules neuronales et gliales à interagir avec la membrane basale est compromise (Forster et al., 2002).

6. Différenciation des neurones granulaires

Tout au long du processus de développement du GD, des NGs sont générés pour constituer la CG du GD. Cette production de nouveaux neurones nécessite la différenciation des cellules souches en NGs et ce procédé est dépendent de l'expression de différents facteurs de transcription pro-neuronaux.

La Neurogenine-2 (Neurog2) est un facteur de transcription pro-neuronal de la famille des protéines bHLH (basic helix loop helix) qui favorise l'engagement de cellules souches vers un devenir neuronal. Dans le cortex embryonnaire elle induit l'expression d'autres facteurs de transcription impliqués dans la différenciation neuronale, tel que NeuroD1 (Neuronal Determination factors; (Wilkinson et al., 2013). Au cours du développement néocortical, Neurog2 joue également un rôle dans la spécification des neurones glutamatergiques embryonnaires et est en partie responsable de l'inhibition du devenir glial (Tomita, 2000). Lors du développement du GD, les précurseurs des trois matrices germinales expriment Neurog2 (Pleasure et al., 2000; Galichet et al., 2008). Neurog2 joue un rôle fondamental dans la formation du GD, comme le montre l'étude des souris mutantes pour *Neurog2* qui présentent, à la naissance, un GD sévèrement atrophié avec une lame suprapyramidale réduite et une lame infrapyramidale absente (Galichet et al., 2008). Les auteurs ont également observé une désorganisation de la glie radiaire et de la migration des progéniteurs neuronaux en l'absence de Neurog2. Neurog2 est aussi exprimée transitoirement dans un sous-ensemble de PNIs du GD, positifs pour Tbr2 (T-box brain protein 2).

Tbr2 est un autre régulateur principal de la neurogénèse embryonnaire qui favorise la génération et la prolifération de PNIs qui donnent naissance aux NGs (Hodge et al., 2012). De même que Neurog2, Tbr2 est exprimé dans les trois matrices germinales du GD, au sein de

cellules prolifératives. La suppression de Tbr2 empêche la génération de PNIs et de NGs tout en augmentant la prolifération des cellules souches du GD, montrant que Tbr2 est nécessaire pour la transition des cellules souches vers les PNIs se différenciant en NGs. De plus il est proposé que Tbr2 puisse inhiber l'expression de Sox2 par les CGRs (Hodge et al., 2012).

Après la spécification des cellules souches en neurones glutamatergiques par Neurog2, la différenciation finale des neurones du GD est régulée par d'autres facteurs de transcriptions bHLH tels que NeuroD1 et NeuroD2. De manière générale, ces facteurs de différenciation régulent différents processus de maturation des neurones glutamatergiques, tels que la migration, la polarisation, la maturation de l'axone et des dendrites, la survie et la maturation des synapses (Pleasure et al., 2000; Schwab et al., 2000). Prox1 (Prospero-related homeobox 1) est un autre facteur de transcription exprimé par les progéniteurs neuronaux et les cellules post-mitotiques, incluant les NGs nouvellement formés dans la matrice germinale tertiaire. Prox1 est souvent utilisé comme marqueur du lignage des NGs du GD, bien qu'il soit faiblement exprimé par certains interneurons de l'hippocampe (Rubin and Kessaris, 2013). Prox1 est essentiel durant le développement du GD non seulement pour la prolifération des progéniteurs mais aussi pour la spécification des NGs (Lavado et al., 2010).

Le GD est donc une structure cérébrale qui se développe tardivement lors de l'embryogenèse et une majeure partie des NGs du GD est générée lors de la période postnatale (Altman and Bayer, 1975) contrairement aux autres structures cérébrales. De plus le GD est, avec la zone sous ventriculaire (ZSV), la seule région cérébrale où la neurogénèse persiste dans le cerveau à l'âge adulte chez la plupart des mammifères.

D. La neurogénèse dans le gyrus denté adulte

1. Découverte et mise en évidence

A partir des années 60, Altman et collègues décrivirent, en utilisant la thymidine tritiée, l'existence de divisions cellulaires au niveau du GD de la FH dans le cerveau adulte de mammifères (**Figure 8**) (Altman, 1962, 1963; Altman and Das, 1965). Dans les années 70/80, les travaux de Kaplan montrèrent l'existence de contacts synaptiques au niveau des cellules néoformées attestant leur nature neuronale (Kaplan and Bell, 1983, 1984; Kaplan et al., 1985). Cependant les travaux d'Altman et de Kaplan furent longtemps ignorés par la communauté scientifique, accrochée au dogme de l'immuabilité des éléments du cerveau adulte.

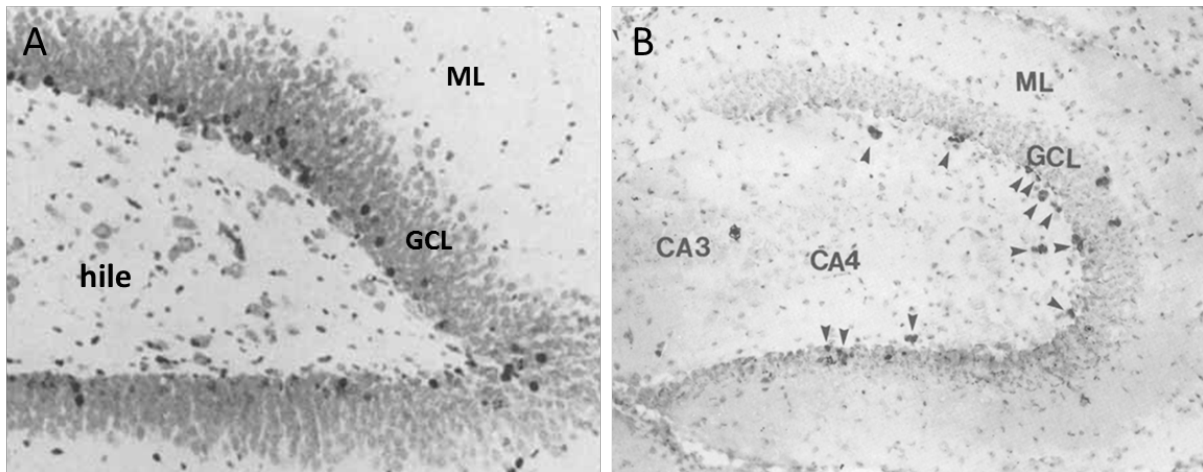


Figure 8. Création de nouvelles cellules dans le gyrus denté postnatal de rongeurs.

A. Photomicrographie d'une autoradiographie de gyrus denté de rat, injecté à P10 avec la thymidine- $[H^3]$ et sacrifié 2 mois après injection. A noter le marquage de cellules dans la partie interne de la couche granulaire. Adapté d'après (Altman and Das, 1965) **B.** Photomicrographie de révélation immunohistochimique du BrdU, au niveau du gyrus denté de souris injectée à P20 et sacrifiée 12,5 heures après injections de BrdU. Les têtes de flèches indiquent les cellules marquées au BrdU. Adapté d'après (Nowakowski et al., 1989). CA3: champs CA3 de l'hippocampe; CA4: champs CA4 de l'hippocampe, nom anciennement donné à la couche polymorphique ou hile; GCL: granule cell layer ou couche granulaire; ML: molecular layer ou couche moléculaire.

Une étape importante fut le travail de Nottebohm et collègues, sur les bases neuronales de l'apprentissage du chant chez l'oiseau. Ils découvrirent que le volume de noyaux cérébraux associés au chant dépendait des saisons et du sexe de l'animal, le canari mâle étant le seul à chanter pour attirer une femelle (Nottebohm, 1985). Par la suite ils démontrèrent que la variation des volumes résultait de l'addition et de l'élimination de neurones dits du chant. Après avoir apporté la preuve d'une production de nouvelles cellules grâce au marquage à la thymidine tritiée (Goldman and Nottebohm, 1983); l'équipe de Nottebohm a prouvé par microscopie électronique et par électrophysiologie que les nouvelles cellules étaient des neurones recevant des contacts synaptiques (Burd and Nottebohm, 1985) les rendant même capables de répondre à des sons (Paton and Nottebohm, 1984). Ces travaux et ceux d'autres équipes comme celle du Dr Gould ne suscitèrent peu d'engouement. Il fallut attendre le développement d'un nouveau marqueur de prolifération, la 5-bromo-2'-déoxyuridine (BrdU), un autre analogue de la thymidine qui s'incorpore dans l'ADN des cellules en division, (Gratzner, 1982; Miller and Nowakowski, 1988; Nowakowski et al., 1989) pour que la neurogénèse connaisse un véritable essor (**Figure 8B**). L'avantage de cette approche est qu'elle fait appel à des techniques d'immunohistochimie. Ainsi, la détection de BrdU peut être combinée avec celle de marqueurs exprimés spécifiquement par les neurones de manière à identifier l'identité des cellules formées. A la fin des années 90, il fut montré, à l'aide du BrdU que la neurogénèse existe chez le rongeur (Kuhn et al., 1996; Kempermann et al., 1997), chez les primates adultes (Gould et al., 1998,

1999b; Kornack and Rakic, 1999) ainsi que chez l'Homme (Eriksson et al., 1998). Depuis, de nombreuses études ont confirmé que de nouveaux neurones sont produits chez l'humain, notamment en utilisant des marqueurs endogènes de neurones immatures, tels que la doublecortine (DCX) et la "polysialylated-neural cell adhesion molecule" (PSA-NCAM) pour identifier les néo-neurones dans le cerveau adulte (Knoth et al., 2010; Boldrini et al., 2018). Une autre étude, utilisant la datation au ^{14}C , a pu également quantifier la neurogénèse chez l'humain adulte (Spalding et al., 2013). Toutefois l'existence d'une neurogénèse dans le cerveau adulte humain reste à l'heure actuelle un sujet très débattu (Spalding et al., 2013; Dennis et al., 2016; Cipriani et al., 2018; Kempermann et al., 2018; Sorrells et al., 2018).

2. Les différentes méthodes d'étude de la neurogénèse adulte

Le domaine de la neurogénèse adulte a été propulsé par différentes avancées technologiques qui ont facilité l'identification et la manipulation de neurones nouvellement formés parmi les milliards de neurones préexistants dans le SNC adulte. Je présente ici deux approches principales.

a) Etudes basées sur l'utilisation de rétrovirus

L'expression de transgènes par des rétrovirus nécessite l'intégration virale dans le génome de l'hôte. Cependant parmi les virus de la classe des rétrovirus, tous ne possèdent pas de mécanismes de transport nucléaire, notamment le virus de la leucémie murine (MuLV, Murine Leukemia Virus) dont l'intégration virale n'est possible que lorsque la membrane nucléaire devient perméable pendant la mitose (Lewis and Emerman, 1994), ce qui en fait un bon indicateur de la division cellulaire. L'intégration virale du rétrovirus dans le génome de l'hôte, permet le marquage des cellules en division mais également de toutes les cellules filles issues de la cellule infectée par le rétrovirus. Ainsi l'injection de rétrovirus dans le cerveau adulte permet de marquer les progéniteurs neuronaux en division ainsi que leur progéniture. L'expression d'un gène rapporteur, comme celui de la "green fluorescent protein" (GFP), permet la visualisation directe de cellules nouvellement formées et l'analyse de leur morphologie grâce à l'expression cytoplasmique du gène rapporteur. Cette approche est également un moyen d'exprimer certains transgènes permettant de manipuler une population spécifique de neurones nouvellement formés, notamment en exprimant par exemple des toxines, des acides ribonucléiques (ARN) interférents et différentes protéines transgéniques. La combinaison du marquage génétique par les rétrovirus avec l'utilisation d'animaux mutants offre de nombreuses possibilités de manipulation de la neurogénèse. Entre autres, l'injection de rétrovirus exprimant la recombinaise

Cre, dans le GD d'animaux pour lesquels le gène d'intérêt est flanqué par des sites lox, permet la délétion de ce gène au sein d'une population spécifique de cellules nouvellement nées dans le GD (Tashiro et al., 2007) et d'étudier le rôle autonome (« cell autonomous ») de ce gène dans le processus de neurogénèse. Cette approche est à la fois une stratégie efficace pour marquer les nouveaux neurones générés à un moment précis dans le cerveau adulte, un outil puissant de manipulation de la neurogénèse adulte et permet une étude précise des mécanismes régulant ce processus.

b) Etudes basées sur l'utilisation de souris transgéniques

Une avancée technologique majeure dans ce domaine de recherche a été la génération de modèles animaux permettant la visualisation et la manipulation spécifique des nouveaux neurones dans le SNC. Plusieurs souris transgéniques ont été générées pour exprimer des gènes d'intérêt sous le contrôle d'un promoteur désiré (voir pour revue Dhaliwal and Lagace, 2011).

1) Les souris transgéniques reportrices

Les CSNs sont souvent identifiées par leur expression de la GFAP (voir **Figure 9**), bien que ce marqueur ne soit pas spécifique de ces cellules et soit également exprimé par des astrocytes matures. Ainsi, des souris transgéniques exprimant la GFP sous le contrôle du promoteur de la GFAP ont été générées afin de visualiser les astrocytes exprimant la GFAP et ont par la suite été utilisées dans une variété d'études qui ont permis une meilleure compréhension des CSNs du cerveau adulte (Nolte et al., 2001). Parmi les souris reportrices les plus connues dans l'étude de la neurogénèse adulte on retrouve les souris exprimant la GFP sous le contrôle de la région régulatrice du gène de la nestine. Chez ces souris, la GFP révèle principalement les CSNs et les progéniteurs neuronaux. D'autres souris permettent le marquage transitoire des néo-neurones à un stade plus différencié, telle que la souris reportrice DCX-GFP ou DCX-DsRed (Couillard-Despres et al., 2006)

2) Les souris transgéniques conditionnelles et inductibles

De même que pour les populaires souris reportrices, l'utilisation de souris conditionnelles et/ou inductibles est devenue très répandue dans la recherche sur la neurogénèse adulte. Ainsi le système de recombinaison Cre/loxP fut le premier système utilisé (Orban et al., 1992). Dans ce système, l'expression de la recombinase Cre est sous le contrôle d'un promoteur spécifique d'un tissu ou d'un type cellulaire. Croiser la souris Cre avec une autre souris "floxxée", qui porte des séquences loxP au niveau du gène d'intérêt, donne naissance à des souris mutantes pour lesquelles la recombinaison du gène d'intérêt est dépendante du promoteur choisi. Ce système

de recombinaison Cre/loxP n'est pas souvent utilisé dans l'étude de la neurogénèse adulte, du fait que la majorité des promoteurs utiles à la recherche sur la néo-neurogénèse, soit également exprimés lors du développement. Cependant il a été utilisé lors d'études de cartographie du devenir cellulaire, notamment pour les cellules exprimant la GFAP dans les régions neurogéniques, où il a été montré que les neurones du cerveau adulte proviennent de cellules souches exprimant la GFAP (Garcia et al., 2004).

De manière à créer un système inductible, la protéine de fusion CreER, composée de la recombinase Cre et du récepteur aux œstrogènes, est utilisée. Ainsi la recombinaison du gène "floxé" est induite au moment choisi, par le traitement des souris avec un ligand des récepteurs aux œstrogènes, tel que le tamoxifène. Plusieurs modifications ont été apportées au système utilisant différents mutants des récepteurs aux œstrogènes: ER^T et ER^{T2}, de manière à augmenter la sensibilité au ligand (Indra et al., 1999). De manière à caractériser la recombinaison par le système inductible, la souris exprimant la protéine CreER est croisée avec une souris reportrice "floxée" permettant l'expression de la protéine reportrice, à la suite de la recombinaison. Par exemple, Lagace et collègues ont développé une souris Nestine-CreER^{T2} et l'ont croisée avec la souris reportrice R26R-YFP, permettant ainsi de marquer les cellules Nestine+ et leur descendance avec la protéine YFP (Yellow Fluorescent Protein) (Lagace et al., 2007). Le croisement de ces souris avec des souris mutantes conditionnelles permet ainsi de générer des souris au sein desquelles les néo-neurones recombinaisonnés pour le gène d'intérêt sont identifiables grâce à l'expression du gène rapporteur.

Une seconde approche inductible utilise le système de régulation par l'administration de la tétracycline. Dans ce système, un promoteur spécifique contrôle l'expression du transactivateur contrôlé par la tétracycline (tetracyclin transactivator, tTA) et un second transgène code pour un rapporteur ou un autre gène d'intérêt, sous le contrôle du promoteur de l'opérateur de la tétracycline (TetOp; Gossen and Bujard, 1992; Chen et al., 1998). En l'absence de tétracycline ou de son dérivé la doxycycline, le tTA se lie au TetOp, induisant l'expression du gène d'intérêt. En revanche, lorsque la tétracycline est présente, le tTA n'est pas capable de se lier et le gène n'est plus exprimé, il est souvent fait référence à cette approche comme le système "Tet-off". Le système Tet-On fonctionne de manière similaire mais opposée au système Tet-Off. Alors que dans le système Tet-Off la protéine tTA est capable de se lier à l'opérateur uniquement si elle n'est pas liée à la tétracycline ou à l'un de ses dérivés, dans un système Tet-On, la protéine rtTA n'est capable de se lier à l'opérateur que si elle est liée à une tétracycline. L'avantage de ce

système comparé à l'approche Cre/loxP est que l'expression du transgène est réversible, en retirant ou en ajoutant la doxycycline.

Un autre exemple de l'utilisation de souris transgéniques dans le domaine de la recherche sur la neurogénèse adulte, et notamment dans l'étude de sa fonction, est le développement de souris permettant l'ablation de la neurogénèse chez l'adulte. A l'inverse des méthodes traditionnelles qui visent toutes les cellules en division (traitements au methylazomethanol, au temozolomide ou irradiations; Shors et al., 2001; Madsen et al., 2003), cette approche génétique a l'avantage de ne cibler qu'une population spécifique de cellules. Le premier de ces modèles utilisa des souris exprimant la thymidine kinase du virus de l'herpès (Herpes simplex virus thymidine kinase, HSV-TK) sous le contrôle du promoteur de la GFAP. Chez ces souris GFAP-TK, le traitement à l'agent antiviral ganciclovir (GCV) permet la suppression spécifique des cellules en division exprimant la GFAP. En effet la HSV-TK (et non la TK endogène) phosphoryle des analogues nucléotidiques tel que le ganciclovir qui ensuite incorporés dans l'ADN des cellules en réplication bloque la synthèse d'ADN et induit une apoptose. Ainsi le traitement avec le GCV à un moment donné conduit à une réduction presque totale de la neurogénèse adulte dans le GD et le bulbe olfactif montrant ainsi que les progéniteurs exprimant la GFAP constituent la source primaire de neurogénèse adulte (Garcia et al., 2004). D'autres études ont étudié la fonction de la neurogénèse adulte en utilisant notamment la souris Nestine-TK (Deng et al., 2009).

Ainsi un grand nombre de lignées de souris reportrices et inductibles ont été créées dans le but d'étudier les différentes étapes du processus neurogénique mais aussi de déterminer les fonctions de cette néo-neurogénèse et l'importance des nouveaux neurones dans le cerveau adulte sain et en condition pathologique (voir pour revue Dhaliwal and Lagace, 2011).

3. Développement des néo-neurones dans le GD adulte

Le développement des néo-neurones dans le GD adulte suit une séquence similaire à celle observée lors de la période périnatale, débutant par une phase de prolifération des CSNs et se terminant par leur intégration fonctionnelle au sein des réseaux hippocampiques.

a) Les cellules souches neuronales du cerveau adulte

L'identité des CSNs dans les niches neurogéniques adultes a longtemps été un sujet à débat. En particulier dans la ZSV, plusieurs types cellulaires ont été proposés comme étant à l'origine de la neurogénèse adulte, incluant les astrocytes (Doetsch et al., 1999), les cellules épendymaires multiciliées (Johansson et al., 1999) et les cellules subépendymaires (Morshead et al., 1994). Le modèle le plus répandu, basé sur l'analyse de traçages génétiques, d'ablations

pharmacologiques, ainsi que d'analyses morphologiques et immunohistochimiques, suggère qu'une catégorie spéciale d'astrocytes possédant des propriétés de la glie radiaire, constitue les CSNs de la ZSV et la ZSG (Alvarez-Buylla and Lim, 2004; Garcia et al., 2004). Dans le GD, ces CSNs sont majoritairement quiescentes (cellules de type I), possèdent un soma dans la ZSG, un prolongement radiaire principal qui traverse la CG et sont identifiables grâce à l'expression de différents marqueurs tels que la GFAP, GLAST (GLlutamate ASpartate Transporter) et BLBP (Brain Lipid – Binding Protein) (**Figure 9**). Elles se différencient cependant des astrocytes par leur expression de la nestine et l'absence d'expression de marqueurs d'astrocytes matures tels que S100 β (S100 calcium –binding protein β ; Filippov et al., 2003). Une deuxième classe de cellule de type I a été identifiée, possédant de court prolongements horizontaux qui longent la limite entre la CG et le hile (Suh et al., 2007; Lugert et al., 2010). Les cellules de type 1 horizontales semblent se diviser plus rapidement que les cellules radiaires. Un autre rapport se basant sur l'analyse morphologique, immunohistochimique et clonale des CSNs a pu souligner, une fois de plus, l'hétérogénéité de la population de CSNs (Gebara et al., 2016). En effet ces travaux identifient l'existence de deux morphotypes de CSNs distincts, les cellules de type α qui donnent naissance à des neurones et des astrocytes et les cellules de type β qui ne prolifèrent pas. Ensemble, ces résultats mettent donc en lumière la complexité de la question concernant l'identité et le lignage des différentes CSNs du GD adulte.

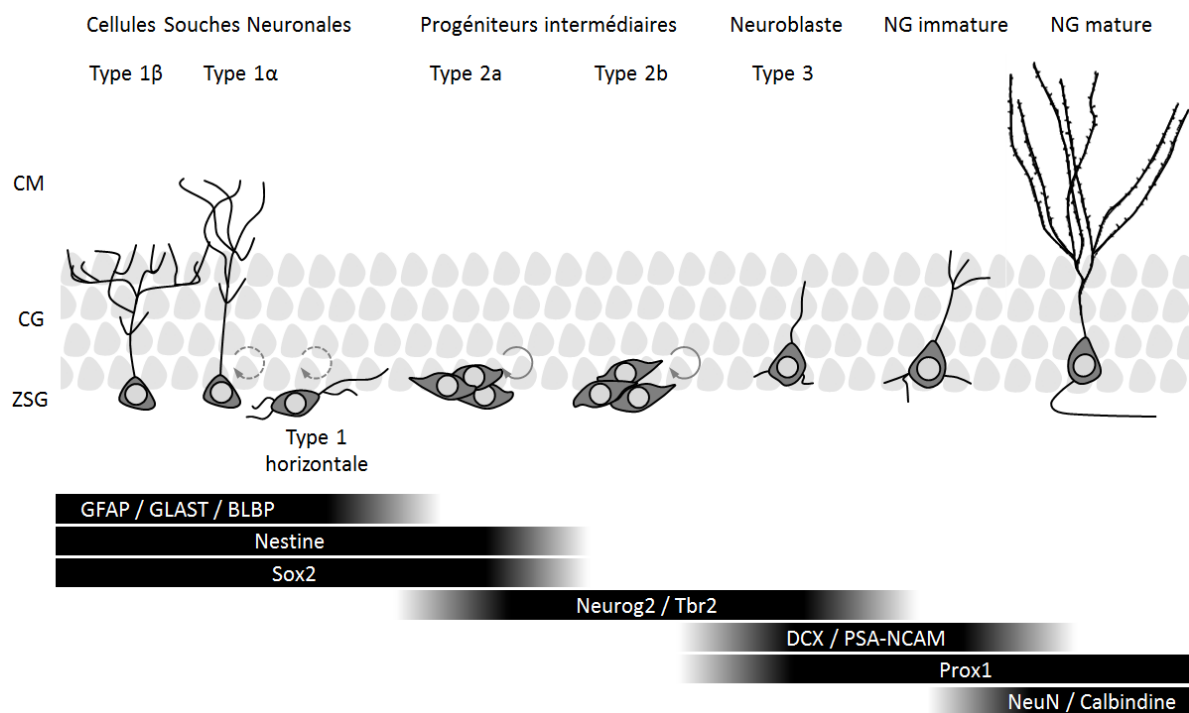


Figure 9. Le développement de nouveaux neurones granulaires au sein du gyrus denté chez l'animal adulte

Représentation schématique des différentes populations de cellules souches, progéniteurs intermédiaires, ainsi que des neuroblastes, des neurones granulaires (NG) immatures et matures. Une synthèse de l'expression de marqueurs cellulaires

spécifique, au cours du lignage neuronal. *BLBP*: brain lipid-binding protein; *CG*: couche granulaire; *CM*: couche moléculaire; *DCX*: doublecortine; *GFAP*: glial fibrillary acidic protein; *GLAST*: glutamate aspartate transporter; *NeuN*: neuronal nuclei; *Prox1*: prospero-related homeobox 1; *PSA-NCAM*: polysialylated-neural cell adhesion molecule; *Sox2*: sex determining region Y-box 2; *Tbr2*: t-box brain protein 2; *ZSG*: zone sous granulaire.

b) Lignage neuronal et différenciation

Dans la ZSG adulte, lorsque les CSNs sortent de leur état de quiescence et prolifèrent, elles donnent naissance à des progéniteurs d'amplification transitoires (transit-amplifying progenitors, TAPs) qui ont le potentiel de se différencier en neurones et en astrocytes (Lugert et al., 2010; Encinas et al., 2011) (**Figure 9**). Morphologiquement, les TAPs (aussi appelé progéniteurs intermédiaire ou cellules de type 2) sont de petites cellules possédant de courts prolongements tangentiels à la CG et forment des groupements de progéniteurs dans la ZSG. Il existe différents types de TAPS, qui peuvent être identifiés sur la base de leur morphologie et de leur expression de marqueurs spécifiques (Suh et al., 2007; Lugert et al., 2010). Deux sous-groupes de cellules de type 2 ont été identifiés: le type 2a (TAPs précoces) expriment toujours la nestine ainsi que facteur de transcription *Ascl1*; et le type 2b (TAPs tardif) qui n'exprime pas la nestine mais commence à exprimer des marqueurs spécifiques de l'engagement dans le lignage neuronal tels que *Tbr2* et *Neurog2* (Kempermann et al., 2004). Un autre marqueur caractéristique est le facteur de transcription *Sox2*, qui est exprimé par l'ensemble des cellules précurseurs, allant des CSNs aux progéniteurs intermédiaires précoce et est également exprimé par les astrocytes (Suh et al., 2007; Dhaliwal and Lagace, 2011).

La transition des TAPs en neuroblastes ou cellules de type 3, implique des modifications morphologiques majeures et indique une différenciation fonctionnelle. Ces cellules étant plus engagées dans le lignage neuronal, elles expriment donc les marqueurs de NGs immatures tels que la *DCX*, la *PSA-NCAM* et *Prox1* (Kempermann et al., 2004; Lavado et al., 2010). A ce stade, les neuroblastes migrent en dehors de la ZSG vers la partie interne de la CG, bien qu'une partie de ces cellules conserve la capacité de proliférer, une majorité des cellules de type 3 devient postmitotique. Les neuroblastes ont un corps cellulaire rond et possèdent une dendrite apicale primaire (**Figure9**) (Kempermann et al., 2004).

Enfin, alors que les neuroblastes migrent vers la CG, l'expression de la *DCX* diminue et des marqueurs de neurones matures apparaissent, tels que *NeuN* (neuronal nuclei) et la calbindine (Kempermann et al., 2004). Les neurones nouvellement générés dans la ZSG, deviennent des NGs glutamatergiques fonctionnellement et structurellement matures, en 7 à 8 semaines chez la souris (van Praag et al., 2002; Zhao et al., 2006).

c) Maturation morphologique

Le marquage des cellules en division dans le GD adulte, à l'aide de rétrovirus exprimant la GFP, a permis une analyse précise de la morphologie des NGs nouvellement générés (van Praag et al., 2002; Espósito et al., 2005; Zhao et al., 2006; Sun et al., 2013). Ces études ont montré que lors des premiers jours du développement neuronal, entre 3 jours post injection (3jpi) et 21 jpi, les néo-neurones mettent en place la majorité de leur arbre dendritique, à savoir un prolongement dendritique unique qui traverse la CG et se ramifie dans la CM (voir **Figure 9**). De plus une étude récente utilisant la microscopie à 2 photons et l'implantation d'une fenêtre intra-crâniale au-dessus du site d'injection rétrovirale, a permis la visualisation du développement morphologique de nouveaux neurones *in vivo* (Gonçalves et al., 2016). Les auteurs confirment que les nouveaux neurones développent principalement leur arbre dendritique pendant les 3 premières semaines, lors d'une phase de croissance active, qui est suivie par une période d'élagage des dendrites surnuméraires. C'est lors de ces 3 premières semaines que les dendrites atteignent la partie externe de la couche moléculaire tandis que l'axone se développe parallèlement et s'étend jusqu'au CA3 (Sun et al., 2013). La formation des épines commence, quant à elle, une fois la première phase de croissance dendritique et axonale terminée, entre 2 et 3 semaines après division cellulaire, pour se terminer –chez la souris – au cours de la 8^{ème} semaine, lorsque la densité des épines se stabilise (Zhao et al., 2006).

d) Intégration fonctionnelle des néo-neurones

Une des dernières étapes du développement des néo-neurones dans le GD adulte, est leur intégration fonctionnelle dans les circuits neuronaux préexistant de la FH. Cette étape est particulièrement intéressante car elle constitue une différence majeure avec la neurogénèse embryonnaire. En effet contrairement aux neurones générés lors de la période prénatale, les néo-neurones se développent dans un réseau mature et fonctionnel, ce qui implique que ces cellules soient potentiellement influencées par l'environnement déjà en place, notamment par l'activité de la voie perforante.

Le consensus actuel est que les néo-neurones sont activés tout d'abord de façon tonique par du GABA ambiant avant d'être séquentiellement innervés par des afférences GABA puis glutamatergiques. Au sein des cellules de type 2, il a été montré que l'activation des récepteurs au GABA favorise la différenciation neuronale, notamment en induisant l'expression du facteur NeuroD (Tozuka et al., 2005).

Lors de la deuxième semaine de maturation, les néo-neurones commencent à développer leurs dendrites et axone. A ce stade, des enregistrements électrophysiologiques montrent qu'ils reçoivent des afférences GABAergiques synaptiques (Espósito et al., 2005). Cette afférence GABAergique joue un rôle primordial dans la maturation des nouveaux neurones. En effet, de même que lors de l'embryogenèse, les neurones immatures du GD adulte possèdent une forte concentration intrinsèque de chlore. Par conséquent, la stimulation des récepteurs au GABA dépolarise la membrane cellulaire, qui est cruciale pour la maturation future des néo-neurones (Overstreet-Wadiche et al., 2005; Tozuka et al., 2005; Ge et al., 2006). Puis, après 2 semaines de développement neuronal, des analyses électrophysiologiques et morphologiques ont pu mettre en évidence que les neurones nouvellement générés reçoivent leurs premières afférences glutamatergiques au niveau d'épines dendritiques, un phénomène qui semble dépendre de l'activité induite par le GABA (Espósito et al., 2005; Ge et al., 2006; Chancey et al., 2013). Parallèlement il a été montré qu'à cette même période, les néo-neurones projettent leurs premières efférences vers les cellules pyramidales du CA3 (Hastings and Gould, 1999; Markakis and Gage, 1999; Toni et al., 2008). De plus, lors de la troisième semaine, le GABA devient hyperpolarisant (Ge et al., 2006) et c'est à la fin de cette 3^{ème} semaine que les néo-neurones acquièrent la capacité de décharger des potentiels d'action en réponse à l'injection de courants de faible amplitude (Mongiat et al., 2009). L'étape finale de l'intégration synaptique est atteinte après formation de synapses GABAergiques périsoniques (Espósito et al., 2005).

Entre la troisième et sixième semaine, les néo-neurones sont hautement plastiques, hyperexcitables et plus prônes à développer une potentialisation à long-terme (long-term potentiation, LTP) au sein du GD (Schmidt-Hieber et al., 2004; Ge et al., 2007). Cependant, une fois matures (environ 7-8 semaines après leur naissance) les néo-neurones présentent des propriétés fonctionnelles similaires à celles des NGs matures générés pendant le développement (Laplagne et al., 2006).

L'ajout de nouveaux NGs au sein du GD mature influence l'activité du GD. Il semble qu'un des rôles des néo-neurones soit de diminuer l'activité des NGs matures. En utilisant des colorants sensibles au potentiel (voltage sensitive dyes), Ikrar et collègues ont constaté qu'une augmentation de la neurogénèse entraîne une diminution de l'excitabilité du GD (Ikrar et al., 2013). De manière similaire, il a été montré qu'une stimulation optogénétique des néo-neurones diminue la proportion de NGs matures exprimant le gène d'expression précoce *c-fos*, un marqueur indirect de l'activité neuronale, après exposition à un nouvel environnement (Drew et

al., 2016). Les auteurs ont notamment mis en évidence que les néo-neurones inhibent l'activité des NGs matures en activant des interneurons GABAergiques locaux.

En augmentant génétiquement le nombre de néo-neurones chez la souris, une diminution des courants excitateurs postsynaptiques et de la densité des épines dendritiques fut observée au niveau des neurones matures (Adlaf et al., 2017). Une hypothèse pouvant expliquer ces observations est celle de la "redistribution synaptique", qui suggère que de nouvelles synapses ne sont pas formées pour les néo-neurones mais qu'elles sont déviées des cellules matures voisines (Adlaf et al., 2017). Cette récente étude renforce l'idée selon laquelle les nouveaux neurones ciblent les connections afférentes par un processus de compétition (Toni et al., 2007; McAvoy et al., 2016), menant à une réorganisation de la connectivité du GD.

e) Selection neuronale

Au cours du processus de différenciation des néo-neurones, une proportion importante de ces cellules meurt, et ce dès les premiers jours après leur naissance. Ainsi, trois semaines après division cellulaire, environ la moitié des neurones nouvellement générés a été perdue (Kempermann, 2003; Tashiro et al., 2006). L'élimination des néo-neurones est médiée par le gène pro-apoptotique Bax (B-cell lymphoma 2 associated protein X) puisque la surexpression de ce gène favorise la mort des nouveaux NGs (Dupret et al., 2008) alors qu'à l'inverse sa suppression entraîne une augmentation de la survie de ces cellules (Sun, 2004; Sahay et al., 2011). La majorité des neurones néo-formés est donc éliminée par mort apoptotique.

Deux phases de mort par apoptose ont été décrites au cours du développement des néo-neurones chez la souris. Une première phase a lieu dans les premiers jours (1 à 4 jours) après la naissance, au stade progéniteur (Sierra et al., 2010). Les cellules apoptotiques sont rapidement éliminées par la microglie locale selon un processus de phagocytose. Une seconde phase apoptotique élimine les néo-neurones 2 à 3 semaines après leur naissance, au moment de leur intégration synaptique (Tashiro et al., 2006). Cette phase de sélection est dépendante des récepteurs NMDA (acide N-méthyl-D-aspartique) et en particulier de la sous-unité NR1 (Tashiro et al., 2006). En effet une délétion de NR1 dans les néo-neurones réduit leur survie 3 semaines après leur naissance.

L'environnement enrichi, l'exercice physique volontaire ou l'apprentissage spatial, affectent tous la survie des néo-neurones et finalement le nombre de nouveaux NGs intégrés (Gould et al., 1999a; van Praag et al., 1999; Dupret et al., 2007), suggérant fortement que les stimuli externes se traduisant en une activité du réseau hippocampique, représenteraient un mécanisme

important de régulation de la survie des néo-neurones. En accord avec l'hypothèse que l'activité locale puisse directement influencer la survie des nouveaux neurones, des études ont montré que la stimulation de la voie perforante favorise la survie des néo-neurones (Bruehl-Jungerman et al., 2006).

La mort neuronale est un phénomène important du développement du SNC, plus particulièrement au moment où le nombre de neurones d'une région devient suffisamment grand pour innervier l'ensemble des neurones cibles (Oppenheim, 1991). De manière intéressante, lors du développement, la mort cellulaire intervient peu de temps après que les neurones aient innervé leurs cibles, confirmant que la formation de synapses et la compétition pour l'établissement de celles-ci, jouent un rôle primordial dans la régulation de la survie des neurones du développement. De manière similaire, le fait que les néo-neurones passent également par un processus de sélection au moment où les premiers contacts synaptiques sont effectués, suggère que leur survie puisse être partiellement régulée par ces mécanismes de compétition.

4. Fonctions des néo-neurones dans la FH

La FH est une structure cérébrale dont l'implication est particulièrement reconnue dans la cognition et l'émotion. La FH présente une segmentation fonctionnelle, où la connectivité et l'expression de certains gènes diffèrent entre la portion temporale et septale (Fanselow and Dong, 2010). La partie septale de la FH est principalement liée aux fonctions cognitives et participe à la mémoire spatiale et l'apprentissage alors que la partie temporale joue quant à elle un rôle important dans le stress et la modulation des comportements (Bannerman et al., 2004).

Etant donné que les nouveaux neurones établissent des synapses avec les neurones préexistants de la FH (Toni et al., 2008), l'introduction de ces cellules dans le réseau a logiquement conduit les scientifiques à s'interroger sur le rôle des nouveaux neurones dans les processus cognitifs et émotionnels.

a) Neurogénèse adulte hippocampique et cognition

La nature précise des fonctions cognitives régulées par les néo-neurones hippocampiques a fait l'objet de nombreux débats ces dernières années. En effet si certaines études ont initialement mis en évidence un lien entre neurogénèse adulte hippocampique et apprentissage spatial (Snyder et al., 2005; Dupret et al., 2008; Farioli-Vecchioli et al., 2008; Garthe et al., 2009), d'autres, à l'inverse, ont montré l'absence de déficit après ablation de la neurogénèse (Shors et al., 2002; Meshi et al., 2006; Saxe et al., 2006). Depuis, avec le raffinement des outils permettant

de manipuler les niveaux de neurogénèse et le raffinement des protocoles comportementaux, un consensus semble atteint : la neurogénèse serait impliquée dans la séparation de patrons et dans la flexibilité cognitive.

La **séparation de patrons** spatiaux ou « spatial pattern separation », peut être défini comme le processus permettant d'encoder des informations spatiales similaires et de transmettre ces informations sous des formes distinctes en atténuant les chevauchements des caractéristiques similaires. Ce processus d'encodage, depuis longtemps associé au GD à la fois chez les rongeurs (Gilbert et al., 2001) et chez l'humain (Bakker et al., 2008), semble également étroitement liés aux néo-neurones granulaires. Des souris pour lesquelles la neurogénèse a été supprimée, présentent une discrimination spatiale altérée (Clelland et al., 2009) et une incapacité à discerner deux contextes similaires (Kheirbek et al., 2012; Tronel et al., 2012). A l'inverse, une augmentation de la population de nouveaux neurones permet d'améliorer la capacité à discriminer des contextes similaires, (Sahay et al., 2011). Ces travaux a permis de conclure que les néo-neurones permettent de résoudre des tâches dites ambiguës ou l'animal doit distinguer des lieux, des contextes, des évènements similaires mais pas identiques.

La **flexibilité cognitive** est un processus par lequel les individus utilisent des informations précédemment acquises pour permettre la réponse la plus appropriée lorsque de nouveaux défis apparaissent (Kempermann, 2008; Burghardt et al., 2012). Bien que la flexibilité cognitive soit principalement attribuée au cortex préfrontal, des expériences ont suggéré que les nouveaux neurones hippocampiques étaient également impliqués dans ce processus. La première étude est inspirée des travaux de Eichenbaum (Eichenbaum et al., 1990). Dans ce protocole les animaux apprennent à localiser une plateforme immergée sous la surface de l'eau en étant libéré d'un point de départ constant. Cet apprentissage dit égocentrique peut-être réalisé par des animaux porteurs de lésions de l'hippocampe. Lorsque les animaux ont appris, ils sont libérés d'un nouveau point de la piscine et doivent utiliser l'information acquise (position de la plateforme qui reste inchangée) dans cette nouvelle condition. Les animaux lésés en sont incapables car ils ne peuvent utiliser l'information acquise de façon inférante. En utilisant ce protocole, il a été montré que des souris ayant une neurogénèse réduite sont incapables de trouver la plateforme à partir du nouveau point de départ (Dupret et al., 2008). Les résultats de cette étude princeps ont plus tard été confirmés dans le même test comportemental mais en utilisant un protocole dit de transfert « reverse » consistant à changer la plateforme de place après un apprentissage à point de départ variables (Garthe et al., 2009). Ces découvertes furent appuyées par une autre étude utilisant le conditionnement de peur et montrant que la

neurogénèse adulte hippocampique est nécessaire pour apprendre le changement de la position de la zone de choc (Burghardt et al., 2012).

Pour conclure, ces travaux indiquent que les néo-neurones sont requis distinguer des lieux, des contextes, des événements ambigus et utiliser l'information de façon flexible.

Enfin outre le rôle spécifique joué par les néo-neurones dans ces processus mnésiques, certaines études se sont attachées à déterminer si ces neurones étaient préférentiellement impliqués dans les phases d'encodage ou de rétention de la mémoire spatiale. Il a ainsi été montré que seule l'ablation, post-acquisition, des néo-neurones conduit à des déficits de mémoire spatiale spécifiquement activés lors du rappel à long terme de l'information spatiale (Arruda-Carvalho et al., 2011), suggérant qu'ils joueraient un rôle spécifique dans le **maintien et le rappel des informations encodées**.

b) Neurogénèse adulte hippocampique et émotions

Tout comme pour les fonctions mnésiques, le lien entre neurogénèse hippocampique et fonctions émotionnelles a longuement été débattu ces dernières années. Ainsi, plusieurs études ont abordé le rôle spécifique de la neurogénèse dans l'**anxiété**, mais avec des résultats non concluants. D'une part certaines ont montré qu'une déplétion partielle ou plus drastique des neurones néoformés entraîne un comportement d'évitement des environnements nouveaux ou des zones anxiogènes dans le labyrinthe en croix surélevé (Ageta et al., 2008; Bergami et al., 2008; Revest et al., 2009). D'autres études au contraire ciblant la neurogénèse adulte en inhibant la prolifération cellulaire par traitement pharmacologique au MAM (methylazoxymethanol acetate) (Shors et al., 2002) ou par irradiation (Raber et al., 2004; Saxe et al., 2006) n'ont mis en évidence aucun déficit dans les tests d'anxiété. Une telle divergence peut s'expliquer par la technique d'ablation utilisée et les potentiels effets secondaires relatifs à la technique. Une autre explication a cependant été avancée. En effet, alors que dans certaines études la diminution de la neurogénèse affecte les niveaux d'anxiété en conditions de base (Ageta et al., 2008; Bergami et al., 2008; Revest et al., 2009) de nombreuses études n'ont révélé un effet modulateur de la neurogénèse sur les états anxieux ou apparentés à la dépression qu'en présence d'un stress (Santarelli, 2003; Bessa et al., 2009; David et al., 2009; Surget et al., 2011; Hill et al., 2015). Il est donc envisageable que selon le modèle employé, le niveau de stress de l'animal diffère et que les effets de la manipulation de la neurogénèse soit masqués ou exacerbés par l'état de l'animal. De plus récemment, il a été montré qu'une inhibition de la neurogénèse dans le GD ventral favorise une susceptibilité au stress lié à la défaite sociale,

tandis qu'une augmentation de la neurogénèse conférerait une résistance au stress chronique (Anacker et al., 2018). Ces résultats suggèrent donc qu'en condition basale la neurogénèse jouerait un rôle clé dans la vulnérabilité individuelle au **stress** et aux troubles anxieux associés.

Pour résumer de nombreuses années de recherche et de débat, le message actuel et consensuel dans la littérature est le suivant : la neurogénèse adulte hippocampique est impliquée dans la régulation de l'anxiété, mais pas dans celle des états apparentés à la dépression même si elle semble jouer un rôle fondamental dans l'action des antidépresseurs (Santarelli, 2003; Eliwa et al., 2017).

5. Régulation de la neurogénèse adulte hippocampique

La génération de nouveaux NGs dans le GD adulte est un processus qui se décline en plusieurs étapes débutant par l'activation des cellules souches quiescentes et se terminant par l'intégration dans le réseau préexistant. L'exécution précise de cette séquence est dépendante d'un programme génétique spécifique coordonné par l'activité de différents facteurs de transcription. Un grand nombre de facteurs de transcription qui gouverne le développement du cerveau sont également importants pour la neurogénèse adulte (Urbán and Guillemot, 2014). Par exemple, les facteurs de transcription décrits précédemment, Pax6 – Neurog2 – Tbr2 – NeuroD1 – Prox1, sont également actifs dans les néo-neurones granulaires. Le contrôle transcriptionnel et génétique de la neurogénèse adulte ont été décrits en profondeur dans plusieurs revues (Ma et al., 2010; Mu et al., 2010; Hsieh, 2012; Faigle and Song, 2013). Toutefois les acteurs agissant en aval de ces facteurs de transcription restent peu connus.

Outre ce contrôle intrinsèque, les différentes étapes du processus neurogénique adulte sont régulées par un grand nombre de signaux extrinsèques, locaux ou environnementaux. En effet, des stimuli environnementaux, tels qu'un environnement enrichi, l'exercice physique, le stress ou encore l'apprentissage, régulent la neurogénèse adulte hippocampique et ont également fait l'objet de nombreuses revues détaillées (Aimone et al., 2014; Abrous and Wojtowicz, 2015; Toda et al., 2018).

De même, les différentes cellules présentes au sein de la niche neurogénique ont un rôle crucial dans cette régulation. On retrouve notamment au sein de cette niche, des cellules endothéliales, des astrocytes, de la microglie ainsi que des neurones matures et les progénies des précurseurs neuronaux. Il a ainsi été montré que les cellules vasculaires jouent un rôle important dans la régulation de la prolifération des progéniteurs neuronaux adulte, et des regroupements de cellules en division sont trouvés à proximité des vaisseaux sanguins (Palmer

et al., 2000). De plus les astrocytes qui enroulent leurs prolongements autour des vaisseaux sanguins, forment des jonctions communicantes (gap junctions) et pourraient servir d'interface entre les progéniteurs neuronaux et le réseau sanguin du GD adulte. En culture, des astrocytes dérivés des niches neurogéniques de l'hippocampe et de la ZSV, favorisent la prolifération et l'engagement dans le lignage neuronal de CSNs adultes (Song et al., 2002). Récemment il a été mis en évidence le rôle critique des astrocytes dans le processus de maturation des épines dendritiques, qui est nécessaire pour l'intégration fonctionnelle des nouveaux neurones (Sultan et al., 2015). Les astrocytes sont également une source potentielle de facteurs paracrines tels que Notch, Sonic hedgehog (Shh), les BMPs et Wnts (voir pour revue Faigle and Song, 2013). Ces voies de signalisations que l'on retrouve lors du développement du GD, sont également primordiales pour la génération de nouveaux neurones à l'âge adulte (Urbán and Guillemot, 2014). Une perturbation dans cette colonne vertébrale du contrôle du développement neuronal peut causer de graves défauts de neurogénèse. Sans ces voies de signalisation, la neurogénèse adulte est fortement compromise (Lim et al., 2000; Lie et al., 2005; Breunig et al., 2008; Lugert et al., 2010).

La microglie, les interneurones, ainsi que les NGs matures et les cellules moussues sont également importants pour la régulation de la neurogénèse adulte, notamment par la libération de différents facteurs de croissance (VEGF, ascler endothelial growth factor; FGF-2, fibroblast growth factors -2) et neurotransmetteurs (NMDA, GABA; voir pour revues Tozuka et al., 2005; Sierra et al., 2010; Yeh et al., 2018). Ainsi, il a été montré que le GABA environnant pouvait influencer la prolifération de CGRs exprimant la nestine. La libération de GABA par des cellules en panier pourrait inhiber la prolifération symétrique et orienter les CGRs vers un état de quiescence (Song et al., 2012). Il est suggéré que l'activité des neurones GABAergiques traduisant indirectement l'activité du GD, diminuerait la prolifération des cellules souches. Comme mentionné précédemment, la réponse au GABA chez les néo-neurones immatures est une dépolarisation, ce qui permet un influx de courant calcium par des canaux calciques dépendant du voltage; à son tour l'activité du calcium augmente l'expression de *NeuroD1* (Tozuka et al., 2005) qui est crucial pour la différenciation et la survie des néo-neurones (Gao et al., 2009). Le GABA reste dépolarisant pendant les 2 premières semaines de vie du neurone, ce qui correspond approximativement au moment où les épines dendritiques se forment (Ge et al., 2006; Zhao et al., 2006). Les afférences glutamatergiques deviennent de plus en plus importantes à mesure que les néo-neurones immatures se développent. Le glutamate joue un rôle important lors de la formation de synapses excitatrices (Ye et al., 2005; Ge et al., 2007;

Treves et al., 2008) et comme décrit précédemment, l'activation par le glutamate des récepteurs NMDA est essentielle pour la survie des nouveaux neurones lors de la période critique (Tashiro et al., 2006).

La neurogénèse adulte est donc un processus hautement dynamique et complexe qui peut être régulé par un grand nombre de signaux endogènes ou exogènes. Les différents régulateurs cités précédemment ne constituent pas une liste exhaustive. De nombreuses revues peuvent compléter cette section (Ma et al., 2010; Mu et al., 2010; Kempermann, 2011; Hsieh, 2012; Faigle and Song, 2013). Dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes particulièrement intéressés au rôle joué par Rnd2, une Rho GTPase atypique.

E. Protéines Rnds et développement neuronal

Lors de ma thèse je me suis intéressé à la régulation de la neurogénèse par des protéines atypiques de la famille des Rho GTPases: les protéines Rnds. Plus particulièrement j'ai étudié le rôle joué par Rnd2 dans les différentes étapes de la neurogénèse hippocampique, principalement à l'âge adulte mais aussi au cours de la période postnatale. La partie suivante a pour objectif de décrire les protéines de la sous-famille Rnd, leur régulation et leurs fonctions, principalement au cours du développement neuronal.

1. Les GTPases de la famille Rho

a) Membres de la famille des Rho GTPases

Les protéines de la superfamille Ras sont de petites guanosine triphosphatases (GTPases) monomériques. Au sein de cette super-famille comptant plus de 150 membres, on retrouve cinq familles différentes de protéines : les familles Ras, Rab (Ras-like protein in brain), Ran (Ras-like nuclear protein), Arf (ADP-ribosylation factor) et Rho (Ras homologous) (Azzarelli et al., 2015b). En contrôlant la dynamique du cytosquelette, les GTPases de la famille Rho influencent un grand nombre de processus cellulaires, tels que la polarité cellulaire, la morphologie des cellules et le cycle cellulaire (Etienne-Manneville and Hall, 2002). Chez l'Homme, cette famille compte vingt-trois membres qui sont répartis en six sous-familles selon l'homologie de leur séquence en acides aminés: Rho (RhoA/B/C), Rac (Rac1/2/3 et RhoG), Cdc42 (Cdc42, TCL, TC10, Chp et Wrch1), Rnd (Rnd1/2/3), RhoBTB (RhoBTB1/2/3) et Miro (Miro1/2). De plus on retrouve 3 autres membres n'appartenant à aucune sous-famille, il s'agit des protéines RhoD, Rif/RhoF et TTF/RhoH (**Figure 10**) (Grise et al., 2009).

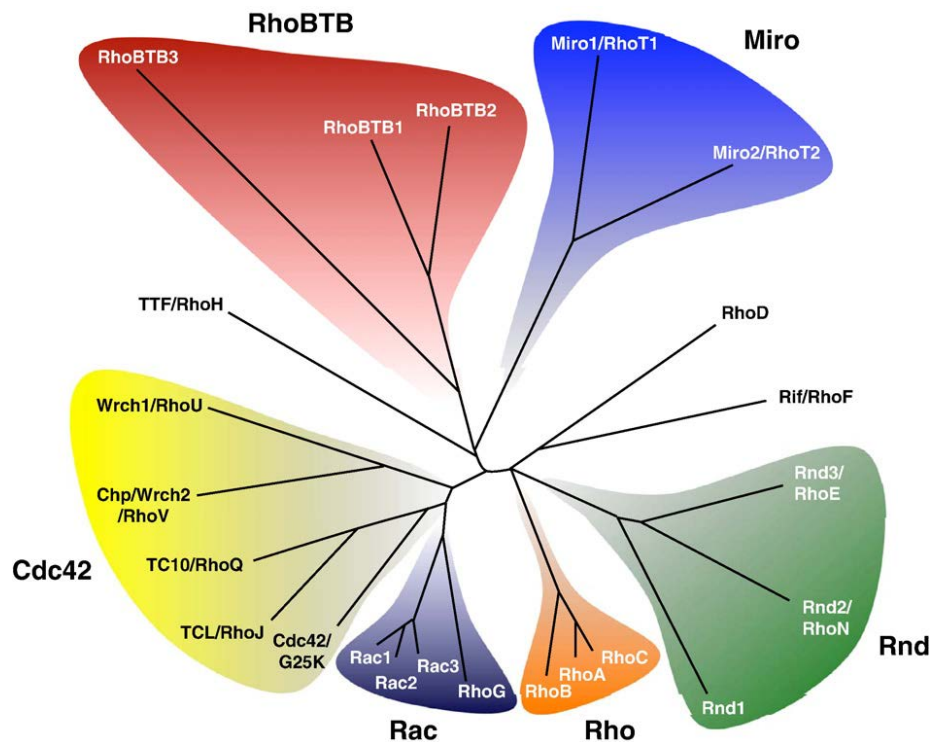


Figure 10. Arbre phylogénétique de la famille des Rho GTPases

Les 23 membres de la famille peuvent être classifiés en 6 sous-familles (Rho, Rac, Cdc42, RhoBTB, Miro et Rnd), indiquées en différentes couleurs. D'après (Grise et al., 2009).

Les membres les plus étudiés de la famille des Rho GTPases sont RhoA (Ras homologous member A, RhoA), Rac1 (Ras related C3 botulinum toxin substrate 1) et Cdc42 (cell division cycle 42). Rac1 et Cdc42 favorisent la formation de protrusions cellulaires, respectivement les lamellipodes et les filopodes. RhoA est quant à elle impliquée dans la contraction du couple actine-myosine et dans la formation de fibres de tension (Ridley, 2001).

b) Rho GTPases classiques et atypiques

Les GTPases de la famille Rho agissent comme des interrupteurs au sein de complexes multi-protéiques permettant l'intégration de signaux variés provenant principalement de récepteurs membranaires. La plupart des membres de cette famille alternent entre un état inactif lorsque lié à la guanosine diphosphate (GDP) et un état actif lorsque liée à la guanosine triphosphate (GTP). Quand elles sont liées au GTP, les Rho GTPases présentent une conformation structurale leur permettant d'interagir avec des effecteurs et initier les différentes voies de signalisation en aval (Raftopoulou and Hall, 2004). Le cycle GDP/GTP est contrôlé par deux classes de molécules, les facteurs d'échange guanidique ou GEFs (Guanine nucleotide Exchanging Factors) et les protéines activatrices de l'activité GTPasique appelées GAPs (GTPase Activating Proteins). Les GEFs facilitent l'échange de GDP avec le GTP, conduisant à l'activation protéique. A l'inverse, les GAPs stimulent l'activité enzymatique intrinsèque des GTPases, qui

favorise l'hydrolyse du GTP en GDP. L'activité des GAPs ramène donc les GTPases à leur état inactif (**Figure 11**) (Bos et al., 2007). De plus, les Rho GTPases peuvent se lier à des protéines appelées les inhibiteurs de la dissociation des nucléotides guanidiques (GDP Dissociation Inhibitors ou GDIs). Les Rho GDIs séquestrent les Rho GTPases dans un état inactif et protègent ces dernières de la dégradation (DerMardirossian and Bokoch, 2005; Boulter et al., 2010). La régulation de l'activité des Rho GTPases et de ses régulateurs est également régulée par des modifications post-traductionnelles comme par exemple la phosphorylation, l'ubiquitination et la sumoylation (Hodge and Ridley, 2016).

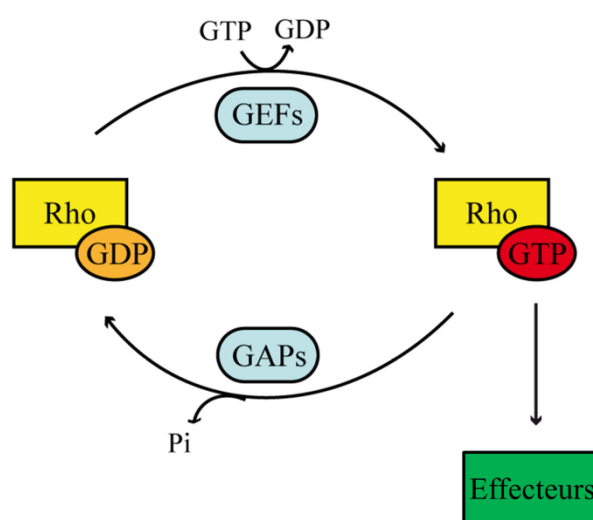


Figure 11. Le cycle de régulation des Rho GTPases classiques.

Représentation schématique du cycle de régulation des Rho GTPases classiques, qui alternent entre un état actif (lié au GTP) et un état inactif (lié au GDP). Dans leur conformation active les Rho GTPases classiques interagissent avec leurs effecteurs. Les GEFs (Guanine nucleotide Exchanging Factors) favorisent l'échange du GDP avec le GTP et les GAPs (GTPase Activating Proteins) stimulent l'hydrolyse du GTP. Adapté d'après (Azzarelli et al., 2015a).

Le cycle GDP/GTP et la régulation par les GDIs sont des propriétés communes parmi les Rho GTPases. Cependant il existe six membres au sein de la famille des Rho GTPases qui ne sont pas régulés par le cycle classique décrit précédemment. Il s'agit des protéines Rnd1, Rnd2, Rnd3, RhoH, RhoBTB1 et RhoBTB2. Ces protéines dites "atypiques" possèdent des mutations au niveau des acides aminés impliqués dans l'activité GTPasique des Rho GTPases, et sont ainsi en permanence lié au GTP donc dans un état actif (Riou et al., 2010). La régulation de l'activité de ces protéines ne fait pas intervenir les GEFs et GAPs, mais à lieu au niveau transcriptionnel ou post-traductionnel.

Les protéines Rnds constitue une sous famille des Rho GTPases constituée de trois membre chez l'humain: Rnd1/Rho6, Rnd2/Rho7 /RhoN et Rnd3/Rho8/RhoE. La protéine Rnd3 a été identifiée pour la première fois pour sa capacité d'interaction avec p190RhoGAP, une GAP de

RhoA (Foster et al., 1996). Rnd1 et Rnd2 ont quant à elles été clonées lors de la recherche de gènes ayant une homologie pour le domaine effecteur de RhoA.

De même que le reste de la famille des Rho GTPases, il a été montré que les protéines Rnds jouaient un rôle prépondérant dans le contrôle du cytosquelette d'actine (Chardin, 2006a). Cependant, leur apparition relativement récente lors de l'évolution indique qu'elles pourraient être impliquées dans des fonctions sophistiquées ou spécialisées du cytosquelette, par exemple dans la plasticité neuronale. Les protéines Rnds ont été trouvées uniquement chez les vertébrés – les mammifères, les oiseaux, la grenouille (*Xenopus laevis*) et les poissons – mais aucun orthologue des Rnds n'a été trouvé chez les ascidiens, mouches et nématodes. Par contraste, Rho, Rac et Cdc42 sont présents chez le ver *Caenorhabditis elegans*, la drosophile (*Drosophila melanogaster*), au sein de plantes et de levures (Chardin, 2006a).

c) Rho GTPases et neurogénèse adulte hippocampique

Jusqu'à ce jour, seul le rôle des trois Rho GTPases les plus connues (RhoA, Rac1 et Cdc42) a été étudié dans le cadre de la neurogénèse adulte hippocampique. Il a été montré *in vitro* qu'il existait une relation inverse entre l'activité de RhoA et la différenciation en nouveaux neurones (Keung et al., 2011). Cependant, il est possible que ces effets sur la différenciation neuronale soient dus à un effet de RhoA sur la survie des néo-neurones et non sur la différenciation en elle-même. En effet les travaux de Christie et al. montrent qu'un blocage pharmacologique de la voie de signalisation de RhoA *in vivo*, induit une augmentation de la survie neuronale au sein du GD adulte, sans altérer la différenciation neuronale (Christie et al., 2013). Une autre étude a pu mettre en évidence les fonctions de Cdc42 et Rac1 dans des étapes spécifiques de la neurogénèse adulte du GD. En effet, il a été montré que Cdc42 est impliquée dans la régulation de la prolifération ainsi que dans la maturation des dendrites et des épines, tandis que Rac1 semble important pour des étapes plus tardives de la maturation dendritique et des épines (Vadodaria et al., 2013). Ensemble ces résultats suggèrent que Cdc42 et Rac1 sont impliquées dans la prolifération et/ou la maturation des dendrites et des épines, alors que RhoA semble inhiber la survie des néo-neurones.

2. Structure et expression des protéines Rnds

a) Structure

La majorité des GTPases de la superfamille Ras est constituée d'un seul domaine principal qui se lie au GDP ou GTP, et sa structure est grandement conservée chez la plupart des membres de la famille. Cependant, chaque membre possède de courtes extensions spécifiques aux extrémités N- et C-terminales du domaine principal qui contribuent à leur localisation cellulaire spécifique. Les protéines Rnds sont également constituées de ce domaine principal de liaison au GTP dont la structure est similaire à celle des Rho (Nobes et al., 1998; Fiegen et al., 2002; Garavini et al., 2002). Cependant, elles possèdent des substitutions au niveau des positions importantes pour l'activité GTPasique. Ces quelques différences changent dramatiquement leurs propriétés biochimiques. Ainsi, contrairement au reste des petites GTPases, les protéines Rnds ne fonctionnent pas comme des "interrupteurs" qui alternent entre deux états liés au GDP ou au GTP. Notamment les protéines Ras présentent une glycine (Gly) en position 12 de leur séquence d'acides aminés et une glutamine (Gln) en position 59 et 61; la plupart des substitutions à ces positions mènent à une perte de la capacité d'hydrolyse du GTP. Les protéines Rnds ont naturellement une valine (Val), une alanine (Ala) ou une sérine (Ser) à la place de ce qui correspond à la Gly12 et une Ser à la position correspondant aux Gln59 et Gln61. Ces substitutions impliquent donc que les protéines Rnds ne possèdent pas ou peu d'activité GTPasique, ce qui a été confirmé pour Rnd1 et Rnd3 mais qui reste à être montré pour Rnd2 (Nobes et al., 1998). Ces propriétés impliquent également que les mutants "dominant negative" (liés au GDP) et "constitutively active" (liés au GTP) généralement utilisés pour l'étude des Rho GTPases classiques ne sont pas utiles pour l'étude des protéines Rnds.

Au niveau du domaine de l'extrémité C-terminale on retrouve la région hyper variable (hyper variable region, HVR). Cette HVR peut être constituée de régions polybasiques ou de sites de palmitoylation qui sont impliqués dans l'adressage des GTPases vers les membranes plasmiques ou les compartiments endomembranaires. Enfin en position C-terminale de la HVR on retrouve le motif CAAX (C, cystéine; A, Aliphatic Amino acid; X, un acide aminé terminal quelconque) qui contient des résidus cystéine cruciaux pour la prénylation, favorisant l'interaction avec les membranes cellulaires et permettant de définir la localisation vers les compartiments spécifiques de chaque protéine Rnd (**Figure 12**) (Roberts et al., 2008). Cette prénylation implique l'ajout d'un groupement lipidique farnésyl au niveau des Rnds alors qu'un groupement géranylgeranyl est ajouté sur la plupart des autres Rho GTPases.

Rho	RhoA	
	RhoB	
	RhoC	
Rac	Rac1	
	Rac2	
	Rac3	
	RhoG	
Cdc42	Cdc42	
	TC10 (RhoQ)	
	TCL (RhoJ)	
Rnd	Rnd1	
	Rnd2	
	Rnd3 (RhoE)	

Figure 12. Structure des Rho GTPases classiques et des Rnds.

Représentation schématique de la structure des sous-familles de Rho GTPases classiques Rho, Rac et Cdc42. Le domaine Rho GTPasique est représenté en bleu clair, le domaine HVR (hyper variable region) est représenté en rouge et le motif CAAX en orange. Pour la sous-famille des Rnds atypique, le domaine Rho GTPasique déficient est représenté en bleu foncé. Adapté d'après (Azzarelli et al., 2015b).

b) Expression

1) Au niveau tissulaire et cellulaire

Au sein de la sous famille des protéines Rnds, les trois membres présentent des profils d'expression bien différents. En effet il a été montré à l'aide de Northern blots réalisés à partir de tissus humains que *Rnd1* est exprimé principalement dans le cerveau et le foie, *Rnd2* dans les testicules et plus faiblement exprimé dans le cerveau, quand *Rnd3* est exprimé de manière ubiquitaire (Nobes et al., 1998).

Un examen plus précis de l'expression de *Rnd1* dans le cerveau adulte humain utilisant la technique du Northern blot a permis de mettre en évidence que les ARNm de *Rnd1* étaient fortement exprimés dans le cortex mais aussi dans une moindre mesure dans l'hippocampe (Nobes et al., 1998). A l'aide d'hybridation *in situ* sur des coupes sagittales de cerveaux de rats adultes, une forte expression de *Rnd1* dans le cortex cérébrale a été confirmée, de plus on retrouve le messenger de *Rnd1* dans l'hippocampe et plus précisément au niveau du GD. Enfin les révélations immunohistochimiques sont en accord avec les observations faites pour les hybridations *in situ* (Nobes et al., 1998).

Concernant *Rnd2*, des études réalisées chez le rat ou la souris adultes montrent que cette Rnd est exprimée au niveau du cortex, de l'hippocampe ou encore du striatum à la fois au

niveau des ARNm et des protéines (Nishi et al., 1999; Decourt et al., 2005). De façon intéressante dans le contexte de la neurogenèse adulte, il a été montré que *Rnd2* est particulièrement enrichi dans la ZSG et la partie interne de la CG du GD (Miller et al., 2013). Enfin *Rnd3* dans le cerveau adulte est particulièrement exprimé, chez la souris, dans le cortex et le bulbe olfactif mais aussi plus faiblement au niveau de l'hippocampe (Ballester-Lurbe et al., 2009).

Les protéines Rnds sont donc exprimées dans le cerveau à l'âge adulte mais aussi lors du développement (Nobes et al., 1998; Ishikawa et al., 2003; Decourt et al., 2005; Heng et al., 2008; Ballester-Lurbe et al., 2009; Pacary et al., 2011). De plus au niveau cellulaire, plusieurs études ont pu mettre en évidence que les 3 membres de cette sous-famille étaient effectivement exprimés dans des neurones du SNC. En particulier des travaux *in vitro* montrent que les Rnds sont exprimées dans les neurones hippocampiques et/ou corticaux (Ishikawa et al., 2003; Pacary et al., 2011)

2) Au niveau subcellulaire

Les protéines Rnds sont toujours présentes dans la conformation active, capable de se lier à leur effecteur. Puisque leur activité n'est pas affectée par l'échange entre le GDP et le GTP, d'autres mécanismes sont mis en jeu pour la régulation de leur activité (Riou et al., 2010). Par exemple, leur localisation dans les compartiments sous-cellulaires joue un rôle primordial dans le contrôle des fonctions des Rnds. Lors de la première description de *Rnd3*, Foster et collègues ont identifié la localisation de *Rnd3* au niveau de la membrane plasmique par fractionnement cellulaire de fibroblastes, ainsi qu'une expression diffuse dans le cytoplasme par des marquages immunocytochimiques au sein de cellules d'ostéosarcome (Foster et al., 1996). Egalement par révélations immunocytochimiques, il a été montré que *Rnd1* est aussi exprimée au niveau de la membrane plasmique et colocalise avec la cadhérine, au sein de fibroblastes (Nobes et al., 1998). Leur localisation au niveau de la membrane plasmique a été confirmée par plusieurs études montrant notamment l'interaction de *Rnd1* et *Rnd3* avec les radeaux lipidiques ou lipid rafts (Oinuma et al., 2012), avec les récepteurs transmembranaires plexines (Oinuma et al., 2003; Azzarelli et al., 2014; McColl et al., 2016) ou encore une interaction de *Rnd3* avec le domaine intracellulaire de Notch (Lin et al., 2013). Dans les neurones corticaux en culture, *Rnd3* est également préférentiellement localisé au niveau de la membrane plasmique (Pacary et al., 2011). *Rnd1*, dans des cultures de neurones hippocampiques, est également enrichi au niveau de la membrane plasmique en particulier sous forme de « puncta » à proximité ou au niveau des épines dendritiques (Ishikawa et al., 2003).

Contrairement aux deux autres membres de la sous famille des Rnd, Rnd2 ne semble pas être associée à la membrane plasmique mais d'avantage aux endosomes (Roberts et al., 2008). La première évidence supportant cette idée fût apportée par une étude montrant que Rnd2 interagit avec une protéine impliquée dans le trafic des vésicules endosomales, la protéine Vps4-A (vacuolar protein sorting 4-A; Tanaka et al., 2002). Une autre étude a montré au sein de neurones corticaux en culture, que l'expression de la protéine Rnd2 colocalise avec EEA1 (early endosome antigen 1), un marqueur spécifique des endosomes précoces, et non avec le récepteur à la transferrine (TfR), Rab7 et LAMP-1, marqueurs respectivement des endosomes de recyclage, tardifs et lysosomes (Pacary et al., 2011).

L'efficacité de l'association des Rnds à la membrane plasmique ou endomembrane est déterminée non seulement par la présence du motif CAAX, sur lequel un groupement farnésyl est ajouté, mais également par des éléments de séquence positionnés directement en amont. Par exemple, Rnd2 et Rnd3 possèdent des motifs CAAX similaires mais des séquences en amont distinctes qui sont responsables de leurs localisations différentielles. De manière intéressante, le remplacement du domaine C-terminal de Rnd2, contenant le motif CAAX et la séquence en amont, par celui de Rnd3, est suffisant pour recruter Rnd2 au niveau de la membrane plasmique (Pacary et al., 2011). Ces études montrent l'importance du domaine C-terminal, cependant de nombreuses évidences supportent l'idée que la région N-terminale joue également un rôle dans la localisation cellulaire. En effet, une séquence spécifique à l'extrémité N-terminale de Rnd1 et Rnd3, favorise leur adressage vers des régions spécialisées de la membrane, les radeaux lipidiques (Oinuma et al., 2012).

3. Régulation des protéines Rnds

a) Régulation transcriptionnelle

L'activité des protéines Rnds peut être régulée par leur localisation au sein des différents compartiments cellulaires, elle peut également être régulée au niveau de leur transcription. Ainsi, lors du développement du cortex cérébral, Rnd2 et Rnd3 sont sous le contrôle de facteurs de transcription pro-neuronaux qui augmente leur expression afin de contrôler les différentes étapes de la migration neuronale. En effet les facteurs Neurog2 et Ascl1 se lient directement aux séquences ADN "enhancer" des régions promotrices de *Rnd2* et *Rnd3*, respectivement (Heng et al., 2008; Pacary et al., 2011). De plus, les niveaux d'expression de *Rnd2* dans le cerveau au cours du développement sont finement régulés par l'activité du facteur de transcription COUP-TF1, qui se lie également à une séquence spécifique du promoteur de Rnd2 et réprime son expression

(Alfano et al., 2011). RP58 et Scratch2 répriment également l'expression de *Rnd2* dans le cerveau en développement (Azzarelli et al., 2015a).

De nombreux autres facteurs de transcription et stimuli sont capables de réguler l'expression des trois Rnds, une liste non exhaustive de ces facteurs est présentée dans la revue publiée par Azzarelli et collègues (Azzarelli et al., 2015a). Pour exemple et de façon intéressante, il a été montré que les niveaux d'expression de *Rnd2* et *Rnd3* sont modifiés par l'administration de cocaïne et de 3,4-méthylènedioxyméthamphétamine (MDMA; (Marie-Claire et al., 2007) suggérant que ces Rho GTPases pourraient jouer un rôle dans le remodelage neuronal du cerveau adulte. D'autre part *Rnd3* a été principalement étudié dans le cadre de la recherche sur le cancer et de nombreux régulateurs de son expression ont été identifiés. Par exemple il a été montré que les modifications d'expression de *Rnd3* en réponse aux agents chimiothérapeutiques était médiées par p53 qui interagit spécifiquement avec le promoteur de *Rnd3* (Ongusaha et al., 2006). D'autres mécanismes entraînent des changements dans l'expression de *Rnd3* au sein de tissus cancéreux, par exemple l'induction de *Rnd3* est liée au facteur de transcription NF- κ B (nuclear factor-kappa B) dans le cancer de la prostate (Nadiminty et al., 2009). De plus il est suggéré que la voie de signalisation de mTOR soit responsable de l'augmentation de l'expression de *Rnd3* dans les astrocytomes sous-épendymaires à cellules géantes, de rares tumeurs du cerveau (Tyburczy et al., 2010).

b) Modifications post-traductionnelles

Les Rnds subissent également des modifications post-traductionnelles qui influencent leur localisation cellulaire et leur stabilité protéique, deux processus cruciaux dans la régulation de leur fonction. La plupart des Rho GTPases sont modifiées au niveau de leur extrémité C-terminale par l'ajout de groupements lipidiques qui facilitent l'interaction avec les membranes (Seabra, 1998). Les Rnds subissent généralement une prénylation par un ajout d'un groupe farnésyl au niveau du motif CAAX de l'extrémité C-terminale. L'inhibition de la farnésyltransférase conduit à une perte de la localisation membranaire ainsi qu'une accumulation au niveau cytoplasmique et nucléaire (Roberts et al., 2008). De plus la phosphorylation de *Rnd3*, à cette extrémité C-terminale mais aussi N-terminale, influence la localisation de *Rnd3* à la membrane plasmique.

De manière générale, les membres de la sous famille Rnd sont sujets à la phosphorylation. En particulier, *Rnd3* peut être phosphorylée par ROCK1 (rho-associated, coiled-coil-containing protein kinase 1) ou PKC α (protein kinase C α) en de nombreux sites (Riento et

al., 2005; Komander et al., 2008; Madigan et al., 2009). Après phosphorylation, l'affinité de Rnd3 pour la membrane plasmique est réduite et sa fraction cytosolique augmente. La phosphorylation de Rnd3 contrôle à la fois sa localisation cellulaire et sa stabilité, 2 événements qui influencent la fonction biologique de Rnd3. En effet, la régulation de la stabilité et du recyclage des protéines Rnds constitue un mécanisme additionnel de contrôle du niveau d'expression des Rnds. Une étude récente a démontré que l'interaction de Rnd3 avec ses effecteurs augmentait sa stabilité et protégeait Rnd3 de la dégradation (Goh and Manser, 2012). Bien qu'il fût longtemps considéré que Rnd3 était le seul membre à pouvoir être phosphorylé, il a été récemment montré *in vitro* que Rnd1 et Rnd2 pouvaient également l'être (Riou et al., 2013). Dans cette étude les protéines 14-3-3 ont été identifiées comme un partenaire de Rnd3. En particulier il est mis en évidence que la phosphorylation de Rnd3 par ROCK1 permettait sa liaison aux protéines 14-3-3, et que ces dernières inhibaient l'activité de Rnd3 notamment en induisant la translocation de cette dernière depuis la membrane plasmique vers le cytosol. Ensemble, la variété des facteurs contrôlant l'expression des protéines ainsi que leur localisation cellulaire révèle un mécanisme complexe de régulation de l'activité des Rnds.

4. Les fonctions biologiques des protéines Rnds

Les protéines Rnds interagissent avec un grand nombre de partenaires, permettant la régulation d'une large variété fonctions biologiques dans différents tissus et différents types cellulaires (voir pour revues (Chardin, 2006a; Riou et al., 2010; Azzarelli et al., 2015a). Toutefois il faut noter que les fonctions et les voies de signalisation en aval de Rnd3 et Rnd1 ont été bien décrites alors que celles régulées par Rnd2 restent floues.

a) Fonctions des Rnds dans les cellules non-neuronales

1) Régulation du cytosquelette d'actine

Les fonctions des Rnds ont été étudiées dans plusieurs types cellulaires – notamment dans les fibroblastes et les cellules épithéliales – et de ces études s'est dégagé un rôle clair des protéines Rnds dans le contrôle du cytosquelette d'actine. Dans les fibroblastes, un traitement à l'acide lysophosphatidique (LPA) induit une formation rapide de faisceaux d'actine-myosine appelés fibres de tension, médiateurs majeurs de la contraction cellulaire. Cependant, l'expression de Rnd1 inhibe la formation de ces fibres de tension en réponse à la stimulation par le LPA (Nobes et al., 1998). L'expression de Rnd1 induit également une perte des adhérences focales qui ancrent les fibres de tensions à la matrice extracellulaire. Les cellules ayant perdu leurs adhérences focales ne peuvent s'étendre, et tendent à s'arrondir. La surexpression de Rnd1

et de Rnd3 dans des fibroblastes en culture conduisent à la perte des adhérences focales et à l'arrondissement des cellules, d'où le nom de la sous-famille Rnd pour "round" (Foster et al., 1996; Nobes et al., 1998). Ce phénotype est donc le résultat de l'inhibition de la formation des fibres de tension par Rnd1 et Rnd3. L'influence de ces deux membres de la famille Rnd sur le cytosquelette d'actine est médiée notamment par inhibition de la voie de signalisation de RhoA, bien connue pour induire l'assemblage des fibres de tension. En particulier il a été montré que Rnd1 et Rnd3 interagissent avec p190RhoGAP, augmentant son activité GAP, réduisant ainsi les niveaux de RhoA-GTP (Wennerberg, 2005). Au contraire de Rnd1 et Rnd3, l'expression de Rnd2 dans les fibroblastes ne module pas la réorganisation du cytosquelette et son interaction avec p190RhoGAP est très faible voire inexistante (Wennerberg et al., 2003). Il semble que Rnd2, plutôt que d'inhiber, induise la réorganisation du cytosquelette dépendante de RhoA, notamment en interagissant avec la prégénérine (Tanaka et al., 2006). Il n'est cependant pas encore clair comment la prégénérine affecte la voie de signalisation de RhoA.

Outre l'interaction avec p190RhoGAP, il a été montré que Rnd3 pouvait inhiber la voie de signalisation RhoA en se liant directement à ROCK1, le principal effecteur de RhoA, et bloquer ainsi son activité (Riento et al., 2005) mais aussi en inhibant des RhoGEFs telle que Syx (Goh and Manser, 2012). Rnd1 ne se lie pas à ROCK1, il semble donc que son interaction avec p190RhoGAP soit son principal moyen d'action pour réguler la voie de signalisation de RhoA. De manière intéressante, ROCK1 peut phosphoryler p190RhoGAP qui réduit sa liaison à Rnd1, un moyen pour RhoA de prévenir sa propre inhibition par Rnd1 (Mori et al., 2009).

Un autre exemple de l'importance du rôle des Rnds dans la régulation de la dynamique du cytosquelette est l'implication de Rnd3 dans la sensibilité des cellules aux forces physiques et tensions mécaniques provenant de l'environnement des cellules. Il a été récemment montré que la voie MAL/SRF (myocardin-related transcription factor A/serum response factor) régule l'expression de Rnd3, qui en retour affecte l'activité de cette voie de mécanotransduction. Notamment il est montré que des processus de mécanosensitivité tels que l'étalement cellulaire et la formation de sphéroïdes sont dépendants de Rnd3 (Piquet et al., 2018).

Les effets de Rnd1 et Rnd3 sur la contractilité de l'actine et la myosine sont également importants pour les cellules musculaires, notamment pour relaxation musculaire (Cario-Toumaniantz et al., 2003). Plusieurs études impliquent Rnd3 dans la motilité des cellules cancéreuses. Rnd3 contribue à l'invasion des cellules cancéreuses par ses effets sur l'activité Rho/ROCK, mais les conséquences vont dépendre du type cellulaire et des modèles d'études. D'une part, l'augmentation de l'activité de Rnd3 par B-Raf, un oncogène, semble favoriser

l'invasion cellulaire en réduisant l'activité de Rho/ROCK (Klein and Aplin, 2009). D'autre part, l'induction de Rnd3 par p53 est liée à l'inhibition de ce phénomène et une perte de p53 promeut l'invasion cellulaire des fibroblastes et des cellules de mélanomes par une augmentation de l'activité de la voie Rho/ROCK (Gadea et al., 2007).

2) Régulation du cycle cellulaire et de la survie

Les fonctions biologiques des Rnds ne sont pas restreintes au réarrangement du cytosquelette, elles incluent également le contrôle de la prolifération et la survie cellulaire par le biais de mécanismes indépendant de la voie de signalisation de RhoA. Par exemple il a été montré que Rnd3 inhibe la progression du cycle cellulaire dans les fibroblastes, par un mécanisme qui implique l'inhibition de la traduction de la cycline D1, un régulateur important de l'entrée en phase S du cycle cellulaire (Villalonga et al., 2004, 2009). La diminution de l'expression de la cycline D1 prévient la phosphorylation de la protéine du rétinoblastome et ainsi inhibe l'activation des facteurs de transcription E2F qui sont nécessaire à l'entrée en phase S (Poch et al., 2007). Dans des cellules dérivées de cancer de la prostate, la surexpression de Rnd3 inhibe l'expression de CDC2 (homologue humain de Cdk1) et de la cycline B1, ce qui entraîne un arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M (Bektic et al., 2005). Ces études tendent à montrer que Rnd3 peut agir comme un gène suppresseur de tumeur.

En plus d'inhiber la progression du cycle cellulaire, Rnd3 peut moduler la survie cellulaire et l'apoptose. En effet, une réduction de l'expression de Rnd3 augmente l'apoptose en réponse à des agents génotoxique ou l'exposition aux UV (Ongusaha et al., 2006; Boswell et al., 2007) et une hausse de l'expression de Rnd3 améliore la résistance des cellules gastriques à différents traitement anti-tumoraux (Li et al., 2009a), ce qui corrèle avec une inhibition post-transcriptionnelle de la protéine pro-apoptotique Bax. Il est également supposé que Rnd3 augmente la survie des cellules d'ostéosarcome en inhibant l'activité de ROCK, qui est capable d'induire l'apoptose au sein de ce type de cellules (Ongusaha et al., 2006). Comme noté précédemment, l'expression de Rnd3 est induite par des agents endommageant l'ADN, ce qui suggère que Rnd3 puisse contribuer à l'arrêt du cycle cellulaire nécessaire à la réparation de l'ADN et inhiber la mise en place du processus de mort cellulaire programmée. Cependant dans certains types cellulaires, Rnd3 mène à l'apoptose (Bektic et al., 2005; Poch et al., 2007). Bien que ce mécanisme ne soit pas encore bien compris, une possibilité est que le détachement cellulaire induit par Rnd3 réduise la voie de signalisation liée à l'adhésion cellulaire médiée par les intégrines, ce qui conduirait à l'apoptose par anoïkose (Chiarugi and Giannoni, 2008).

b) Fonctions des Rnds dans le développement neuronal

Les protéines Rnds sont hautement exprimées dans le cerveau, à l'âge adulte comme lors du développement. Plusieurs études ont montré qu'elles affectent des aspects multiples du développement neuronal, par des effets directs sur la voie de signalisation Rho/ROCK et/ou par une interaction avec les plexines.

1) Rnds et progéniteurs neuronaux

Dans le cadre du développement du cortex cérébral (Azzarelli et al., 2015a), il a été montré que Rnd3 joue un rôle crucial lors des étapes précoces de la neurogénèse (Pacary et al., 2013). La diminution de l'expression de Rnd3 *in vivo* dans le cortex embryonnaire altère les jonctions adhérentes qui maintiennent les CGRs attachées les unes aux autres. En conséquence les CGRs perdent leurs contacts apicaux et se détachent prématurément de la zone ventriculaire (ZV). De plus, les progéniteurs apicaux dans lesquels l'expression de Rnd3 est réduite, présentent un mouvement nucléaire retardé lors de la migration nucléaire intercinétique et une orientation anormale de leur plan de division cellulaire (Pacary et al., 2013). Ensemble ces effets contribuent à la perturbation de l'organisation de la ZV et à une distribution anormale des cellules progénitrices en dehors de la ZV. Les effets de Rnd3 sur les jonctions adhérentes, la migration nucléaire intercinétique et le plan de division cellulaire sont médiés par son action sur le cytosquelette d'actine et l'inhibition de RhoA (Pacary et al., 2013). Au-delà de son rôle dans les progéniteurs apicaux, Rnd3 contrôle directement la prolifération des progéniteurs basaux. En effet, Rnd3 limite la prolifération de cellules exprimant Tbr2 dans la ZSV et la zone intermédiaire, par un mécanisme indépendant du cytosquelette d'actine mais par l'inhibition de l'expression de la cycline D1 (Pacary et al., 2013). Ce mécanisme rappelle celui décrit précédemment dans d'autres types cellulaires, ce qui suggère que la fonction de Rnd3 dans la régulation du cycle cellulaire est conservée. Cette étude *in vivo* indique que Rnd3 est non seulement importante pour la prolifération des progéniteurs mais également pour le maintien d'une niche appropriée au développement des précurseurs corticaux. A l'inverse, une diminution de l'expression de *Rnd2* dans le cortex embryonnaire n'affecte pas la prolifération des progéniteurs neuronaux (Heng et al., 2008).

2) Rnds et migration neuronale

Le rôle des protéines Rnds dans la migration cellulaire est un sujet couvert par de nombreux travaux, notamment l'importance de Rnd3 dans la motilité des cellules cancéreuses est une fonction bien caractérisée (Klein and Aplin, 2009). Concernant les neurones, seuls Rnd2 et Rnd3 ont été décrits comme régulateurs de la migration et ce dans le contexte du développement du

cortex cérébral. Des études ont en effet mis en évidence que Rnd2 et Rnd3 sont essentiels au processus de migration radiaire des neurones de projection glutamatergiques (Nakamura et al., 2006; Heng et al., 2008; Pacary et al., 2011). Dans ces études, une diminution de l'expression de *Rnd2* ou *Rnd3*, induite par électroporation *in utero* du cortex embryonnaire avec des shRNA, cause de sévères déficits de migration radiaire. Rnd2 et Rnd3 contrôlent différentes étapes de ce processus, respectivement la transition multipolaire-bipolaire et la locomotion dans la plaque corticale.

Dans ces études les auteurs démontrent, comme mentionné précédemment, que l'expression de *Rnd2* et *Rnd3* est sous le contrôle des facteurs de transcription pro-neuronaux Neurog2 et Ascl1 respectivement (Heng et al., 2008; Pacary et al., 2011). De façon intéressante, une délétion de ces facteurs proneuronaux induit également des défauts de migration (Hand et al., 2005; Heng et al., 2008; Pacary et al., 2011), migration qui peut être restaurée par une surexpression de la Rnd cible, indiquant que Rnd2 et Rnd3 sont des effecteurs majeurs médiant l'activité pro-migratoire de Neurog2 et Ascl1 respectivement (Heng et al., 2008; Pacary et al., 2011).

Par ailleurs, Rnd2 et Rnd3 régulent le processus de migration radiaire en inhibant RhoA, mais ceci dans différents compartiments subcellulaires, dans les endosomes et à la membrane plasmique respectivement (Pacary et al., 2011). De ce fait les défauts de migration induits par une diminution de l'expression de *Rnd2* ne peuvent pas être restaurés par une surexpression de Rnd3 et vice versa, Rnd2 et Rnd3 ne sont donc pas interchangeables (Pacary et al., 2011). La compartimentation sous cellulaire des voies de signalisation des Rnds est donc primordiale pour leur fonction. Ainsi, un mutant de Rnd3 capable de s'associer plus facilement à la membrane plasmique (*Rnd3^{Alla}*, une forme de Rnd3 ne pouvant être phosphorylée), est plus efficace pour promouvoir la migration radiaire (Pacary et al., 2011). Bien que Rnd2 et Rnd3 ne puisse se substituer l'un à l'autre, une forme chimérique de Rnd2 qui présente une localisation à la membrane plasmique similaire à celle de Rnd3, peut compenser la perte de Rnd3 (Pacary et al., 2011). Enfin il a été montré, dans les neurones corticaux en migration, que Rnd3 inhibe RhoA via p190RhoGAP alors que les mécanismes sous-tendant l'inhibition de RhoA par Rnd2 reste inconnus (Pacary et al., 2011). De plus, il est important de préciser que les effets de Rnd2 dans les neurones en migration ne sont médiées qu'en partie par RhoA (Pacary et al., 2011), les autres voies de signalisation impliquées sont elles aussi méconnues.

Une autre étude a également exploré plus en profondeur le mode d'action de Rnd3 dans la migration neuronale, notamment en relation avec les stimuli extracellulaires. Dans cette étude

il a été montré que la plexine B2, un récepteur des sémaphorines, interagit physiquement et fonctionnellement avec Rnd3 et stimule l'activité de RhoA lors de la migration corticale (Azzarelli et al., 2014). Plus particulièrement, il a été mis en évidence que le récepteur plexine B2, d'une part, entre en compétition avec p190RhoGAP pour se lier à Rnd3 – bloquant ainsi l'inhibition de RhoA dépendante de Rnd3 – et d'autre part, recrute des RhoGEFs qui stimulent l'activité de RhoA. Ainsi, une interaction entre la voie de signalisation extracellulaire des sémaphorines-plexines et la voie intracellulaire Ascl1-Rnd3, détermine le niveau approprié d'activité de RhoA pour la migration des neurones corticaux.

3) Rnds et maturation morphologique

Neurites

Les Rho GTPases et les Rnds sont des régulateurs centraux de la morphologie neuronale (Govek et al., 2005; Azzarelli et al., 2015a). Avant d'établir un axone et des dendrites, les neurones présentent de courts prolongements appelés neurites. La croissance des neurites, de même que la formation de l'axone et des dendrites nécessitent un contrôle précis et dynamique du cytosquelette (Dotti et al., 1988; Dotti and Banker, 1991). La plupart des études explorant le rôle des Rho GTPases dans la formation des prolongements neuronaux ont été réalisées en culture cellulaire, avec des neurones hippocampiques, corticaux ou avec des cellules PC12, une lignée cellulaire dérivée de phéochromocytomes de rat (Chardin, 2006a; Riou et al., 2010).

RhoA est connue pour son rôle inhibiteur sur la croissance des neurites (Govek et al., 2005). Un blocage de l'activité de RhoA conduit à une augmentation du nombre et de la longueur des neurites de cellules PC12 (Jeon et al., 2012). Les Rnds jouent également un rôle central dans la régulation de la dynamique des neurites en contrôlant l'activation de RhoA. En particulier, Rnd1 et Rnd3 favorise l'extension des neurites chez les cellules PC12, en diminuant l'activation de la voie RhoA/ROCK1 (Aoki et al., 2000; Talens-Visconti et al., 2010). A l'inverse, Rnd2 inhibe la croissance des neurites induite par du NGF (nerve growth factor) au sein des cellules PC12, en inhibant partiellement l'activité de RhoA (Tanaka et al., 2006). Des résultats similaires ont été obtenus en culture primaire de neurones corticaux où Rnd2 inhibe la croissance de neurites et Rnd3 la favorise (Pacary et al., 2011).

Les fonctions des protéines Rnds dans la régulation de la morphologie neuronale ont aussi été étudiées *in vivo* une fois encore dans le contexte du développement du cortex cérébral. Des neurones pyramidaux naissants électroporés avec un shRNA dirigé contre *Rnd2* possèdent au stade multipolaire dans la zone intermédiaire davantage de prolongements et ceux-ci sont plus longs (Heng et al., 2008). Concernant les neurones corticaux déficients pour *Rnd3*, ils

présentent une morphologie aberrante dans la plaque corticale au stade bipolaire avec un élargissement de la région proximale du "leading process" qui est excessivement ramifiée (Pacary et al., 2011).

Dendrites et épines

Le rôle des Rnds n'est pas limité aux étapes précoces de l'initiation des neurites, les Rnds régulent également la maturation des dendrites et des épines. Par exemple, Rnd1 en inhibant RhoA est essentiel pour la ramification dendritique (Ishikawa et al., 2003) et les trois membres Rnds favorisent la morphogenèse des épines dans les neurones hippocampiques (Fujita et al., 2002; Ishikawa et al., 2003; Svitkina et al., 2010; Wakita et al., 2011). En particulier, la fonction de Rnd2 nécessite l'interaction avec un effecteur appelé rapostline. Le mécanisme sous-jacent de l'activité de Rnd2-Rapostline implique une invagination de la membrane et le trafic d'endosomes (Wakita et al., 2011). Cette étude révèle que les protéines Rnds ne régulent pas uniquement la dynamique de l'actine mais peuvent également contrôler le remodelage de la membrane plasmique par endocytose et ceci semble surtout vrai pour Rnd2.

Axone

Les Rnds affectent également l'extension et le guidage de l'axone par des mécanismes variés qui influencent l'assemblage de l'actine et la stabilité des microtubules. Par exemple, Rnd3 favorise la croissance de l'axone et son extension par le biais de la voie RhoA/ROCK1/LIMK/cofiline qui en définitive contrôle les niveaux d'actine filamenteuse (Peris et al., 2012). De son côté Rnd1 induit l'extension de l'axone en stimulant la déstabilisation des microtubules en agissant via SCG10 (superior cervical ganglion 10; Li et al., 2009b). A l'inverse de Rnd1 et Rnd3, il a été montré que Rnd2 inhibe l'élongation de l'axone au sein de neurones corticaux (Uesugi et al., 2009). Plus précisément, Rnd2, en se liant à la plexine D1, est nécessaire à l'inhibition de la croissance axone induite par Sema3E/Plexin-D1 (Uesugi et al., 2009).

De manière générale, les récepteurs transmembranaires plexines sont les partenaires des Rnds les mieux caractérisés dans le contrôle de l'élongation et le guidage de l'axone. En effet, il a été mis en évidence que les Rnds font partie de la voie de signalisation en aval des plexines qui ultimement induit l'effondrement du cône de croissance (Püschel, 2007; Tong et al., 2007).

Pour conclure il est important de préciser que seuls des mutants pour Rnd3 ont été générés à l'heure actuelle (Mocholí et al., 2011; Lin et al., 2013 p.3). La génération de mutants, en particulier conditionnels devraient permettre d'étendre nos connaissances quant aux fonctions des Rnds *in vivo* en particulier dans les neurones.

Chapitre II. Objectifs de la thèse

Dans la plupart des structures cérébrales, les neurones sont générés lors de l'embryogenèse. En ce qui concerne le GD, la majorité des NGs de la CG est générée en période postnatale et ce processus est maintenu au cours de la vie adulte de nombreux mammifères. La découverte d'une neurogénèse dans l'hippocampe adulte a suscité un grand intérêt en raison de l'implication de cette structure cérébrale dans les fonctions mnésiques et émotionnelles. De plus, de nombreux travaux ont pu démontrer l'importance fonctionnelle des néo-neurones, en particulier dans des processus cognitifs tels que la discrimination de contextes proches, ainsi que dans la régulation de l'humeur (Toda et al., 2018). Ainsi, en raison du rôle clé de la néo-neurogénèse dans la physiologie et la physiopathologie de la FH, la compréhension des mécanismes qui président le développement et l'intégration des néo-neurones dans le réseau est capitale. Dans cette perspective, notre travail s'est concentré sur l'étude des Rho GTPases, connues pour leur rôle majeur dans la régulation du cytosquelette mais dont le rôle lors de la neurogénèse adulte a été très peu abordé (Vadodaria and Jessberger, 2013). Notre intérêt pour les Rho GTPases s'appuie sur le fait que la génération d'un neurone fonctionnel à l'âge adulte, tout comme lors du développement, est un processus finement orchestré nécessitant un remodelage constant et précis du cytosquelette. Ainsi ces Rho GTPases pourraient jouer un rôle essentiel dans la genèse de nouveaux neurones. Plus particulièrement nous nous sommes intéressés à Rnd2/Rho7/RhoN, un membre de la sous famille des Rnds. Les protéines Rnds sont des Rho GTPases atypiques dont l'activité ne dépend pas du cycle de liaison au GDP/GTP et sont donc constamment liées au GTP (Riou et al., 2010). De manière intéressante, parmi les Rho GTPases, seules *Rnd2* et *TC10* sont spécifiquement enrichis dans la ZSG et la partie interne de la CG de souris adultes, indiquant un rôle potentiellement central dans le développement de nouveaux neurones au sein du GD adulte (Miller et al., 2013).

Au vu des fonctions de Rnd2 lors de la neurogénèse développementale (Fujita et al., 2002; Tanaka et al., 2006; Heng et al., 2008; Pacary et al., 2011) et de son expression spécifique au niveau de la ZSG du GD à l'âge adulte, nous avons émis l'hypothèse selon laquelle Rnd2 pourrait jouer un rôle prépondérant dans la neurogénèse adulte hippocampique. Les objectifs principaux de ce projet de thèse ont donc été de 1) caractériser l'expression de Rnd2 dans le GD de souris adultes, 2) déterminer les fonctions de cette Rho GTPase dans les différentes étapes de la neurogénèse adulte et, 3) évaluer l'implication de Rnd2 dans les fonctions cérébrales régulées par les néo-neurones hippocampiques.

Au cours de cette étude, nous avons découvert des propriétés particulières pour Rnd2, spécifiques aux néo-neurones hippocampiques par comparaison aux NGs générés à la naissance.

Ces résultats nous ont alors amené à nous demander si les NGs formés chez l'individu adulte se développent de manière similaire à ceux générés au cours du développement. Nous avons donc recherché si ces populations neuronales étaient similaires ou différentes et dans un premier temps, nous avons entrepris de les caractériser d'un point de vue morphologique. Dans la seconde partie de ma thèse, sera donc présentée une analyse comparative approfondie et détaillée de la morphogénèse des NGs nés lors des périodes embryonnaire, postnatale et adulte.

Chapitre III. Méthodes

A. Animaux

1. Souris *Rnd2^{flox/flox}*

Des souris mâles *Rnd2^{flox/flox}*, homozygotes pour l'allèle mutant conditionnel et âgées de 12 semaines ont été utilisées pour nos expérimentations. Les souris mutantes conditionnelles pour *Rnd2* ont été générées dans le laboratoire du Dr François Guillemot (NIMR, UK) par recombinaison homologue. L'allèle *Rnd2^{flox}* contient un premier site de recombinaison loxP entre l'exon 1 et 2 du gène *Rnd2* et un deuxième site localisé à l'extrémité 3' (**Figure 13A**). Une cassette de sélection NeoR flanquée par des sites de recombinaison FRT (flippase recognition target) a été insérée en 3' de *Rnd2* et excisée ensuite *in vivo* par la flippase. Une séquence FLAG a été insérée en position N-terminale. Après recombinaison par la recombinase Cre, les exons 2 à 5 de *Rnd2* sont délétés.

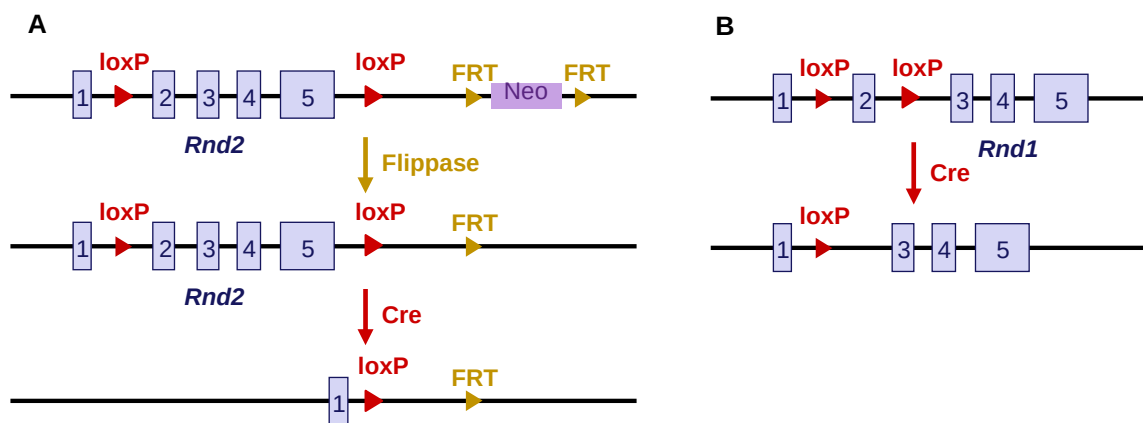


Figure 13 : Génération de l'allèle mutant conditionnel pour *Rnd1* et *Rnd2*.

2. Souris *Rnd1^{flox/flox}*

Les souris mâles *Rnd1^{flox/flox}* utilisées dans nos expériences ont elles aussi été générées dans le laboratoire du Dr François Guillemot (NIMR, UK) à partir de cellules ES provenant du consortium EUCOMM (*Rnd1^{tm1a(EUCOMM)Wtsj}*). La génération de cette souris repose sur l'identification d'un exon critique, commun à tous les variants, qui une fois délété génère une mutation induisant un décalage du cadre de lecture. En présence de la Cre, l'exon critique flanqué de sites loxP est supprimé (**Figure 13B**).

3. Souris CD1 et C57Bl6/J

Les souris CD1 et C57Bl6/J ont été achetées auprès de la compagnie Janvier (France).

4. Conditions d'élevage et génotypage

Les croisements des souris homozygotes *Rnd1*^{flox/flox} et *Rnd2*^{flox/flox} ont été effectués dans l'animalerie de statut EOPS (exempt d'organisme pathogène spécifique) de l'institut Magendie. Deux semaines avant la chirurgie, les animaux ont été transférés dans une animalerie conventionnelle. Dans ces animaleries, les souris ont été gardées en cages collectives avant la chirurgie, à température constante ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) et à une humidité relative de ~50%, et soumises à un cycle lumière-obscurité de 12/12h (lumière de 7h à 19h) avec un accès *ad libitum* à la nourriture et à l'eau. Suite à la chirurgie, les animaux ont été placés en cage individuelle afin d'éviter qu'ils se battent. Les procédures expérimentales ont été réalisées en accord avec le décret n° 2013-118 du 1er février 2013 transposant la directive européenne 2010/63 relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques.

Le génotypage des animaux est réalisé au sein de la plateforme de génotypage (dirigée par Delphine Gonzales) du Neurocentre Magendie.

B. Préparation de l'ADN

1. Transformation, Amplification et Extraction de l'ADN

Tout d'abord, 0,5 µl d'ADN est incubé avec 50 µl de bactéries compétentes (DH5α ou TOP10 lorsque l'ADN est destiné à la production de rétrovirus, ThermoFisher Scientific) dans la glace pendant 15 min. Puis l'ensemble est chauffé à 42°C pendant 1 min et remis sur la glace. Ensuite, 200 µl de milieu enrichi (SOC Medium, ThermoFisher Scientific), préchauffé à 37°C , sont ajoutés et le mélange est incubé 40 min à 37°C sous agitation. A la suite de cette incubation, 50 µl de mélange ADN-bactéries est étalé sur la gélose (Luria Broth (LB) Agar, ThermoFisher Scientific) contenant l'antibiotique correspondant à la résistance du plasmide utilisé. Les boîtes de géloses sont ensuite incubées toute la nuit à 37°C .

Le lendemain, un clone isolé est prélevé et ensemencé dans un erlenmeyer contenant 200 ml de LB avec l'antibiotique adapté. Après 24 h d'amplification sous agitation, l'ensemble est centrifugé pendant 20 min à 4000 rpm. Le culot bactérien est ensuite utilisé pour extraire l'ADN à l'aide du kit Endofree Plasmid Maxi Kit (Qiagen) selon le protocole du fournisseur. A la suite de l'extraction, une lecture de densité optique à 260 nm et 280 nm est effectuée afin d'évaluer la concentration et la pureté de l'ADN extrait.

2. Clonage

Clonage d'un gène d'intérêt et d'un marqueur fluorescent dans un vecteur rétroviral pour les expériences de « rescue ».

La séquence codant pour le gène d'intérêt est tout d'abord amplifiée par PCR en utilisant une amorce sens contenant le site de restriction de l'enzyme SfiI et une amorce antisens contenant le site de restriction PmeI ainsi qu'un plasmide contenant la séquence étudiée « Templates » utilisés: pCMV-Rnd1, pCMV-Rnd2, pCMV-Rnd3 et pCAG-CARhoA(G14V)-ires-GFP (fournis par le Dr Emilie Pacary), pRK5-myc-RhoA-T19N (Addgene #12963), pFUW-GFP-mDISC1 (fourni par le Dr Hongjun Song ; (Duan et al., 2007)), pCAG-Akt3A (fourni par le Dr Koji Oishi ; (Oishi et al., 2009)). Le produit de PCR est ensuite digéré séquentiellement avec SfiI et PmeI. Parallèlement, le vecteur rétroviral CAG-Neurog2-ires-DsRed (fourni par le Dr Benedikt Berninger ; (Heinrich et al., 2011)) est digéré avec les mêmes enzymes afin d'extraire la séquence codante Neurog2. Après migration sur gel d'agarose 1%, les produits de la digestion sont extraits et la ligation de l'insert et du vecteur est réalisée sur la nuit à 4°C. 2 µl du produit de ligation sont ensuite utilisés pour transformer des bactéries TOP10. Les clones obtenus sont ensuite amplifiés dans 3 ml de LB avec ampicilline (100 µg/ml) puis l'ADN est extrait avec un kit Miniprep (Qiagen) selon les instructions du fournisseur. Les clones positifs sont ensuite identifiés par la présence de l'insert suite à une nouvelle digestion SfiI/PmeI et enfin contrôlés par séquençage (Genewiz).

C. Production de rétrovirus

La production de rétrovirus se fait au sein de cellules GPG-1F8 (Ory et al., 1996). Ces cellules humaines dérivées de la lignée de cellules rénales embryonnaires humaines (human embryonic kidney 293, HEK293) sont génétiquement modifiées de façon à exprimer constitutivement les gènes rétroviraux *Gag* (codant une protéine structurelle principale) et *Pol* (codant une DNA polymérase). De plus, dans ces cellules, le gène codant la glycoprotéine de l'enveloppe du virus de la stomatite vésiculaire (VSVg) est sous contrôle Tet-Off, donc induit après retrait de la doxycycline. Les cellules sont cultivées dans un milieu de croissance: 10% sérum de veau fœtal (SVF, Gibco™), 1% de milieu minimum essentiel supplémenté avec des acides aminés non-essentiels (MEM NEAA, Gibco™), 1% de sodium pyruvate 100 mM (Gibco™) dans du milieu minimum essentiel de Dulbecco (DMEM, Gibco™) complémenté avec deux antibiotiques : puromycine (2 µg/ml, Gibco™) et généticine (300 µg/ml, Gibco™). Les cellules GPG-1F8 possèdent les gènes de résistance aux deux antibiotiques et sont donc sélectionnées.

L'expression de VSVg pendant l'amplification cellulaire est toxique, de la doxycycline (10 ng/ml, Gibco™) est donc ajoutée au milieu de croissance afin de réprimer son expression. Après amplification, la transfection se fait à partir de 3 flasques T175 (Greiner) de cellules GPG-1F8 à 80-90% de confluence. Les cellules sont collectées après incubation avec de la trypsine EDTA à 0.05% puis après centrifugation (7 min à 1500 rpm) elles sont reprises dans du milieu OptiMEM-SVF 10% (sans puromycine, geneticine, ni doxycycline). Elles sont ensuite mises en présence d'un mélange de lipofectamine 2000 et de 150 µg d'ADN plasmidique (**Tableau 1**).

Constructions	Promoteurs	Inserts	Origines (Laboratoire)	Références
pCAG-GFP	CAG	GFP	Dr Fred Gage (La Jolla)	(Zhao et al., 2006)
pCAG-RFP	CAG	RFP	Dr Fred Gage (La Jolla)	(Laplagne et al., 2006)
pCAG-ires-DsRed	CAG	DsRed	Dr Benedikt Berninger (Mainz)	(Heinrich et al., 2011)
pCAG-GFP/Cre	CAG	GFP fusionnée à la Cre	Dr Fred Gage (La Jolla)	(Tashiro et al. 2006, 2007)
pCAG-GFP-T2A-CreER ^{T2}	CAG	GFP et CreER ^{T2}	Dr Fred Gage (La Jolla)	(Mu et al., 2015)
pCAG-Rnd1-ires-DsRed	CAG	Rnd1 et DsRed	Produit au laboratoire (Voir partie B.2.Clonage)	
pCAG-Rnd2-ires-DsRed	CAG	Rnd2 et DsRed	Produit au laboratoire (Voir partie B.2.Clonage)	
pCAG-Rnd3-ires-DsRed	CAG	Rnd3 et DsRed	Produit au laboratoire (Voir partie B.2.Clonage)	
pCAG-CARhoA-ires-DsRed	CAG	CA-RhoA et DsRed	Produit au laboratoire (Voir partie B.2.Clonage)	
pCAG-DNRhoA-ires-DsRed	CAG	DN-RhoA et DsRed	Produit au laboratoire (Voir partie B.2.Clonage)	
pCAG-DISC1-ires-DsRed	CAG	Disc1 et DsRed	Produit au laboratoire (Voir partie B.2.Clonage)	
pCAG-Akt3A -ires-DsRed	CAG	3AAkt et Dsred	Produit au laboratoire (Voir partie B.2.Clonage)	

Tableau 1. Liste des constructions virales utilisées pour la production de rétrovirus

Les cellules sontensemencées sur 8 boîtes de pétri de 10 cm et incubée à 37°C, 5% CO₂. La récolte est effectuée après 72 h, le surnageant des 8 boîtes est récupéré et centrifugé (15 min à 3500 rpm) puis filtré sur un filtre 0,45 µm. Puis une centrifugation (2 h à 4°C, 19500 rpm ; Centri Aventi J25, rotor JA 25.50) est effectuée à partir du filtrat. Le surnageant est éliminé et le culot repris dans du milieu OptiMEM. Les tubes sont laissés 2 h dans la glace en chambre froide avant que le mélange subisse une autre centrifugation (2h à 4°C, 19400 rpm; LE-80K Optima, rotor SW40-Ti). Enfin le culot est resuspendu dans du PBS froid et aliquoté pour être stocké à -80°C.

Le titre de la suspension virale est ensuite déterminé. Les cellules GPG-1F8 sont récupérées dans du milieu basic (10% SVF, 1% MEM NEAA, 1% Sodium pyruvate, DMEM) et la concentration de la suspension cellulaire est déterminée sur lame de Malassez. La suspension est ensuite diluée au besoin dans du milieu basic, afin d'obtenir une suspension de 1.10⁶ cellules/ml. Sur une plaque de 12 puits (NUNC®), une série de dilution en cascade de la suspension virale est

effectuée ($1/100$ à $1/10^6$ dans 500 μl de milieu basic). Puis, 500 μl de la suspension cellulaire est déposée par puit et le mélange est incubé à 37°C et à 5% CO_2 . Trois jours après infection, le nombre de cellules fluorescentes est compté par microscopie à fluorescence afin de déterminer le titre de la suspension virale de départ (exprimé en TU/ml).

D. Injection stéréotaxique de rétrovirus dans le GD de souris adultes

Des souris mâles âgées de 11-12 semaines ont été utilisées pour les injections stéréotaxiques de rétrovirus (10^9 - 10^{10} TU/ml) à l'âge adulte. Les souris sont anesthésiées par injection intrapéritonéale (i.p.) d'un mélange de kétamine (120 mg/kg; Imalgene® 1000, Merial) - xylazine (16 mg/kg; Rompun®, Bayer HealthCare). Elles sont ensuite injectées par voie sous-cutanée, au niveau du dos avec 0,1 ml de meloxicam (0,5 mg/ml; Metacam®, Boehringer Ingelheim) et au niveau du crâne avec 0,1 ml de lidocaïne (20 mg/ml; Lurocaïne®, Vetoquinol). Les souris sont placées sur le cadre stéréotaxique (Model 900, Kopf®), un lubrifiant oculaire (Lacrigel® 0,2%, Europhtha) leur est appliqué et une incision de la peau est faite au niveau du crâne. Le microcapillaire en verre permettant l'injection (1-5 μl , Sigma-Aldrich®) est relié via un cathéter à un dispositif de 'robinet à trois vannes' qui permet de contrôler le débit d'injection. Une fois rempli de solution virale, il est introduit au niveau du GD selon les coordonnées suivantes par rapport au bregma : Antéro-Postérieur (AP) -2 mm; Médio-Latéral (ML) -1,6 mm; Dorso-Ventral (DV) -2,2 mm en dessous de la surface du crâne (Tashiro et al., 2006). Au préalable le crâne est perforé au-dessus du site d'injection à l'aide d'un foret. Le microcapillaire est maintenu en place pendant 1 min puis la suspension virale est injectée en 3 étapes sur une période de 6 min (0,5 μl en 1 min et 1 min d'attente après chaque injection). La canule est laissée en place pendant 1 min après la fin des infusions puis retirée avant que la peau soit suturée. A la fin de la chirurgie, les animaux sont placés dans une chambre à 37°C jusqu'à leur réveil. Une seconde injection de 0,1 ml de meloxicam (0,5 mg/ml; Metacam®, Boehringer Ingelheim) est effectuée 24 h après la chirurgie.

E. Injection stéréotaxique de rétrovirus dans le GD à P21

L'injection stéréotaxique de rétrovirus dans le GD de souris CD1 au jour postnatal 21 (P21) se fait selon un protocole similaire à celui utilisé pour l'adulte. Les souris sont anesthésiées avec un mélange de kétamine (60 mg/kg; Imalgene® 1000, Merial) - xylazine (1,4 mg/kg; Rompun®,

Bayer HealthCare) et injectées avec 0,05 ml de meloxicam (0,5 mg/ml; Metacam®, Boehringer Ingelheim) et de lidocaïne (20 mg/ml; Lurocaïne®, Vetoquinol) par voie sous-cutanée. Les coordonnées sont individuellement adaptées à partir de celles utilisées pour l'adulte en calculant un ratio: distance bregma-lambda divisée par 4,21 mm (la distance bregma-lambda communément décrite dans l'atlas du cerveau de souris (Paxinos and Franklin, 2012)). Les 3 coordonnées sont multipliées par ce ratio et 1 µl de solution virale est injectée dans le GD des souris, selon la même procédure que pour l'adulte.

F. Injection de rétrovirus dans le GD à P0

L'injection de rétrovirus dans le GD au jour postnatal 0 (P0) s'effectue selon une méthode décrite dans la littérature (Pilpel et al., 2009). Les souriceaux sont anesthésiés par hypothermie et 0,5 µl de solution virale (10^9 TU/ml) est injectée au travers de la peau et du crâne à l'aide d'un microcapillaire de verre (1-5µl, Sigma-Aldrich®) et d'un microinjecteur Femtojet® (Eppendorf). Afin de viser le ventricule latéral droit des souriceaux à P0, une ligne virtuelle liant l'œil droit au lambda est utilisée et le milieu de cette ligne est repéré afin d'insérer le microcapillaire légèrement caudalement à ce repère (Boutin et al., 2008). Les souriceaux sont ensuite placés dans une chambre à 37°C jusqu'à leur réveil puis sont remis auprès de leur mère dans la cage d'hébergement.

G. Électroporation postnatale du GD à P0

L'électroporation du GD à P0 se fait selon une méthode précédemment publiée (Ito et al., 2014). De même que pour l'injection de rétrovirus les souriceaux sont anesthésiés par hypothermie et 1µl de solution d'ADN plasmidique (pCAG-GFP 1 µg/µl mélangé au Fast Green 0,05%) est injectée dans le ventricule droit. Les animaux sont immédiatement électroporés avec 2 électrodes de platine de 5mm de diamètre (Tweezertrode 45-0489, BTX, Harvard Apparatus) positionnées de façon à cibler le futur GD (Ito et al., 2014). Cinq impulsions électriques de 100V durant 50 msec et espacées de 950 msec sont appliquées. Les souriceaux sont ensuite placés dans une chambre à 37°C jusqu'à leur réveil puis sont remis à leur mère dans la cage d'hébergement.

H. Électroporation *in utero* du GD

L'électroporation *in utero* du GD est réalisée au 14^{ème} jour de gestation, jour embryonnaire 14 (E14.5) comme décrit précédemment (Navarro-Quiroga et al., 2007; Pacary et al., 2012).

Brièvement, des souris CD1 gestantes sont injectées avec un analgésique, la buprénorphine (0,1mg/kg, Buprécare®, Axience) et anesthésiées avec de l'isoflurane (oxygène 2 litres/min, isoflurane 2.5%; TEM SEGA). Après incision du péritoine, les embryons en sont délicatement extraits à l'aide de forceps et placés sur un champ opératoire stérile. L'ADN (pCAG-GFP) utilisé pour l'électroporation *in utero* et postnatale est préalablement transformé en utilisant des bactéries compétentes DHα5 (Invitrogen Life Technologies) puis amplifié et extrait selon le protocole du fournisseur (Maxiprep endofree, Qiagen). L'ADN plasmidique (1μg/μl) mélangé au Fast Green 0,05% (Sigma-Aldrich®) est injecté au travers de la paroi utérine dans un des ventricules latéraux en utilisant un microcapillaire en verre (1-5μl, Sigma-Aldrich®) et un microinjecteur Femtojet® (Eppendorf). De façon à viser le GD, 2 électrodes de platine de 5mm de diamètre (Tweezertrode 45-0489, BTX, Harvard Apparatus) sont placées sur le cerveau des embryons comme décrit précédemment (Pacary et al., 2012) et 5 impulsions électriques de 30V durant 50ms sont appliqués au travers de la paroi utérine à 1 sec d'intervalle (Electroporator BTX, ECM 830, Harvard Apparatus). L'utérus bifide est ensuite replacé au sein de la cavité abdominale puis les parois de l'abdomen et la peau sont suturés. Les souris gestantes sont ensuite placées dans une chambre à 37°C jusqu'à leur réveil.

I. Traitement au tamoxifène

Le traitement au tamoxifène est réalisé chez des souris mâles *Rnd2*^{flox/flox} adultes (12 semaines) injectées au préalable avec le rétrovirus CAG-GFP-T2A-CreER^{T2}. Une solution à 15 mg/ml est préparée en diluant le tamoxifène (T5648, Sigma-Aldrich®) dans de l'huile de maïs (C8267, Sigma-Aldrich®). Les animaux sont traités pendant 5 jours, avec une injection intrapéritonéale quotidienne à une dose de 150 mg/kg. Les groupes témoins sont injectés avec l'huile de maïs sans tamoxifène. La solution de tamoxifène est fraîchement préparée avant chaque première injection, 5 aliquots sont préparés et placés à -20°C. Avant injection les aliquots sont décongelés au bain-marie à 45°C.

J. Tests comportementaux évaluant un état anxieux

1. Champ libre (Open-field)

Le test de comportement en champ libre évalue l'activité motrice globale et l'exploration d'un nouvel environnement, permettant de révéler des profils de type "anxieux". Le champ libre est une arène carrée de 50 cm de côté avec des parois de 50 cm de couleur blanche, vivement

éclairée (200 lux) et au sein de laquelle le centre représente une zone anxiogène. Le jour du test, les souris sont préalablement exposées à la pièce d'expérimentation durant un minimum 30 min, à l'issue desquelles elles sont placées dans un coin de l'arène pour une période d'exploration libre de 10 min ; leur comportement d'exploration est enregistré par une caméra reliée à un ordinateur. Le temps passé dans le centre de l'arène ainsi que les distances parcourues dans le centre et totale sont mesurés automatiquement par un système de vidéo-traceur (Vidéotrack, ViewPoint). L'expérimentateur et le système d'enregistrement sont situés dans une pièce adjacente.

2. Emergence

Le test d'émergence est réalisé en utilisant la même arène que pour le test de champ libre mais où un cylindre sombre (10 x 6,5 cm, PVC gris) est placé dans un des coins de l'arène et où la lumière est plus forte qu'en test de champ libre (~350 lux). Le test est réalisé sur 10 min et au début de l'expérience l'animal est placé dans le cylindre. La latence à émerger du cylindre, le temps total passé dans le cylindre et le nombre total de sorties réalisées sont évalués. Dans ce test, les animaux anxieux mettent plus de temps à sortir du cylindre et y passent plus de temps.

3. Labyrinthe en croix surélevé (Elevated plus maze)

L'appareillage pour ce test est constitué d'une croix composée de deux bras fermés (d'une longueur de 37 cm) par des parois d'une hauteur de 15 cm et de deux bras ouverts d'une longueur de 37 cm, le tout surélevé de 115 cm par rapport au sol. L'animal est placé au centre du labyrinthe, face à un bras ouvert et son comportement d'exploration est enregistré pendant 5 min (sous lumière tamisée ~75 lux). Le temps passé et le nombre d'entrées dans les bras ouverts, fermés et le centre de l'appareil sont mesurés par le vidéo-traceur. Dans ce test, les animaux anxieux évitent les bras ouverts.

4. Compartiment illuminé / Compartiment sombre (Light/Dark test)

Le test des compartiments illuminé et sombre ou "clair/obscur" permet d'évaluer la volonté innée des souris à explorer ou éviter les espaces fortement illuminés. L'appareil est constitué d'une chambre illuminée (36 x 36 cm, ~350 lux) et d'une chambre sombre (36 x 23 cm, ~10 lux), les souris peuvent circuler librement d'un compartiment à l'autre grâce à une porte (10 x 10 cm). Les souris sont placées dans le compartiment illuminé et sont libres d'explorer l'environnement pendant 5 min. La latence à quitter le compartiment lumineux ainsi que le temps passé dans celui-ci sont évalués.

K. Tests comportementaux évaluant un état dépressif

1. La préférence au sucrose

Le test de préférence au sucrose consiste à exposer les souris à 2 biberons dans leur cage d'hébergement, pendant 72 h. Pendant les premières 24 h les deux biberons sont remplis d'eau de boisson, ce premier jour est la phase d'habituation. Pour la phase de test, un des biberons est rempli de 30 ml de saccharose 4% dilué dans l'eau de boisson, le deuxième biberon contient de l'eau seule. Les 2 biberons sont placés côte à côte sur la grille de la cage pendant 24 h, puis pour les dernières 24 h les positions des biberons sont inversées. La préférence au sucrose est calculée de la façon suivante

$$\text{Préférence sucrose} = \frac{\Delta \text{poids}_{\text{sucrose}}}{\Delta \text{poids}_{\text{sucrose}} + \Delta \text{poids}_{\text{eau}}}$$

2. Test de nage forcée

Le dispositif est constitué d'un cylindre de verre de 16 cm de diamètre et 25 cm de hauteur rempli d'eau sur une hauteur de 15 cm et placé dans une pièce où la luminosité est vive (~350 lux). L'eau est maintenue à ~26°C. Les souris sont placées dans l'eau et leur comportement est observé pendant 6 min. La latence à engager un comportement d'immobilité et le temps total d'immobilité (i.e. flottaison), considérés comme des mesures d'un comportement d'abandon caractéristique des syndromes dépressifs, sont mesurés pendant 4 min. L'expérimentateur et le système d'enregistrement sont situés dans une pièce adjacente.

L. Labyrinthe aquatique de Morris (Morris water maze)

Ce test est utilisé pour évaluer les capacités d'apprentissage et de mémoire spatiale chez la souris. L'appareil est constitué d'une piscine circulaire dont le diamètre est de 1,50 m et de 60 cm de profondeur. Elle est remplie d'eau (~19°C) rendue opaque par addition d'un adjuvant cosmétique blanc non toxique. La pièce de test est faiblement illuminée (80 lux à la surface de l'eau) et comporte de nombreux indices visuels dont la localisation reste inchangée durant la durée du test. Le labyrinthe aquatique est arbitrairement divisé en quatre quadrants à l'intérieur desquels une plate-forme (14 cm de diamètre) peut être positionnée à mi-chemin entre le centre et la paroi de la piscine.

Au cours d'un apprentissage, la position de la plateforme qui est immergée 2 cm au-dessous de la surface de l'eau reste fixe. Pour chaque session quotidienne, 3 essais (60 sec maximum, 5

min entre chaque essai) sont réalisés. La distance, la durée des essais ainsi que le tracé de navigation réalisé par les animaux sont enregistrés automatiquement par un système de vidéo-traceur (Vidéotrack, ViewPoint). L'expérimentateur et le système d'enregistrement sont situés dans une pièce adjacente.

La procédure qui a été utilisée est celle de la plateforme immergée devant être atteinte à partir de points de départ variables. Cette version favorise l'utilisation d'une stratégie allocentrique et dépend de l'intégrité fonctionnelle de la formation hippocampique. Trois jours après la dernière séance d'apprentissage, les animaux sont soumis à un test de rétention ou «probe test» au cours duquel la plateforme est retirée. Ce test, qui consiste en un essai de 60 sec, permet d'évaluer si les animaux ont une bonne mémoire de la localisation de la plateforme. Cette procédure permet d'évaluer classiquement la mémoire spatiale de référence (Morris et al., 1982).

M. Conditionnement de peur au contexte

Les animaux sont exposés à deux contextes différents (contextes A et B) qui partagent certains points communs de façon à évaluer leur capacité à discriminer ces deux contextes. Le conditionnement a lieu dans une cage de Plexiglass transparent (26 x 25 x 17 cm) permettant un accès aux indices visuels de l'environnement et dans laquelle le sol est constitué d'une grille (barreaux de 3 mm de diamètre, espacés de 3 mm) connectée à un générateur de chocs électriques (Imétronic). Dans le contexte A la cage est illuminée (90 lux), un nettoyage avec de l'éthanol 70% est effectué avant chaque essai et des indices visuels éloignés sont placés sur les murs de la pièce. Dans le contexte B, la cage est toujours illuminée (75 lux), le nettoyage se fait à l'acide acétique, des panneaux noirs avec des indices visuels sont placés autour de la cage et un récipient contenant de la sciure souillée est placé sous la grille.

Dans un premier temps les souris sont conditionnées dans le contexte A. Les animaux sont individuellement transportés vers la salle d'expérimentation et placés dans la cage de conditionnement. Après 180 sec, un choc électrique (0,7 mA, 1 sec) est délivré à la souris puis l'animal est laissé dans la cage pendant 59 sec, cette séquence d'une minute est répétée deux fois. La souris reçoit donc 3 chocs électriques.

Vingt-quatre heures plus tard, les souris sont de nouveau transportées individuellement vers la pièce d'expérimentation, placées dans la cage de conditionnement et exposées au contexte A pendant 5 min sans choc. Trois heures plus tard, les souris sont exposées au contexte

B pendant 5 min sans choc. La réponse conditionnée de peur ou « freezing », caractérisée par une immobilité totale de l'animal exception faite des mouvements dus à la respiration (Blanchard and Blanchard, 1969; Fanselow, 1980) est enregistrée automatiquement par un système informatique (Freezing, Imétron). La discrimination de contextes similaires est évaluée en comparant le temps d'immobilité dans chacun des contextes et en calculant un ratio de discrimination.

$$\text{Ratio de discrimination} = \frac{\text{temps immobilité}_{\text{contexte A}}}{\text{temps immobilité}_{\text{contexte A}} + \text{contexte B}}$$

Selon ce calcul, une souris discriminant correctement les deux contextes est plus immobile dans le contexte A que dans le contexte B et présente un ratio de discrimination supérieur à 0,5.

N. Quantification de l'expression des ARNm

1. Microdissection et PCR quantitative

a) Préparation des tissus

Pour l'analyse de l'expression des *Rnds* dans les cellules transduites :

Les souris *Rnd2*^{flox/flox} adultes mâles âgées de 12 semaines ont été injectées bilatéralement dans le GD, avec 2 µl de solution virale par hémisphère selon le protocole indiqué précédemment. Le rétrovirus CAG-GFP a été injecté pour le groupe témoin et le rétrovirus CAG-Cre/GFP pour les souris du groupe délété pour *Rnd2*. Les animaux ont été euthanasiés 7 jours post-injection (7 jpi), les cerveaux non perfusés ont été extraits et rincés dans du tampon phosphate salin (PBS) froid, la procédure se faisant en conditions exemptes de RNase et sur la glace. Les cerveaux ont été incubés 72 h dans du PBS / 30% sucrose (sous agitation, à 4°C) puis rapidement congelés en isopentane et conservés à -80°C.

Pour l'analyse de l'expression des *Rnds* dans le GD :

Les cerveaux de souris C57Bl6/J ont été prélevés puis rincés dans du PBS froid et congelés directement en isopentane. Les cerveaux ont ensuite été conservés à -80°C jusqu'à utilisation.

b) Microdissection

Pour l'analyse de l'expression des *Rnds* dans les cellules transduites :

Les cerveaux sont disposés à l'aide de Tissue-Tek® OCT sur le support adapté du cryostat Leica CM3050S (Leica Microsystems) et laissés 20 min dans la chambre du cryostat afin d'acclimater les tissus aux -20°C de cette chambre. Des coupes de 10 µm d'épaisseur sont

réalisées et les tissus sont placés sur des lames dotées d'une membrane de polyéthylène naphthalate (PEN; Carl Zeiss) en conditions exemptes de RNase. Les coupes sont ensuite déshydratées à l'aide de bains successifs d'éthanol à 95% (40 sec) suivis par deux bains de 40 sec dans de l'éthanol à 100%, anhydre. Les lames sont ensuite laissées sécher 5 min à température ambiante. Immédiatement après la déshydratation, la technique de microdissection laser est effectuée à l'aide d'un système de microdissection PALM MicroBeam, version 4.8 équipé d'un bras robotisé P.A.L.M. RoboSoftware (P.A.L.M. Microlaser Technologies AG) et d'un objectif x63. Cet appareil se compose d'un microscope à fluorescence haute résolution couplé à un laser UV. Le système est associé à un logiciel spécifique et à une tablette graphique qui permet de dessiner en direct la cellule que l'on souhaite découper et prélever (~1000 cellules par animal). Le laser découpe donc les cellules sélectionnées puis permet de collecter les échantillons par microcatapultage des cellules GFP+ dans des capsules adhésives (P.A.L.M. Microlaser Technologies AG). Les cellules collectées sont re-suspendues dans des tubes de microcentrifugation stériles contenant du tampon PK (Tampon PK, RNeasy FFPE Kit, Qiagen) puis conservées à une température de -80°C jusqu'à leur extraction.

L'ARN total est extrait des cellules microdisséquées à l'aide du kit RNeasy® FFPE Kit (Qiagen) selon le protocole décrit par le fournisseur. L'intégrité de l'ARN est vérifiée par électrophorèse microcapillaire en utilisant le kit RNA 6000 Pico Labchip et le bioanalyseur 2100 (Agilent Technologies). La quantité d'ARN est estimée grâce au spectrophotomètre Nanodrop 1000 (Thermo Scientific). L'intégrité de l'ARN est considérée correcte quand le nombre d'intégrité de l'ARN (RNA integrity number, RIN) est au-dessus de 6-8 (fragmentation de l'ARN par la protéine SK due à fixation PFA). Ces expériences de microdissection ont été réalisées par Marlène Maître et Hélène Doat au sein de la plateforme Microdissection Laser du Neurocentre Magendie (référence Mique).

Pour l'analyse de l'expression des *Rnds* dans le GD :

Les étapes de microdissection du GD (ZSG et CG) sont sensiblement similaires à celles décrites précédemment avec néanmoins quelques modifications. Dans ce cas des coupes coronales de 50 µm ont été réalisées, puis immédiatement fixées avec de l'éthanol 95% pendant 90 sec et incubées avec 75% d'éthanol 30 sec et 50% d'éthanol 30 sec. Les coupes ont ensuite été colorées avec 1% de crésyl violet dans 50% d'éthanol pendant 30 sec et déshydratées dans des bains successifs (30 sec chacun) à 50%, 75% et 95% d'éthanol puis finalement deux incubations dans 100% d'éthanol ont été réalisées pendant 30 sec. La microdissection a ensuite

été effectuée selon le même protocole avec un objectif X5. Les tissus ont été resuspendus dans 250 μ l de tampon (Tampon BL, ReliaPrepTMRNA Cell miniprep System, Promega) contenant 10 μ l de 1-Thioglycerol et conservés à -80°C. Pour l'analyse à différents temps développementaux, le GD entier de chaque animal a été microdisséqué (**Figure 14**).

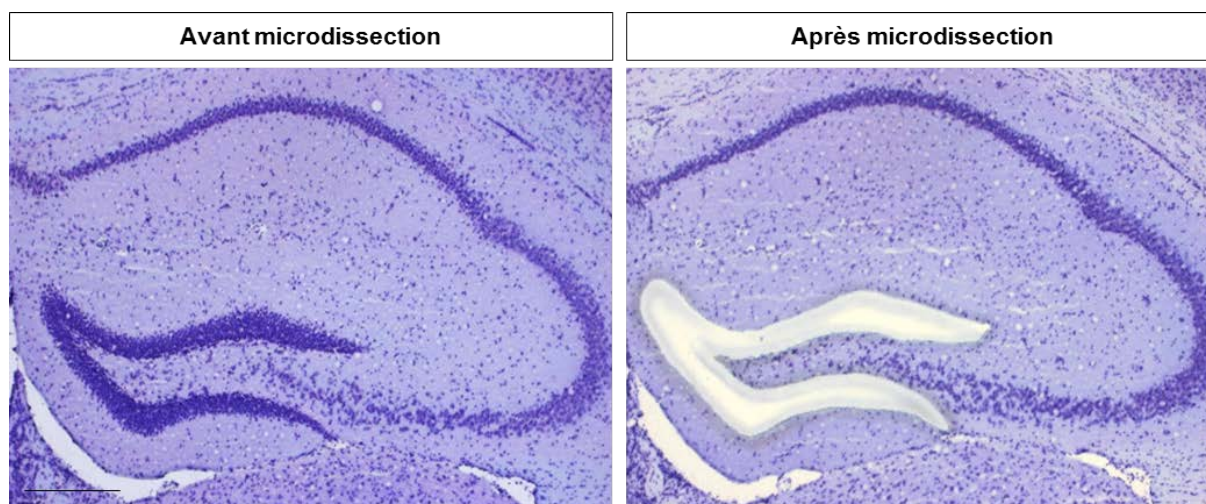


Figure 14. Coupes de souris adultes colorées avec le violet de Crésyl montrant la région microdisséquée (CG et ZSG).

Pour l'analyse de l'expression des *Rnds* selon l'axe septo-temporal, le DG de l'hémisphère droit uniquement a été microdisséqué. Dans ce cas, 10 sections successives de 50 μ m ont été poolées. Dans les deux types d'analyse, la première section a été récoltée quand la coordonnée antéro-postérieure -1.34 mm à partir du Bregma a été atteinte, i.e. lorsque les deux lames du GD sont visibles.

Les ARNs totaux pour ce type d'analyse ont été extraits avec le kit ReliaPrepTM RNA Cell miniprep System (Promega) selon les instructions du fournisseur.

c) PCR quantitative

Les ARN totaux extraits sont ajoutés à un mélange composé d'amorces Random Hexamer Primer (Fermentas) et d'oligonucléotides (dT) (Fermentas) puis sont dénaturés 5min à 65°C. La synthèse des ADN complémentaires (ADNc) est basée sur un kit commercial (RevertAidTM Premium First Strand cDNA Synthesis Kit, Fermentas). La réaction de transcription inverse est réalisée à 50°C pendant une heure, puis une étape d'inactivation est réalisée pendant 15 min à 70°C. La solution d'ADNc de chacun des échantillons est conservée à -80°C.

Pour amplifier les gènes d'intérêt, des couples d'amorces spécifiques (sens et anti-sens) sont choisis à l'aide du logiciel Primer Express 2.0 (Applied Biosystems). Les couples d'amorces sélectionnés sont validés par une première PCR (polymerase chain reaction) quantitative en

temps réel. Ainsi pour chaque gène d'intérêt un mélange réactionnel est déposé sur des plaques où chaque puits contient 3 µl d'amorces à 2 µM, 2 µl d'ADNc et 5 µl d'un mélange contenant les réactifs nécessaires à l'amplification (mix 2X, LightCycler® 480 SYBR Green I Master, ROCHE). La PCRq commence par une étape où le mélange réactionnel est chauffé à 95°C pendant 5 min permettant d'activer l'ADN polymérase, puis 45 cycles successifs d'amplification sont réalisés; et se termine par une incrémentation de la température de 0.3°C toutes les 3 secondes entre 65°C et 95°C permettant d'obtenir la courbe de fusion. Chaque cycle est constitué d'une étape de 15 sec de dénaturation à 95°C puis d'une étape de 30 sec à 61°C associant l'hybridation des amorces placées dans chaque puits et l'élongation par l'ADN polymérase. La mesure de la fluorescence du rapporteur fluorescent SYBR® Green s'intercalant dans l'ADN double brin est réalisée à la fin de l'élongation de chaque cycle, l'émission de fluorescence est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générés pendant la réaction de PCR.

Les amorces sont validées selon deux critères: la spécificité et l'efficacité. La spécificité est vérifiée à l'aide de la courbe de fusion représentant l'émission de fluorescence en fonction de la température. Cette étape est réalisée à la fin de la PCRq et permet la dissociation du produit d'amplification, de doubles brins en simples brins. Une température unique de dissociation traduit un amplicon unique, nous indiquant la spécificité du couple d'amorces. L'efficacité est mesurée grâce à une courbe étalon représentant le nombre de cycles en fonction de la quantité d'ADNc (gamme étalon: 20 ; 10 ; 4 ; 0.8 ; 0.16 ng par puits). Cette efficacité doit être proche de 100%.

De plus il est nécessaire de quantifier au moins deux gènes dont l'expression ne varie pas, par exemple entre les néo-neurones où *Rnd2* est délété et les néo-neurones des animaux témoins, et qui serviront de gènes de référence. L'expression de 12 gènes, potentiellement gènes de référence, a été analysée par deuxième PCRq sur l'ensemble des individus. L'analyse des résultats s'effectue à l'aide du logiciel Genorm (Vandesompele et al., 2002) qui classe l'ensemble des gènes testés en fonction des différentes expressions entre tous les individus. Pour chaque projet d'analyse par PCRq, deux gènes ont été choisis pour les valeurs Genorm les plus faibles suggérant que leur expression est indépendante des conditions expérimentales. Les gènes d'intérêt et de références utilisés pour chacune des analyses, ainsi que les couples d'amorces respectifs sont présentés dans le **Tableau 2**.

Validation de l'approche de perte de fonction de <i>Rnd2</i>				
	Gène	GenBank ID	Séquence amorce sens	Séquence amorce anti-sens
Gènes d'intérêt	<i>Rnd1</i>	NM_172612	CCAGACGCTCCATCACTGAAA	GGGTTAGGCAAAAATGAGGGTT
	<i>Rnd2</i>	NM_009708	CCTGTCACACATGAGCAGGGTA	GAGGAACATTCAACGTAGGACACA
	<i>Rnd3</i>	NM_028810	GTTGATCGTTGCCAGAGTGATAAT	AAAGGAAGTCTCAAAAGGAGAAA
Gènes de référence	<i>Rpl13a</i>	NM_009438	CGCCGCAACTAGGGAA	GGTGCGCTGTCTAGCTCTCTAAT
	<i>Eef1a1</i>	NM_010106	TGAACCATCCAGGCCAAATC	GCATGCTATGTGGGCTGTGT

Quantification de l'expression des <i>Rnds</i> au sein du GD en fonction de l'âge				
	Gène	GenBank ID	Séquence amorce sens	Séquence amorce anti-sens
Gènes d'intérêt	<i>Rnd1</i>	NM_172612	CCAGACGCTCCATCACTGAAA	GGGTTAGGCAAAAATGAGGGTT
	<i>Rnd2</i>	NM_009708	CCTGTCACACATGAGCAGGGTA	GAGGAACATTCAACGTAGGACACA
	<i>Rnd3</i>	NM_028810	GTTGATCGTTGCCAGAGTGATAAT	AAAGGAAGTCTCAAAAGGAGAAA
Gènes de référence	<i>Vcp</i>	NM_009503	TGGCCGTCTAGATCAGCTCAT	TTTCGCAGATTGGCTTTTAGG
	<i>Eef1a1</i>	NM_010106	TGAACCATCCAGGCCAAATC	GCATGCTATGTGGGCTGTGT

Quantification de l'expression des <i>Rnds</i> au sein du GD le long de l'axe septo-temporal				
	Gène	GenBank ID	Séquence amorce sens	Séquence amorce anti-sens
Gènes d'intérêt	<i>Rnd1</i>	NM_172612	CCAGACGCTCCATCACTGAAA	GGGTTAGGCAAAAATGAGGGTT
	<i>Rnd2</i>	NM_009708	CCTGTCACACATGAGCAGGGTA	GAGGAACATTCAACGTAGGACACA
	<i>Rnd3</i>	NM_028810	GTTGATCGTTGCCAGAGTGATAAT	AAAGGAAGTCTCAAAAGGAGAAA
Gènes de référence	<i>Vcp</i>	NM_009503	TGGCCGTCTAGATCAGCTCAT	TTTCGCAGATTGGCTTTTAGG
	<i>Hprt</i>	NM_013556	AAACAATGCAAACTTTGCTTTCC	CGAGAGGTCCTTTTACCAGC

Tableau 2. Liste des gènes quantifiés par PCRq et séquences des amorces spécifiques

L'analyse de l'expression des gènes est basée sur une quantification relative. Elle se traduit par le calcul du facteur de variation (Fold Change, FC) entre les différentes conditions. Il est basé sur la formule proposée par Livak et Schmittgen: $FC = 2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ (Livak and Schmittgen, 2001). Le ΔCt est la différence d'expression entre le gène d'intérêt et la moyenne de l'expression des gènes de référence choisis : $\Delta Ct = Ct_{(\text{gène intérêt})} - Ct_{(\text{gène de référence})}$. Le $\Delta\Delta Ct$ correspond quant à lui à la différence d'expression entre les néo-neurones des différentes conditions: $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{(Rnd2 \text{ délété})} - \Delta Ct_{(\text{témoins})}$. Les expériences de PCR quantitative ont été réalisées par Thierry Leste-Lasserre et Hélène Doat au sein de la plateforme Transcriptome du Neurocentre Magendie. Toutes les données issues des analyses PCRq sont transmises, traitées et calculées par un logiciel accessible à la plateforme transcriptome du Neurocentre Magendie, Gease, développé par Alexandre Brochard.

2. Hybridation in situ (HIS)

Afin de localiser l'expression des ARNm de *Rnd2* dans des cerveaux de souris à P14 et à l'âge adulte (11 weeks), des coupes flottantes (40 μm , vibratome) de cerveaux fraîchement perfusées

ont été utilisées pour réaliser l'HIS. Le protocole est ensuite similaire à celui décrit précédemment pour les HIS réalisées à partir de tissus embryonnaires (Azzarelli et al., 2014). Brièvement, les coupes après post-fixation avec du PFA 4% sont traitées avec de l'anhydride acétique 0.25% et du triéthanolamine pour acétyler les groupements aminés et réduire le bruit de fond. Après une étape de pré-hybridation à 70°C, les sections sont incubées toute la nuit avec une sonde ARN anti-sens spécifique de *Rnd2* (Heng et al., 2008), sonde non radioactive marquée avec la digoxigenin (DIG). Le jour suivant, les sections sont incubées à nouveau toute la nuit à 4°C avec un anticorps anti-DIG conjugué à la phosphatase alcaline (Roche). Le signal est enfin révélé par l'addition du substrat de la phosphatase alcaline, le nitro blue tetrazolium 5-bromo 4-chloro 3-indolyl phosphate (NBT/BCIP, Roche).

O. Immunohistochimie

1. Préparation des coupes

Les animaux sont anesthésiés léthalement par un mélange de pentobarbital de sodium (300 mg/kg, Exagon®, Richter Pharma) et de lidocaïne (30 mg/kg; Lurocaïne®, Vetoquinol) dilués dans l'eau pour solution injectable. La lidocaïne est injectée en temps qu'anesthésique local car l'administration périvasculaire d'Exagon peut provoquer une irritation des tissus. Les animaux sont perfusés avec 25 mL de PBS (0,1M, pH 7,3) contenant de l'héparine (anticoagulant ; 5000 UI/litre) puis avec 30 mL de fixateur (solution de PBS à 0,1M contenant 4% de para-formaldéhyde : PFA, pH 7,3). Les cerveaux sont ensuite prélevés et conservés dans du fixateur en chambre froide à 4°C jusqu'à leur utilisation. Les cerveaux sont coupés dans leur totalité au moyen d'un vibratome (Leica®) et des coupes coronales sériées de 40 µm sont réalisées (10 séries par cerveau). Les coupes flottantes sont conservées dans une solution tampon phosphate (PB).

2. Marquage immunohistochimique de Rnd2

Il a été montré sur des cultures primaires de neurones que la protéine Rnd2 est exprimée dans les endosomes (Roberts et al., 2008; Pacary et al., 2011). Aussi, nous avons mis en œuvre un protocole classiquement utilisé pour marquer les protéines des endosomes par immunofluorescence. Ces marquages sont réalisés sur des coupes de cerveaux fixés et post-fixés 2 h avec du PFA 4%. Les coupes flottantes sont tout d'abord rincées 3 x 5 min dans du PBS puis une étape de blocage des groupements aldéhydes libres est réalisée en incubant les coupes 15

min dans une solution de PBS / NH_4Cl 50 mM. Les tissus sont ensuite incubés dans une solution de PBS / Saponine 0,05% / Albumine de sérum bovin (Bovine serum albumin, BSA) 0,2% pendant 15 min.

Les coupes sont ensuite incubées avec l'anticorps primaire (Acl) : anticorps de chèvre anti-Rnd2 (1/50^e; Santa Cruz sc-1945) dilué dans la solution de saturation-perméabilisation pendant 24h à 4°C et sous agitation. Les tissus sont ensuite rincés 3 x 5 min dans du PBS / Saponine 0,05% avant d'être incubés avec l'anticorps secondaire (AclI) produit chez l'âne -dirigé contre les anticorps de chèvre - couplé à l'Alexa 488 (1/1000^e ; Invitrogen A11055); également incubées avec le marqueur nucléaire TOTO-3 (1/2000^e) le tout dilué dans du PBS / Saponine 0,05% / BSA 0,2%. Les coupes sont finalement rincées 3 x 5 min dans du PBS puis dans de l'eau milliQ avant d'être montées sur lame et observées en microscopie confocale (Leica® SP8, Bordeaux Imaging Center).

3. Marquage immunohistochimique fluorescent

Le reste des révélations immunohistochimiques fluorescentes s'effectuent selon un protocole précédemment décrit par la laboratoire (Abrous et al., 2002). Les coupes flottantes de cerveaux conservées dans le PB à 4°C sont rincées 4 x 7 min au PBS (pH 7,4 à température ambiante). Une étape de perméabilisation et de saturation des sites aspécifiques de liaison est effectuée: les tissus sont pré-incubés pendant 45 min dans une solution de PBS-Triton (0,3% de triton X100), contenant 3% de sérum normal (SN). Après élimination de cette solution, les coupes sont incubées pendant 24h (à 4°C sous agitation) en présence de l'Acl choisi (voir **Tableau 3**) dilué dans du PBS / 0,3% triton X100 / 1% SN. Les coupes, lavées 4 x 7 min dans du PBS, sont ensuite incubées pendant 90 min (à température ambiante, dans le noir et sous agitation constante) avec un AclI approprié (voir **Tableau 3**) ainsi que le marqueur nucléaire TOTO-3 (dilué au 1/2000^e). Après incubation, les coupes sont de nouveau lavées 3 x 5min dans du PBS et rincées dans de l'eau milliQ avant d'être montées dans du milieu de montage pour fluorescence (Aqua Polymount, Polysciences Inc.) et recouvertes d'une lamelle de verre.

Anticorps primaires				
Marqueurs	Noms	Espèces	Références	Dilutions
Caspase3	Cleaved Caspase-3 (Asp175)	Lapin	Cell signaling 9661	1/400
DCX	Anti-Doublecortine (C-terminal)	Lapin	Sigma D9818	1/2000
GFP	Anti-GFP	Poulet	Abcam ab13970	1/1000
GFP	Anti-GFP	Lapin	Millipore AB3080P	1/15000
Ki67	Anti-Ki67	Lapin	NovoCastra Ki67p	1/1000
RFP/dsRed	Anti-DsRed	Lapin	Clontech 632495	1/500
Rnd2 (Rho7)	Anti-Rho7 (C-19)	Chèvre	Santa-Cruz sc-1945	1/50
Anticorps secondaires				
Sérums	Noms	Fluorochromes	Références	Dilutions
Sérum normal de chèvre	Chèvre anti-poulet	Alexa 488	Invitrogen A11039	1/1000
	Chèvre anti-lapin	Alexa 488	Invitrogen A11008	1/1000
	Chèvre anti-lapin	Alexa 568	Invitrogen A11036	1/1000
Sérum normal d'âne	Âne anti-chèvre	Alexa 488	Invitrogen A11055	1/1000
	Âne anti-lapin	Alexa 568	Invitrogen A11056	1/1000

Tableau 3. Liste des anticorps utilisés pour les révélations immunohistochimiques

4. Marquage immunohistochimique peroxydasique de la GFP

Les coupes flottantes sont rincées 3 x 5 min au PBS puis sont prétraitées avec une solution de méthanol et 0,5% de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) pendant 30 min afin d'épuiser les peroxydases endogènes. Les coupes sont ensuite rincées 4 x 7 min dans du PBS puis pré-incubées pendant 45 min dans une solution de blocage: PBS-Triton (0,3% de triton X100), contenant 3% de sérum normal de chèvre (SNC). Après élimination de la solution, les coupes sont incubées en présence d'Acl de lapin anti-GFP (1/15 000, Millipore, AB3080P) dans la solution de blocage, sous agitation pendant 24h à 4°C. Après rinçages au PBS, les coupes sont incubées avec l'AclI biotinylé produit chez la chèvre et dirigé contre les anticorps de lapin (dilué au 1/200^e, Dako; dans du PBS, 1% SNC; agitation, 90 min). Les tissus sont ensuite rincés 4 x 7 min au PBS puis incubés pendant 90 min dans une solution de streptavidine-biotine-peroxydase (Vectastain ABC HRP Kit, Vector labs. 1/200; PBS ; 1% SN). Une étape de rinçage au PBS est réalisé puis le marquage est révélé par réaction entre peroxyde, le chromogène 3,3-diaminobenzidine (DAB) (CN75 Carl Roth, 50 mg/100 ml) et le substrat de la réaction peroxydasique H₂O₂ (0,005%) pendant 30 min maximum. Après rinçage 3 x 5 min au PBS les coupes sont lavées avec de l'eau milliQ et montées dans un milieu de montage aqueux se solidifiant après montage (Aquatex, 108562 Merck Millipore) et recouvertes d'une lamelle en verre.

P. Analyse anatomique

1. Etude de l'expression de marqueurs moléculaires

L'injection de rétrovirus dans le GD de souris adultes permet la transduction des cellules nouvellement formées qui expriment alors les transgènes viraux, marquant ainsi ces nouvelles cellules grâce à l'expression des protéines fluorescentes: GFP, RFP et dsRed. Des doubles marquages immunohistochimiques sont réalisés de façon à révéler, d'une part les cellules néoformées exprimant ces protéines fluorescentes et d'autre part le marqueur moléculaire d'intérêt (voir **Tableau 3**). En mesurant la co-localisation de ces deux marquages il est donc possible d'évaluer l'expression par les cellules néoformées des différents marqueurs moléculaires. L'expression de Ki67, un marqueur endogène exprimé tout au long du cycle cellulaire, est utilisée pour mesurer la prolifération cellulaire (Scholzen and Gerdes, 2000; Endl et al., 2001; Kee et al., 2002). L'engagement dans la voie de différenciation neuronale des jeunes cellules néoformées a été caractérisé par l'expression de la doublecortine, un marqueur de neurone immature (DCX; Gleeson et al., 1999; Couillard-Despres et al., 2005). Les cellules apoptotiques ont été étudiées en visualisant la forme activée de la protéine caspase3 (Nicholson et al., 1995). L'acquisition des images est réalisée à l'aide d'un microscope confocal (Leica SP5, Bordeaux Imaging Center) et la coexpression est analysée avec le logiciel ImageJ.

2. Evaluation quantitative des cellules d'intérêt

Le nombre total de cellules transduites par l'injection de rétrovirus dans le GD est évalué par analyse stéréologique. Brièvement, le nombre total de cellules exprimant les protéines fluorescentes dans le GD gauche et droit est estimé en effectuant un échantillonnage randomisé d'une coupe de cerveau sur dix le long de l'axe rostro-caudal de la formation hippocampique (Drapeau et al., 2003). Sur chaque coupe, toutes les cellules immuno-réactives (IR) pour ces protéines fluorescentes sont comptées dans les couches sous-granulaire, granulaire et moléculaire du GD en utilisant un microscope à épifluorescence (Axio Imager A2 Zeiss) et un objectif x40. Le nombre total de cellules IR comptées est multiplié par 10 si les GD gauche et droits sont analysés et par 20 si seulement le GD droit est compté.

3. Analyse de la position relative des néo-neurones dans le GD

L'analyse de la position relative des néo-neurones, marqués par les protéines fluorescentes, au sein du GD se fait en calculant le ratio de la distance parcourue par ces cellules depuis la ZSG rapporté à la taille de la CG visualisée à l'aide du marqueur nucléaire TOTO-3. Ainsi lorsque le

ratio est proche de 0, les néo-neurones sont retrouvés dans la partie interne de la CG et quand le ratio est proche de 1, les néo-neurones sont proches de la limite entre la CG et la CM du GD.

4. Etude morphométrique des néo-neurones

L'étude morphométrique de l'arborisation dendritique ainsi que du soma des néo-neurones est réalisée à partir de la reconstruction 3D des neurones GFP⁺ ou RFP⁺ selon la méthode décrite par Rao et coll. (Rao and Shetty, 2004). Brièvement, pour chaque souris étudiée, un minimum de 3 neurones sont tracés sous objectif 100x au moyen du module semiautomatique Neuron Tracing du logiciel Neurolucida (MicroBrightField) associé à un microscope Zeiss. L'analyse morphométrique faite à l'aide du logiciel NeuroExplorer (MicroBrightField) permet d'évaluer le périmètre maximal du soma, la longueur dendritique totale, le nombre total de noeuds dendritiques et de terminaisons dendritiques, la taille du tronc, ainsi que l'analyse de Sholl et du Convex Hull 3D. L'analyse de Sholl – ou analyse par cercles concentriques – consiste à compter automatiquement à partir du centre du soma le nombre de dendrites croisant une série de cercles concentriques équidistants de 10 μ m permettant ainsi d'étudier la complexité de l'arbre dendritique. Les analyses de l'angle de l'arborisation dendritique, la "path distance", la largeur de l'arbre dendritique ainsi que le ratio entre la longueur et la largeur du soma sont effectuées avec le logiciel ImageJ. L'analyse de l'enveloppe convexe en 3 dimensions (Convex Hull 3D) mesure le volume de l'arbre dendritique en générant un polygone convexe reliant l'extrémité des dendrites distales.

Q. Analyses statistiques

La normalité des variances pour chaque échantillon sont respectivement testées avec le test de Shapiro-Wilk. Les données sont exprimées par la moyenne $\pm$ l'erreur type de la moyenne (standard error of mean, S.E.M.) des échantillons. Les données sont traitées par comparaison des moyennes avec le test t de Student (t-test) ou par analyse de variance (ANOVA). Si une interaction significative des facteurs est détectée, les tests post-hoc de Tukey et de Dunnett sont utilisés. Les effets dont la valeur de p est inférieure à 0.05 sont reportés comme significatifs. Les analyses statistiques sont effectuées à l'aide du logiciel Prism6 (GraphPad).

Chapitre IV. Résultats

A. Etude du rôle joué par Rnd2 dans la neurogénèse adulte hippocampique

1. Présentation Générale

Le cytosquelette est un pilier de nombreux processus biologiques, allant de la division cellulaire à la migration, en passant par l'extension de prolongements spécialisés. Parmi les "sculpteurs" principaux du cytosquelette, se trouvent les petites GTPases de la famille Rho (Govek et al., 2005; Azzarelli et al., 2015b). Cette famille compte de nombreux membres, dont les protéines de la sous famille des Rnds, qui sont des Rho GTPases atypiques jouant un rôle prépondérant dans le développement neuronal. Plus particulièrement il a été montré que Rnd2 et Rnd3 étaient des régulateurs importants de la neurogénèse embryonnaire corticale (Heng et al., 2008; Pacary et al., 2011; Azzarelli et al., 2015a). De plus *Rnd2* est enrichi au niveau de la ZSG du GD adulte (Miller et al., 2013), indiquant donc une potentielle implication dans le processus de neurogénèse hippocampique adulte.

Le premier axe de recherche de cette thèse fut donc l'étude du rôle de Rnd2 dans le développement de nouveaux NGs au sein du GD adulte. Dans un premier temps, une **caractérisation de l'expression de Rnd2 au sein du GD de souris adultes** a été nécessaire. Dans ce but, nous avons réalisé d'une part des hybridations *in situ* et des analyses par PCRq afin d'étudier l'expression de *Rnd2* et, d'autre part, des révélations immunohistochimiques pour caractériser l'expression de la protéine Rnd2 dans le GD adulte. Nous avons ainsi pu confirmer que l'expression de Rnd2 est restreinte à la ZSG à l'âge adulte et que Rnd2 est effectivement exprimée au sein des néo-neurones immatures du GD. De manière intéressante nous avons observé que l'expression de *Rnd2* est augmentée dans la partie temporale du GD de souris adultes, une région impliquée dans la régulation des comportements liés à l'humeur (Bannerman et al., 2004; Kheirbek et al., 2013; Anacker et al., 2018). Puis de façon à disséquer **le rôle joué par Rnd2 lors de la neurogénèse hippocampique adulte**, une approche de perte de fonction a été mise en place. Pour cela des rétrovirus exprimant la recombinaise Cre fusionnée à la GFP ont été injectés dans le GD de souris adultes mutantes pour lesquelles le gène *Rnd2* est flanqué de sites lox (*Rnd2^{flox/flox}*), permettant la délétion spécifique de *Rnd2* dans les neurones générés au moment de l'injection rétrovirale. De cette manière nous montrons que la délétion de *Rnd2* induit un mauvais positionnement des nouveaux neurones et une maturation morphologique altérée. De plus nous observons une augmentation de l'apoptose des néo-neurones délétés pour *Rnd2* lors de la période critique de survie au stade immature (Tashiro et al., 2006). Ayant ainsi

montré un rôle central de *Rnd2* dans la régulation de la neurogénèse hippocampique adulte, nous avons ensuite **étudié son implication dans les fonctions hippocampiques soutenues par les néo-neurones du GD adulte**. En utilisant la même stratégie de perte de fonction, nous avons délété *Rnd2* au sein des néo-neurones et étudié le comportement des souris. Nous avons ainsi pu montrer que les animaux "délétés pour *Rnd2*" (i.e. dont l'expression de *Rnd2* a été supprimée dans les néo-neurones hippocampiques) présentent un comportement d'évitement des environnements lumineux, manifestant donc un état d'anxiété plus prononcé que les souris témoins. Cependant aucune altération des fonctions mnésiques n'a été observée après délétion de *Rnd2* au sein des néo-neurones du GD adulte et cette suppression n'induit pas un état de type dépressif chez les souris. L'ensemble de ces résultats est présenté dans la partie suivante sous forme d'un article scientifique en préparation.

2. Article 1: *Rnd2* is essential for granule neuron development in the adult hippocampus and serves a critical role in anxiety-like behavior

**Rnd2 is essential for granule neuron development in the adult hippocampus
and serves a critical role in anxiety-like behavior**

Thomas Kerloch ^{1, 2}, Fanny Farrugia ^{1, 2}, Marlène Maître ³, Muriel Koehl ^{1, 2}, Mylène Blanchard ^{1, 2},
Hélène Doat ^{3, 4}, Thierry Leste-Lasserre ⁴, Julian Ik-Tsen Heng ⁵, Adeline Goron ^{1, 2}, Delphine
Gonzales ⁶, Djoher Nora Abrous ^{1, 2, 7}, Emilie Pacary ^{1, 2, 7, *}

¹ INSERM U1215, Neurocentre Magendie, F-33000 Bordeaux, France

² Université de Bordeaux, F-33000 Bordeaux, France

³ Laser microdissection Facility, INSERM U1215, Neurocentre Magendie, F-33000 Bordeaux, France

⁴ Transcriptome Facility, INSERM U1215, Neurocentre Magendie, F-33000 Bordeaux, France

⁵ Curtin Health Innovation Research Institute, Curtin University, Bentley, Western Australia, Australia 6102

⁶ Genotyping Facility, INSERM U1215, Neurocentre Magendie, F-33000 Bordeaux, France

⁷ These authors contributed equally

* Correspondence: emilie.pacary@inserm.fr

Running title: Rnd2 is essential for adult hippocampal neurogenesis

INTRODUCTION

Neurogenesis was traditionally believed to occur only during embryonic and early postnatal periods in the mammalian brain. However, over the last 20 years, research has firmly established that new neurons are continuously born throughout lifespan in mammals, especially in the hippocampal dentate gyrus (DG) (Goncalves et al., 2016). It is now widely accepted that adult hippocampal neurogenesis, also described in humans (Boldrini et al., 2018; Eriksson et al., 1998; Spalding et al., 2013) but still controversial (Cipriani et al., 2018; Kempermann et al., 2018; Sorrells et al., 2018), is not merely a remnant of embryonic development, but a highly responsive and regulated process that appears to be critically involved in hippocampus-dependent functions such as memory encoding and mood regulation (Toda et al., 2018). The finding that new neurons are generated throughout life has opened novel avenues for brain repair and has initiated tremendous efforts to characterize how new neurons differentiate and integrate into adult neural circuitries. However, we are only just beginning to understand the cellular and molecular mechanisms that regulate the neurogenic process in the adult brain (Toda et al., 2018). Thus, further studies are needed to provide new insights into the mechanisms and signaling cascades involved in the generation, survival and integration of individual adult newborn neurons and to eventually identify new potential therapeutic targets for stimulating neurogenesis.

Like during development, adult hippocampal neurogenesis is a multi-step process starting with a phase of proliferation (Abrous et al., 2005). Once generated, immature neurons migrate from the subgranular zone (SGZ) of the DG to the inner granule cell layer (GCL) and differentiate into glutamatergic dentate granule neurons (DGNs). Within days, newborn neurons extend dendrites toward the molecular layer and project axons through the hilus toward the CA3 (Sun et al., 2013). After a maturation phase of approximately 6 weeks, adult-born neurons exhibit similar basic electrophysiological properties as developmentally-born DGNs (Laplagne et al., 2006). However, within several days after their birth, at least fifty percent of the newborn cells die via two apoptotic waves, one at the progenitor stage (Sierra et al., 2010) and one at the immature neuron integration stage (Tashiro et al., 2006a).

Although this series of events is a highly choreographed process that requires an extensive and dynamic remodeling of the cytoskeleton, very little is known about the role of cytoskeletal regulators during adult neurogenesis (Vadodaria and Jessberger, 2013). In particular, few studies have addressed the roles played by the Rho GTPases, the master regulators of cytoskeleton rearrangements (Heasman and Ridley, 2008). In this family, Cdc42, Rac1 and RhoA are the most

well-known members and are the only one that have been studied in the context of adult hippocampal neurogenesis. Vadodaria et al (2013) showed that Cdc42 is involved in mouse neural stem/progenitor cell proliferation, dendritic development and spine maturation, while Rac1 is important in late steps of dendritic growth and spine maturation in adult hippocampal newborn neurons (Vadodaria et al., 2013). Regarding RhoA, the blockage of its signaling, pharmacologically *in vivo*, seems to promote the survival of adult-born DGNs (Christie et al., 2013).

In this study, we focused our attention on Rnd2/Rho7/RhoN. Rnd2 belongs to the Rnd subfamily of atypical Rho proteins that lack intrinsic GTPase activity and is therefore constitutively bound to GTP (Chardin, 2006). Interestingly, among the 23 members of the Rho GTPase family (Grise et al., 2009), *Rnd2* is the only one with *TC10* to be selectively enriched in the adult mouse SGZ and inner GCL suggesting a potential prominent role in the process of adult hippocampal neurogenesis (Miller et al., 2013). In addition, Rnd2 is known for its regulatory action during embryonic cortical neurogenesis especially during radial migration (Heng et al., 2008; Pacary et al., 2011) and was shown to regulate multiple aspects of neuronal development *in vitro* like neurite outgrowth and branching (Azzarelli et al., 2015; Fujita et al., 2002; Tanaka et al., 2006). Thus, in view of all these data, it was tempting to speculate that Rnd2 may also play a key role in the regulation of adult hippocampal neurogenesis. Here, to elucidate the *in vivo* function of Rnd2 in this process, we used a retrovirus-based loss-of-function approach. With this strategy, we demonstrate that Rnd2 is crucial not only for the survival of adult-born DGNs but also for their positioning in the GCL and the morphogenesis of their somatodendritic compartment. Importantly, we also show that Rnd2 controls anxiety-like behavior from adult-born hippocampal neurons. Altogether, our data provide the evidence that Rnd2 controls cell autonomously the development of adult hippocampal newborn neuron and plays a critical role in anxiety-like behavior.

RESULTS

Rnd2 is enriched in the temporal SGZ of the mouse DG

We began this study by examining the expression of Rnd2 in the mouse DG. We first observed by RNA in situ hybridization and real-time PCR that *Rnd2* expression decreases significantly in the DG between the postnatal period and the adult stage (Fig. 1A-D), similarly to *Rnd1* and *Rnd3* (Fig. S1A, B). However in the adult brain, *Rnd2* shows a different pattern of expression compared to

other members of the Rnd family, particularly interesting in the context of adult neurogenesis. Indeed, *Rnd2* is more specifically expressed in the DG whereas *Rnd1* and *Rnd3* are localized both in CA1-CA3 hippocampal fields and in the DG (Fig. 1B and S1C) and, more importantly, this expression of *Rnd2* in the DG is restricted to the SGZ and the inner GCL (Fig. 1B, C). In addition, *Rnd2* mRNA expression increases in the temporal part of the adult DG (Fig. 1E), whereas *Rnd1* and *Rnd3* levels are relatively stable along the septo-temporal axis (Fig. S1D). By immunohistochemistry, we confirmed, at the protein level, the enrichment of Rnd2 in the SGZ and inner GCL of the adult DG (Fig. 1F) and we showed that Rnd2 is expressed in adult newborn neurons, by colabeling with doublecortin (DCX), a marker of immature neurons (Fig. 1G-I). Rnd2 has been shown to be expressed in endosomes (Pacary et al., 2011; Tanaka et al., 2002), hence a vesicular staining for Rnd2. Altogether these results indicate that Rnd2 is particularly enriched in the SGZ of the adult DG where newborn neurons are generated, suggesting that this Rho GTPase might be involved in the process of adult hippocampal neurogenesis.

Rnd2 is critical for the survival of adult hippocampal newborn neurons

To address the role of Rnd2 in adult hippocampal neurogenesis, we deleted *Rnd2* specifically in adult-born hippocampal neurons using a loss of function approach based on retrovirus-mediated single-cell gene knockout in new neurons *in vivo* (Tashiro et al., 2006b). The principle of the technique is to deliver the Cre recombinase selectively to adult new neurons, using a retroviral vector, in *Rnd2^{flox/flox}* mice (Fig. S2A). By injecting retroviruses expressing Cre fused to green fluorescent protein (GFP/Cre), or GFP only in control condition, into the DG of adult *Rnd2^{flox/flox}* mice (12 week-old), we first confirmed, after microdissection of GFP+ cells followed by RT-PCR, that *Rnd2* mRNA expression was strongly decreased in GFP/Cre+ cells compared to control GFP+ cells whereas *Rnd1* and *Rnd3* mRNA expressions were not changed (Fig. S2B; $t_{15}=4.42$, $p<0.001$). Indeed, 7 days post-injection (dpi), the expression of *Rnd2* was decreased by almost 80% (Fig. S2B).

Once validated, we used this viral strategy to study the role of Rnd2 in the development of adult-born hippocampal neurons. We first showed that *Rnd2* deletion in these cells does not affect neuronal progenitor proliferation and neuronal differentiation (Fig. S3). Intriguingly, we noticed, in these first sets of experiments, that the number of GFP+ labeled cells in the GFP/Cre condition was always lower compared to the GFP condition 2-3 weeks after retroviral injection (Fig. 2A). So to determine whether Rnd2 is involved in the regulation of adult newborn neuron survival, we quantified the number of GFP+ cells in the DG of *Rnd2^{flox/flox}* mice, injected with

Cre/GFP or GFP expressing retrovirus, at different time points post-injection (Fig. 2B). Importantly the same viral preparation was used for each type of virus. Indeed, as already mentioned by others (Tashiro et al., 2006a), the absolute number of fluorescently labelled cells is generally highly variable when different viral preparations are injected, even if we try to measure and match virus titer precisely; whereas with the same viral preparation, this number is consistent between mice. For the same reason, the number of GFP+ cells at each time point was normalized to the number obtained for the corresponding virus at 3 dpi to properly compare the survival rate of new neurons transduced by GFP or GFP/Cre retrovirus. In accordance with previous studies showing the existence of a critical period for newborn granule cell survival between 2 and 3 weeks post-mitosis (Kempermann et al., 2003; Tashiro et al., 2006a), we found a significant decrease in the number of control new neurons 3 weeks after virus injection (Fig. 2B). Indeed, in the GFP control condition, the absolute number of retrovirus-labeled cells decreased over time and in particular between 14 and 21 dpi, such that the number of cells at 21 dpi was 64% of the number at 3 dpi (Fig. 2B). Consistent with our first observations, the suppression of *Rnd2* substantially decreased the number of newborn granule neurons from 14 dpi and, at 21 dpi, only $10.9\% \pm 1.9\%$ of *Rnd2*-deleted cells survived compared to $35.7 \pm 5.7\%$ of control cells (Fig. 2A, B; $t_9=2.54$, $p=0.03$ at 14 dpi; $t_8=4.12$, $p=0.003$ at 21 dpi). To confirm that this decrease induced by *Rnd2* suppression was really due to their elimination through an apoptotic process, we examined the activation of caspase 3 (caspase 3a, Fig. 2C). Since apoptotic cells are rapidly cleared (Savill, 1997; Sierra et al., 2010), the probability of detecting apoptotic newborn cells is low. Thereby we observed a small fraction of GFP+ cells expressing caspase 3a in the control group at 14 and 21 dpi (Fig. 2D). Nonetheless, the proportion of transduced cells expressing caspase-3a was significantly increased at 21 dpi in the GFP/Cre condition compared to GFP (Fig. 2D; $t_{10}=1.98$, $p=0.04$) indicating that the phenomenon of cell death in newborn neuron is significantly amplified by *Rnd2* suppression.

To further confirm these results, we used a retroviral co-injection strategy (Tashiro et al., 2006a). We injected *Rnd2*^{flox/flox} mice with retrovirus expressing GFP/Cre together with red fluorescent protein (RFP) expressing control virus. This approach allows to analyze, in the same mice, *Rnd2*-knockout (GFP+/RFP+ cells and GFP+ only) and control new neurons (RFP+ only) (Fig. 2E). Consistently with previous results, we found that the number of *Rnd2*-deleted cells was significantly lower at 21 dpi compared to wild-type cells (Fig. 2E; $20.3\% \pm 3.8\%$ of *Rnd2*-deleted cells survived compared to $56.7 \pm 12.8\%$ of control cells; $t_7=3.71$, $p=0.008$). Thus, taken together,

the aforementioned data demonstrate that the suppression of *Rnd2* in adult hippocampal newborn neurons substantially reduces their survival.

Rnd2 controls the positioning and the morphogenesis of adult-born neurons

We next examined the role of *Rnd2* in the migration of adult newborn neuron. Previous studies have established that newborn neurons generated during adult hippocampal neurogenesis migrate into the GCL during the second week after birth (Esposito et al., 2005) and they contribute mostly to the inner third of the GCL and to a less extent to the mid third (Duan et al., 2007; Kempermann et al., 2003). To analyze the impact of *Rnd2* deletion on this developmental step, we determined the relative position of GFP and GFP/Cre retrovirus-labeled cells expressing DCX in the GCL at 7, 14 and 21 dpi (Fig. 3A). This relative position was examined as already described (Han et al., 2016; Kerloch et al., 2018) : the inner border of the GCL was defined as the start line for cell migration and the perpendicular distance from this border to the center of each cell body was measured and normalized by the thickness of the GCL (Fig. 3B). At 21 dpi, we found that the surviving *Rnd2*-knockout neurons migrated further in the GCL compared to control neurons (Fig. 3C; relative position of 0.51 ± 0.13 for *Rnd2*-deleted neurons compared with 0.21 ± 0.01 for control neurons; $t_8=2.34$, $p=0.05$), indicating that *Rnd2* is important for the correct positioning of newborn neurons in the GCL of the adult DG.

While migrating, adult-born dentate neurons develop their dendritic arborization (Esposito et al., 2005). Three weeks after birth, their overall morphology resemble that of neurons at later time points (Zhao et al., 2006). To determine whether *Rnd2* is also important for this process, we examined the morphology of newborn neurons in *Rnd2*^{flox/flox} brains injected with a mixture of GFP/Cre and RFP retroviruses. In the same animals, we were able to reconstruct the somatodendritic structure of control cells (cells expressing only RFP) and *Rnd2*-deficient cells (cells expressing GFP and RFP) (Fig. 3D). Interestingly, our quantifications showed that *Rnd2*-depleted neurons exhibit longer (Fig. 3E-F; $t_4=3.64$, $p=0.02$ at 14 dpi; $t_5=3.36$, $p=0.02$ at 21 dpi) and more branched dendrites compared to control neurons (Fig. 3E, G; $t_5=3.39$, $p=0.02$ at 21 dpi). Sholl analysis at 21 dpi also revealed that *Rnd2* deletion increases the complexity of the dendritic tree within the entire molecular layer (Fig. 3H). More surprisingly, we also found that the absence of *Rnd2* in newborn neurons impacts the size of the cell body. Indeed, cell bodies of *Rnd2*-deleted neurons were significantly larger than those of control neurons at 21 dpi (Fig. 3I; $t_5=3.17$, $p=0.02$). Altogether, these results show that, besides their correct distribution in the

GCL, *Rnd2* controls the morphogenesis of adult-born hippocampal neurons, including soma size and dendritic tree extent.

***Rnd2* controls newborn neuron survival independently of its role in positioning and morphology**

The aforementioned results then raised the following question: do the *Rnd2*-deleted neurons die because of their mispositioning and/or aberrant morphology or because *Rnd2* has a proper effect on the survival of adult newborn neurons? To break the tie between these two scenarios, we used a retrovirus expressing an inducible Cre (Mu et al., 2015) in order to delete *Rnd2* expression at a specific stage, in particular 3 weeks after birth, when new neurons have reached their final position and developed their arborization (Fig. 4A). In this paradigm, we showed that *Rnd2* suppression induces cell death without perturbing, as expected, new neuron position and morphology, indicating that *Rnd2* controls directly the survival of these cells (Fig. 4B; $t_{12}=2.31$, $p=0.04$ for survival). Interestingly, when we induced *Rnd2* deletion at 28 dpi we still observed newborn neuron cell death (Fig. S4; $t_{11}=2.75$, $p=0.02$ for survival) whereas its suppression at 56 dpi following the same protocol did not impact anymore the survival of newborn neurons (Fig. 4C, D; $t_{12}=0.84$, $p=0.42$ for survival). Thus *Rnd2* is critical for adult hippocampal newborn neuron survival during a defined period of their development, in a late phase of neurogenesis.

***Rnd2* expression in adult-born dentate neurons controls anxiety-like behavior**

Accumulating evidence suggests that new neurons in the DG may be of pivotal importance for several hippocampal-dependent functions (Toda et al., 2018). In particular, newborn neurons in the adult DG have been shown to contribute to spatial navigation (Dupret et al., 2008) and behavioral pattern separation (Clelland et al., 2009; Nakashiba et al., 2012; Tronel et al., 2010), a process allowing to distinguish highly similar events or contexts. In addition, hippocampal neurogenesis has been involved in the regulation of affective states and anxiety in particular (Anacker and Hen, 2017; Revest et al., 2009). In view of these data and because *Rnd2* is crucial for adult newborn neuron survival and maturation in the DG, we studied whether the deletion of *Rnd2* specifically in these cells impairs hippocampal-dependent memory, anxiety and/or depression-like behaviors. In this goal, two batches of adult *Rnd2*^{flox/flox} mice were injected bilaterally into the DG with high-titer retroviruses expressing GFP or Cre/GFP and tested behaviorally at least four weeks after the injection (Fig. 5A).

Regarding memory, we first studied spatial navigation according to a classical procedure in the Morris water maze (MWM) that allows to test reference memory (Fig. S5A). We found that spatial memory was intact following *Rnd2* depletion in adult-born neurons since *Rnd2*-deficient mice, released from variable starting points, were able to find the hidden platform similarly to control mice (Fig. S5B). Moreover no memory deficit was observed during the probe test, performed 3 days after the completion of the learning phase, indicating that long-term memory retention and recall were not affected (Fig. S5C). To explore the impact of *Rnd2* deletion on behavioral pattern separation, mice were trained in a contextual fear conditioning paradigm to assess their ability to discriminate two similar contexts (Fig. S5D). First, mice received three shocks in context A and freezing response was measured 24 h later in the same context (without shock) and in a similar context B (Fig. S5D). The absence of *Rnd2* in adult-born neurons did not impact contextual fear conditioning since GFP and Cre/GFP injected mice exhibited similar freezing in context A (Fig. S5E). In addition, no generalization was observed since both groups did not freeze in context B (Fig. S5E). When animals were tested 5 weeks later, both groups of animals froze in context A and not in B, similarly to what we observed 24 h after conditioning (Fig. S5F). Altogether these results indicate that the deletion of *Rnd2* does not affect the formation and retention of spatial or associative memory as well as behavioral pattern separation.

We next examined the impact of *Rnd2* suppression in adult-born DGNs on anxiety-like behaviors. In rodents these behaviors are primarily studied by measuring avoidance responses to potentially threatening situations, such as open and bright environments. Using the open field test, we first checked, 4 weeks after retrovirus injection, that *Rnd2*-deficient mice showed comparable locomotor activity compared to control mice (Fig. S5G). In this test, the time spent in the center was not significantly different between the two groups (Fig. S5H, $t_{25}=0.64$, $p=0.53$). The following day, mice were subjected to the emergence test using a dark cylinder placed into a bright open field. In this task, we did not observe any significant difference although the latency to emerge from the reassuring cylinder tends to be longer for *Rnd2*-deficient mice compared to control mice (Fig. S5I-K, $t_{25}=1.73$, $p=0.10$). In contrast, in the elevated plus maze (EPM), *Rnd2*-deficient mice (GFP/Cre) spent significantly less time in the open arms, constituting the threatening areas, compared to control mice (GFP) (EPM1, Fig. 5B, $t_{24}=2.48$, $p=0.02$). Interestingly, the avoidance of the threatening area was still increased in the GFP/Cre group compared to control group 10 weeks after virus injection, thus showing a long-lasting effect of the deletion (EPM2, Fig. 5B; $t_{25}=2.19$, $p=0.04$). Importantly, this effect was not due to a

modification of locomotor activity and/or exploration since the number of total entries was similar between the two groups (Fig. 5C). In accordance with these results, *Rnd2*-deficient mice also exhibited an increase anxiety-like behavior in the light/dark test. Indeed, mice depleted for *Rnd2* in adult-born hippocampal neurons escaped more quickly the illuminated room (Fig. 5D, $t_{18}=2.80$, $p=0.01$) and spent significantly less time in this room compared to control mice (Fig. 5E, $t_{18}=4.63$, $p<0.001$).

In a subsequent analysis, a z-normalization was applied (Guilloux et al., 2011). This normalization is a methodology that standardizes observations obtained at different times and from different cohorts, thus allowing their compilation. For each anxiety-like behavior, a z-score was calculated as follows: $z = ((x-\mu)/\sigma)$ where x represents the individual data for the observed parameter, and μ and σ the mean and standard deviation for the control group, respectively (see Methods for details and Fig. S6A-E). The directionality of scores was adjusted so that increased score values reflect increased anxiety. Then the z values obtained for each test were averaged to obtain a single z-anxiety score (Fig. S6F-H). As shown in Figure 5F ($t_{45}=4.01$, $p<0.001$), this score is highly increased in mice injected with the GFP/Cre retrovirus compared to control mice further supporting that the suppression of *Rnd2* in adult-born granule neurons significantly increases anxiety-like behavior.

We then analyzed depression-like behaviors to determine whether *Rnd2*, from adult-born granule neurons, has also a specific role on this behavior. In the sucrose preference test, the total liquid intake as well as the consumption of sucrose were similar between the two groups indicating that the deletion of *Rnd2* does not induce anhedonia-like behavior (Fig. S5L-M). Next, we assessed immobility during exposure to inescapable stress using the forced-swim test (FST). In this test, the latency to immobility and the total time spent floating are indicative of the level of resignation. These two parameters were not modified by the absence of *Rnd2*, although there was a slight trend (Fig. S5N-O, $t_{18}=1.92$, $p=0.07$ for immobility time). z-score normalization was also performed to obtain a single depression score. As shown in Figure S6I-K, this score was similar between the two groups showing that the absence of *Rnd2* in newborn neurons of the adult DG does not impact depression-like behavior.

Finally, the number and the position of adult-born neurons targeted by our retroviral approach were quantified at the end of the behavioral sequences. In both batches of animals, we confirmed that the deletion of *Rnd2* increases the death of newborn neurons in the adult DG since fewer GFP+ cells were detected in the GFP/Cre group compared to control group (Fig. 5G-

J), although similar titers of virus were infused (see Methods for details). In addition, transduced cells were located along the septo-temporal axis of the DG.

DISCUSSION

Despite the central role of Rho GTPases in neuronal development (Govek et al., 2005), their function in adult neurogenesis has been poorly investigated (Vadodaria and Jessberger, 2013) and the role in particular of the Rnd subfamily is totally unknown. In this study, by using an approach of loss of function, we provide evidence that Rnd2 is essential for adult hippocampal neurogenesis. At the cellular level, we demonstrate that Rnd2 is cell-intrinsically required for the survival and maturation of adult-born neurons. At the organism level, we show that the expression of Rnd2 in newborn neurons of the adult hippocampus is critical in the control of anxiety behavior. By using *Rnd2* mutant conditional mice, we thus highlight new important functions for this atypical Rho GTPase *in vivo*.

Rnd2 has unique functions in the development of adult-born granule neurons

So far, our knowledge on Rnd2 functions in neurons *in vivo* is based on studies performed in the context of cerebral cortex development (Heng et al., 2008; Pacary et al., 2011). During corticogenesis, Rnd2 has been shown to control neuronal migration (Heng et al., 2008; Pacary et al., 2011) and neurite outgrowth (Heng et al., 2008). The finding that Rnd2 is a key player in newborn neuron positioning and morphology in the adult DG was thus not surprising although the environment in the developing and adult brain are not similar. In contrast, the finding that Rnd2 is crucial for the survival of adult-born neurons was more unexpected because Rnd2 has never been described, to our knowledge, as a regulator of cell survival in any cell types. This function of Rnd2 in adult newborn neurons seems thus unique. In contrast to Rnd2, Rnd3 has been shown to modulate cell survival and apoptosis (Riou et al., 2010). Moreover, Rnd3 is involved in neural progenitor proliferation (Pacary et al., 2013), neuronal migration (Azzarelli et al., 2014; Pacary et al., 2011) and polarization (Peris et al., 2012) whereas Rnd1 regulates late stages of neuronal development such as dendrite and spine formation (Ishikawa et al., 2003, 2006). Therefore, it will be interesting in future experiments to determine whether the two other Rnds also contribute to adult hippocampal neurogenesis and whether they have similar functions. However, in view of their distinct expression pattern in the adult DG (Fig. S1), we can already speculate that Rnd1 and Rnd3 might mediate different functions than Rnd2 in this

process. Moreover, Rnd1 and Rnd3 have been shown, in different cell types including neurons, to be predominantly expressed at the plasma membrane whereas Rnd2 is mainly located in endosomes (Pacary et al., 2011; Roberts et al., 2008). This expression at different subcellular levels further supports our hypothesis that Rnd2 might dictate different functions than Rnd1 and Rnd3 in adult-born neurons.

Our data obtained with the retrovirus expressing an inducible Cre (Fig. 4) indicate that Rnd2 controls directly adult newborn neuron survival, independently of its role in their positioning and morphology. Interestingly, when *DISC1* (Disrupted-In-Schizophrenia 1) was downregulated in adult newborn neurons using a similar retroviral approach, Duan et al. observed an ectopic migration of these neurons in the molecular layer, an increase of cell body size and dendrite length, similarly to the phenotypes observed after *Rnd2* deletion, but no increased cell death was described (Duan et al., 2007). This study thus suggested that an abnormal morphological development and an aberrant positioning of adult newborn neurons do not result in the death of these cells further reinforcing that the control of newborn survival is independent of the regulation of their position and morphology.

Indirectly, this set of experiments with the inducible Cre also suggests that Rnd2 regulates newborn neuron survival and their maturation through distinct mechanisms. The signaling pathways mediating Rnd2 action in general are poorly understood (Azzarelli et al., 2015). In cortical neurons, during embryogenesis, Rnd2 promotes migration independently of the actin cytoskeleton but partially through the inhibition of RhoA (Pacary et al., 2011). In P19 cells, inversely, Rnd2 regulates neurite outgrowth by activating RhoA (Tanaka et al., 2006) and interestingly a pharmacological inhibition of RhoA signaling was shown to enhance the survival of adult hippocampal newborn neurons (Christie et al., 2013). However, our preliminary data indicate that the action of Rnd2 in adult-born DGNs is independent of RhoA (data not shown). Other potential interactors with Rnd2 protein include the semaphorin receptors, Plexins, which have been implicated in adult hippocampal neurogenesis (Duan et al., 2014; Jongbloets et al., 2017; Mata et al., 2018; Zhao et al., 2018) and have been shown to be bound and regulated by Rnd2 in neurons and other cell types (Azzarelli et al., 2014; McColl et al., 2016; Uesugi et al., 2009). Nevertheless, whether Plexins mediate some aspects of Rnd2 action in adult newborn neurons remains unknown.

As mentioned previously, Rnd2 has been shown to be expressed in endosomes (Pacary et al., 2011; Roberts et al., 2008; Tanaka et al., 2002) and to interact with molecules involved in the formation and trafficking of endocytic vesicles (Kamioka et al., 2004; Tanaka et al., 2002). In the

adult DG, our immunostainings (Fig. 1F-I) also suggest that Rnd2 could be expressed in this subcellular compartment. This localization raises the possibility that Rnd2 activity in adult newborn neurons may involve endocytosis and, in particular, Rnd2 may regulate the trafficking of membrane-associated molecules such as receptors or adhesion molecules that control survival, migration and/or morphological development. Among these molecules, the NMDA receptor could be a candidate. Indeed, like Rnd2, NMDA receptors are critical for the survival of immature neurons at the time of their integration into the preexisting network (Tashiro et al., 2006a). The mechanisms by which Rnd2 controls adult newborn survival and maturation in the DG remain to be characterized in order to better understand its function(s) at the molecular level.

Rnd2 in adult-born granule neurons: a new target for anxiety-like disorders

We show here that *Rnd2* deletion in adult-born DGNs impacts a specific aspect of emotional behavior, anxiety-like behavior, while reference memory and behavioral pattern separation are left intact. These results partly reproduce what we and others have obtained following depletion of new DGNs in the adult brain. Indeed, transgenic mice (Nestin-rtTA/TRE-Bax mice), in which adult hippocampal neurogenesis is specifically impaired by over-expressing the pro-apoptotic protein Bax in Nestin+ cells of the DG, exhibit a striking increase in anxiety-related behavior whereas depression like-behavior remain unchanged (Revest et al., 2009). Similarly, *TrkB* deletion in adult hippocampal progenitors decreases newborn neuron survival in the adult DG and promotes an anxiety-like state (Bergami et al., 2008). In our study, reference memory and behavioral pattern separation were not altered. These results were unexpected since we showed that these processes are impaired in the Nestin-rtTA/TRE-Bax mice (Dupret et al., 2008; Tronel et al., 2010). However, it should be emphasized that the retroviral strategy only targets a population of new neurons born at a specific time whereas the previous approach, using doxycycline for ablation, targets a broader population. So memory processes might be affected only when a large population of adult newborn DGNs is suppressed. In accordance with this assumption, it was shown that an extensive lesion of the hippocampus is required to observe memory deficits (Moser et al., 1995). Consequently, anxiety-like behavior may be more sensitive to the loss of new neurons compared to memory processes, hence the behavior of *Rnd2* deficient mice. Another explanation of our phenotype could be that Rnd2 plays a more prominent role in temporal adult-born DGNs. This hypothesis is based on several data: 1) memory function depends on the septal hippocampus whereas anxiety is related to its temporal

part (Bannerman et al., 2004; Fanselow and Dong, 2010), 2) adult-born DGCs in the ventral DG seem to be especially important in stress-induced regulation of anxiety (Anacker et al., 2018) and 3) we found that *Rnd2* is particularly enriched in the temporal DG (Fig. 1E). Finally, regarding depression, it is becoming clear that adult neurogenesis cannot be considered as an etiological factor of this disorder. Adult-born neurons in the DG rather mediate the effects of antidepressants or the effect of stress on depression-like behavior (Anacker et al., 2018; Eliwa et al., 2017; Miller and Hen, 2015).

Rho GTPases have been implicated in learning and memory (De Filippis et al., 2014). The literature also suggests that disruption of Rho GTPases-related signaling pathways may provoke pathological alterations which extend beyond cognitive deficits, such as anxiety disorders (De Filippis et al., 2014; Saitoh et al., 2006). However the data are scarce. Here, by providing the evidence that altered levels of *Rnd2* in adult-born DGNs increases anxiety-like behavior, we show a direct link between a specific Rho GTPase and anxiety and we identify *Rnd2* as a potential novel target for anxiety disorders.

EXPERIMENTAL PROCEDURE

Animals and genotyping

C57Bl6/J (Janvier) and *Rnd2*^{flox/flox} mice were housed, bred, and treated according to the European directive 2010/63/EU and French laws on animal experimentation. All procedures involving animal experimentation and experimental protocols were approved by the Animal Care Committee of Bordeaux (CEEA50) and the French Ministry of Higher Education, Research and Innovation.

Rnd2 conditional mutant allele is described in Figure S2A. *Rnd2* was targeted by homologous recombination to generate the *Rnd2*^{flox} allele. This allele contains one loxP site between the exon 1 and 2 and a second loxP site after the last exon. A neomycin (Neo) selection gene flanked by flippase recognition target (FRT) sites was inserted in 3' of *Rnd2*. Following transmission of the mutation to the germline, the Neo gene was excised, giving rise to the *Rnd2*^{flox} allele. Upon Cre recombination, exons 2 to 5 of *Rnd2* are deleted.

Genotyping of *Rnd2* wild-type allele was performed with the following primers: forward, 5'-CAGGGCACTTCTGATACAAAGC -3' and reverse 5'- TCTCACCACCCCTGGCTGAT -3'. Genotyping of *Rnd2* conditional mutant allele was performed with the same forward primer as for the wild-type allele (WT) and the following reverse primer 5'- GTTGTCTCTCAACCGGAGCTG -3'. Mice

were genotyped from genomic DNA purified from tail biopsies by PCR using these primers according to the following protocol. Tails were incubated overnight at 56°C in Proteinase K (PK) buffer (100 mM Tris-HCl pH8, 5 mM EDTA, 0.2 % SDS, 200 mM NaCl, 0.2 mg/mL PK). After a centrifugation at 13200 rpm for 10 min, the supernatants were purified by vacuum on silica columns, according to the manufacturer's protocol (Macherey-Nagel) and on Zephyr automatic station (Perkin-Elmer). PCR assay was carried out on a Bio-Rad C1000 thermal cycler, in a 20 µL volume, using GoTaq G2 Hot Start Green Master Mix (Promega), and 0.2 µM of common forward primer, 0.2 µM of flox Reverse primer, and 0.4 µM of WT reverse primer. PCR conditions were as follows: 1 cycle, 5 min at 95°C; 37 cycles, 30 sec at 95°C, 30 sec at 60°C, 45 sec at 72°C; 1 cycle, 5 min at 72°C. PCR products were analysed on a Labchip GX microfluidic electrophoresis system (Perkin-Elmer) using the DNA5k kit.

Constructs

The murine Moloney leukemia virus-based retroviral vectors CAG–GFP (Zhao et al., 2006), CAG–GFP/Cre (Tashiro et al., 2006a), CAG–RFP (Laplagne et al., 2006) and CAG–GFP–T2A–CreER^{T2} (Mu et al., 2015) were kind gifts from Dr Fred Gage.

Retrovirus production and stereotaxic injection into the DG of adult mice

High-titers of retroviruses were prepared as previously published (Kerloch et al., 2018) with a human 293-derived retroviral packaging cell line (293GPG) kindly provided by Dr Dieter Chichung Lie. The retroviral solution (10^9 – 10^{10} TU/ml) was injected into the DG of 12-week-old male *Rnd2^{flox/flox}* mice. Mice were anaesthetized by intraperitoneal injection of ketamine (120 mg/kg; Imalgene® 1000, Merial)-xylazine (16 mg/kg; Rompun®, Bayer HealthCare) mixture and eye ointment was applied to prevent eyes from over-drying. A cranial subcutaneous injection of 0.1 µl of lidocaine (20 mg/ml; Lurocaïne®, Vetoquinol) and a dorsal subcutaneous injection of 0.1 µl of meloxicam (0.5 mg/ml; Metacam®, Boehringer Ingelheim) were performed before settling the mouse into the stereotaxic frame. Betadine was applied, then the skin was cut and a pulled microcapillary glass tube (1–5 µL, Sigma) was placed above bregma. Coordinates of the injection site from bregma were: anteroposterior: -2 mm, mediolateral: -1.8 mm, dorsoventral: -2.2 mm. A small hole was made on the skull using an electric drill, the microcapillary was loaded with the retroviral solution and introduced within the hole to reach the DG and stayed in place for one minute. Then 1.5 µl of retrovirus was injected at the rate of 0.5 µl every two minutes and the

microcapillary was left again in the same position for two minutes after the end of infusion before being removed. Then the skin was stitched with absorbable sutures and the mouse was placed in a recovery chamber (37°C) until it woke up.

Tamoxifen administration

For activation of the CreER^{T2} recombinase, animals were administered intraperitoneally with 150 mg/kg tamoxifen (Sigma, diluted in corn oil) for 5 consecutive days. Control animals were injected with the same volume of corn oil for 5 consecutive days.

Tissue processing

Mice were deeply anesthetized with an intraperitoneal injection of pentobarbital (100 mg/kg; Pentobarbital® sodique, Ceva) and transcardially perfused with phosphate buffer saline (PBS, 0.1M, pH=7.3) and then with 4% paraformaldehyde (PFA) in PBS. Brains were dissected out of the skull, post-fixed in 4% PFA and cut (40 µm) with a vibratome (Leica).

Immunostaining

Rnd2 immunostaining was performed on coronal sections cut with a vibratome and obtained from brains freshly perfused and post-fixed 2 h with 4% PFA. After 3 washings in PBS, sections were treated with PBS - NH₄Cl 50 mM for 15 min and blocked with a solution containing PBS - 0,05% saponin - 0,2% bovine serum albumin (BSA) for 15 min. They were then incubated overnight at 4°C with a goat anti-Rnd2 antibody (1/50, Santa Cruz, sc-1945) diluted in the blocking buffer. The following day, sections were washed three times in PBS – 0.05% saponin and incubated for 2 h with a donkey anti-goat Alexa Fluor® 488 (1/1000, Invitrogen A11055) diluted in PBS – 0.05% saponin – 0.2% BSA. For Rnd2/DCX immunostaining, a rabbit anti-doublecortin (1/2000, Sigma, D9818) was used.

For other immunostainings, each brain, after fixation and post-fixation with 4% PFA, was sectioned serially (10 series of 40 µm sections) with a vibratome. For each staining, one in 10 free-floating sections (so one series) were used. After washing in PBS, sections were treated with PBS - 0.3% Triton X100 - 3% normal serum for 45 min. They were then incubated overnight at 4°C with the following primary antibodies diluted in PBS - 0.3% Triton X100 - 1% normal serum: rabbit anti-cleaved caspase 3 (1/400, Cell Signaling, 9661), rabbit anti-doublecortin (1/2000, Sigma, D9818), chicken anti-GFP (1/1000; Abcam, ab13970), rabbit anti-Ki67 (1/1000;

NovoCastra, NCL-Ki67-P), rabbit anti-DsRed (1/500, Clontech, 632496). Sections were then incubated for 2 h at room temperature with appropriate fluorescent secondary antibodies diluted in PBS – 1% normal serum. TOTO-3 iodide (1/2000, Invitrogen) was added to the secondary antibody solution to label cell nuclei (Invitrogen). Images were acquired with a confocal microscope (Leica SP5 or SP8).

Neuronal structure tracing and quantification

Dendrites and cell body of fluorescent dentate neurons were traced using a 100X objective and a semiautomatic neuron tracing system (Neuron Tracing from NeuroLucida® software; MicroBrightField). Measurements of dendrite and node numbers, dendritic length and cell body area were performed with NeuroLucida software as well as Sholl analysis.

RNA in situ hybridization

Brains, freshly perfused and post-fixed overnight with 4% PFA, were cut coronally with a vibratome (40 µm). Nonradioactive RNA in situ hybridizations on floating brain sections were then immediately performed with digoxigenin-labelled riboprobes as previously described (Azzarelli et al., 2014). The riboprobes used to visualize the expression of *Rnd2* (Heng et al., 2008) and *Rnd3* (Pacary et al., 2011) were previously described and the antisense RNA probe for *Rnd1* was prepared from IMAGE:3416797, GenBank accession number BE852181.

Microdissection of the DG

Coronal sections (50 µm) were cut from frozen brains in isopentane using a cryostat (CM3050 S Leica) at -20°C and mounted on polyethylene-naphthalate membrane 1mm glass slides (P.A.L.M. Microlaser Technologies AG) that were pretreated to inactivate RNases. Sections were then immediately fixed for 30 sec with 95% ethanol and incubated with 75% ethanol for 30 sec and with 50% ethanol for 30 sec. Sections were stained with 1% cresyl violet in 50% ethanol for 30 sec and dehydrated in 50%, 75% and 95% ethanol for 30 sec each, and finally 2 incubations in 100% ethanol for 30 sec were performed. Laser Pressure Catapulting (LPC) microdissection of the DG (SGZ and GCL) (Fig. S1A) was performed using a PALM MicroBeam microdissection system version 4.6 equipped with the P.A.L.M. RoboSoftware (P.A.L.M. Microlaser Technologies AG). Laser power and duration were adjusted to optimize capture efficiency. Microdissection was performed at 5X magnification. Microdissected tissues were collected in adhesives caps and

resuspended in 250 µl guanidine isothiocyanate-containing buffer (BL buffer from ReliaPrep™ RNA Cell Miniprep System, Promega) with 10 µl 1-Thioglycerol and stored at –80°C until RNA extraction was done. For the analysis of *Rnd* expression at different time points (Fig. 1D and S1B), the entire DG of each animal was microdissected. For the rostro-caudal analysis of *Rnd* expression (Fig. 1E and S1D), DG in the right hemisphere from 10 following coronal sections of 50 µm were pooled for each coordinate. In both cases, we began to microdissect the DG from the section at the anteroposterior coordinate -1.34 mm from the Bregma (when the two blades of the DG were visible).

Total RNAs were extracted from microdissected tissues using the ReliaPrep™ RNA Cell Miniprep System (Promega) according to the manufacturer's protocol. The integrity of the RNA was checked by capillary electrophoresis using the RNA 6000 Pico Labchip kit and the Bioanalyser 2100 (Agilent Technologies), and quantity was estimated using a Nanodrop 1000 (ThermoScientific). The RNA integrity numbers (RIN) were between 8,2 to 10.

Microdissection of GFP+ cells

For this analysis, *Rnd2*^{flox/flox} mice were injected bilaterally with 2 µl of high-titer retroviral solution. Brains were dissected out of the skulls in PBS and incubated in 30% sucrose / PBS for 3 days at 4°C under agitation. Brain were then frozen with isopentane and coronal sections (10 µm) were done using a cryostat and treated for microdissection as previously described but with some modifications. Sections were dehydrated in a series of pre-cooled ethanol baths (40 sec in 95% and twice 40 sec in 100%) and air-dried. Microdissection was performed at 63X magnification. Microdissected cells were collected in adhesives caps, resuspended in PK buffer (PK buffer from RNeasy FFPE Kit, Qiagen) and stored at –80°C until extraction was done. Total RNAs were extracted using the RNeasy® FFPE Kit (Qiagen,) according to the manufacturer's protocol. The RNA integrity numbers (RIN) were above 7/8.

Quantitative real-time PCR

RNA was processed and analyzed following an adaptation of published methods (Bustin et al., 2009). cDNA was synthesized from total RNA using RevertAid Premium Reverse Transcriptase (Fisher Scientific) and primed with oligo-dT primers (Fisher Scientific) and random primers (Fisher Scientific). qPCR was performed using a LightCycler® 480 Real-Time PCR System (Roche). qPCR reactions were done in duplicate for each sample, using

transcript-specific primers (Table 1), cDNA and LightCycler 480 SYBR Green I Master mix (Roche) in a final volume of 10 μ l. PCR data were exported and analyzed in the GEASE software (Gene Expression Analysis Software Environment) developed in the Neurocentre Magendie (<https://bioinfo.neurocentre-magendie.fr/outils/GEASE/>). For the determination of the reference genes, the GeNorm method was used (Bustin et al., 2009). Relative expression analysis was corrected for PCR efficiency and normalized against two reference genes. The relative level of expression was calculated using the comparative ($2^{-\Delta\Delta CT}$) method (Livak and Schmittgen, 2001).

Gene	GenBank ID	Forward Sequence (5'-3')	Reverse Sequence (5'-3')
Rnd1	NM_172612	CCAGACGCTCCATCACTGAAA	GGGTTAGGCAAAAATGAGGGTT
Rnd2	NM_009708	CCTGTACACATGAGCAGGGTA	GAGGAACATTCAACGTAGGACACA
Rnd3	NM_028810	GTTGATCGTTGCCAGAGTGATAAT	AAAGGAACTGCTCAAAAGGAGAAA

Table 1: Sequences of primers used for qPCR.

Behavior

For behavioral analyses, 12 week-old male *Rnd2*^{flox/flox} mice were bilaterally injected with 1.5 μ l of GFP or GFP/Cre retroviruses on each side. Two batches of animals were used. The number of animals in each group was as follows: Batch 1 (GFP, 13 mice; GFP/Cre, 14 mice), Batch 2 (GFP, 11 mice; GFP/Cre, 9 mice). For the first batch, the titers of GFP and GFP/Cre retroviruses were 3-4.10⁹ TU/ml and for the second batch they were estimated at 5-6.10¹⁰ TU/ml. The behavioural sequences for the two batches are presented in Figure 5A. For all behavioral tests, animals were placed in the test room 30 min before the beginning of the experiment. For all procedures, experimenters were blind to the virus injected.

Open-field test (OF). Mice were placed in one corner of a square open-field (50x50 cm, 200 lux). Exploratory behavior was monitored for 10 min. Time spent in the center (35x35 cm) and the distance ratio (distance travelled in the periphery divided by the total travelled distance) were automatically measured by a video-tracking system connected to a camera (Videotrack, ViewPoint). These two parameters were used for z-open field score calculation (Fig. S6A).

Emergence test. The emergence test was done in the same open-field but with brighter light (~300 lux). Mice were placed in a dark cylinder (10x6.5 cm, grey PVC) in one corner of the arena. The behavior was monitored for 5 min using the same system as in the open-field test

(Videotrack, ViewPoint). Latency to emerge from the cylinder and the number of re-entries in the cylinder were automatically measured and used for z-emergence score calculation (Fig. S6B).

Elevated Plus Maze (EPM). Behavior in the EPM was measured using a cross maze with two open and two closed arms (37x6 cm arms, 75 lux) placed 115 cm above the ground. Mice were placed at the centre of the cross, facing one of the open arms and the behavior was monitored for 5 min. Time spent in open arms as well as the ratio between entries in open arms divided by entries in closed and open arms were measured using the video-tracking system (Videotrack, ViewPoint) and used for z-EPM score calculation (Fig. S6C, D).

Light/Dark. The apparatus used for this test was composed of a strongly illuminated room (36x36 cm, ~350 lux) and a dark room (36x23 cm, ~10 lux) separated by a wall with a door (10x10 cm) allowing animals to travel freely between the two compartments. Mice were placed in the light room and left exploring the apparatus for 5 min. Latency to leave the light room and time spent in this compartment were manually measured and used for z-light dark score calculation (Fig. S6E).

Sucrose preference. In the sucrose preference test, mice were exposed in their home cage to two drinking bottles during 72 h. During the first 24 h, a habituation was performed with the two bottles filled with water. For the test phase, one of the bottles was filled with 30 mL of 4% sucrose water while the second bottle was filled with water. Bottles were placed side by side for 24 h, then for the last 24 h positions were reversed. Sucrose preference ratio was calculated as follows and used for z-sucrose preference score calculation (Fig. S6I):

$$\text{Sucrose preference} = \frac{\Delta \text{weight}_{\text{sucrose}}}{\Delta \text{weight}_{\text{sucrose}} + \Delta \text{weight}_{\text{water}}}$$

Forced swim test (FST). The FST device consists of a glass cylinder 16 cm in diameter and 25 cm high, filled with water to a height of 15 cm and placed in a strongly illuminated room (~350 lux). Water was maintained at ~26°C. Mice were placed in the apparatus and behavior was monitored for 6 min. Latency to immobility and total immobility time in the last 4 min of the test were measured and used for z-FST score calculation (Fig. S6J).

Morris Water Maze (MWM). The apparatus was a white circular swimming pool (150 cm in diameter and 60 cm deep) located in a room with various distal visual cues (80 lux). The pool was filled with water maintained at 19°C and made opaque by the addition of a non-toxic white cosmetic adjuvant. The escape platform (14 cm diameter) was hidden underwater so that its top surface was 0.5 cm below the surface of the water. In this task, mice were required to locate the hidden platform using distal cues and mice behavior was monitored using a camera and a video-

tracking system (Videotrack, ViewPoint). For the entire training period, the platform stayed in the same position and mice were tested with variable random start positions (Fig. S5A). Mice were trained in 3 trials a day, each trial being separated by a 5 min interval. A trial was terminated when the animal climbed onto the platform. Mice that failed to find the platform within the 60 sec cut-off time were placed onto the platform by the experimenter and had to stay there for 15 sec before being placed back in their home cage. The releasing point (starting point) differed for each trial and different sequences of releasing points were used day to day. Three days after the last training trial, the hidden platform was removed and the memory for the platform location was assessed during a probe test (Fig. S5A). During this test, mice were allowed to freely swim in the water maze for 60 sec and performances were assessed by time spent in the target quadrant where the platform was located.

Contextual fear conditioning. Mice were exposed to contextual fear conditioning in two distinct conditioning contexts that shared features in order to test their ability to discriminate these contexts. Conditioning was done in a transparent plexiglass cage (26x25x17 cm) allowing access to visual cues of the environment with a floor composed of 42 stainless steel rods, separated by 3 mm, which were wired to a shock generator and scrambler (Imetronic). In the context A, the cage was illuminated (90 lux), the testing room was strongly illuminated (250 lux) and visual cues were placed on the walls of the room. The cage was cleaned between each mouse with a 70% ethanol solution and the experimenter wore latex gloves. For the context B, the testing room was lit with a low light (50 lux) and the cage was not illuminated. Dark panels were placed proximal to the cage, on which the visual cues were placed. Furthermore, a plastic boat containing used litter was added under the steel bars of the cage and lemon scent was added in the cage. Between each mouse, the cage was cleaned with 30% acetic acid solution and the experimenter wore nitrile gloves.

For the conditioning phase, mice were individually transported from the resting room to the experimental room and placed in the context A conditioning chamber. After 180, 240 and 300 sec, they received a single footshock (0,7 mA, 1 sec) and remained in the chamber for 1 min (Fig. S5D) after the last shock before being transported back to their housing room. On the following day mice were tested for context discrimination. In this goal, mice were again individually transported to the experimental room and placed in the context A conditioning chamber for 5 min without delivery of a footshock. Three hours later, mice were then exposed to the context B conditioning chamber for 5 min, again without any footshock (Fig. S5D). During the conditioning phase and the testing phase, mice behavior was monitored with a video-tracking system

(Freezing, Imétron). Freezing behavior, defined as a behavioral immobility except for breathing movements, was measured. Discrimination of contexts was evaluated comparing the immobility time in each context, a discrimination ratio was calculated as follows:

$$\text{Discrimination ratio} = \frac{\text{immobility time}_{\text{context A}}}{\text{immobility time}_{\text{context A} + \text{context B}}}$$

Criteria of exclusion. Most tests used in this study rely on exploration and locomotor activity, therefore total distance travelled in these tests was used as an index of locomotor activity. Although no animal was excluded on the basis of the total travelled distance, several other criteria were determined to exclude mice that did not follow the rules of the designed tests. For example mice that did not swim and instantly started floating during the MWM and the FST would be excluded for the final analysis of performances, as well as mice that did not leave the cylinder in the emergence test. In the EPM, mice that stayed 240 sec in the centre or less than 1 sec in open or closed arms were excluded from analysis, as well as mice that explored less than 2 different arms. After the quantification of GFP+ cells at the end of the behavioural sequences, no animal was removed from the analysis because all of them showed a significant number of GFP+ cells on both side.

z-score calculation

z-scores are mean-normalization of the results and allow for comparison of related data across this study. They indicate how many standard deviations (σ) an observation (X) is above or below the mean of a control group (μ) and was calculated as previously described (Guilloux et al., 2011):

$$Z = \frac{X - \mu}{\sigma}$$

z-score values were calculated for test parameters measuring emotionality. The directionality of scores was adjusted so that increased score values reflect increased dimensionality (anxiety or depression-related behavior). For instance, decreased time spent in open arms in the EPM or decreased time spent in the centre of the open-field test, compared to control, were converted into positive standard deviation changes compared to group means indicating increased anxiety-related behavior. On the other hand, increased immobility time in the FST for example, is directly related to increased depression-like behavior and was not converted.

As an example, z-score in the open-field (Z_{OF}) was calculated for each animal, using normalization of "time in the center" (TC) and "distance in periphery/total distance ratio" (DR) values.

$$Z_{OF} = \frac{\left(\frac{X - \mu}{\sigma}\right) TC + \left(\frac{X - \mu}{\sigma}\right) DR}{\text{Number of parameters}}$$

Similarly, z-scores were calculated for the emergence test ($Z_{emergence}$), the EPM (Z_{EPM}) and the light/dark test ($Z_{L/D}$). z values obtained for each test were then averaged to obtain a single z-anxiety score:

$$\text{Anxiety score} = \frac{Z_{OF} + Z_{emergence} + Z_{EPM 4w} + Z_{EPM 10w}}{\text{Number of tests}}$$

The same calculations were done with the z-scores of the sucrose preference test (Z_{SP}) and the FST (Z_{FST}), and an individual "depression score" was calculated as for the z-anxiety score.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using the GraphPad Prism software. No statistical methods were used to predetermine sample sizes, but our sample sizes are similar to those generally employed in the field. Results are presented as mean $\pm$ s.e.m. (standard error of the mean). The statistical tests used for each experiment and sample size (n) are indicated in the corresponding figure legend or in the Methods. Statistical values are mentioned in the text.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: *Rnd2* expression in the mouse dentate gyrus.

(A, B, C) Distribution of *Rnd2* transcripts in the hippocampus at postnatal day 14 (P14) (A) and at adult stage (12-week old mouse) (B, C). The black rectangle in B shows the area enlarged in the inset C. (D) Analysis by real-time PCR of *Rnd2* mRNA expression in microdissected DG (SGZ and GCL) at different ages. Data are presented as fold change compared with the expression level at postnatal day 7 (P7) $\pm$ s.e.m (n = 4 mice per time point). P, postnatal day; W, weeks. (E) Analysis by real-time PCR of *Rnd2* mRNA expression along the septo-temporal axis in the adult (12-week old) microdissected DG. Data are presented as fold change compared with the expression level at the anteroposterior coordinate -1.34 from the Bregma $\pm$ s.e.m (n = 5 mice per time point). (F) Adult (12-week old) coronal sections immunostained for *Rnd2*. Nuclei were labeled with TOTO. (G, H) Immunostaining for *Rnd2* and doublecortin (DCX) in the DG of a 12-week old mouse. The white rectangle in G shows the area enlarged in the insets H and I. Imaris software was used to apply masks and selects the *Rnd2* staining (in green) that was only inside DCX+ neurons. (I) Dots illustrating *Rnd2* positive vesicles inside DCX+ neurons after Imaris analysis.

Scale bars represent 20 μ m (F) and 10 μ m (G, H, I).

Figure 2: The absence of *Rnd2* reduces the survival rate of adult newborn neurons.

(A) Images of the DG illustrating the reduction of GFP+ cell number after *Rnd2* deletion (GFP/Cre panel) compared to control (GFP panel) at 14 days post-injection (dpi). No difference was observed at 3 dpi. Nuclei were labeled with TOTO. (B) Survival rate of GFP+ cells at different time points. Mean $\pm$ s.e.m.; unpaired two-tailed Student's t-test; *p < 0.05, **p < 0.01 (n = 3-7 mice). (C) Immunostaining for GFP and activated caspase 3 (caspase-3a) in the DG, 21 days after GFP/Cre virus injection. (D) Quantification of the percentage of transduced cells that are caspase-3a+ at 14 and 21 dpi. Mean $\pm$ s.e.m.; unpaired one-tailed Student's t-test; *p < 0.05 (n = 4-7 mice). (E) The retroviral co-injection strategy allows to analyze in the same mice *Rnd2*-deleted and control new neurons. The graph shows the survival rate of control (RFP+ only) and *Rnd2*-knockout (GFP+ only and GFP+/RFP+) new neurons in *Rnd2*^{flox/flox} mice. Mean $\pm$ s.e.m.; paired two-tailed Student's t-test; **p < 0.01 (n = 7-8 mice).

Scale bars represent 50 μ m (A) and 5 μ m (C).

Figure 3: *Rnd2* deletion affects adult newborn neuron positioning and morphology.

(A) Representative images of adult newborn neurons transduced with GFP or GFP/Cre retrovirus at 21 dpi in the DG. Doublecortin (DCX) identifies immature neurons and TOTO-3 labels nuclei. (B) Schematic depiction of the analysis of the relative positions of newborn neurons in the granular cell layer (GCL) of the DG. ML, molecular layer. (C) Relative positions of newborn neurons within the GCL in control group (GFP) and after *Rnd2* deletion (GFP/Cre). Mean $\pm$ s.e.m.; unpaired two-tailed Student's t-test; * $p < 0.05$ ($n = 5-7$ mice, a minimum of 6 cells were analyzed per animal). (D) Representative images of control (RFP+ GFP-) and *Rnd2*-depleted (RFP+ GFP+) newborn neurons in the DG of *Rnd2*^{flox/flox} mice, 14 days after the injection of a mixture of GFP/Cre and RFP retroviruses. (E) Representative tracings of control and *Rnd2*-deleted newborn neurons in the adult DG at 7, 14 and 21 dpi. (F, G) Quantification of the total dendritic length (F) and the number of nodes. Mean $\pm$ s.e.m.; paired two-tailed Student's t-test; * $p < 0.05$, ($n = 4-6$ mice, a minimum of 4 cells were analyzed per animal). (H) Sholl analysis of control and *Rnd2*-depleted newborn neurons at 21 dpi. Mean $\pm$ s.e.m.; paired two-tailed Student's t-test; at least * $p < 0.05$ between 130 and 220 μm . (G) Quantification of the cell body area. Mean $\pm$ s.e.m.; paired two-tailed Student's t-test; * $p < 0.05$.

Scale bars represent 10 μm (A) and 20 μm (D, E).

Figure 4: *Rnd2* deletion impacts directly the survival of adult newborn neurons during a specific period of their development.

(A, C) Experimental designs. A retrovirus expressing GFP together with a conditionally active form of Cre recombinase, which is activated upon tamoxifen, was injected into the DG of adult *Rnd2*^{flox/flox} mice. Three (A) or 8 weeks (C) after virus injection, tamoxifen (150 mg/kg, daily for 5 days), or oil in control group, was injected and animals were sacrificed 21 days after the last injection of tamoxifen. dpi, days post-injection. (B, D) The relative number of GFP+ cells, the relative position in the GCL and the morphology of transduced cells were quantified 21 days after the last injection of tamoxifen. Mean $\pm$ s.e.m., Unpaired two-tailed Student's t-test; * $p < 0.05$. ($n = 7$ animals per group).

Figure 5: *Rnd2* suppression in adult-born hippocampal neurons, using a retroviral approach, increases anxiety-like behavior.

(A) Experimental design and diagram of the behavioral task sequences. (B) Time spent in the open arms and (C) number of total entries in the elevated plus maze (EPM), 4 (EPM1) or 10

weeks (EPM2) after GFP or GFP/Cre retrovirus injection. Mean $\pm$ s.e.m., Unpaired two-tailed Student's t-test; * $p < 0.05$. **(D)** Time to escape the light room in the light/dark test and **(E)** time spent in this room 5 weeks after retroviral injection. Mean $\pm$ s.e.m., Unpaired two-tailed Student's t-test; * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$. **(F)** z-anxiety score calculated by averaging z-score values of the different tests used to assess anxiety-like behavior (see Fig. S6). An increased score value reflects increased anxiety. Mean $\pm$ s.e.m., Unpaired two-tailed Student's t-test; *** $p < 0.001$. **(G-J)** Quantification of the number of transduced (GFP+) cells at the end of the behavioral sequences. The number of GFP+ cells along the septo-temporal axis (G, I) is shown as well as the total number per mouse (H, J) for the first (G, H) and second (I, J) batch. Mean $\pm$ s.e.m., Unpaired two-tailed Student's t-test; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

FIGURE 1

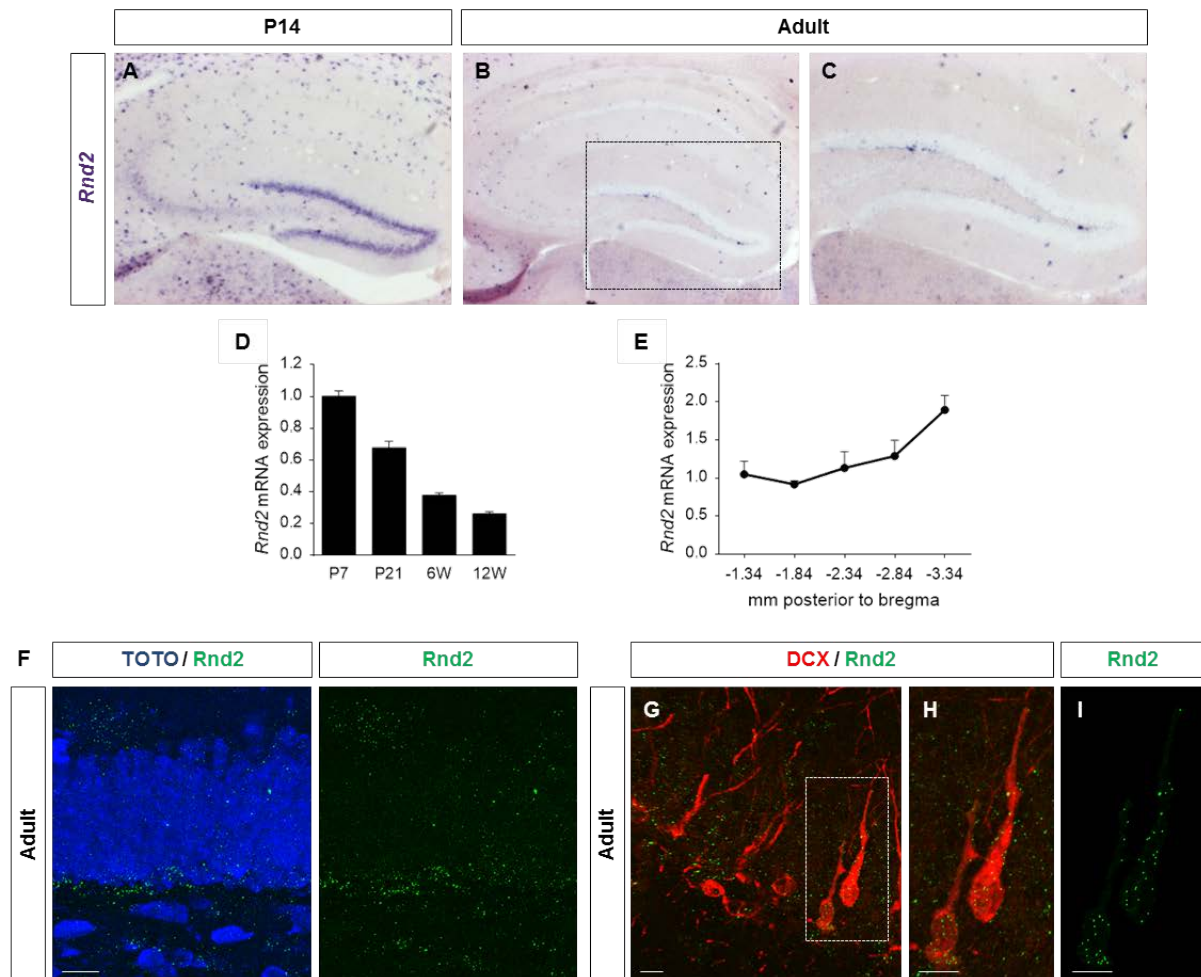
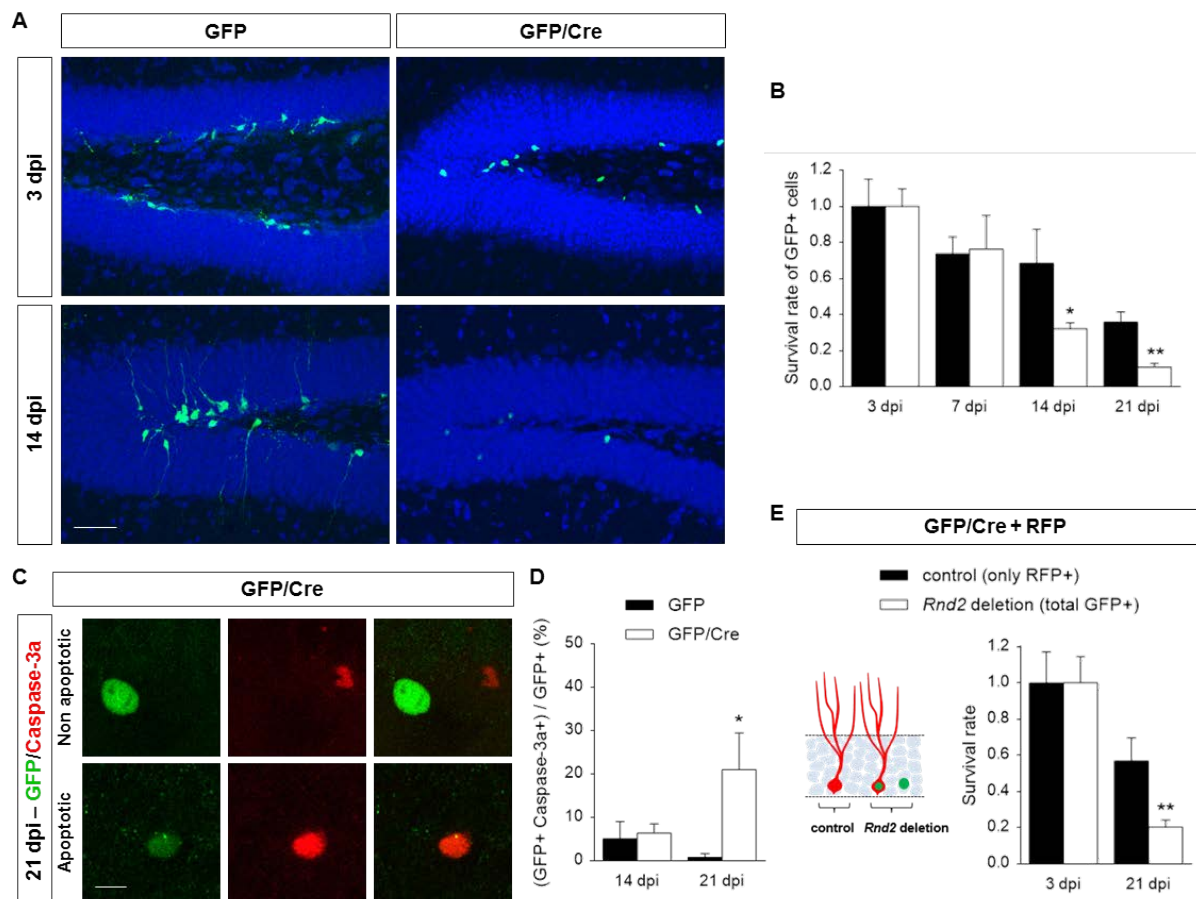


FIGURE 2



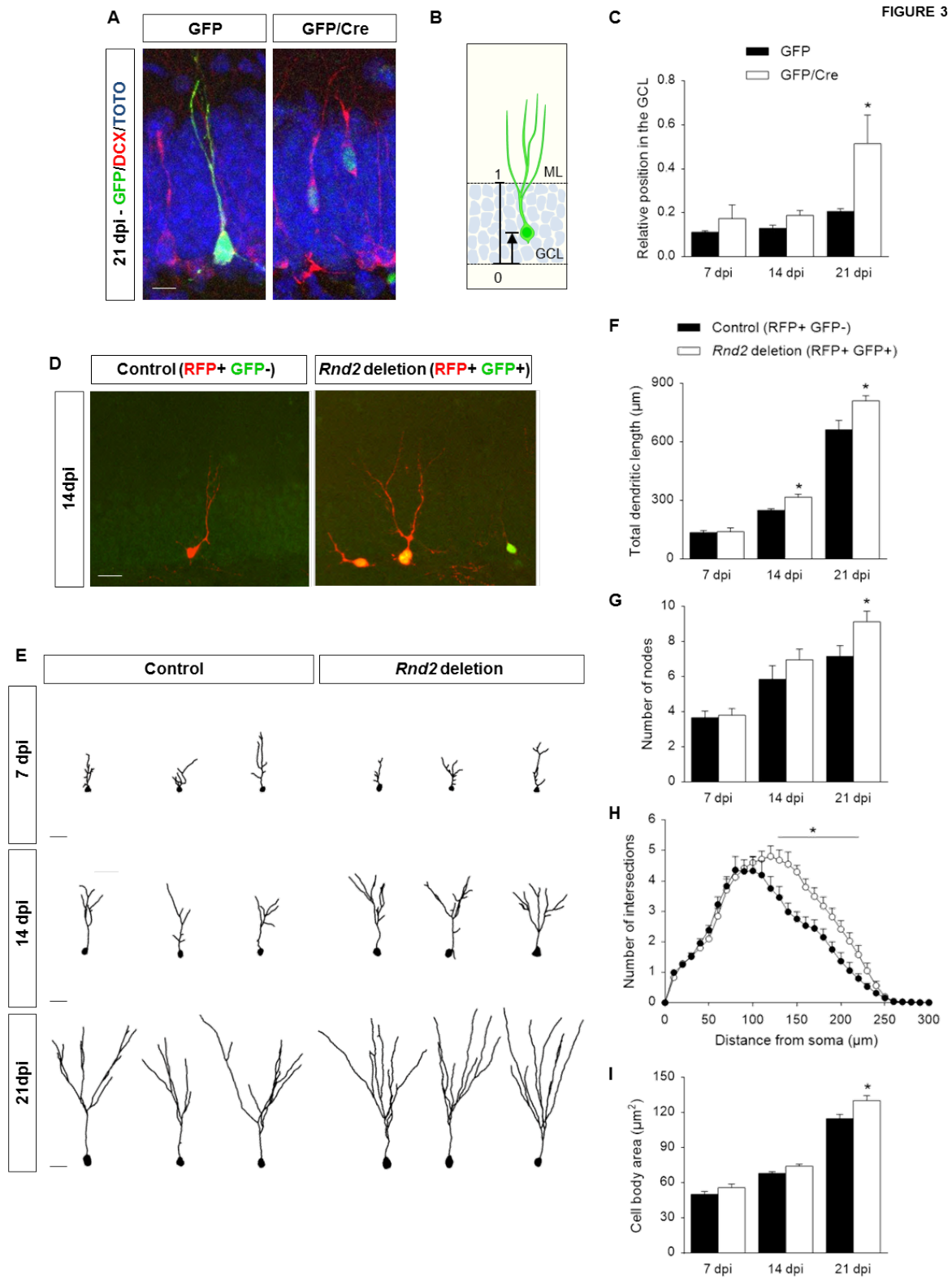
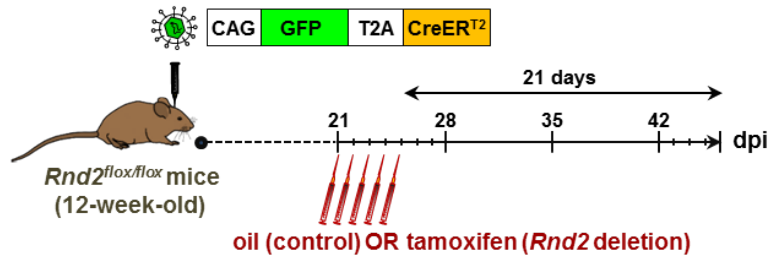
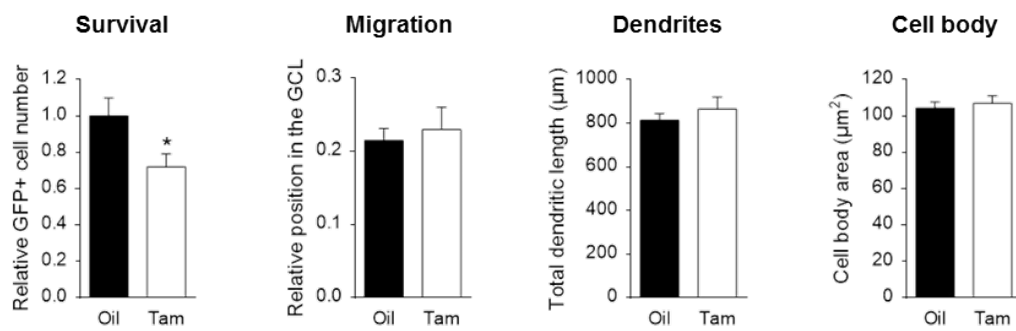


FIGURE 4

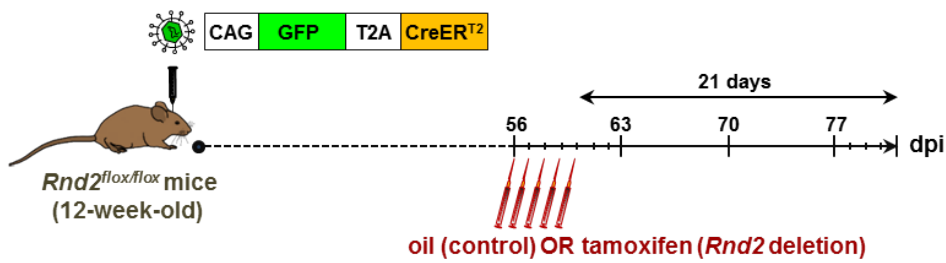
A



B



C



D

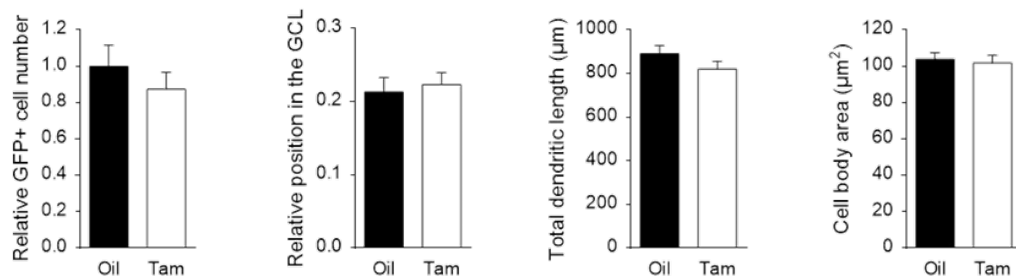
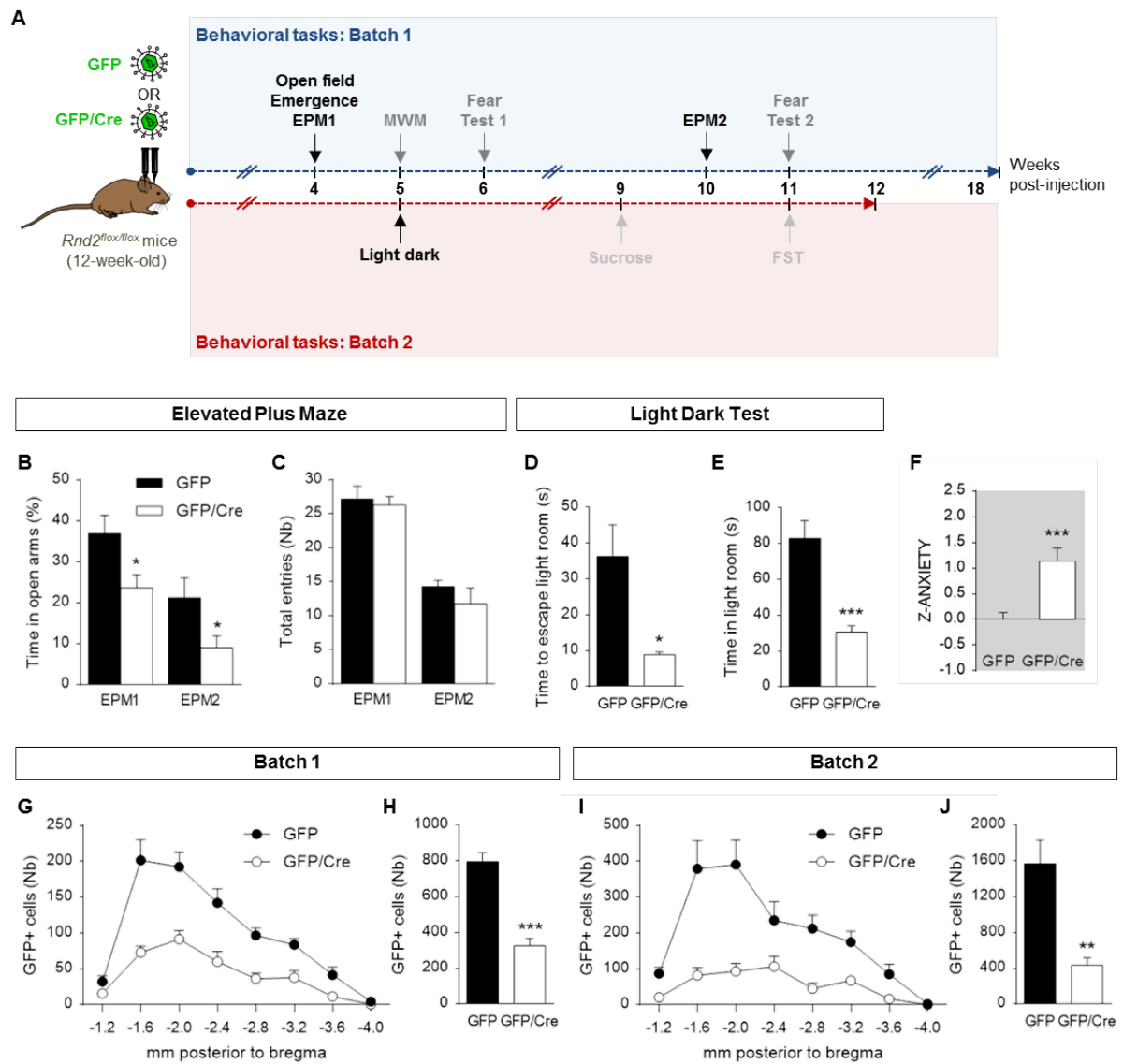


FIGURE 5



SUPPLEMENTARY MATERIAL

**Rnd2 is essential for granule neuron development in the adult hippocampus
and serves a critical role in anxiety-like behavior**

SUPPLEMENTARY FIGURE LEGENDS

Supplementary Figure 1: *Rnd1* and *Rnd3* expressions in the mouse dentate gyrus.

(A) Sequential images of the hippocampus showing the region (SGZ and GCL) microdissected by laser capture from cresyl violet-stained sections. (B) Analysis by real-time PCR of *Rnd1* and *Rnd3* mRNA expressions in microdissected DG (SGZ and GCL) at different ages. Data are presented as fold change compared with the expression level at P7 $\pm$ s.e.m (n = 4 mice per time point). P, postnatal day; W, weeks. (C) Distribution of *Rnd1* and *Rnd3* transcripts in the adult hippocampus (12-week old mouse). (D) Analysis by real-time PCR of *Rnd1* and *Rnd3* mRNA expressions along the septo-temporal axis in the adult (12-week old) microdissected DG. Data are presented as fold change compared with the expression level at the anteroposterior coordinate -1.34 from the Bregma $\pm$ s.e.m (n = 5 mice per time point).

Scale bar represents 300 μ m (A).

Supplementary Figure 2: *Rnd2* deletion in adult hippocampal newborn neurons using *Rnd2*^{flox/flox} mice and Cre expressing retrovirus.

(A) *Rnd2* conditional mutant allele. This allele contains one loxP site between the exon 1 and 2 and a second loxP site after the last exon. A neomycin (Neo) selection gene flanked by flippase recognition target (FRT) sites was inserted in 3' of *Rnd2*. Following transmission of the mutation to the germline, the Neo gene was excised, giving rise to the *Rnd2*^{flox} allele. Upon Cre recombination, exons 2 to 5 of *Rnd2* are deleted. (B) Analysis 7 days post-retroviral injection of *Rnd1*, *Rnd2* and *Rnd3* transcripts by quantitative RT-PCR in micro-dissected GFP+ cells. Graphs show expression levels normalized to housekeeping genes and relative to *Rnd* expression in control condition (GFP). (n=9 for GFP condition, n=8 for GFP/Cre condition; 500-800 cells per animal). Mean $\pm$ s.e.m., Unpaired two-tailed Student's t-test; ***p < 0.001.

Supplementary Figure 3: *Rnd2* deletion does not impact the proliferation and neuronal differentiation of adult hippocampal newborn neurons.

(A) Immunostainings for GFP and Ki67 in the DG 3 days after GFP (control) or GFP/Cre (*Rnd2* deletion) retrovirus injection. TOTO labels nuclei (B) Quantification of the percentage of transduced cells that are Ki67+ at 3 and 7 days post-injection (dpi). Mean $\pm$ s.e.m (n = 4-6 mice). (C) Immunostainings for GFP and doublecortin (DCX) in the DG 14 days after virus injection. (B)

Quantification of the percentage of transduced cells that are DCX+ at 7, 14 and 21 dpi. Mean $\pm$ s.e.m (n = 4-7 mice).

Scale bars represent 20 μ m (A, C).

Supplementary Figure 4: *Rnd2* deletion at 28 dpi induces cell death but does affect cell positioning and morphology.

A retrovirus expressing GFP together with a conditionally active form of Cre recombinase, which is activated upon tamoxifen, was injected into the DG of adult *Rnd2*^{flox/flox} mice. Four weeks after virus injection, tamoxifen (150 mg/kg, daily for 5 days), or oil in control group, was injected and animals were sacrificed 21 days after the last injection of tamoxifen (B) The number of GFP+ cells, the relative position in the GCL and the morphology of transduced cells were quantified 21 days after the last injection of tamoxifen. Mean $\pm$ s.e.m., Unpaired two-tailed Student's t-test; *p<0.05 (n=5-8 animals per group).

Supplementary Figure 5: *Rnd2* suppression in adult-born hippocampal neurons, using a retroviral approach, does not perturb hippocampal-dependent memory and depressive-like behavior.

(A) Experimental design used in the Morris water maze. NW, quadrant north west; NE, quadrant north east; SW, quadrant south west; SE, quadrant south east. (B) Latency to reach the hidden platform using variable start positions, 5 weeks after GFP or GFP/Cre retrovirus injection. (C) Time spent in the different quadrants during the probe test. (D) Experimental design used for contextual fear conditioning and context discrimination. (E, F) Contextual fear conditioning assessed by the percentage of freezing when mice were re-exposed (E) 24 hours or (F) 5 weeks later to the conditioning context (context A) and to a similar context (context B). The percentage of freezing for the baseline was measured during the first three minutes before the first shock. Mean $\pm$ s.e.m., two way ANOVA, ***p<0.001 compared to baseline and context B (G) Total travelled distance in the arena and (H) time spent in the center of the open field, 4 weeks after GFP or GFP/Cre retrovirus injection. (I) Total travelled distance, (J) latency to emerge from the cylinder and (K) number of re-entries in the cylinder in the emergence test, 4 weeks after virus infusion. (L) Sucrose preference (% of total intake) and (M) total intake 9 weeks after GFP or GFP/Cre virus injection into *Rnd2*^{flox/flox} mice. (N) Latency to first immobility and (O) total

immobility time in the forced-swim test, 11 weeks after retrovirus injection. All data are presented as the mean $\pm$ s.e.m..

Supplementary Figure 6: z-anxiety score shows an increased anxiety-like behavior after *Rnd2* deletion in adult-born hippocampal neurons.

(A-E) Individual anxiety z-scores for each behavioral task used to measure anxiety-like behavior. (F, G) Anxiety z-scores obtained for each cohort after averaging z-score values of individual tests. (H) Final z-anxiety score after averaging z-score values of each cohort. (I, J) Individual depression z-scores for each behavioral task used to measure depression-like behavior. (K) Final z-depression score after averaging z-score values of individual test. All data are presented as the mean $\pm$ s.e.m.. Unpaired two-tailed Student's t-test; * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

FIGURE S1

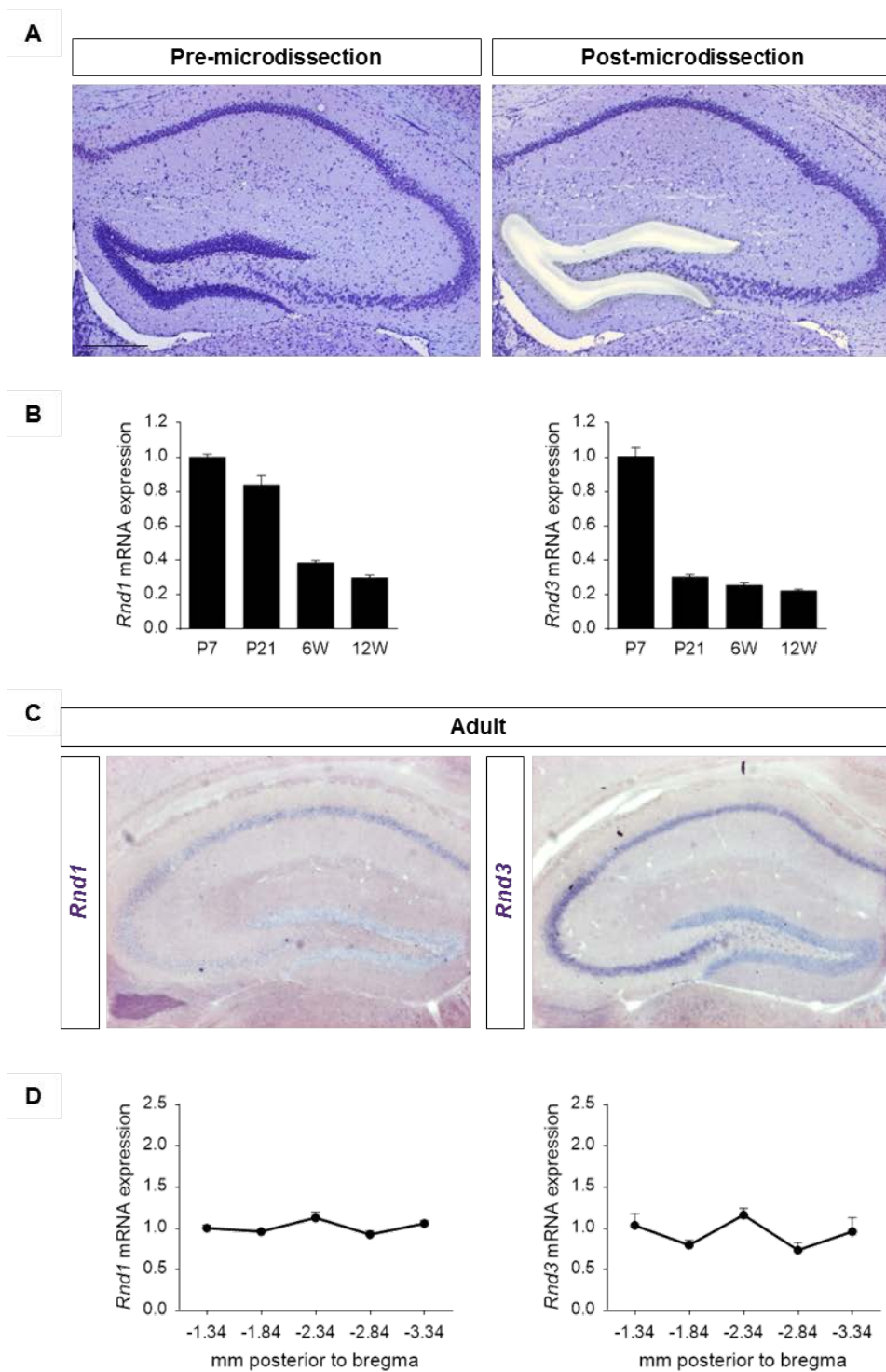


FIGURE S2

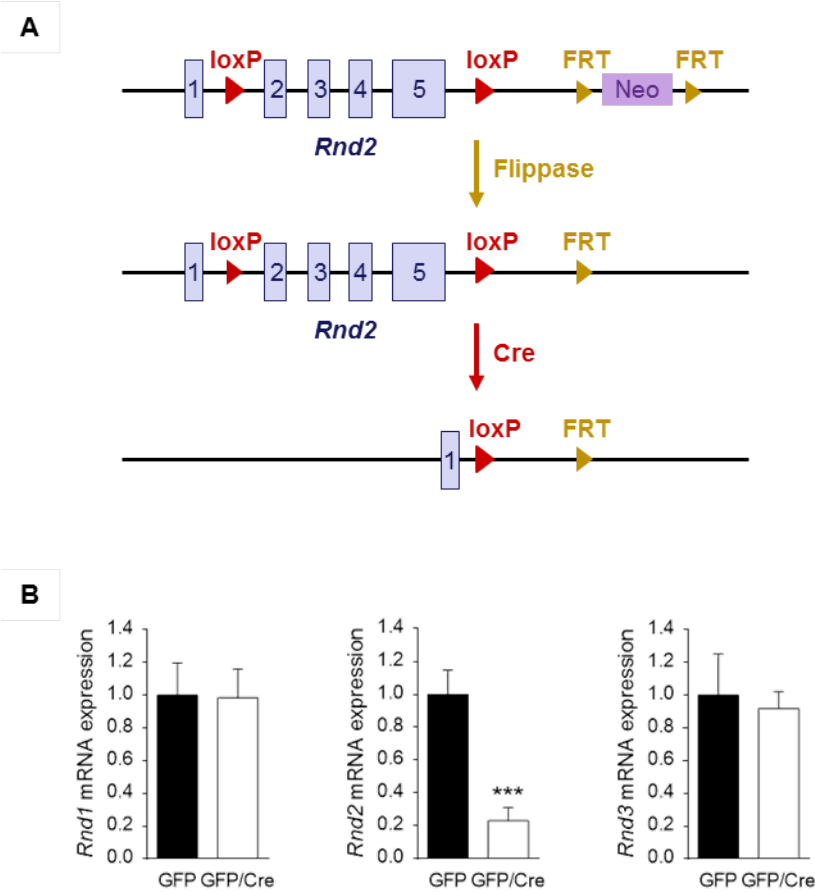


FIGURE S3

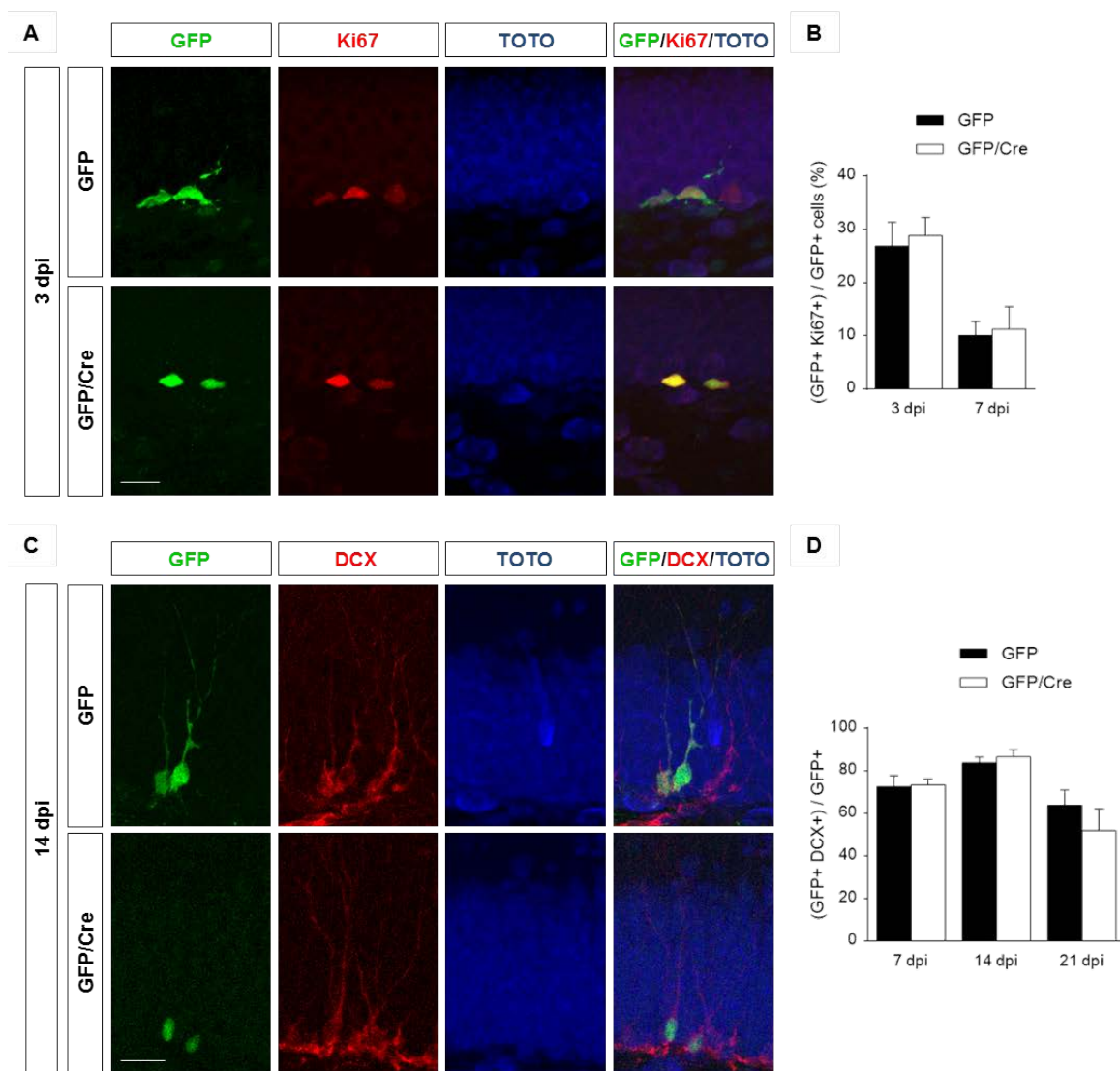


FIGURE S4

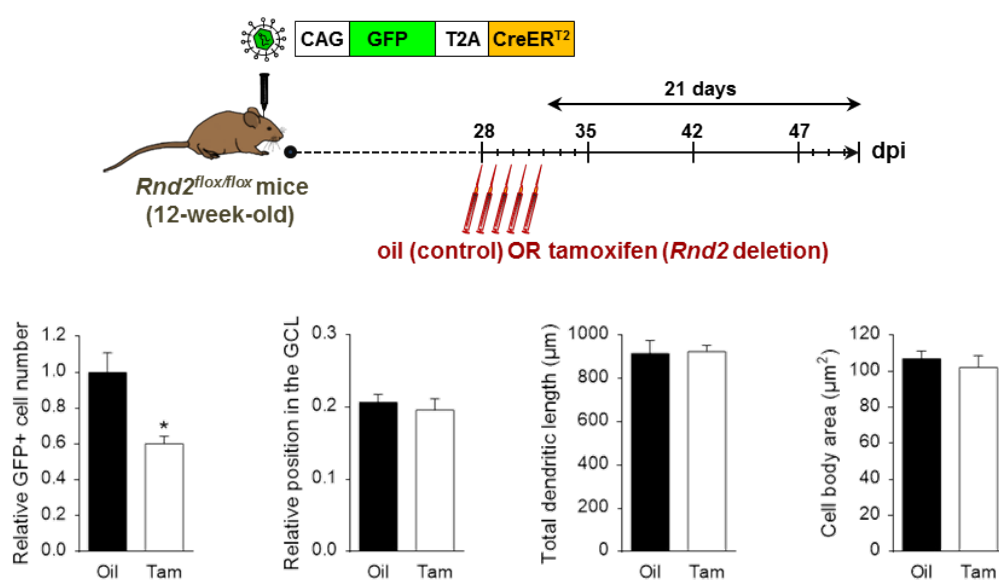


FIGURE S5

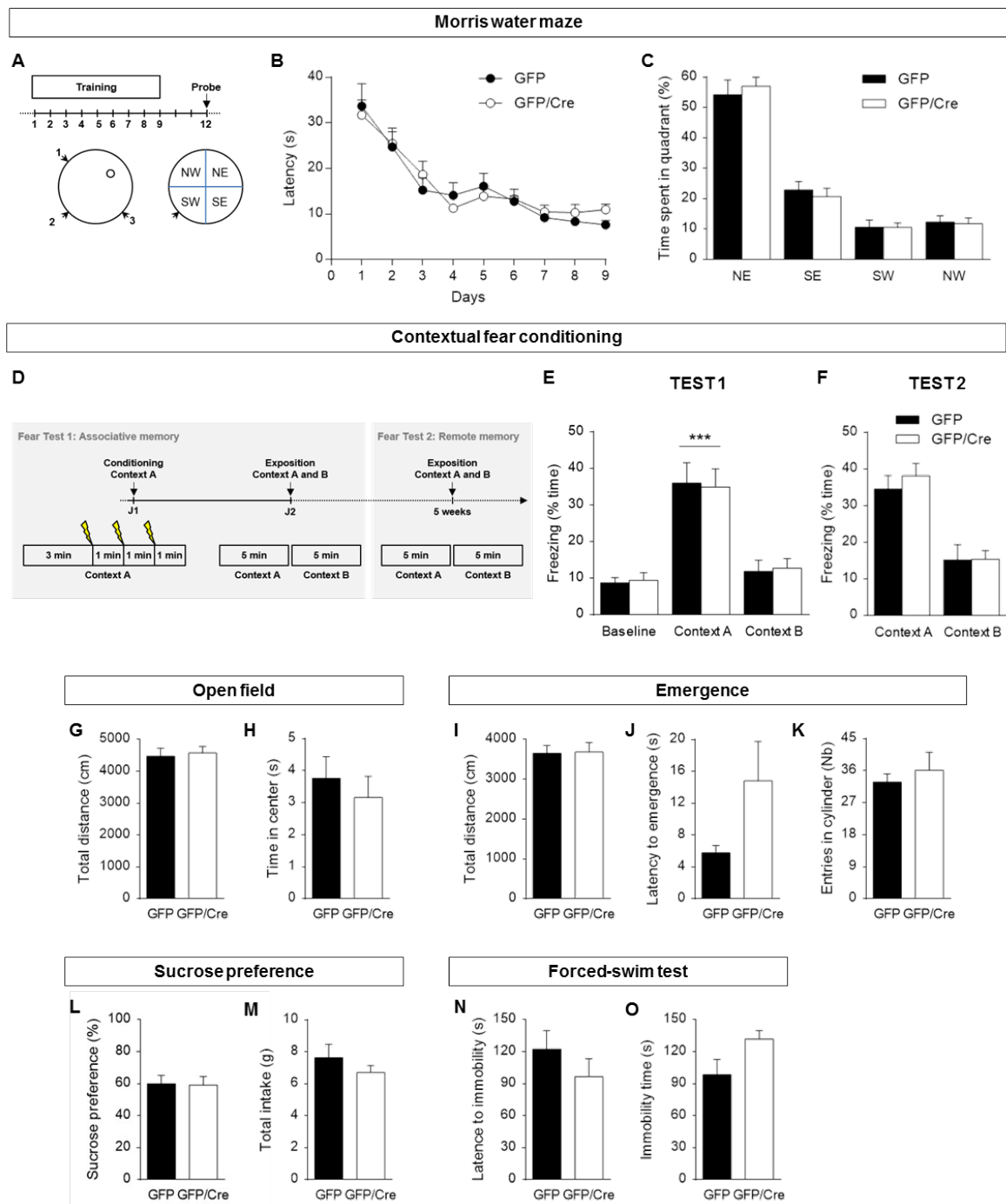
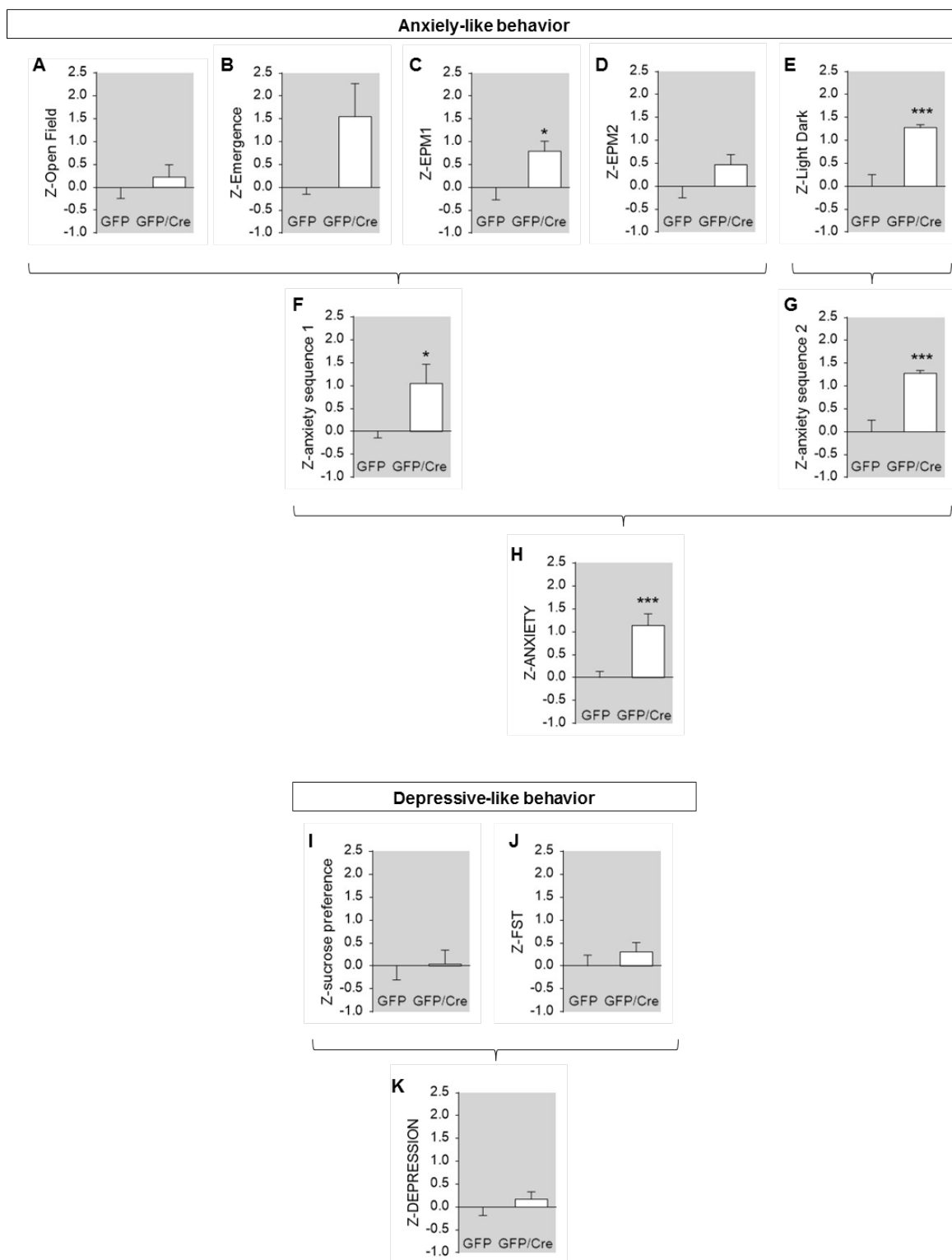


FIGURE S6



REFERENCES

- Abrous, D.N., Koehl, M., and Le Moal, M. (2005). Adult neurogenesis: from precursors to network and physiology. *Physiol Rev* 85, 523-569.
- Anacker, C., and Hen, R. (2017). Adult hippocampal neurogenesis and cognitive flexibility - linking memory and mood. *Nature reviews Neuroscience* 18, 335-346.
- Anacker, C., Luna, V.M., Stevens, G.S., Millette, A., Shores, R., Jimenez, J.C., Chen, B., and Hen, R. (2018). Hippocampal neurogenesis confers stress resilience by inhibiting the ventral dentate gyrus. *Nature* 559, 98-102.
- Azzarelli, R., Guillemot, F., and Pacary, E. (2015). Function and regulation of Rnd proteins in cortical projection neuron migration. *Frontiers in neuroscience* 9, 19.
- Azzarelli, R., Pacary, E., Garg, R., Garcez, P., van den Berg, D., Riou, P., Ridley, A.J., Friedel, R.H., Parsons, M., and Guillemot, F. (2014). An antagonistic interaction between PlexinB2 and Rnd3 controls RhoA activity and cortical neuron migration. *Nature communications* 5, 3405.
- Bannerman, D.M., Rawlins, J.N., McHugh, S.B., Deacon, R.M., Yee, B.K., Bast, T., Zhang, W.N., Pothuisen, H.H., and Feldon, J. (2004). Regional dissociations within the hippocampus--memory and anxiety. *Neuroscience and biobehavioral reviews* 28, 273-283.
- Bergami, M., Rimondini, R., Santi, S., Blum, R., Gotz, M., and Canossa, M. (2008). Deletion of TrkB in adult progenitors alters newborn neuron integration into hippocampal circuits and increases anxiety-like behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 15570-15575.
- Boldrini, M., Fulmore, C.A., Tartt, A.N., Simeon, L.R., Pavlova, I., Poposka, V., Rosoklija, G.B., Stankov, A., Arango, V., Dwork, A.J., *et al.* (2018). Human Hippocampal Neurogenesis Persists throughout Aging. *Cell stem cell* 22, 589-599 e585.
- Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J.A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M.W., Shipley, G.L., *et al.* (2009). The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical chemistry* 55, 611-622.
- Chardin, P. (2006). Function and regulation of Rnd proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 54-62.
- Christie, K.J., Turbic, A., and Turnley, A.M. (2013). Adult hippocampal neurogenesis, Rho kinase inhibition and enhancement of neuronal survival. *Neuroscience* 247, 75-83.
- Cipriani, S., Ferrer, I., Aronica, E., Kovacs, G.G., Verney, C., Nardelli, J., Khung, S., Delezoide, A.L., Milenkovic, I., Rasika, S., *et al.* (2018). Hippocampal Radial Glial Subtypes and Their

Neurogenic Potential in Human Fetuses and Healthy and Alzheimer's Disease Adults. *Cerebral cortex* 28, 2458-2478.

Clelland, C.D., Choi, M., Romberg, C., Clemenson, G.D., Jr., Fagniere, A., Tyers, P., Jessberger, S., Saksida, L.M., Barker, R.A., Gage, F.H., *et al.* (2009). A functional role for adult hippocampal neurogenesis in spatial pattern separation. *Science* 325, 210-213.

De Filippis, B., Romano, E., and 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.

Duan, X., Chang, J.H., Ge, S., Faulkner, R.L., Kim, J.Y., Kitabatake, Y., Liu, X.B., Yang, C.H., Jordan, J.D., Ma, D.K., *et al.* (2007). Disrupted-In-Schizophrenia 1 regulates integration of newly generated neurons in the adult brain. *Cell* 130, 1146-1158.

Duan, Y., Wang, S.H., Song, J., Mironova, Y., Ming, G.L., Kolodkin, A.L., and Giger, R.J. (2014). Semaphorin 5A inhibits synaptogenesis in early postnatal- and adult-born hippocampal dentate granule cells. *eLife* 3.

Dupret, D., Revest, J.M., Koehl, M., Ichas, F., De Giorgi, F., Costet, P., Abrous, D.N., and Piazza, P.V. (2008). Spatial relational memory requires hippocampal adult neurogenesis. *PLoS One* 3, e1959.

Eliwa, H., Belzung, C., and Surget, A. (2017). Adult hippocampal neurogenesis: Is it the alpha and omega of antidepressant action? *Biochemical pharmacology* 141, 86-99.

Eriksson, P.S., Perfilieva, E., Bjork-Eriksson, T., Alborn, A.M., Nordborg, C., Peterson, D.A., and Gage, F.H. (1998). Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nature medicine* 4, 1313-1317.

Esposito, M.S., Piatti, V.C., Laplagne, D.A., Morgenstern, N.A., Ferrari, C.C., Pitossi, F.J., and Schinder, A.F. (2005). Neuronal differentiation in the adult hippocampus recapitulates embryonic development. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 25, 10074-10086.

Fanselow, M.S., and Dong, H.W. (2010). Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures? *Neuron* 65, 7-19.

Fujita, H., Katoh, H., Ishikawa, Y., Mori, K., and Negishi, M. (2002). Rapostlin is a novel effector of Rnd2 GTPase inducing neurite branching. *The Journal of biological chemistry* 277, 45428-45434.

Goncalves, J.T., Schafer, S.T., and Gage, F.H. (2016). Adult Neurogenesis in the Hippocampus: From Stem Cells to Behavior. *Cell* 167, 897-914.

Govek, E.E., Newey, S.E., and Van Aelst, L. (2005). The role of the Rho GTPases in neuronal development. *Genes Dev* 19, 1-49.

Grise, F., Bidaud, A., and Moreau, V. (2009). Rho GTPases in hepatocellular carcinoma. *Biochimica et biophysica acta* 1795, 137-151.

Guilloux, J.P., Seney, M., Edgar, N., and Sibille, E. (2011). Integrated behavioral z-scoring increases the sensitivity and reliability of behavioral phenotyping in mice: relevance to emotionality and sex. *Journal of neuroscience methods* 197, 21-31.

Han, J., Kim, H.J., Schafer, S.T., Paquola, A., Clemenson, G.D., Toda, T., Oh, J., Pankonin, A.R., Lee, B.S., Johnston, S.T., *et al.* (2016). Functional Implications of miR-19 in the Migration of Newborn Neurons in the Adult Brain. *Neuron* 91, 79-89.

Heasman, S.J., and Ridley, A.J. (2008). Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 690-701.

Heng, J.I., Nguyen, L., Castro, D.S., Zimmer, C., Wildner, H., Armant, O., Skowronska-Krawczyk, D., Bedogni, F., Matter, J.M., Hevner, R., *et al.* (2008). Neurogenin 2 controls cortical neuron migration through regulation of Rnd2. *Nature* 455, 114-118.

Ishikawa, Y., Katoh, H., and Negishi, M. (2003). A role of Rnd1 GTPase in dendritic spine formation in hippocampal neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 23, 11065-11072.

Ishikawa, Y., Katoh, H., and Negishi, M. (2006). Small GTPase Rnd1 is involved in neuronal activity-dependent dendritic development in hippocampal neurons. *Neuroscience letters* 400, 218-223.

Jongbloets, B.C., Lemstra, S., Schellino, R., Broekhoven, M.H., Parkash, J., Hellemons, A.J., Mao, T., Giacobini, P., van Praag, H., De Marchis, S., *et al.* (2017). Stage-specific functions of Semaphorin7A during adult hippocampal neurogenesis rely on distinct receptors. *Nature communications* 8, 14666.

Kamioka, Y., Fukuhara, S., Sawa, H., Nagashima, K., Masuda, M., Matsuda, M., and Mochizuki, N. (2004). A novel dynamin-associating molecule, formin-binding protein 17, induces tubular membrane invaginations and participates in endocytosis. *The Journal of biological chemistry* 279, 40091-40099.

Kempermann, G., Gage, F.H., Aigner, L., Song, H., Curtis, M.A., Thuret, S., Kuhn, H.G., Jessberger, S., Frankland, P.W., Cameron, H.A., *et al.* (2018). Human Adult Neurogenesis: Evidence and Remaining Questions. *Cell stem cell* 23, 25-30.

Kempermann, G., Gast, D., Kronenberg, G., Yamaguchi, M., and Gage, F.H. (2003). Early determination and long-term persistence of adult-generated new neurons in the hippocampus of mice. *Development* 130, 391-399.

Kerloch, T., Clavreul, S., Goron, A., Abrous, D.N., and Pacary, E. (2018). Dentate Granule Neurons Generated During Perinatal Life Display Distinct Morphological Features Compared With Later-Born Neurons in the Mouse Hippocampus. *Cerebral cortex*.

Laplagne, D.A., Esposito, M.S., Piatti, V.C., Morgenstern, N.A., Zhao, C., van Praag, H., Gage, F.H., and Schinder, A.F. (2006). Functional convergence of neurons generated in the developing and adult hippocampus. *PLoS biology* 4, e409.

Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods* 25, 402-408.

Mata, A., Gil, V., Perez-Clausell, J., Dasilva, M., Gonzalez-Calixto, M.C., Soriano, E., Garcia-Verdugo, J.M., Sanchez-Vives, M.V., and Del Rio, J.A. (2018). New functions of Semaphorin 3E and its receptor PlexinD1 during developing and adult hippocampal formation. *Scientific reports* 8, 1381.

McColl, B., Garg, R., Riou, P., Riento, K., and Ridley, A.J. (2016). Rnd3-induced cell rounding requires interaction with Plexin-B2. *Journal of cell science* 129, 4046-4056.

Miller, B.R., and Hen, R. (2015). The current state of the neurogenic theory of depression and anxiety. *Current opinion in neurobiology* 30, 51-58.

Miller, J.A., Nathanson, J., Franjic, D., Shim, S., Dalley, R.A., Shapouri, S., Smith, K.A., Sunkin, S.M., Bernard, A., Bennett, J.L., *et al.* (2013). Conserved molecular signatures of neurogenesis in the hippocampal subgranular zone of rodents and primates. *Development* 140, 4633-4644.

Moser, M.B., Moser, E.I., Forrest, E., Andersen, P., and Morris, R.G. (1995). Spatial learning with a minislab in the dorsal hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 9697-9701.

Mu, Y., Zhao, C., Toni, N., Yao, J., and Gage, F.H. (2015). Distinct roles of NMDA receptors at different stages of granule cell development in the adult brain. *eLife* 4, e07871.

Nakashiba, T., Cushman, J.D., Pelkey, K.A., Renaudineau, S., Buhl, D.L., McHugh, T.J., Rodriguez Barrera, V., Chittajallu, R., Iwamoto, K.S., McBain, C.J., *et al.* (2012). Young dentate

granule cells mediate pattern separation, whereas old granule cells facilitate pattern completion. *Cell* 149, 188-201.

Pacary, E., Azzarelli, R., and Guillemot, F. (2013). Rnd3 coordinates early steps of cortical neurogenesis through actin-dependent and -independent mechanisms. *Nature communications* 4, 1635.

Pacary, E., Heng, J., Azzarelli, R., Riou, P., Castro, D., Lebel-Potter, M., Parras, C., Bell, D.M., Ridley, A.J., Parsons, M., *et al.* (2011). Proneural transcription factors regulate different steps of cortical neuron migration through Rnd-mediated inhibition of RhoA signaling. *Neuron* 69, 1069-1084.

Peris, B., Gonzalez-Granero, S., Ballester-Lurbe, B., Garcia-Verdugo, J.M., Perez-Roger, I., Guerri, C., Terrado, J., and Guasch, R.M. (2012). Neuronal polarization is impaired in mice lacking RhoE expression. *Journal of neurochemistry* 121, 903-914.

Revest, J.M., Dupret, D., Koehl, M., Funk-Reiter, C., Grosjean, N., Piazza, P.V., and Abrous, D.N. (2009). Adult hippocampal neurogenesis is involved in anxiety-related behaviors. *Molecular psychiatry* 14, 959-967.

Riou, P., Villalonga, P., and Ridley, A.J. (2010). Rnd proteins: multifunctional regulators of the cytoskeleton and cell cycle progression. *Bioessays* 32, 986-992.

Roberts, P.J., Mitin, N., Keller, P.J., Chenette, E.J., Madigan, J.P., Currin, R.O., Cox, A.D., Wilson, O., Kirschmeier, P., and Der, C.J. (2008). Rho Family GTPase modification and dependence on CAAX motif-signaled posttranslational modification. *The Journal of biological chemistry* 283, 25150-25163.

Saitoh, A., Yamada, M., Yamada, M., Kobayashi, S., Hirose, N., Honda, K., and Kamei, J. (2006). ROCK inhibition produces anxiety-related behaviors in mice. *Psychopharmacology* 188, 1-11.

Savill, J. (1997). Recognition and phagocytosis of cells undergoing apoptosis. *British medical bulletin* 53, 491-508.

Sierra, A., Encinas, J.M., Deudero, J.J., Chancey, J.H., Enikolopov, G., Overstreet-Wadiche, L.S., Tsirka, S.E., and Maletic-Savatic, M. (2010). Microglia shape adult hippocampal neurogenesis through apoptosis-coupled phagocytosis. *Cell stem cell* 7, 483-495.

Sorrells, S.F., Paredes, M.F., Cebrian-Silla, A., Sandoval, K., Qi, D., Kelley, K.W., James, D., Mayer, S., Chang, J., Auguste, K.I., *et al.* (2018). Human hippocampal neurogenesis drops sharply in children to undetectable levels in adults. *Nature* 555, 377-381.

Spalding, K.L., Bergmann, O., Alkass, K., Bernard, S., Salehpour, M., Huttner, H.B., Bostrom, E., Westerlund, I., Vial, C., Buchholz, B.A., *et al.* (2013). Dynamics of hippocampal neurogenesis in adult humans. *Cell* 153, 1219-1227.

Sun, G.J., Sailor, K.A., Mahmood, Q.A., Chavali, N., Christian, K.M., Song, H., and Ming, G.L. (2013). Seamless reconstruction of intact adult-born neurons by serial end-block imaging reveals complex axonal guidance and development in the adult hippocampus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 33, 11400-11411.

Tanaka, H., Fujita, H., Katoh, H., Mori, K., and Negishi, M. (2002). Vps4-A (vacuolar protein sorting 4-A) is a binding partner for a novel Rho family GTPase, Rnd2. *The Biochemical journal* 365, 349-353.

Tanaka, H., Katoh, H., and Negishi, M. (2006). Pragmin, a novel effector of Rnd2 GTPase, stimulates RhoA activity. *The Journal of biological chemistry* 281, 10355-10364.

Tashiro, A., Sandler, V.M., Toni, N., Zhao, C., and Gage, F.H. (2006a). NMDA-receptor-mediated, cell-specific integration of new neurons in adult dentate gyrus. *Nature* 442, 929-933.

Tashiro, A., Zhao, C., and Gage, F.H. (2006b). Retrovirus-mediated single-cell gene knockout technique in adult newborn neurons in vivo. *Nature protocols* 1, 3049-3055.

Toda, T., Parylak, S.L., Linker, S.B., and Gage, F.H. (2018). The role of adult hippocampal neurogenesis in brain health and disease. *Molecular psychiatry*.

Tronel, S., Belnoue, L., Grosjean, N., Revest, J.M., Piazza, P.V., Koehl, M., and Abrous, D.N. (2010). Adult-born neurons are necessary for extended contextual discrimination. *Hippocampus*.

Uesugi, K., Oinuma, I., Katoh, H., and Negishi, M. (2009). Different requirement for Rnd GTPases of R-Ras GAP activity of Plexin-C1 and Plexin-D1. *The Journal of biological chemistry* 284, 6743-6751.

Vadodaria, K.C., Brakebusch, C., Suter, U., and Jessberger, S. (2013). Stage-specific functions of the small Rho GTPases Cdc42 and Rac1 for adult hippocampal neurogenesis. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 33, 1179-1189.

Vadodaria, K.C., and Jessberger, S. (2013). Maturation and integration of adult born hippocampal neurons: signal convergence onto small Rho GTPases. *Frontiers in synaptic neuroscience* 5, 4.

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

Zhao, X.F., Kohen, R., Parent, R., Duan, Y., Fisher, G.L., Korn, M.J., Ji, L., Wan, G., Jin, J., Puschel, A.W., *et al.* (2018). PlexinA2 Forward Signaling through Rap1 GTPases Regulates Dentate Gyrus Development and Schizophrenia-like Behaviors. *Cell reports* 22, 456-470.

3. Résultats complémentaires

a) Voies de signalisation mises en jeu par Rnd2 dans les néo-neurones hippocampiques

Nous montrons que Rnd2 régule de nombreuses étapes de la neurogénèse hippocampique adulte. Plus particulièrement la délétion de *Rnd2* diminue la survie des néo-neurones lors d'une période critique entre 2 et 3 semaines après leur naissance mais provoque également une migration aberrante et altère leur maturation morphologique. De plus nous mettons en évidence qu'une délétion de *Rnd2* après cette période critique diminue la survie des néo-neurones sans altérer leur position et leur maturation morphologique, indiquant donc un contrôle direct de la survie par Rnd2 (voir Figure 4 de l'article 1). De plus ces résultats ont soulevé l'existence potentielle, en aval de Rnd2, de plusieurs voies de signalisation indépendantes régulant les différentes étapes de la neurogénèse hippocampique adulte. Dans le but d'explorer ces mécanismes d'action de Rnd2, nous avons étudié l'implication de plusieurs partenaires potentiels. Nous avons tout d'abord focalisé notre attention sur RhoA, un candidat idéal car les fonctions biologiques des protéines Rnds sont étroitement liées à l'activité de la voie de signalisation de RhoA/ROCK1 (Chardin, 2006a; Riou et al., 2010), notamment lors de la corticogénèse (Pacary et al., 2011; Azzarelli et al., 2014). En effet, une diminution de l'expression de *Rnd2* dans les neurones corticaux naissants est associée à une augmentation de l'activité de RhoA et cette augmentation est responsable, en partie, des défauts de migration observés (Pacary et al., 2011). De plus il a récemment été montré qu'un blocage pharmacologique de la voie de signalisation de RhoA *in vivo*, induisait une augmentation de la survie des néo-neurones au sein du GD adulte (Christie et al., 2013). Dans ce contexte nous nous sommes donc intéressés à déterminer si Rnd2 régule la survie des néo-neurones via RhoA.

Afin d'étudier l'implication de RhoA dans les mécanismes sous-jacents de Rnd2, nous avons de nouveau utilisé l'approche de perte de fonction, combinée à une approche de surexpression de différents transgènes au sein des néo-neurones. Cette nouvelle approche est appelée "rescue" et a pour but de restaurer des phénotypes – ici la survie neuronale – altérés par la délétion de *Rnd2*, en surexprimant une protéine spécifique. Plusieurs groupes de souris *Rnd2^{flox/flox}* âgées de 12 semaines ont été injectées dans le GD avec un mélange de deux rétrovirus, le premier exprimant la GFP/Cre (ou GFP seule pour la condition témoin) et le deuxième exprimant la protéine d'intérêt avec la DsRed (ou DsRed seule pour la condition témoin et "délétion Rnd2"). Les différents groupes sont présentés dans la Figure 15A.

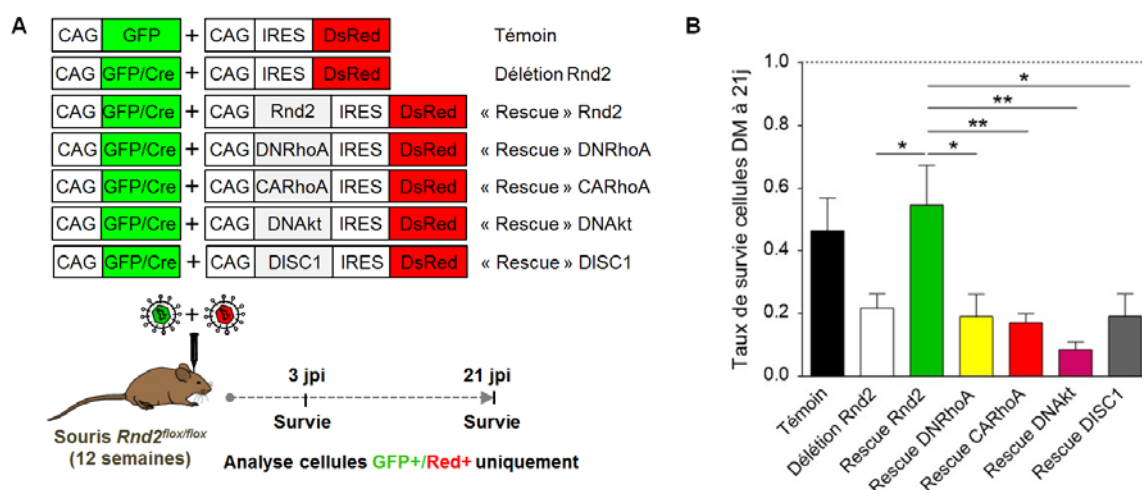


Figure 15. Etude de la voie de signalisation impliquée dans la régulation de la survie des néo-neurones par *Rnd2*.

A. Protocole expérimental décrivant les injections rétrovirales pour les expériences de «rescue». **B.** Quantification normalisée du nombre de cellules doublement marquées (DM) pour chaque condition de rescue à 21 jours post-injection (jpi) par rapport à 3 jpi. Moyenne $\pm$ s.e.m.; one way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison test ($F_{6,54} = 4,44$, $p = 0,001$); ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$ comparé à rescue Rnd2 ($n = 6-12$ souris).

De cette façon, au sein du même animal, des cellules exprimant la GFP seule, des cellules exprimant la DsRed seule et des cellules exprimant les deux sont présentes à 3 et 21 jpi. Dans ce projet, nous avons donc étudié la survie, la migration et la maturation morphologique des cellules doublement marquées (DM). Nous présentons dans cette partie les résultats relatifs à la survie neuronale. Pour chaque condition, la moyenne du nombre de cellules DM quantifiées à 21 jpi est normalisée par la moyenne quantifiée à 3 jpi. Cette normalisation permet ainsi de calculer un "taux de survie" des cellules DM.

Dans un premier temps, nous confirmons avec cette nouvelle approche, que la délétion de *Rnd2* au sein des néo-neurones induit une diminution de leur taux de survie à 21 jpi comparé aux néo-neurones témoins (Figure 15B). Afin de valider cette approche de «rescue», nous avons injecté le rétrovirus exprimant la GFP/Cre, qui permet la délétion spécifique de *Rnd2*, avec le rétrovirus permettant la surexpression de la protéine Rnd2 au sein des néo-neurones (« Rescue » Rnd2 = « Rescue » témoin). De cette manière, au sein des cellules DM, le gène *Rnd2* est supprimé mais la protéine est présente, ce qui devrait permettre d'atteindre un niveau de Rnd2 comparable à celui observé dans des cellules « wild-type ». Nous montrons ici que les cellules DM de la condition "rescue Rnd2" (barre verte) présentent un taux de survie comparable à celui des cellules DM du groupe témoin (barre noire) et significativement supérieur au taux de survie des neurones délétés pour *Rnd2* (barre blanche) (Figure 15B), validant ainsi notre stratégie de «rescue».

Nous avons ensuite utilisé cette stratégie pour étudier l'implication de RhoA. Christie et collègues ayant montré qu'une inhibition pharmacologique de la voie de signalisation de RhoA augmente la survie des néo-neurones, nous avons donc émis l'hypothèse que *Rnd2* agirait sur la survie neuronale en inhibant la signalisation de RhoA. Ainsi en l'absence de *Rnd2*, cette voie serait plus active, provoquant une mort neuronale plus importante. Dans l'espoir de bloquer l'effet négatif de la délétion de *Rnd2* sur la survie et restaurer un taux de survie physiologique, nous avons inhibé l'activité de RhoA, supposément trop élevée en l'absence de *Rnd2*. Contrairement aux Rnds atypiques, l'activité de RhoA n'est pas uniquement dépendante de son niveau d'expression mais également du cycle de liaison au GTP/GDP. Nous avons donc utilisé un rétrovirus permettant l'expression d'une forme "dominant négatif" de RhoA (DNRhoA) (Figure 15A). Cette forme génétiquement modifiée de RhoA ne peut se lier au GTP, elle est donc constamment à l'état inactif. La surexpression de cette forme DNRhoA au sein des néo-neurones entraîne une compétition avec la protéine endogène, de laquelle résulte une inhibition de la voie de signalisation de RhoA, qui selon notre hypothèse augmenterait la survie neuronale. Néanmoins, la quantification du nombre de cellules DM au sein du GD des souris de la condition "rescue DNRhoA" (barre jaune), ne révèle pas d'augmentation de la survie des néo-neurones (Figure 15B). En effet le taux de survie dans cette condition est comparable à celui obtenu pour la condition "délétion *Rnd2*" et est significativement plus faible que le taux de survie de la "rescue témoin". Ces résultats suggèrent donc que l'effet de la délétion de *Rnd2* sur la survie ne serait pas dépendant d'une augmentation de l'activité de RhoA. Il n'est cependant pas à exclure que la surexpression du DNRhoA par le biais d'un rétrovirus avec un promoteur CAG, ne soit pas idéale pour une inhibition appropriée de la voie de RhoA. En effet une inhibition excessive de la voie de signalisation dépendante de RhoA pourrait perturber de manière aberrante la signalisation intracellulaire globale. Une approche pharmacologique, quoique souvent peu spécifique, serait peut-être plus appropriée. De même une approche visant à diminuer l'expression de RhoA plutôt que son activité, par exemple avec des rétrovirus exprimant des shRNA dirigés contre RhoA, pourrait être envisagée.

Dans une autre condition de «rescue», nous avons injecté le rétrovirus exprimant la GFP/Cre avec le rétrovirus exprimant la forme "constamment active" de RhoA (CARhoA), une forme de RhoA modifiée qui reste liée au GTP, à l'état actif donc (Figure 15A). Si l'hypothèse d'une augmentation de l'activité de RhoA en l'absence de *Rnd2*, ne semble pas confirmée par nos résultats, il n'est cependant pas impossible que l'inverse se produise. En effet de nombreuses études mettent en évidence un rôle inhibiteur de RhoA sur la croissance

dendritique (Govek et al., 2005). De plus Tanaka et al. (Tanaka et al., 2006) ont montré, dans les cellules PC12, que *Rnd2* inhibe la croissance des neurites induite par le NGF en inhibant l'activité de RhoA. Aussi nous avons supposé qu'en l'absence de *Rnd2*, l'activité de RhoA serait diminuée, ce qui induirait l'augmentation de la longueur et la ramification dendritique. En permettant la surexpression d'une forme constamment active de RhoA au sein des néo-neurones délétés pour *Rnd2* nous pourrions ainsi restaurer un phénotype physiologique proche de celui des neurones témoins. L'analyse de la morphologie des cellules DM dans les deux conditions «rescue» DNRhoA et CARhoA étant en cours, nous ne présentons ici que les données relatives à la survie. Nous avons pu observer que les cellules DM de la condition «rescue» CARhoA (barre rouge) présentent un taux de survie similaire à celui des neurones délétés pour *Rnd2*. L'ensemble de ces premiers résultats ne mettent donc pas en évidence une implication de RhoA dans les voies de signalisation induite par *Rnd2* pour réguler la survie des néo-neurones dans le GD à l'âge adulte. La poursuite de l'analyse de ces expériences de «rescue» permettra de mieux comprendre si RhoA est impliquée en aval de *Rnd2* dans le contrôle de la maturation morphologique et/ou le positionnement des néo-neurones.

Outre RhoA, nous avons également exploré une potentielle implication de la protéine DISC1 (disrupted in schizophrenia 1) dont le rôle dans la régulation de la neurogénèse adulte hippocampique a largement été décrit (Duan et al., 2007; Kim et al., 2009; Namba et al., 2011; Kim et al., 2012; Wu et al., 2013; Lee et al., 2015). En effet, il a été mis en évidence que DISC1 régule l'intégration des néo-neurones au sein du GD à l'âge adulte sans affecter leur survie (Duan et al., 2007). Il est en effet intéressant de noter qu'une réduction de l'expression de *DISC1* dans les néo-neurones hippocampiques entraîne une migration aberrante hors de la CG, et augmente la taille du corps cellulaire et altère leur morphologie dendritique (Duan et al., 2007). Ce phénotype induit par l'inhibition de DISC1 se rapproche en de nombreux points au phénotype obtenu après délétion de *Rnd2*, c'est pourquoi l'idée que ces deux régulateurs de la neurogénèse puissent être reliés nous est apparue séduisante. Nous avons donc injecté le GD de souris *Rnd2^{flox/flox}* avec les rétrovirus exprimant la GFP/Cre et ceux surexprimant DISC1 avec la DsRed (condition «rescue» DISC1, barre grise) (Figure 15A). La quantification du nombre de cellules DM dans cette condition ne montre pas d'augmentation du taux de survie comparé aux cellules seulement délétées pour *Rnd2* (Figure 15B). Ce résultat est en accord avec le fait que la survie des néo-neurones n'est pas affectée par une réduction de l'expression de *DISC1*. Par ailleurs, l'analyse de la position des cellules DM dans la CG nous révèle que la surexpression de DISC1 au sein de neurones délétés pour *Rnd2* ne permet pas de corriger les défauts de positionnement

(données non présentées), excluant l'implication de DISC1. De manière surprenante, la seule surexpression de DISC1 induit une migration ectopique et une morphologie aberrante des néo-neurones quand les travaux de Duan et collègues montrent que l'inhibition de DISC1 conduit à ces mêmes altérations.

Une autre étude provenant du même laboratoire, a pu mettre en évidence que la régulation de la neurogénèse hippocampique par DISC1 était dépendante de la modulation de la voie de signalisation d'Akt (ou protéine kinase B) (Kim et al., 2009). Plus spécifiquement, l'inhibition de DISC1 induit une augmentation de l'activité d'Akt et par des manipulations génétiques les auteurs ont pu montrer qu'une augmentation de l'activité d'Akt peut, par elle-même, induire le même phénotype. En injectant un rétrovirus surexprimant une forme "dominant négatif" d'Akt (DNAkt) avec le rétrovirus exprimant la GFP/Cre, nous visons de nouveau à restaurer certains phénotypes physiologiques dus à la suppression de *Rnd2* (Figure 15A). Ici nous observons que dans cette condition de «rescue» (barre violette) le taux de survie des néo-neurones n'est pas restauré, il semble même être plus faible encore que pour les neurones simplement délétés pour *Rnd2* (Figure 15B). Cet effet peut s'expliquer par le fait qu'Akt, en phosphorylant la protéine Bad, possède un rôle anti-apoptotique (Khawaja, 1999). La délétion de *Rnd2* ajoutée à l'inhibition d'Akt semble donc induire une mort cellulaire plus importante, bien que non significative, suggérant potentiellement que *Rnd2* pourrait agir via une voie distincte de celle d'Akt.

Ensemble ces résultats montrent, à ce stade de notre analyse, que le rôle de *Rnd2* dans la neurogénèse hippocampique adulte ne semble pas être dépendant des voies de signalisation de RhoA et de DISC1-Akt. L'analyse de la morphologie et de la position des néo-neurones dans les différentes conditions de «rescue» pourrait nous éclaircir quant à l'implication de ces protéines. Néanmoins le faible taux de survie des cellules DM au sein des différentes conditions limite grandement le nombre de cellules analysables pour la morphologie.

Rnd2 étant exprimé dans les endosomes, il sera intéressant dans des expériences ultérieures d'étudier si *Rnd2* régule le développement des néo-neurones via une modulation de l'endocytose. *Rnd2* pourrait en effet contrôler la disponibilité de certains récepteurs ou molécules d'adhésion importants pour la survie, le positionnement et/ou la maturation morphologique.

b) Impact d'une surexpression de *Rnd2* sur la survie des néo-neurones

Au vu des résultats obtenus après délétion de *Rnd2* dans les néo-neurones hippocampiques, nous nous sommes demandés si inversement une surexpression de *Rnd2* dans ces cellules pouvait favoriser leur survie.

Dans ce but, nous avons pris avantage des expériences de «rescue» présentées précédemment. En s'évertuant à restaurer les phénotypes altérés par la délétion de *Rnd2*, nous avons pu montrer que l'expression de la protéine *Rnd2* au sein de neurones pour lesquels le gène *Rnd2* est délété, permettait une survie et un positionnement similaires aux cellules « wild-type ». Ces résultats ont été obtenus en étudiant les cellules DM au sein de souris *Rnd2^{flox/flox}* injectées avec le rétrovirus exprimant la GFP/Cre et celui exprimant *Rnd2* avec la DsRed. Or au sein de ces mêmes animaux il est également possible d'étudier les cellules uniquement marquées par la DsRed, des cellules dans lesquelles l'expression de *Rnd2* est augmentée (Figure 16A).

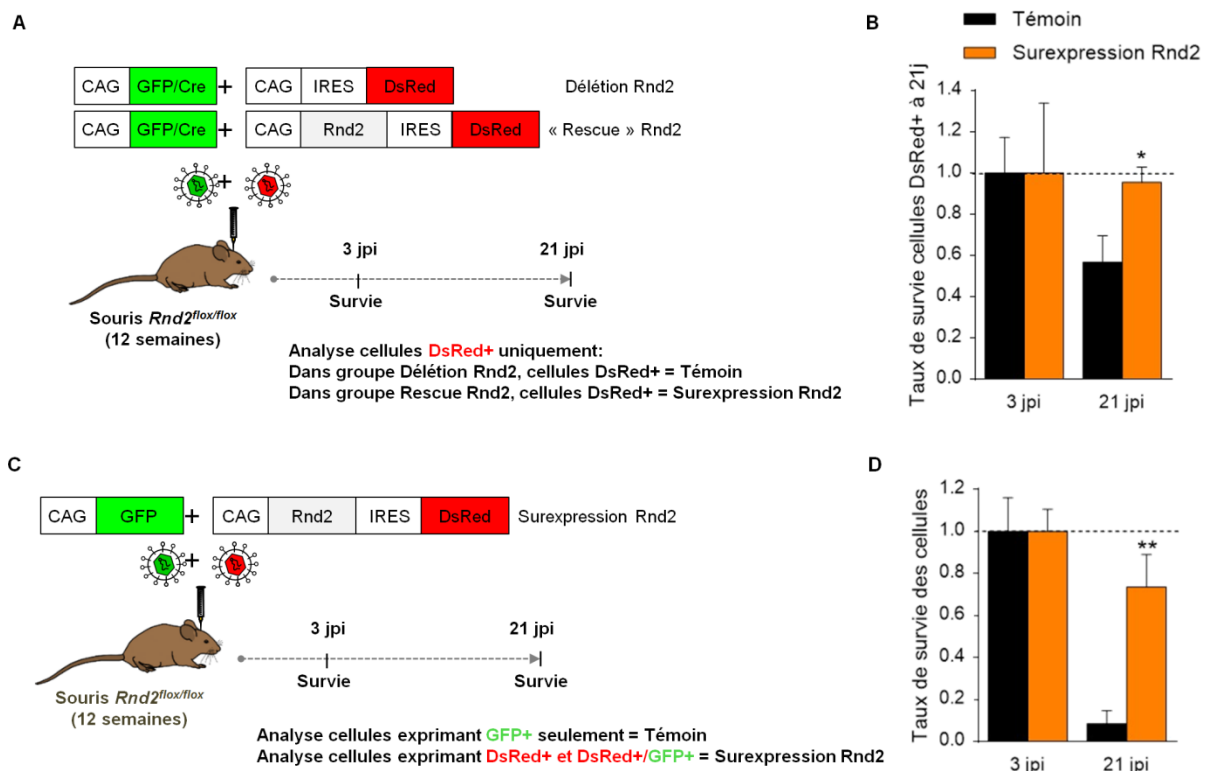


Figure 16. Etude de l'impact d'une surexpression de *Rnd2* sur la survie des néo-neurones

A, C. Protocoles expérimentaux décrivant les injections rétrovirales pour les expériences de surexpression. **B.** Quantification normalisée du nombre de cellules seulement DsRed+, au sein des conditions «rescue» *Rnd2* et délétion *Rnd2*, à 21 jours post-injection (jpi) par rapport à 3 jpi. Moyenne $\pm$ s.e.m.; unpaired two-tailed Student's t-test ($t_{17} = 2,79$, $p = 0,01$); * $p < 0,05$ comparé aux neurones témoins ($n = 8-11$ souris). **D.** Quantification normalisée du nombre de cellules seulement GFP+ et des cellules DsRed totales (cellules DsRed+ uniquement + cellules doublement marquées), au sein de la condition surexpression *Rnd2*, à 21 jpi par rapport à 3 jpi. Moyenne $\pm$ s.e.m.; unpaired two-tailed Student's t-test ($t_8 = 3,91$, $p = 0,0045$); ** $p < 0,01$ comparé aux neurones témoins ($n = 5$ souris).

Nous avons donc quantifié, chez ces souris, le nombre de cellules DsRed+ uniquement, à 3 et 21 jpi, afin de déterminer leur taux de survie. Nous avons comparé ce taux de survie à celui des cellules simplement marquées pour la DsRed chez les animaux de la condition délétion *Rnd2* (i.e. cellules témoins). Nous montrons que le taux de survie des néo-neurones surexprimant *Rnd2* est significativement augmenté par rapport aux néo-neurones témoins (Figure 16B). Etant donné le taux de survie des néo-neurones témoins, relativement cohérent avec ce qui a été observé précédemment, nous mettons en évidence ici que la surexpression de *Rnd2* peut favoriser la survie des néo-neurones, au moins entre 3 et 21 jpi. Après surexpression de *Rnd2*, le taux de survie est proche de 100%, indiquant que ces néo-neurones ne seraient pas éliminés par mort cellulaire, entre 3 et 21 jpi. Ce résultat semble donc apporter une nouvelle preuve que *Rnd2* joue un rôle clé dans la régulation de la survie des néo-neurones.

Pour confirmer ce résultat, nous avons ensuite utilisé la même stratégie de co-injection que celle décrite précédemment pour étudier l'effet de la délétion de *Rnd2* sur la survie (voir la Figure 2E de l'article 1). Nous avons en effet co-injecté des rétrovirus exprimant la GFP seule et ceux exprimant *Rnd2* avec la DsRed, au sein du GD de souris *Rnd2*^{flox/flox} adultes (Figure 16C). Dans cette condition, les cellules simplement marquée pour la GFP sont les néo-neurones témoins tandis que les cellules simplement marquée pour la DsRed et les cellules DM, sont les néo-neurones surexprimant *Rnd2*. De cette façon nous montrons de nouveau que la surexpression de *Rnd2* augmente le taux de survie des néo-neurones à 21 jpi comparé aux néo-neurones témoins (Figure 16D). Cependant lors de cette expérience, nous observons un faible taux de survie pour les néo-neurones témoins. Il sera donc nécessaire de réitérer l'expérience afin de confirmer ce résultat. Nous ne pouvons pas exclure par ailleurs que la surexpression de *Rnd2* dans une sous-population de néo-neurones ait des effets non autonomes sur les populations de néo-neurones environnantes.

Ensemble ces résultats confirment donc que *Rnd2* est un régulateur majeur de la survie des néo-neurones du GD adulte. Il serait en revanche bon de savoir si une telle augmentation de la survie des néo-neurones se traduit par une augmentation du nombre de neurones fonctionnellement intégrés à long terme, dans le GD adulte. En étudiant la morphologie des néo-neurones surexprimant *Rnd2*, nous avons obtenus des résultats très préliminaires semblant indiquer que cette surexpression diminue la ramification des dendrites et la taille du corps cellulaire à 21 jpi. La poursuite des analyses nous permettra de mieux comprendre l'impact de la surexpression de *Rnd2* sur le développement et l'intégration de nouveaux NGs au sein du GD

adulte et en définitive nous apportera une meilleure compréhension du rôle de Rnd2 dans ce processus.

c) Rôle des trois protéines Rnds dans la neurogénèse adulte hippocampique

Les trois protéines Rnds (Rnd1, Rnd2 et Rnd3) possèdent des structures proches, elles ont par conséquent certaines fonctions communes qui mettent en jeu des partenaires communs. Elles sont notamment connues pour leur action sur la voie de signalisation de RhoA qui est un médiateur de nombreuses fonctions des Rnds, bien qu'elles n'interagissent pas toutes de la même manière avec RhoA (Chardin, 2006b; Riou et al., 2010; Pacary et al., 2011). Une des différences principales entre ces 3 protéines est leurs localisations cellulaires distinctes. Rnd1 est principalement associée à la membrane plasmique, Rnd2 est localisée dans les endosomes précoces et Rnd3 semble être exprimée au niveau de la membrane plasmique, dans les endosomes et au sein du cytoplasme (Chardin, 2006a; Roberts et al., 2008; Riou et al., 2010; Pacary et al., 2011). Cette répartition au sein de différents compartiments sous-cellulaires suggère que malgré leur ressemblance, les trois Rnds posséderaient des fonctions biologiques bien spécifiques.

Dans le cadre de notre étude, nous nous sommes aussi demandé si les fonctions de Rnd2 étaient uniques et spécifiques ou si Rnd1 et/ou Rnd3 avaient les mêmes fonctions. En supprimant *Rnd2* nous mettons en évidence une diminution de la survie des néo-neurones hippocampiques, une migration ectopique et une morphologie altérée. Le fait que cette délétion induise ces effets suggèrent que Rnd1 et Rnd3 ne sont pas capables de compenser l'absence de Rnd2, au moins pour les déficits observés. Les fonctions de Rnd1, Rnd3 et Rnd2 ne semblent donc pas être redondantes. Par ailleurs l'expression de *Rnd1* et *Rnd3* dans le GD adulte (voir la Figure S1 de l'article 1) est distincte de celle de *Rnd2* suggérant encore une fois des fonctions distinctes pour ces deux autres Rnds dans le processus de neurogénèse adulte comparé à Rnd2.

1) Interchangeabilité des protéines Rnd

Afin de tenter de déterminer si les 3 Rnds ont les mêmes fonctions, nous avons pris avantage de l'approche de «rescue». En délétant *Rnd2* et surexprimant Rnd1 ou Rnd3, nous avons cherché à déterminer si l'une et/ou l'autre de ces Rnd pouvait remplacer Rnd2 dans le contrôle de la survie, de la position et/ou de la morphologie. Ce type de manipulation ne donne de réponse claire qu'en cas de non « rescue ». En effet, par exemple, une absence de « rescue » signifierait que la Rnd concernée n'a pas la même fonction que Rnd2. En revanche une «rescue» ne permettrait pas une conclusion inverse. En effet, par exemple, si la surexpression de Rnd3

compense l'absence de *Rnd2* pour la survie, il est difficile de conclure qu'en condition physiologique ces protéines possèdent la même fonction mais uniquement que *Rnd3* peut remplacer *Rnd2* en son absence, suggérant ainsi qu'elles sont capables de mobiliser les mêmes partenaires et voies de signalisation.

Comme décrit précédemment, nous avons injecté différents groupes de souris *Rnd2^{flx/flx}* adultes avec un mélange de deux rétrovirus, l'un exprimant la GFP/Cre et l'autre exprimant une des *Rnds* avec la DsRed (Figure 17A).

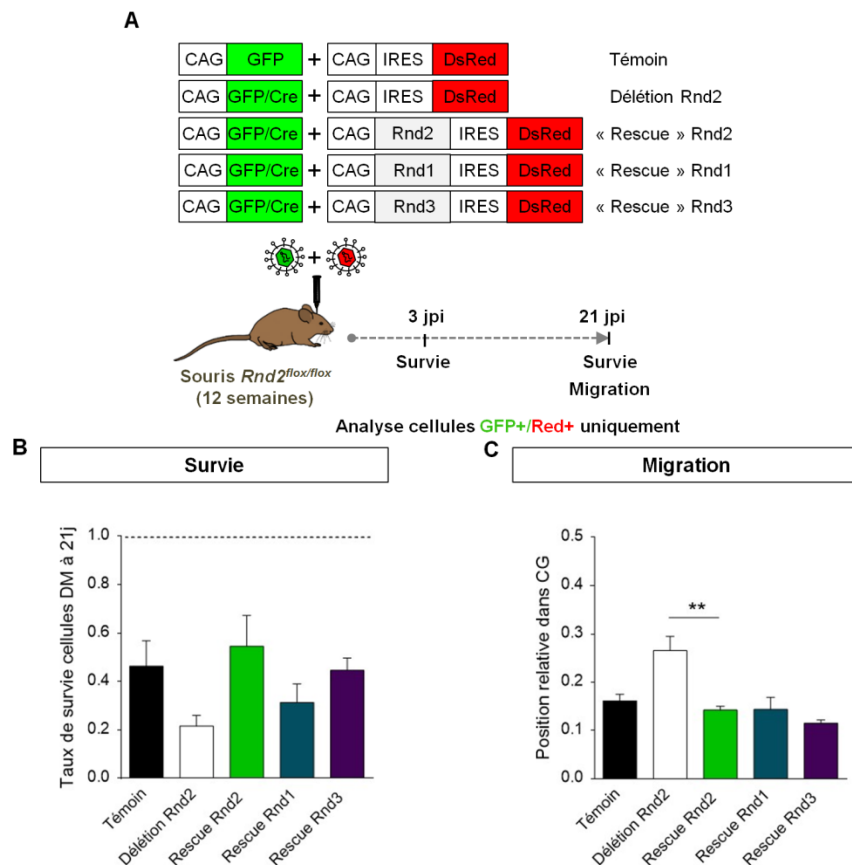


Figure 17. La surexpression de *Rnd1* ou *Rnd3* peut restaurer certains défauts de neurogénèse induits par la délétion de *Rnd2*.

A. Protocole expérimental décrivant les injections rétrovirales pour les expériences de «rescue». **B.** Quantification normalisée du nombre de cellules doublement marquées (DM) pour chaque condition de «rescue» à 21 jours post-injection (jpi) par rapport à 3 jpi. Moyenne $\pm$ s.e.m.; one way ANOVA ($F_{4,36} = 1,88$, $p = 0,14$); $n = 7-11$ souris. **C.** Analyse de la position relative des cellules DM au sein de la couche granulaire à 21jpi. Moyenne $\pm$ s.e.m.; ANOVA une voie suivie du test de comparaisons multiples de Dunnett ($F_{4,19} = 7,17$, $p = 0,0011$); ** $p < 0.01$ comparé à «rescue» *Rnd2* ($n = 3-6$ souris).

L'analyse du nombre de cellules DM survivantes dans chaque condition montre que la surexpression de *Rnd1* ne permet pas de restaurer un taux de survie proche des néo-neurones témoins ou restaurés par l'expression de *Rnd2* (Figure 17B). En revanche la surexpression de *Rnd3* pourrait être suffisante pour un retour à un niveau physiologique du taux de survie des néo-neurones délétés pour *Rnd2* (Figure 17B). Toutefois l'ANOVA n'étant pas significative

($F_{4,36}=1.88$, $p=0.14$), nous ne pouvons pas clairement conclure. Quant à l'analyse de la migration, nous pouvons observer que la surexpression individuelle des 3 Rnds permet de restaurer un positionnement dans la CG adulte, proche de celui des neurones témoins (Figure 17C). Ces résultats suggèrent donc que Rnd1 et Rnd3 peuvent compenser l'absence de Rnd2 de manière à empêcher la migration ectopique. Il est possible qu'une surexpression de Rnd1 et Rnd3 à des niveaux non physiologiques, change leur répartition au sein des différents compartiments sous-cellulaires et dans un "dépassement de fonction", Rnd1 et Rnd3 pourraient alors interagir avec les partenaires propres à Rnd2 qui régulent la migration des néo-neurones du GD adulte. L'analyse de la morphologie dans chaque condition de «rescue» permettra également d'approfondir nos connaissances sur l'interchangeabilité des 3 Rnds. Toutefois une approche par perte de fonction, similaire à celle utilisée pour Rnd2, semble davantage appropriée pour étudier les fonctions propres de Rnd1 et Rnd3 dans les différentes étapes du développement des néo-neurones hippocampiques.

2) Rôle de Rnd1 dans les étapes de la neurogénèse adulte régulées par Rnd2

Si nos recherches se sont concentrées sur Rnd2, en partie pour son expression enrichie au niveau de la ZSG chez l'adulte, les ARNm des autres Rnds sont également exprimés dans le GD de souris adulte (voir la Figure S1C de l'article 1). Pour étudier le rôle joué par Rnd1 dans le processus de néo-neurogénèse, nous avons donc utilisé la même stratégie de perte de fonction que pour Rnd2, en injectant le rétrovirus exprimant la Cre fusionnée à la GFP, dans le GD de souris mutantes adultes (12 semaines) pour lesquelles le gène *Rnd1* est flanqué de séquences lox (*Rnd1^{flox/flox}*) (Figure 18A). Le groupe de souris témoin est lui injecté avec le rétrovirus exprimant la GFP seule. Ainsi nous avons pu étudier l'impact de la délétion de *Rnd1* sur les différentes étapes du développement de nouveaux NGs, en se concentrant principalement sur les étapes régulées par Rnd2 à savoir la survie, la position et la morphologie. Les résultats présentés ci-dessous ont été obtenus par l'étudiante Umami Ciptasari que j'ai co-encadré lors d'un stage de Master 1 Neurasmus.

Premièrement nous montrons que la délétion de *Rnd1* n'a pas d'effet sur l'expression de la DCX, un marqueur de NGs immatures, indiquant que Rnd1 n'est pas impliqué dans la différenciation des néo-neurones (données non présentées). Pour l'étude du rôle de Rnd1 dans la régulation de la survie des nouveaux neurones, nous avons utilisé la même méthode que précédemment présentée pour Rnd2. Ainsi nous avons quantifié le nombre de cellules GFP+ dans le GD de souris *Rnd1^{flox/flox}* injectées soit avec le rétrovirus exprimant la GFP/Cre, soit avec le

rétrovirus exprimant la GFP seule pour la condition témoin, à différents temps post-injection (Figure 18A).

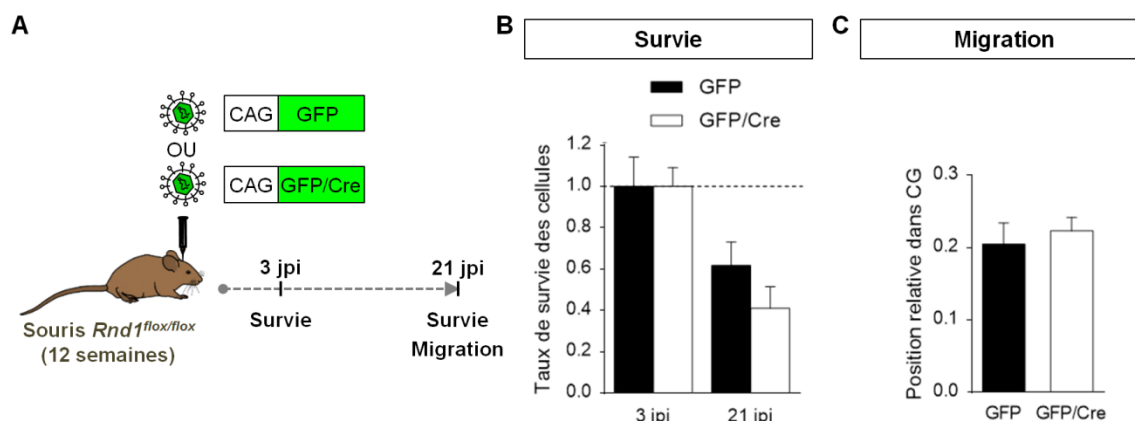


Figure 18. La délétion de *Rnd1* n'affecte pas la survie et la migration des néo-neurones hippocampiques.

A. Protocole expérimental. Les cerveaux des animaux sont analysés à 3 et 21 jours post injection (jpi) pour la survie et à 21jpi pour la migration. **B.** La quantification normalisée des cellules GFP+ à 21jpi ne révèle pas de différence significative entre les deux groupes. Les données sont présentées sous forme de moyennes $\pm$ s.e.m; unpaired two-tailed Student's t-test ($t_6 = 1,64$, $p = 0,26$) à 21 jpi; $n=3-5$ souris. **C.** L'analyse de la position relative des cellules GFP+ au sein de la CG ne montre pas de différence entre les deux groupes. Moyennes $\pm$ s.e.m.; 4-6 souris.

Comme mentionné précédemment, pour palier à une éventuelle variabilité de transduction entre préparations rétrovirales différentes, nous normalisons pour chaque type de virus le nombre de cellules GFP+ compté à 21 jours post-injection (jpi) par le nombre de cellules compté à 3jpi. Ainsi nous avons observé que, contrairement à *Rnd2*, la délétion de *Rnd1* n'induit pas une diminution significative du nombre de cellules GFP+ à 21jpi, comparé aux animaux témoins (Figure 18B), indiquant que *Rnd1* n'est pas nécessaire à la survie des néo-neurones. En étudiant l'étape de migration, nous avons pu constater que les neurones témoins étaient positionnés dans la partie interne de la CG, un résultat cohérent avec les expériences faites chez la souris *Rnd2^{flox/flox}* et la littérature (Muramatsu et al., 2007; Mathews et al., 2010). Ici nous montrons que les néo-neurones délétés pour *Rnd1* présentent la même distribution dans la CG interne que les néo-neurones témoins (Figure 18C). *Rnd1* ne semble donc pas réguler la survie et la position des néo-neurones dans le GD adulte. Ces résultats sont en accord avec nos attentes, étant donné l'absence de données montrant un rôle de *Rnd1* dans le contrôle de la survie et de la migration.

En revanche, un certain nombre d'études ont pu mettre en évidence que *Rnd1* joue un rôle central dans l'extension et la ramification des dendrites, ainsi que dans le développement des épines dendritiques (Aoki et al., 2000; Ishikawa et al., 2003). De manière à examiner l'effet de la délétion de *Rnd1* sur la maturation morphologique des néo-neurones, nous avons injecté dans le GD de souris *Rnd1^{flox/flox}*, un mélange de rétrovirus exprimant la RFP d'une part et la GFP/Cre d'autre part (Figure 19A). Ainsi, au sein d'un même animal, 21 jours après injection rétrovirale,

nous avons pu reconstruire la structure de l'arbre dendritique de neurones témoins (cellules exprimant uniquement la RFP) et celle de neurones "délétés pour *Rnd1*" (cellules exprimant la GFP et la RFP) (Figure 19B). De manière inattendue, nous n'avons pas observé de différence significative dans la structure des arbres dendritiques entre les néo-neurones des 2 groupes, tant au niveau de la longueur dendritique totale qu'au niveau du nombre de nœuds (Figure 19C-D). De plus la taille du corps cellulaire n'est pas modifiée par la délétion de *Rnd1* (Figure 19E).

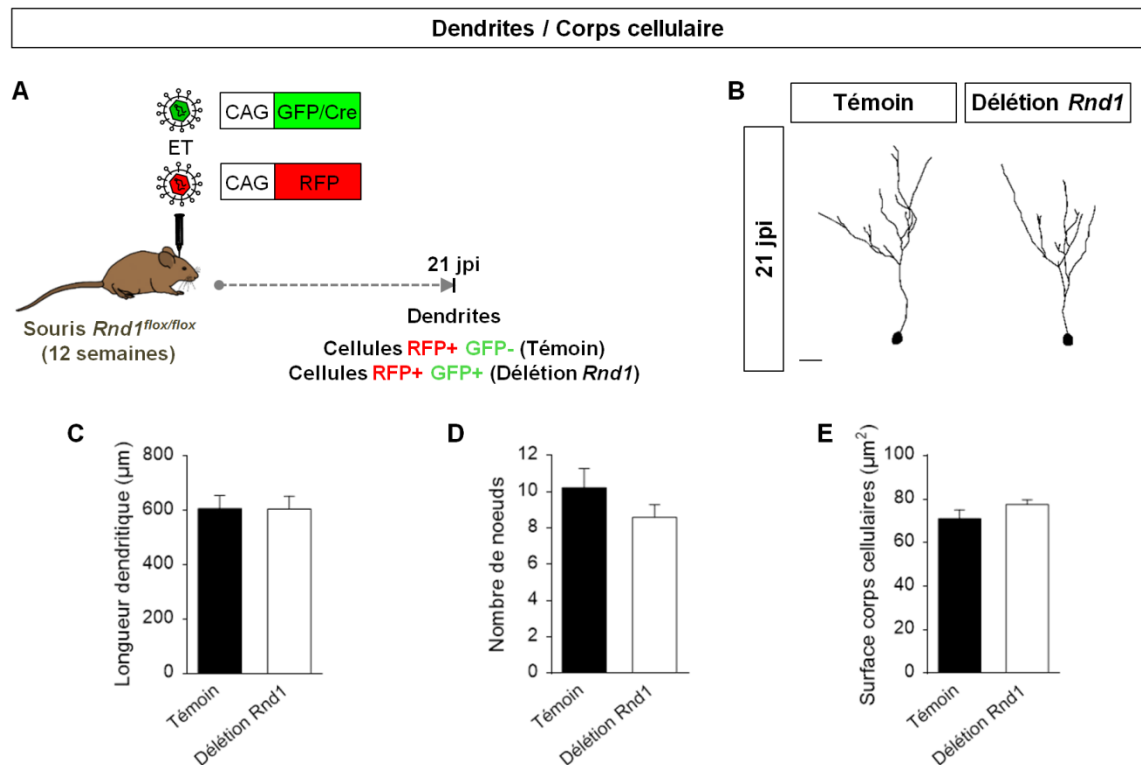


Figure 19. La délétion de *Rnd1* n'a pas d'impact sur la morphologie des néo-neurones hippocampiques.

A. Protocole expérimental décrivant l'injection du mélange de rétrovirus exprimant la RFP et la GFP/Cre au sein de souris *Rnd1^{flox/flox}* âgées de 12 semaines. **B.** Reconstitution de la morphologie des néo-neurones témoins (exprimant seulement la RFP) et délétés pour *Rnd1* (RFP+ et GFP+) à 21 jours post-injection (jpi). **C,D,E.** La quantification de la longueur dendritique totale, du nombre de nœuds et de la surface du corps cellulaire ne révèle aucune différence entre les deux groupes. Moyennes $\pm$ s.e.m.; n=3 souris.

Nous montrons donc ici que *Rnd1* ne semble pas non plus impliquée dans la maturation morphologique des néo-neurones hippocampiques. Des expériences supplémentaires seront nécessaires afin d'approfondir cette étude, notamment il sera intéressant d'examiner l'implication de *Rnd1*, mais aussi celle de *Rnd2*, dans la formation des épines et le développement de l'axone. Quoiqu'il en soit ces données permettent toutefois de montrer que *Rnd1* ne semble pas jouer le même rôle que *Rnd2* dans le contrôle du développement des néo-neurones dans le GD adulte.

d) Rôle(s) joué(s) par *Rnd2* lors du développement des neurones granulaires générés en période postnatale

Le processus de neurogénèse dans le GD à l'âge adulte présente de nombreuses similitudes avec celui décrit lors de la période développementale. Néanmoins il est admis que le développement de nouveaux neurones dans le cerveau adulte se déroule dans un contexte relativement différent, pouvant influencer le déroulement du développement neuronal. En effet à la naissance les NGs nouvellement générés se développent dans un GD en pleine prolifération, au sein duquel relativement peu de neurones ont atteint leur maturité et où les connexions ne sont pas totalement établies. En revanche à l'âge adulte, les néo-neurones se développent au milieu d'un GD déjà formé de NGs matures et connectés. La survie de ces nouveaux neurones est donc un véritable défi et l'intégration dans les réseaux hippocampiques préexistant met en jeu certains mécanismes de compétition. Dans ce contexte, nous nous sommes posé la question de savoir si *Rnd2* jouait ou non des rôles similaires dans ces deux processus de neurogénèse hippocampique, postnatale et adulte.

Dans ce but, nous avons injecté le rétrovirus exprimant la GFP/Cre dans le GD de souris *Rnd2^{flox/flox}*, le jour de la naissance (P0) et le rétrovirus exprimant la GFP seule chez les animaux du groupe témoin (Figure 20A).

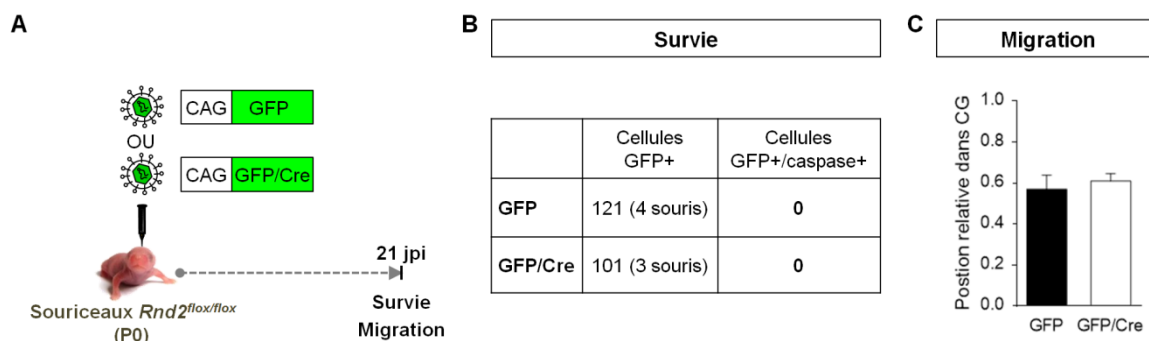


Figure 20. La délétion de *Rnd2* n'affecte pas la mort cellulaire et la migration des neurones granulaires générés en période postnatale.

A. Protocole expérimental décrivant l'injection de rétrovirus GFP et GFP/Cre au sein de souriceaux *Rnd2^{flox/flox}* à P0. La survie et la migration sont analysées à 21 jours post injection (jpi). **B.** La révélation immunohistochimique de la GFP et la forme activée de la caspase 3 montre qu'aucune cellule GFP+ n'exprime la caspase 3 activée à 21jpi, dans les deux groupes expérimentaux (n=3-4 souris). **C.** L'analyse de la position relative des cellules GFP+ au sein de la CG ne montre pas de différence entre les deux groupes. Moyennes $\pm$ s.e.m.; n=3 souris.

La majorité des effets de la délétion de *Rnd2* chez des animaux adultes ayant été observés 21 jours après injection rétrovirale, nous avons utilisé ici la même fenêtre d'étude. Nous avons alors examiné l'expression de la caspase-3 activée (caspase-3a) au sein des cellules GFP+ dans les deux groupes d'animaux, de manière à évaluer la mort cellulaire par apoptose et indirectement la survie des nouveaux neurones. Bien qu'un certain nombre de cellules exprimant la caspase-3a

aient été révélées par marquage immunohistochimique dans le GD de souris à P21, aucun marquage de la caspase-3a n'a été observé au sein des cellules GFP+ dans les deux groupes d'animaux (Figure 20B). Ces résultats indiquent que la délétion de *Rnd2* ne semble pas induire la mort des neurones générés à P0, au moins 3 semaines après leur naissance. Plusieurs possibilités pourraient expliquer ces résultats. D'une part, il est possible que les neurones générés à P0 meurent au cours de la semaine suivant leur naissance (Gould et al., 1991). Les cellules apoptotiques ne seraient donc plus détectables à 3 semaines. D'autre part il est possible : les NGs nés lors des premiers jours postnataux survivraient pendant la période d'immatrité mais seraient éliminés plus tardivement entre 2 et 6 mois (Cahill et al., 2017). Toutefois, dans les deux cas, les études citées ont été effectuées chez le rat et les processus que nous étudions pourraient dépendre de l'espèce étudiée. Des données récentes du laboratoire, obtenues avec des souris C57Bl6, semblent indiquer que les NGs générés à E17.5 ne meurent pas (étude jusqu'à 4 mois post-naissance) tandis que la moitié des NGs générés à P7 meurent dès la première semaine suivant leur naissance. Des expériences complémentaires sont donc nécessaires pour déterminer si les NGs générés à P0 subissent eux aussi une phase de sélection, et si oui à quel moment de leur développement intervient-elle.

Dans un deuxième temps, nous montrons que la délétion de *Rnd2* n'a pas d'effet sur le positionnement des neurones postnataux, qui sont localisés dans la partie intermédiaire de la CG (Figure 20C). Nous nous sommes ensuite intéressés à l'impact de la délétion de *Rnd2* sur la maturation morphologique des NGs générés à P0. Pour cela nous avons de nouveau injecté un mélange de rétrovirus exprimant la RFP et la GFP/Cre dans le GD de souris *Rnd2*^{flox/flox} à P0 et reconstruit la structure des arbres dendritiques des neurones témoins (RFP+ seule) et des neurones délétés pour *Rnd2* (GFP+ et RFP+), 21 jours après injection rétrovirale (Figure 21A-B).

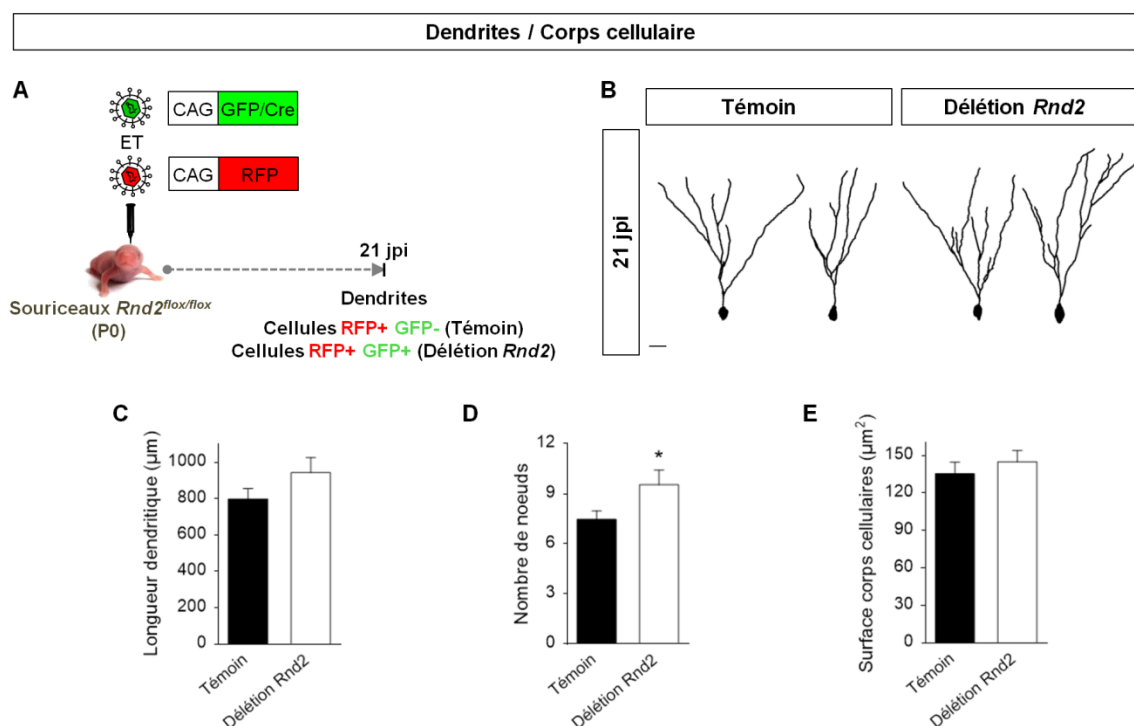


Figure 21. Une augmentation de la ramification est induite par la délétion de *Rnd2* dans les neurones granulaires générés en période postnatale.

A. Protocole expérimental décrivant l'injection du mélange de rétrovirus exprimant la RFP et la GFP/Cre au sein de souris *Rnd2^{flox/flox}* à P0. **B.** Reconstruction de la morphologie des neurones postnatals témoins (exprimant seulement la RFP) et délétés pour *Rnd2* (RFP+ et GFP+) à 21 jours post-injection (jpi). **C.** La quantification de la longueur dendritique totale montre une tendance à l'augmentation pour les neurones délétés pour *Rnd2* comparés aux témoins. Moyennes $\pm$ s.e.m.; paired Student's t-test ($t_3 = 2,98$, $p = 0,06$) ($n = 4$ souris). **D.** Une augmentation significative du nombre de nœuds est observée quand *Rnd2* est délété. Moyennes $\pm$ s.e.m.; paired Student's t-test ($t_3 = 4,49$, $p = 0,02$); * $p < 0,05$ ($n = 4$ souris). **E.** L'analyse de la surface du corps cellulaire ne révèle aucune différence entre les deux groupes.

Ici nous pouvons remarquer que la longueur dendritique totale des neurones délétés pour *Rnd2* n'est pas significativement différente de celle des neurones témoins, bien qu'il y ait une forte tendance à l'augmentation (Figure 21C). En revanche le nombre de nœuds est significativement augmenté après délétion de *Rnd2* chez les neurones du développement, un effet que nous avons également obtenu chez les néo-neurones (Figure 21D). Enfin l'analyse de la surface du corps cellulaire montre qu'il n'y a pas non plus de différence entre les neurones délétés pour *Rnd2* et les neurones témoins (Figure 21E).

Ces résultats indiquent donc que *Rnd2* n'a pas les mêmes fonctions lors de la neurogénèse hippocampique postnatale et adulte. Si la taille du corps cellulaire et leur position ne semble pas être régulées par *Rnd2* en période postnatale, le contrôle de *Rnd2* sur le développement dendritique semble être toutefois conservé entre les deux périodes de neurogénèse. Les contextes différents dans lesquels les nouveaux neurones se développent peuvent expliquer ces différences de régulation. *Rnd2* pourrait potentiellement être impliquée dans des mécanismes de régulation spécifiques à l'âge adulte, notamment les stimuli locaux provenant des niches

neurogéniques distinctes pourraient recruter Rnd2 de manière différente, de même que les stimuli provenant de l'environnement pourraient être perçus différemment à l'âge adulte comparé aux premières semaines de vie de l'animal. Une autre hypothèse est que le développement de nouveaux neurones dans ces deux contextes ne se fait pas au même rythme et que de nouvelles analyses sont nécessaires à des temps d'analyse supplémentaires. Il est également possible que les panels de partenaires de Rnd2 soient différents, ou absents lors du développement, impliquant donc des rôles différents.

Ainsi ces résultats mettent en évidence que la neurogénèse adulte et développementale dans le GD ne sont pas régulées et orchestrées de manière similaire. Afin de mieux comprendre les différences entre ces deux processus, nous avons donc en parallèle à cette étude sur Rnd2 cherché à mieux caractériser les différentes populations de NGs du DG, notamment d'un point de vue morphologique.

B. Analyse de la morphogenèse des neurones granulaires du gyrus denté, générés en période embryonnaire et postnatale

1. Présentation générale

Le GD est une structure cérébrale singulière puisque contrairement au reste du SNC qui se développe exclusivement lors de l'embryogenèse, le développement du GD se développe également après la naissance et de nouveaux NGs continuent d'être ajoutés au réseau du GD à l'âge adulte. Au sein de la CG à l'âge adulte, on retrouve donc des populations de NGs d'âges variés, notamment les neurones générés au moment de la mise en place du GD lors de l'embryogenèse, les neurones nés en période postnatale lors des premiers jours de vie de l'animal, et les neurones ajoutés lors de la vie adulte. Des travaux visant à évaluer la contribution de chacune de ces populations, ont pu montrer que la majorité des NGs de la CG adulte est générée lors des périodes embryonnaire et postnatale (Muramatsu et al., 2007; Mathews et al., 2010). Malgré cela, les NGs développementaux restent très peu caractérisés par rapport aux neurones générés à l'âge adulte. Toutefois quelques données parcellaires montrent que les NGs embryonnaires constituent la partie externe de la CG, quand les neurones générés après la naissance sont trouvés plus proches du hile (Muramatsu et al., 2007; Mathews et al., 2010; Save et al., 2018). Les nouveaux neurones générés à l'âge adulte restent quant à eux majoritairement concentrés dans la partie interne de la CG. Des travaux ont pu montrer également que les neurones nés lors du développement ne sont pas recrutés durant les mêmes tâches d'apprentissage (Tronel et al., 2015) et ne supportent pas les mêmes fonctions que les neurones nés à l'âge adulte (Wei et al., 2011; Nakashiba et al., 2012). Toutefois malgré ces différences, les néo-neurones matures semblent posséder des caractéristiques électrophysiologiques similaires à celles des neurones générés lors du développement du GD (Laplagne et al., 2006, 2007) et il est généralement admis que ces populations de neurones sont morphologiquement indiscernables une fois matures (Llorens-Martín et al., 2016). Or aucune analyse détaillée de la morphologie des neurones développementaux n'avait été réalisée pour confirmer ce postulat. De ce fait, nous avons effectué une **analyse détaillée de la morphogenèse des NGs générés lors de l'embryogenèse et la période postnatale, ceci en vue de les comparer aux néo-neurones adultes.**

Les données morphologiques disponibles, avant notre analyse, concernant les NGs développementaux provenaient d'études utilisant des techniques de marquage cellulaire qui ne permettaient pas la datation précise de la naissance des cellules (marquage de Golgi, injection

de peroxydase de raifort par iontophorèse, marquage au Dil et injection d'AAV) (Green and Juraska, 1985; Claiborne et al., 1990; Jones et al., 2003; Beining et al., 2017) ou d'études utilisant des injections de rétrovirus, dont les analyses sur des temps courts avec peu de temps d'analyses ne permettaient pas une analyse détaillée de la morphogenèse des neurones du développement. Pour ce projet nous avons électroporé un plasmide exprimant la GFP, au sein du GD d'embryons à E14.5, ainsi que dans le GD de souris le jour de la naissance (P0) grâce à la technique d'électroporation *in vivo*. Les animaux ont ensuite été sacrifiés et la morphologie des NGs marqués a été analysée à de nombreux temps post-électroporation. Des injections rétrovirales ont également été effectuées dans le GD de souris en période juvénile (P21) et à l'âge adulte (12 semaines) de manière à pouvoir comparer la morphologie des NGs générés à ces périodes avec celles des neurones embryonnaires et postnataux.

Nous montrons que la morphologie des neurones nés à E14.5 à P0 est différente de celles des neurones nés en période juvénile ou adulte. En particulier les NGs embryonnaires sont distincts des autres populations en de nombreux points. Nous avons ainsi pu mettre en évidence plusieurs caractéristiques morphologiques propres à chaque population, permettant ainsi de les identifier. Les résultats de ces travaux de recherches ont fait l'objet d'une publication récemment publiée dans le journal *Cerebral Cortex* et sont présentés dans la partie suivante.

2. Article 2 : Dentate granule neurons generated during perinatal life display distinct morphological features compared with later-born neurons in the mouse hippocampus

ORIGINAL ARTICLE

Dentate Granule Neurons Generated During Perinatal Life Display Distinct Morphological Features Compared With Later-Born Neurons in the Mouse Hippocampus

Thomas Kerloch^{1,2}, Solène Clavreul^{1,2}, Adeline Goron^{1,2},
Djoher Nora Abrous^{1,2} and Emilie Pacary ^{1,2}

¹INSERM U1215, Neurocentre Magendie, F-33000 Bordeaux, France and ²Université de Bordeaux, F-33000 Bordeaux, France

Address correspondence to Emilie Pacary. Email: emilie.pacary@inserm.fr  orcid.org/0000-0002-7316-4546

Nora Abrous and Emilie Pacary contributed equally.

Abstract

In nonhuman mammals and in particular in rodents, most granule neurons of the dentate gyrus (DG) are generated during development and yet little is known about their properties compared with adult-born neurons. Although it is generally admitted that these populations are morphologically indistinguishable once mature, a detailed analysis of developmentally born neurons is lacking. Here, we used *in vivo* electroporation to label dentate granule cells (DGCs) generated in mouse embryos (E14.5) or in neonates (P0) and followed their morphological development up to 6 months after birth. By comparison with mature retrovirus-labeled DGCs born at weaning (P21) or young adult (P84) stages, we provide the evidence that perinatally born neurons, especially embryonically born cells, are morphologically distinct from later-born neurons and are thus easily distinguishable. In addition, our data indicate that semilunar and hilar GCs, 2 populations in ectopic location, are generated during the embryonic and the neonatal periods, respectively. Thus, our findings provide new insights into the development of the different populations of GCs in the DG and open new questions regarding their function in the brain.

Key words: dendrites, dentate gyrus, hippocampus, mouse, neurogenesis

Introduction

In most areas of the brain, neurons are born during embryogenesis. In contrast, the majority of granule cells (GCs) of the dentate gyrus (DG) in the hippocampus are born postnatally, even though the primary period of neurogenesis begins during late embryonic development (Schlessinger et al. 1975; Altman and Bayer 1990), and their generation continues throughout adulthood, albeit at low rates (Kuhn et al. 1996). While these sequential waves of neurogenesis are well described and accepted in rodents, the neurogenic process in the human hippocampus is not so clear and still the subject of intense debate (Arellano et al. 2018; Kempermann et al. 2018). Indeed recent works have shown that adult humans do not acquire new neurons in the

hippocampus (Cipriani et al. 2018; Sorrells et al. 2018) while others have found that human hippocampal neurogenesis persists throughout adulthood (Eriksson et al. 1998; Spalding et al. 2013; Boldrini et al. 2018).

In the mouse brain, the DG originates from the dentate neuroepithelium (DNE), also called primary matrix, a part of the ventricular zone of the medial pallium that becomes distinguishable around embryonic day 14.5 (E14.5) (Urban and Guillemot 2014). At late gestational stages, progenitor cells migrate out of the DNE towards the pial side of the medial cortex constituting a new migratory progenitor population called the secondary matrix. Neural progenitors then reach the hilus, where they accumulate and form another proliferative zone

called the tertiary matrix. GCs generated from precursors of all 3 matrices during DG development form the granule cell layer (GCL). By early postnatal stages, the tertiary matrix becomes the only source of dentate progenitors and GCs. Gradually, the proliferative zone becomes restricted to a region known as the subgranular zone, lying just beneath the GCL, and proliferation in this area contributes to the addition of new neurons to the DG throughout the adult life of most mammals (Nicola et al. 2015). The DG thus appears as a heterogeneous structure composed of different populations of granule neurons.

Although developmentally born GCs make the largest contribution to the adult DG in rodents, little is known about their properties compared with adult-born neurons. Some studies have nonetheless highlighted similarities and differences between these populations. Embryonically born dentate GCs (DGCs) contribute preferentially to the outer GCL whereas postnatally born DGCs remain closer to the hilus and adult-born cells are located mostly in the inner one-third of the GCL (Muramatsu et al. 2007; Mathews et al. 2010; Save et al. 2018). Regarding their survival, it was shown that dentate granule neurons born on postnatal day 6 (P6) do not undergo cell death during their immature stages, in contrast to adult-born neurons (Dayer et al. 2003), but rather undergo delayed cell death between 2 and 6 months of age (Cahill et al. 2017). At the behavioral level, neurons born during the developmental period and those born during adulthood are recruited during different learning tasks (Tronel et al. 2015) and do not seem to support the same functions (Wei et al. 2011; Nakashiba et al. 2012). Despite these differences, at the end of the maturation process, adult-born granule neurons exhibit electrophysiological properties similar to those of developmentally born GCs (Laplagne et al. 2006, 2007) and, at the morphological level, it is generally admitted that they are indistinguishable (Llorens-Martin et al. 2015): they project their dendrites throughout the molecular layer (ML), their cell bodies form the adjacent GCL and they extend, from the opposite pole of the soma, an axon through the hilus toward the CA3 region. However, an extensive and detailed analysis of the morphogenesis of developmentally born neurons is lacking to properly compare the different populations of GCs. Indeed, the morphological data on these cells have been obtained so far from studies using labeling methods that do not allow to birthdate the labeled cells (Golgi, iontophoretic injection of horseradish peroxidase, Dil labeling, AAV) (Green and Juraska 1985; Claiborne et al. 1990; Jones et al. 2003; Beining et al. 2017) or from studies using retroviral labeling of postnatally born neurons with short-term analysis and few time points (Zhao et al. 2006; Kim et al. 2012).

Here, to properly characterize the morphological development of embryonically and neonatally born DGCs, we used *in vivo* electroporation to target DGCs generated at E14.5 and P0, respectively, in the mouse brain. Importantly, we highlight for the first time major morphological differences with granule neurons born during juvenile or young adult stages and we identified different morphological parameters that can be used to predict the birthdate of DGCs. Interestingly, our data also suggest that semilunar and hilar ectopic GCs, 2 other categories of GCs located outside the GCL, are generated during the embryonic and the neonatal periods, respectively.

Materials and Methods

Animals

CD1 mice (Janvier, France) were housed, bred, and treated according to the European directive 2010/63/EU and French laws on animal experimentation.

In Utero Electroporation of the DG

In utero electroporation of the DG was performed at E14.5 as previously described (Navarro-Quiroga et al. 2007; Pacary et al. 2012). Briefly, timed-pregnant CD1 mice were injected before the surgery with the analgesic drug buprenorphine (Buprécare, Axience) and anesthetized with isoflurane in oxygen carrier (TEM SEGA, France). After incision of the ventral peritoneum, embryos were carefully lifted using ring forceps through the incision and placed on sterile drapes. DNA (pCAG-GFP) for *in utero* and postnatal electroporation was prepared in endotoxin-free conditions (Qiagen). Plasmid DNA solution (1 µg/µL) mixed with 0.05% Fast Green (Sigma) was injected through the uterine wall into one of the lateral ventricles using pulled borosilicate needles (Harvard Apparatus) and a Femtojet microinjector (Eppendorf). To target the DG, two 5 mm platinum electrodes (Tweezertrode 45-0489, BTX, Harvard Apparatus) were positioned onto the embryonic brains as previously described (Pacary et al. 2012) and 5 electrical pulses at 30 V were applied across the uterine wall at 1-s intervals (Electroporator BTX, ECM 830, Harvard Apparatus). The uterine horns were then replaced into the abdominal cavity and the abdomen wall and skin were sutured. Pregnant mice were placed in a recovery chamber at 37 °C until they woke up.

Postnatal Electroporation of the DG

Postnatal electroporation of the DG was performed at postnatal day 0 (P0) according to a previously published method (Ito et al. 2014). In brief, CD1 pups were anesthetized by hypothermia and 1 µL of DNA solution (pCAG-GFP 1 µg/µL mixed with 0.05% Fast Green) was injected through the skin and skull into the right lateral ventricle using pulled borosilicate needles and a Femtojet microinjector. To target the right lateral ventricle, a virtual line connecting the right eye with the lambda was used and the needle was injected slightly caudal of the midpoint of this line as previously described (Boutin et al. 2008). Injected pups were immediately electroporated with 5 mm platinum electrodes positioned onto the brains as described by Ito et al. (2014). Five pulses of 100 V and of 50 ms duration were given with a 950 ms interval. Electroporated animals were placed in a recovery chamber at 37 °C for several minutes and then returned to their mother.

Retrovirus Production

The murine Moloney leukemia virus-based retroviral vector CAG-GFP was a kind gift from Dr Fred Gage (Zhao et al. 2006). High titers of retroviruses were prepared with a human 293-derived retroviral packaging cell line (293GPG) (Ory et al. 1996) kindly provided by Dr Dieter Chichung Lie. Virus-containing supernatant was harvested 3 days after transfection with Lipofectamine 2000 (ThermoFisher). This supernatant was then cleared from cell debris by centrifugation at 3500 rpm for 15 min and filtered through a 0.45 µm filter (Millipore). Viruses were concentrated by 2 rounds of centrifugation (19 500 rpm for 2 h) and resuspended in PBS.

Stereotaxic Virus Injection Into the DG of Adult Mice

The retroviral solution was injected into the DG of 12-week-old male CD1 mice. Mice were anaesthetized by intraperitoneal injection of ketamine (120 mg/kg; Imalgene 1000, Merial)-xylazine (16 mg/kg; Rompun, Bayer HealthCare) mixture and eye ointment was applied to prevent eyes from over-drying. A cranial

subcutaneous injection of 0.1 μ L of lidocaine (20 mg/mL; Lurocaine, Vetoquinol) and a dorsal subcutaneous injection of 0.1 μ L of meloxicam (0.5 mg/mL; Metacam, Boehringer Ingelheim) were performed before settling the mouse into the stereotaxic frame. Betadine was applied, then the skin was cut and a pulled microcapillary glass tube (1–5 μ L, Sigma) was placed above bregma. Coordinates of the injection site from bregma were: anteroposterior: –2 mm, mediolateral: –1.8 mm, dorsoventral: –2.2 mm. A small hole was made on the skull using an electric drill, the microcapillary was loaded with the retroviral solution and introduced within the hole to reach the DG and stayed in place for 1 min. Then 1.5 μ L of retrovirus was injected at the rate of 0.5 μ L every 2 min and the microcapillary was left again in the same position for 2 min after the end of infusion before being removed. Then the skin was stitched with absorbable sutures and the mouse was placed in a recovery chamber (37 °C) until it woke up.

Stereotaxic Virus Injection Into the DG of P21 Mice

Retrovirus injections into the DG of P21 mice were performed according a similar experimental procedure. Mice were anaesthetized with a mixture of ketamine (60 mg/kg)–xylazine (1.4 mg/kg), 0.05 μ L of lidocaine and meloxicam were injected subcutaneously. The coordinates were individually adapted by measuring the Bregma-Lambda distance of each mouse, divided by 4.21 mm (the distance from bregma to lambda cranial landmarks commonly described in mouse brain atlas) (Paxinos and Franklin 2012). The 3 coordinates were then multiplied by this ratio and 1 μ L of retroviral solution was injected into the DG following the same procedure as for adult mice.

Tissue Processing and GFP Immunostaining

At the desired time point after electroporation/viral injection, pups or adult mice were deeply anesthetized with an intraperitoneal injection of pentobarbital (100 mg/kg; Pentobarbital sodium, Ceva) and transcardially perfused with phosphate buffer saline (PBS, 0.1 M, pH=7.3) and then with 4% paraformaldehyde in PBS. Brains were dissected out of the skull, postfixed for a week in 4% PFA and cut with a vibratome (100 μ m) (Leica).

After washing in PBS, sections were treated with methanol and 0.5% H₂O₂ for 30 min. Sections were washed again in PBS before incubation with a blocking solution containing 3% normal goat serum (NGS) and 0.3% Triton X100 in PBS for 45 min at room temperature. They were then incubated overnight at 4 °C with a rabbit anti-GFP antibody (1/15 000, Millipore, AB3080P) diluted in the blocking buffer. The following day, sections were incubated with a biotin-labeled goat antirabbit secondary antibody (1/200, Dako) diluted in PBS—0.3% Triton X100—1% NGS. Immunoreactivities were visualized by the biotin–streptavidin technique (ABC kit; Dako) with 3,3'-diaminobenzidine (DAB) as chromogen.

Neuronal Structure Tracing and Quantification

Only DGCs in the suprapyramidal blade and in the septal hippocampus were used for morphometrical analysis. Indeed, since very few cells were electroporated in the temporal DG, we only focused on the septal part. Moreover, since the morphology of dentate neurons in the suprapyramidal and infrapyramidal blades are known to be different (Rahimi and Claiborne 2007), we only analyzed cells in one blade to avoid morphological variations due to their blade localization. Although the

repartition of electroporated cells in the DG between the infrapyramidal and suprapyramidal blades was equivalent, we chose the suprapyramidal blade because electroporated cells in the infrapyramidal blade were mainly located in the most septal part of the DG, that is, in coronal sections where only the infrapyramidal blade is visible. Moreover, we noticed that the dendrites of electroporated cells in the infrapyramidal blade were more often cut.

Cells with primary dendrites cut off in the proximal region (inner third of the ML and below) were excluded as well as cells with more than 3 dendrites cut off in the ML. Dendrites and cell body of GFP positive dentate neurons were traced using a $\times 100$ objective and a semiautomatic neuron tracing system (Neuron Tracing from NeuroLucida software; MicroBrightField). Measurements of dendrite and node numbers, dendritic length, cell body area, trunk length, relative position in the GCL were performed with NeuroLucida software as well as Sholl and Convex Hull analyses. Measurements of branching angle, path distance and transverse spread as well as the ratio of nuclear length to width were done with Image J. Primary dendrites are the dendrites emerging from the soma. The dendritic length is the sum of the length of all dendritic branches. The trunk length corresponds to the length of the primary dendrite. The path distance is defined as the distance from the center of the soma to the most distal dendritic tip (Fig. 4H) and the transverse spread is defined as the maximum distance between the most lateral dendritic segments (Fig. S4A) both in the xy plane. The angle between the 2 most lateral branches (branching angle) was measured from the center of the cell body (Fig. 4I) or from the distal tip of the primary dendrite (see Fig. S4B). Branch order was studied using the centrifugal method, which starts ordering the dendritic branches from the root, that is, at the soma. The centrifugal branch ordering method assigns a lowest order of 1 to the segments connected to the soma and increases the order by 1 at each branch point. This process continues towards the periphery until all branches are assigned a value. Low-order dendrites correspond to branches with an order of 1–3 and high-order dendrites correspond to branches with an order equal or superior to 4. Sholl analysis was used to analyze neuronal dendritic complexity. This analysis was performed on 2D traces by counting the number of dendrite intersections with concentric circles, which are drawn at regular intervals (10 μ m) around the center of the cell body. Then, to obtain a Sholl profile, the number of dendritic intersections was plotted as a function of radial distance from the cell soma. The Convex Hull 3D analysis measures the size of the dendritic field by generating a convex polygon by connecting the tips of the distal dendrites.

Image Acquisition With Slide Scanner

Z-stack images of 100 μ m sections containing electroporated cells were acquired using a slide scanner Nanozoomer 2.0HT (Hamamatsu Photonics, France), a TDI-3CCD camera and were processed with the NDP.Toolkit software (Hamamatsu Photonics, France).

Statistical Analysis

Statistical analyses were performed using the GraphPad Prism software. No statistical methods were used to predetermine sample sizes, but our sample sizes (Tables S1 and S2) are similar to those generally employed in the field. Results are presented as mean $\pm$ S.E.M (standard error of the mean). The statistical test used for each experiment is described in the

corresponding figure legend and detailed statistic results are shown in Table S3.

Results

Efficient Labeling of Perinatally Born DGCs With In Vivo Electroporation

To label embryonically and neonatally born DGCs, we used the technique of in vivo electroporation. This technique consists of an injection of plasmid DNA solution into one of the lateral ventricles of embryos/pups followed by an application of an electric current with oriented electrodes to transfect specific progenitors along the ventricular wall (Pacary and Guillemot 2014). In vivo electroporation is now an established method that has been shown to be innocuous and efficient for long-term expression (Navarro-Quiroga et al. 2007; Boutin et al. 2008). Here, we electroporated in utero or early postnatally a plasmid expressing GFP under the CAG promoter into the dentate primordium at E14.5 or P0, respectively, following published protocols (Navarro-Quiroga et al. 2007; Pacary et al. 2012; Ito et al. 2014). When electroporation was performed at E14.5, most of the electroporated cells in the DG were GCs located in the upper part of the GCL (Fig. 1A), but there were also some cells in the inner ML, known as semilunar GCs (Fig. 1B,D) (Williams et al. 2007; Larimer and Strowbridge 2010). These cells are a subtype of GCs with a soma in the inner ML, axon collaterals in the ML and a large dendritic arbor shaped like a half-moon, hence the name semilunar GCs (Williams et al. 2007). These cells represented $12.4 \pm 1.0\%$ of total electroporated cells in the DG (Fig. S1A). Importantly, at E14.5, progenitor cells in the DNE generate the first DGCs and they are adjacent to progenitors in the Ammonic neuroepithelium that give rise to CA pyramidal neurons (Urban and Guillemot 2014). Since these domains are very close, the electroporation at E14.5 targets neuronal progenitors of both domains explaining why, in addition to GCs in the DG, pyramidal neurons are also labeled in CA1, CA2, and CA3 (Fig. S1C), as already described by others (Nakahira and Yuasa 2005; Navarro-Quiroga et al. 2007).

After early postnatal electroporation, labeled cells in the DG were mostly GCs in the GCL (Fig. 1A,D). Cells with astroglial morphology were also observed at the area beside the CA regions as previously described (Ito et al. 2014) (Fig. S1D). These cells originate from the electroporated Ammonic primordium which does not generate neurons anymore at P0 but instead astrocytes (Subramanian et al. 2011). Of note, some ectopic GCs were also found in the hilus (Fig. 1C,D), where they develop several primary dendrites in random directions, features similar to that previously reported (Pierce et al. 2011). These cells represented only $4.3 \pm 0.7\%$ of total electroporated cells in the DG (Fig. S1B). Since these cells as well as the semilunar GCs were a minority, they were not further studied.

Development of the Somatodendritic Compartment of Embryonically and Neonatally Born DGCs

To study the morphogenesis of DGCs born at E14.5 or P0, electroporated mice were sacrificed at different time points after electroporation and we reconstructed the somatodendritic structure of labeled cells from 100 μm fixed sections using the Neurolucida software (Figs 2 and S2). Embryonically born granule neurons located in the GCL exhibit as soon as one week after their birth at least 2 primary dendrites, a number that remains constant with time (Figs 2A and 3A; $F_{8,35} = 0.42$, $P =$

0.90). During the first 2 weeks, dendrites undergo rapid growth, then a phase of moderate growth (between 12 and 33 days postelectroporation [dpe]) and finally reach a plateau with only small growth increments until the last time point examined at 6 months postelectroporation (Figs 2A and 3B; $F_{8,35} = 43.36$, $P < 0.0001$). In addition, the number of dendritic nodes peaks by 12 dpe and this increase is followed by a significant reduction in branching (Fig. 3C; $F_{8,35} = 3.84$, $P = 0.0025$), indicating that branch overgrowth with subsequent pruning occurs in these dentate neurons. Finally, our characterization revealed unexpectedly an initial phase of cell body growth followed by a phase of shrinkage (Fig. 3D; $F_{8,35} = 6.25$, $P < 0.0001$).

DGCs born in P0 mice exhibit generally a single primary dendrite (Figs 2B and 3E; $F_{7,32} = 0.63$, $P = 0.73$). During the second week following birth, their dendritic tree dramatically develops (Figs 2B and 3F; $F_{7,32} = 74.86$, $P < 0.0001$). The number of dendritic nodes peaks by 14 dpe and then remains stable (Fig. 3G; $F_{7,32} = 16.78$, $P < 0.0001$) although the dendrites continue to grow at a moderate level. The cell body of neonatally born DGCs grows in the first 4 weeks (Fig. 3H; $F_{7,32} = 15.43$, $P < 0.0001$) and then shrinks but only transiently (56 dpe vs. 28 dpe, $P < 0.05$). Interestingly, many embryonically and neonatally born neurons exhibit basal dendrites at immature stage (at 7 dpe only) but this feature is also transient (data not shown).

In summary, the development of embryonically and neonatally born DGCs share some features (development of the dendritic tree) but they also differ since regressive events (dendritic pruning, perikarion shrinkage) seem to only concern the earliest born population. Finally, one of the most striking differences between these 2 populations is the number of primary dendrites.

Morphological Comparison of Mature Granule Neurons Born at Different Ontogenetic Stages

We then investigated whether perinatally born DGCs, once they are mature, are indistinguishable from mature DGCs born at weaning or young adult stage. To this end, we compared the morphology of 12-week-old granule neurons generated at E14.5 or at P0 with that of mature dentate neurons of the same age but born at P21 or P84 and labeled with retroviruses expressing GFP (Figs 4A and S3). We first focused on dendrites (Fig. 4B–L) and found that embryonically born DGCs show several distinct dendritic characteristics compared with the other 3 populations (see Materials and Methods for precisions on the dendritic parameters). Indeed, this category of DGCs have more primary dendrites (Fig. 4B), a shorter total dendritic length (Fig. 4C), more and longer low-order dendrites (Fig. 4D,E), inversely fewer and shorter high-order dendrites (Fig. 4F,G), a dendritic tree with a shorter path distance (Fig. 4H) and their branching angle is wider when measured from the middle of the cell body (Fig. 4I). Moreover, Sholl analysis revealed that their dendritic arbor is less complex in the distal part and inversely somewhat more complex in the proximal part (Fig. 4J). To note, the transverse spread of the dendritic tree tends to be larger for embryonic DGCs compared with DGCs born at P21 or P84 (Fig. S4A).

DGCs generated at P0 are also distinguishable from other dentate populations by several traits: they exhibit a longer total dendritic length (Fig. 4C), more nodes (Fig. 4K), and a shorter trunk (Fig. 4L). Their high-order dendrites are also longer compared with DGCs born at E14.5 or P84 (Fig. 4G) and the branching angle measured from the distal tip of the primary dendrite is wider compared with adult-born neurons (Fig. S4B). Interestingly, Sholl distribution indicates that these GCs have

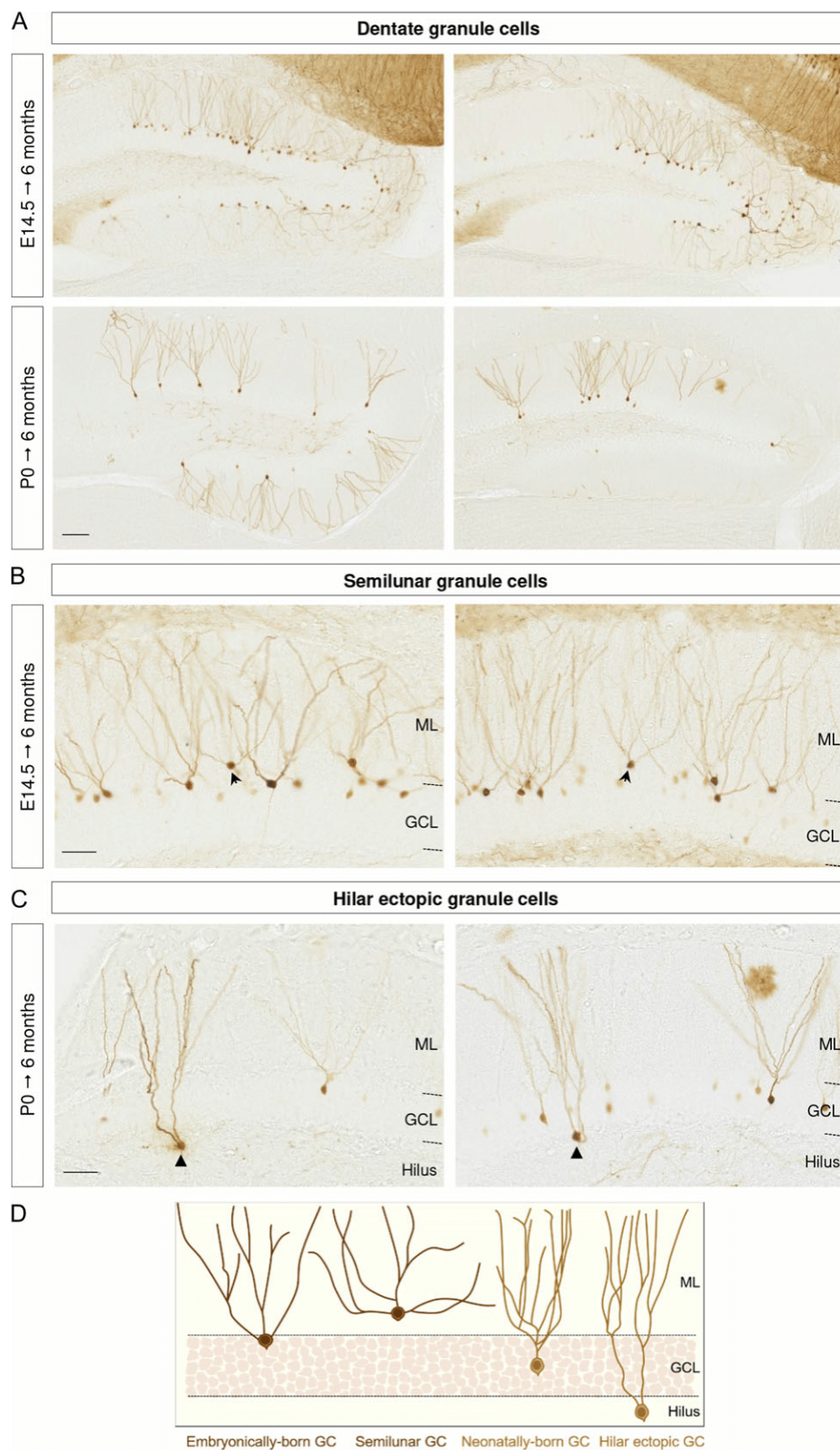


Figure 1. Pictures of embryonically and neonatally born GCs in the adult mouse hippocampus. (A) Illustration of electropored cells (GFP⁺ cells) in the granule cell layer (GCL), 6 months after in vivo electroporation of the hippocampus at embryonic (E14.5) or neonatal stage (P0). (B) Semilunar GCs (black arrows) in the molecular layer (ML) after embryonic electroporation. (C) Ectopic GCs (black arrowheads) in the hilus after early postnatal electroporation. (D) Representation of the different GCs labeled by electroporation at E14.5 (depicted in dark brown) or P0 (depicted in light brown). Scale bars represent 50 μ m (B, C) and 100 μ m (A).

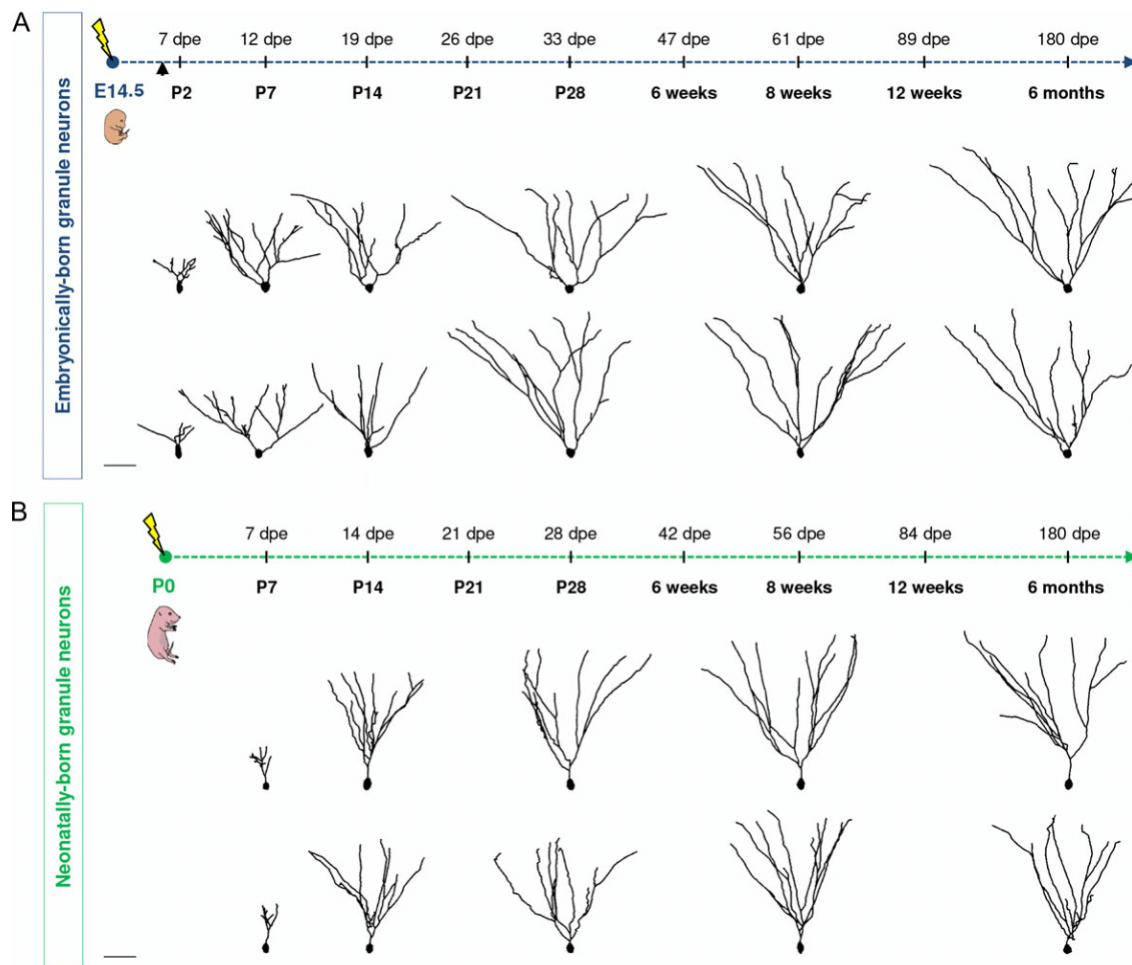


Figure 2. Illustration of the morphological development of embryonically and neonatally born DGCs. Experimental design used to study the development of granule neurons born (A) at E14.5 or (B) at P0 and representative 2D-projection tracings of granule neurons at different time points after electroporation. Birth (=P0) occurs at E19.5 and is indicated with a black arrow in (A). dpe, Days postelectroporation. Scale bars represent 50 μ m (A, B).

more nodes only in the proximal part of the dendritic tree (Fig. 4J). In contrast to perinatally born neurons, DGCs generated at the time of weaning (P21) are identical to adult-born neurons (born at P84) at the dendritic level. The only slight difference between these 2 populations is the length of the trunk although not significant (Fig. 4L). This length increases when neurons are generated later but this parameter is highly variable within the same population and thus not predictable of the birthdate of granule neurons (Figs 4L and S4C). We also analyzed the total dendritic field size using a 3D Convex Hull analysis but we did not find any major differences between the 4 populations of mature granule neurons (Fig. S4D,E). Concerning the cell body, the area is similar between the different categories of mature GCs but the ratio of nuclear length to width is significantly smaller in embryonically born neurons indicating a rounder cell body in these neurons (Fig. 3M,N). Mature granule neurons born at different ontogenetic stages are thus structurally distinct.

Finally, in addition to these morphological characteristics, we found that mature DGCs have a defined relative position in the GCL according to their birthdate. This relative position was examined as already described (Han et al. 2016): the inner border of the GCL was defined as the start line for cell migration and the perpendicular distance from this border to the center

of each cell body was measured and normalized by the thickness of the GCL (Fig. 4O). The embryonically born DGCs are located as expected in the upper part of the GCL whereas granule neurons generated at P0 are positioned in the middle of the layer and P21 and P84-born neurons in the inner GCL (Fig. 4O). Taken together the aforementioned results provide the evidence that DGCs generated during embryogenesis or neonatal life display unique features regarding their morphology and position compared with DGCs born during the juvenile period or adulthood (Fig. 5).

Discussion

Morphogenesis of DGCs is Different According to Their Birthdate

Most DGCs are generated during the developmental period and yet little is known about their properties compared with later-born neurons. In particular, the morphogenesis of adult-born DGCs has been described in details in mice (Zhao et al. 2006; Sun et al. 2013; Gonçalves et al. 2016) but a similar characterization is missing for developmentally born DGCs. Here, to fill this gap, we labeled DGCs born in mouse embryos (E14.5) or in neonates (P0) using in vivo electroporation and analyzed their

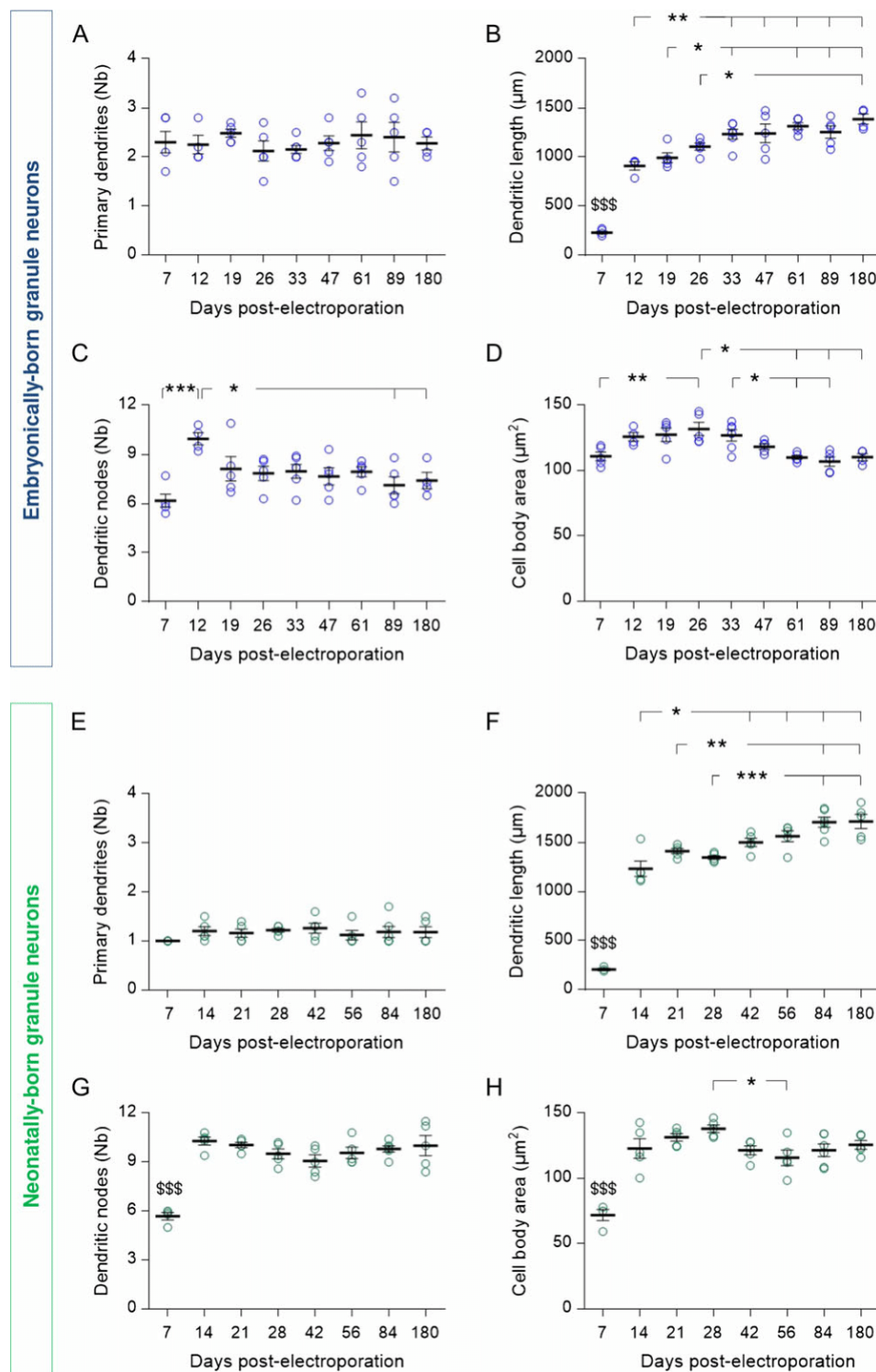


Figure 3. Quantification of the morphological development of embryonically and neonatally born DGCs. (A–H) Quantification of the number (Nb) of primary apical dendrites, the total dendritic length, the number of nodes and the cell body area at different stages after electroporation (A–D) at E14.5 or (E–H) at P0. Data are presented as mean $\pm$ S.E.M. from 4 to 6 animals obtained from at least 3 litters (3–8 cells were traced per animal, 17–39 cells were traced in total per time point). One way ANOVA followed by a Tukey post hoc test; \$\$\$ $P < 0.001$ compared with all other time points, * P value at least < 0.05 compared with the indicated time points, **at least $P < 0.01$, ***at least $P < 0.001$. For statistical analyses, see Tables S1 and S3.

morphological development up to 6 months after birth. Importantly, *in vivo* electroporation is now widely used for studying brain development (Vreugdenhil et al. 2007; Pacary and Guillemot 2016; Huang and Carcagno 2018) and does not

induce, in our hands and others (Navarro-Quiroga et al. 2007; Boutin et al. 2008), any obvious consequences on brain formation and on the behavior of electroporated pups. In addition, the morphology of DGCs labeled by electroporation resembled

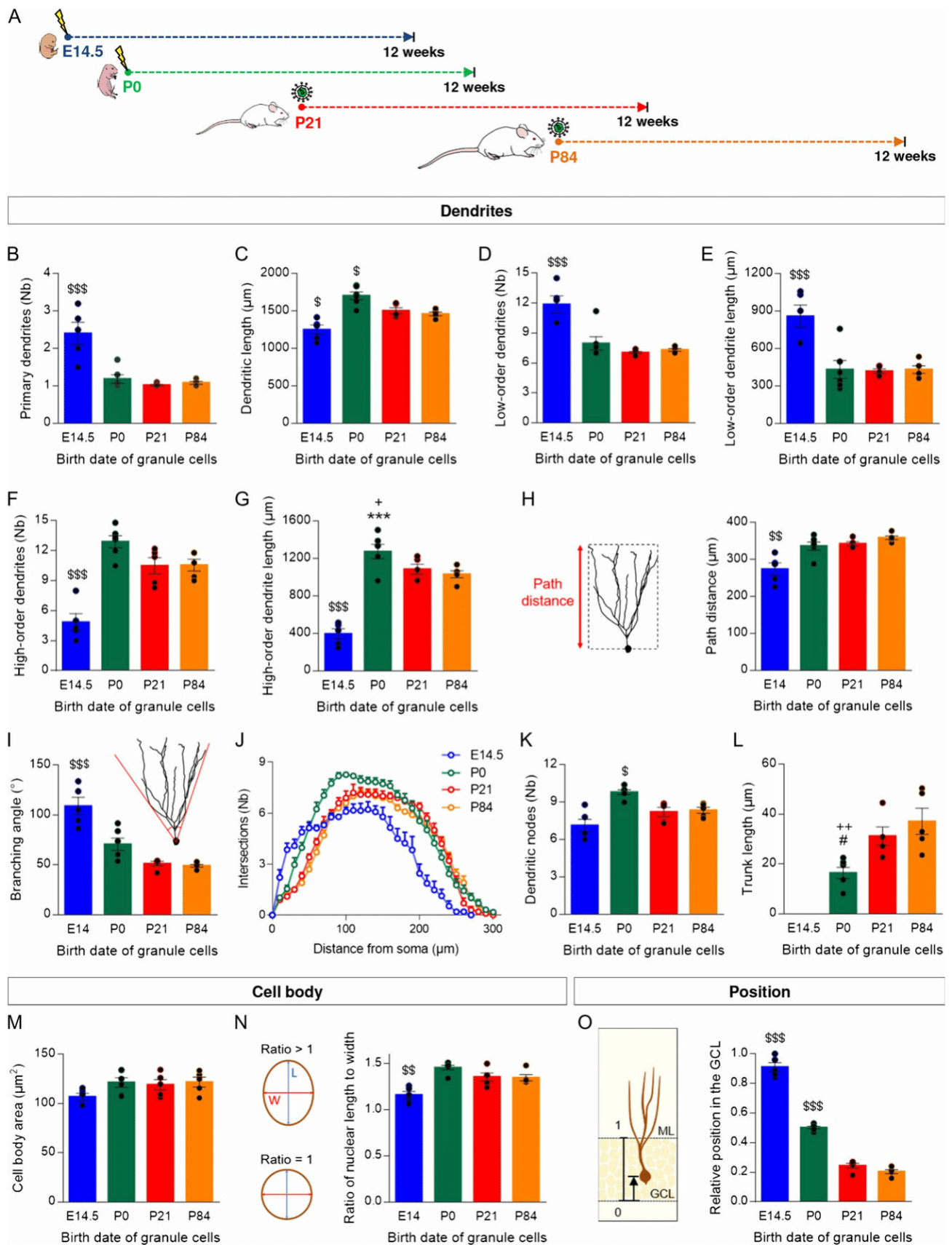


Figure 4. Morphological comparison of mature granule neurons born at different ontogenetic stages. (A) Schematic diagram of the experimental design. (B–L) Comparison of the dendritic arbors, (M, N) the cell bodies, and (O) the relative positions in the granule cell layer (GCL) of mature granule neurons (12-week old) born

those labeled by other techniques such as Dil labeling or Golgi (Claiborne et al. 1990; Jones et al. 2003). With this technique, we found that the dendritic development of perinatally born neurons follows a sequence similar to that of adult-born neurons, that is, a rapid phase of dendritic outgrowth followed by minimal growth (Zhao et al. 2006; Sun et al. 2013). However, it should be noticed that this dendritic development is somewhat faster in perinatally born DGCs compared with adult-born neurons, as previously reported (Zhao et al. 2006; Kim et al. 2012). Furthermore, in contrast to the other 2 populations with a single primary process, embryonically born DGCs develop at least 2 primary dendrites. Interestingly, we observed dendritic pruning in embryonically born neurons, like described in adult-born neurons (Goncalves et al. 2016) but this process was not significant in neonatally born neurons. Of note, basal dendrites were present in immature perinatally born DGCs like in adult-born neurons (Ribak et al. 2004). Finally, the cell body of embryonic DGCs grows and then shrinks, which might reflect the rates of protein synthesis required for dendrite outgrowth. Indeed the cell body of embryonic DGCs grows during the active phase of dendrite formation, a phase that requires intense protein synthesis, and then shrinks when dendrites reach a plateau. This phenomenon was only transient in neonatally born neurons highlighting differences between the 2 populations. The morphogenesis of each population of DGCs is thus unique in the mouse hippocampus. In humans, although the generation of new neurons in the adult hippocampus is still highly controversial, it is accepted that new neurons are born in the DG during the first years of life (Cipriani et al. 2018; Sorrells et al. 2018). Thus, it would be interesting to determine whether DGCs born during fetal or postnatal life in the human brain also display distinct morphological characteristics.

Mature DGCs Born During Perinatal Life are Morphologically Distinct From Adult-Born DGCs

Once mature, adult-born DGCs exhibit only one primary apical dendrite emerging from the soma and vertically oriented toward the ML. This dendrite is poorly branched until it reaches the ML (Zhao et al. 2006). In this study, we provide the evidence that mature embryonically and neonatally born DGCs are morphologically distinct from these mature adult-born DGCs. These data are against the commonly accepted view according to which “adult-born DGCs are indistinguishable from developmentally generated DGCs after maturation.” How to explain such discrepancy? Previous assumption is mainly based on the overall appearance of developmentally born neurons but not on a detailed characterization (Laplagne et al. 2006). Moreover, in most previous studies, retroviruses were used to label this population and they were injected into the DG during early postnatal stages (Zhao et al. 2006; Kim et al. 2012). Thus, DGCs generated during embryogenesis, which constitute the most distinct population at the morphological level, were not taken into consideration. The strategy used to label developmentally born neurons might be also part of the explanation. In this study, we chose to use *in vivo* electroporation to label embryonic and neonatal GCs because this strategy allows to label a homogeneous population of cells in contrast to retroviruses. Indeed, retroviruses integrate into the genome of dividing cells

and are transmitted to all of the progeny of these cells. Thus, at later stages, after several round of divisions, retrovirus-labeled cells are heterogeneous because of different ages and distributed throughout the GCL (Mathews et al. 2010). Consequently, DGCs born at early postnatal stages might be diluted by later-born neurons potentially more similar morphologically to adult-born neurons. *In vivo* electroporation also targets cells preferentially in M-phase (Pilaz et al. 2009) but in that case, the nonintegrating plasmid is lost in successive cell divisions and the fluorescence is unequally inherited between daughter cells. Consequently, the episomal construct persists only in cells generated after a reduced number of divisions, which thus allow to label a homogeneous cell population of similar age and to birthdate the cells more precisely. Although embryonically and neonatally born DGCs were labeled using *in vivo* electroporation, we labeled adult-born neurons with retroviruses. Indeed, *in vivo* electroporation of the adult brain, and especially of cells in the adult neurogenic niches has been described, but the transfection rate remains very low (Barnabe-Heider et al. 2008). Moreover, neural stem and progenitor cells in the adult hippocampus divide only for a few rounds before they mature into neurons (Pilz et al. 2018). Therefore, the population labeled after injection of retrovirus in the adult hippocampus is homogeneous and comparable to the perinatally born neurons labeled via electroporation.

Although adult- and developmentally born neurons have been considered for years to be identical at the morphological level, old and recent studies suggested potential differences. For example, in 1985, it was reported that the dendritic morphology of DGCs varies with their position in the GCL (Green and Juraska 1985) and Claiborne et al. (1990) described that superficial neurons have a greater number of primary dendrites. More recently, Beining et al. (2017) compared the morphology of AAV-labeled GCs that had a soma in the middle of the GCL, so potential neonatally born neurons, with that of retrovirus-labeled adult-born GCs and found subtle differences between the 2 populations (Beining et al. 2017). However, in these studies the precise birthdate of labeled neurons was unknown.

Interestingly, besides DGCs located in the GCL, we also observed semilunar GCs and ectopic hilar GCs after *in vivo* electroporation. There have been few studies on these 2 subpopulations and very little is known in particular about their origin and birth. Semilunar DGCs represent only a very small minority of DG glutamatergic neurons, characterized by a particular dendritic morphology and localization of their soma in the ML (Williams et al. 2007), but they have recently been identified as a major component of information processing across DG circuit (Larimer and Strowbridge 2010). Our data suggest that these cells are generated during embryogenesis around E14.5 from progenitors of the primary matrix, which is in accordance with recent data showing that their peak of neurogenesis is around E14.5 (Save et al. 2018). However, whether these cells originate from the same progenitors as the main type of GCs or from a distinct population remains an unanswered question. Hilar ectopic GCs are also rare, but their number increases dramatically after severe seizures, and their functional implications in the normal brain have not been elucidated (Scharfman et al. 2007). In our study, these cells were only detected when the DG

at E14.5, P0, P21, or P84. Low-order dendrites (1–3); high-order dendrites (≥ 4); ML, molecular layer; L, length; W, width. Data are presented as mean $\pm$ S.E.M. from 5 to 6 animals (3–8 cells were traced per animal, 17–39 cells were traced in total per time point). One way ANOVA followed by a Tukey post hoc test; [§]statistical significance compared with the other 3 populations; [§]at least $P < 0.05$, ^{§§}at least $P < 0.01$, ^{§§§}at least $P < 0.001$; ^{***} $P < 0.001$ compared with GCs born at E14.5; [†] $P < 0.05$ compared with GCs born at P21; ^{††} $P < 0.05$ and ^{†††} $P < 0.01$ compared with GCs born at P84. For statistical analyses, see Tables S2 and S3.

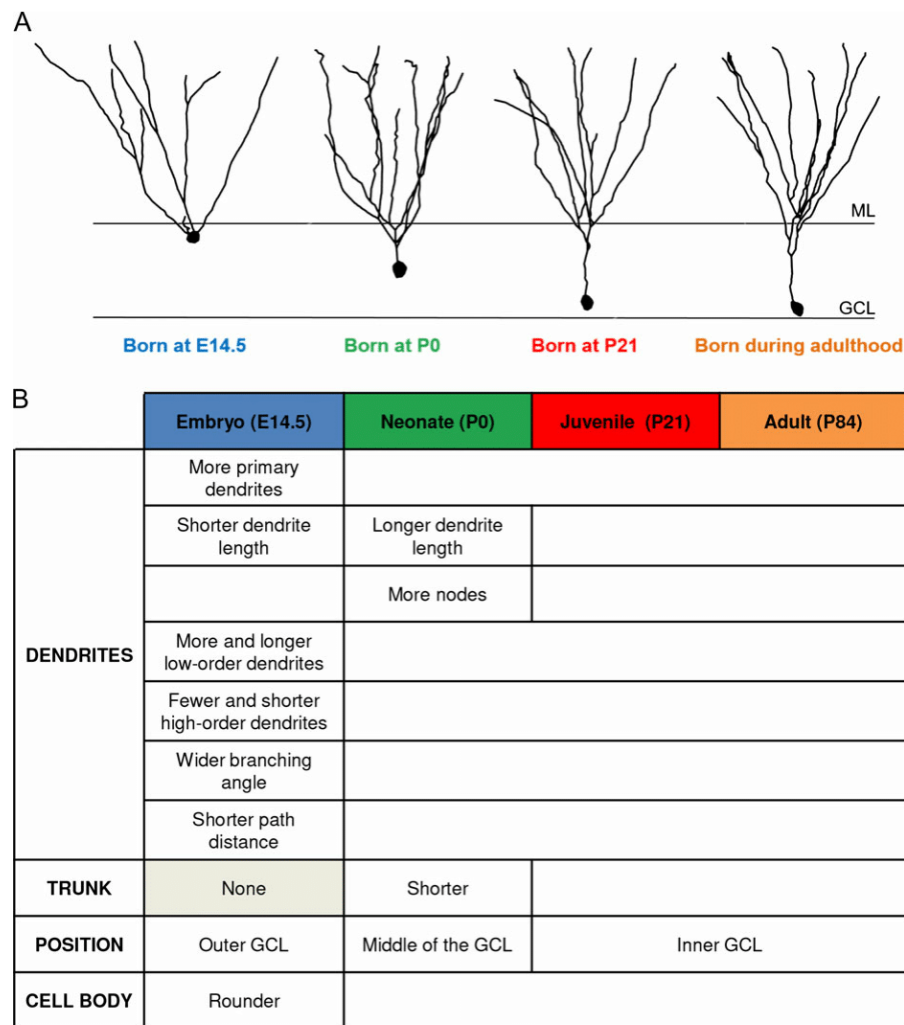


Figure 5. Summary of the morphological and position differences between mature granule neurons born at embryonic, neonatal, juvenile or adult stages. (A) Representative morphology of mature granule neurons (12-week old) born at E14.5, P0, P21, or P84. (B) Table summarizing the main differences between mature granule neurons born at different ontogenetic stages.

was electroporated at P0. Again it would be interesting in future experiments to determine the exact source of these cells and clarify whether they originate or not from the same progenitor populations as neonatally born GCs.

Distinct Dendritic Morphologies and Position may Underlie Different Inputs and Functions

Dendrite morphology is a hallmark of the neuron and has important functional implications in determining what signals a neuron receives and how these signals are integrated. Indeed, the overall extent and orientation of dendrites determines the amount and specificity of inputs a neuron receives and, consequently, appears to reflect the complexity of the task that it must perform (Lefebvre et al. 2015). The relative position of DGCs in the GCL may also have an impact on their connectivity and subsequently on their function. This hypothesis is based on the fact that the connections of DGCs in the septal DG are different from those of DGCs in the temporal DG and this differential connectivity between the septal and temporal DG has been linked to different functions, memory and emotion, respectively (Moser and Moser 1998; Wu et al. 2015). In the

same vein, it has been suggested that DGCs in the suprapyramidal blade may have more afferent connections since they have longer total dendritic lengths (Rahimi and Claiborne 2007) compared with DGCs in the infrapyramidal blade, but also differential functions since the 2 blades exhibit differential reactivity to environmental challenges (Chawla et al. 2005; Snyder et al. 2009; Peret et al. 2018).

Besides providing neurons with adequate connectivity, dendritic trees are not just simple passive signal conductors but are also involved in sophisticated signal processing and neural computation (London and Hausser 2005). Studies have suggested that dendritic morphology alone is able to influence the functional properties of a neuron such as its firing pattern (Mainen and Sejnowski 1996). For example, using computational models, van Elburg and van Ooyen (2010) showed in pyramidal neurons that not only the total length of the apical dendrite but also the topological structure of its branching pattern markedly influences interburst and intraburst spike intervals and even determines whether or not a cell exhibits burst firing. Furthermore, the basic geometrical properties of dendrites also influence molecular signal propagation to the nucleus (Li et al. 2015). Concerning DGCs, data are scarce.

Studies suggested that differences in the morphology of DGCs and pyramidal neurons may strongly influence dendritic voltage transfer (Jaffe and Carnevale 1999; Schmidt-Hieber et al. 2007). For example, computational analysis shows that signal propagation from soma into dendrites is more efficient in DGCs compared with CA1 pyramidal cells (Schmidt-Hieber et al. 2007). In addition, it has been shown that the presence of a trunk in DGCs had little or no effect on voltage transfer from dendritic synapses to the soma but attenuated voltage signal spreading from the soma out to the dendrites (Carnevale et al. 1997). Interestingly, a recent study also indicates that the dendrite architecture of DGCs can be predictive of their activity during behavior (Diamantaki et al. 2016). Thus, in view of these data and because they exhibit distinct dendritic arbors, mature DGCs born at embryonic, neonatal or adult stages might contribute differently to hippocampal function. This hypothesis is reinforced by recent data showing that the electrophysiological properties of embryonically born DGCs differ from that of randomly patched DGCs (Save et al. 2018). Moreover, it has been shown that developmentally and adult-born DGCs have differential ability to reshape in response to a seizure or learning experience (Kron et al. 2010; Tronel et al. 2010; Lemaire et al. 2012), are activated in different memory processes when they are mature (Tronel et al. 2015) and are required for different functions (Wei et al. 2011; Nakashiba et al. 2012). Nevertheless whether these different DGC populations have different functional properties is still a matter of debate (Laplagne et al. 2006, 2007). Thus, further detailed and extensive analyses of the inputs and functional properties of the different populations of GCs are needed and in vivo electroporation might be a relevant approach to properly address this controversial question.

Altogether our data provide important new insights into the development of the different GC populations in the DG and open new questions regarding their contribution to hippocampal function.

Supplementary Material

Supplementary material is available at *Cerebral Cortex* online.

Authors' Contributions

E.P., T.K., and D.N.A. designed experiments. E.P. and S.C. performed in utero electroporation, E.P. and T.K. performed postnatal electroporation, T.K. injected retroviruses into the DG. A.G. prepared DNA and produced retroviruses. E.P. and T.K. analyzed the data. T.K., D.N.A., and E.P. wrote the article.

Funding

This work benefited from the support of the Biochemistry and Biophysics Facility of the Bordeaux Neurocampus funded by the LabEX BRAIN ANR-10-LABX-43 and the Animal Housing facility funded by INSERM and LabEX BRAIN ANR-10-LABX-43. Acquisitions with the slide scanner were done in the Bordeaux Imaging Center (BIC), a service unit of the CNRS-INSERM and Bordeaux University, member of the national infrastructure France BioImaging supported by the French National Research Agency (ANR-10-INBS-04). Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) (to D.N.A. and E.P.), University of Bordeaux, Marie Curie Actions (Intra European Fellowship to D.N.A. for E.P.). A.G. was supported by a FRM (Fondation pour la Recherche Médicale) grant (ING20121226343 to D.N.A.). T.K. was supported by a MESR (Ministère de l'Enseignement Supérieur et

de la Recherche) fellowship and by a LabEx BRAIN (Bordeaux Region Aquitaine Initiative for Neuroscience) PhD extension grant. The equipment for in vivo electroporation was purchased thanks to a Federation of European Biochemical Societies (FEBS) Distinguished Young Investigator Award (to E.P.).

Notes

We thank Drs Fred Gage and Dieter Chichung Lie for providing the retroviral vector CAG-GFP and the 293GPG cell line, respectively. We gratefully acknowledge Cedric Dupuy for animal care. The help of BIC engineers, Sébastien Marais and Patrice Mascaldi, is acknowledged. **Conflict of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

References

- Altman J, Bayer SA. 1990. Migration and distribution of two populations of hippocampal granule cell precursors during the perinatal and postnatal periods. *J Comp Neurol.* 301: 365–381.
- Arellano JI, Harding B, Thomas JL. 2018. Adult human hippocampus: no new neurons in sight. *Cereb Cortex.* 28:2479–2481.
- Barnabe-Heider F, Meletis K, Eriksson M, Bergmann O, Sabelstrom H, Harvey MA, Mikkers H, Frisen J. 2008. Genetic manipulation of adult mouse neurogenic niches by in vivo electroporation. *Nat Methods.* 5:189–196.
- Beining M, Jungenitz T, Radic T, Deller T, Cuntz H, Jedlicka P, Schwarzacher SW. 2017. Adult-born dentate granule cells show a critical period of dendritic reorganization and are distinct from developmentally born cells. *Brain Struct Funct.* 222:1427–1446.
- Boldrini M, Fulmore CA, Tartt AN, Simeon LR, Pavlova I, Poposka V, Rosoklija GB, Stankov A, Arango V, Dwork AJ, et al. 2018. Human hippocampal neurogenesis persists throughout aging. *Cell Stem Cell.* 22:589–599 e585.
- Boutin C, Diestel S, Desoeuvre A, Tiveron MC, Cremer H. 2008. Efficient in vivo electroporation of the postnatal rodent forebrain. *PLoS One.* 3:e1883.
- Cahill SP, Yu RQ, Green D, Todorova EV, Snyder JS. 2017. Early survival and delayed death of developmentally-born dentate gyrus neurons. *Hippocampus.* 27:1155–1167.
- Carnevale NT, Tsai KY, Claiborne BJ, Brown TH. 1997. Comparative electrotonic analysis of three classes of rat hippocampal neurons. *J Neurophysiol.* 78:703–720.
- Chawla MK, Guzowski JF, Ramirez-Amaya V, Lipa P, Hoffman KL, Marriott LK, Worley PF, McNaughton BL, Barnes CA. 2005. Sparse, environmentally selective expression of Arc RNA in the upper blade of the rodent fascia dentata by brief spatial experience. *Hippocampus.* 15:579–586.
- Cipriani S, Ferrer I, Aronica E, Kovacs GG, Verney C, Nardelli J, Khung S, Delezoide AL, Milenkovic I, Rasika S, et al. 2018. Hippocampal radial glial subtypes and their neurogenic potential in human fetuses and healthy and Alzheimer's disease adults. *Cereb Cortex.* 28:2458–2478.
- Claiborne BJ, Amaral DG, Cowan WM. 1990. Quantitative, three-dimensional analysis of granule cell dendrites in the rat dentate gyrus. *J Comp Neurol.* 302:206–219.
- Dayer AG, Ford AA, Cleaver KM, Yassaee M, Cameron HA. 2003. Short-term and long-term survival of new neurons in the rat dentate gyrus. *J Comp Neurol.* 460:563–572.
- Diamantaki M, Frey M, Berens P, Preston-Ferrer P, Burgalossi A. 2016. Sparse activity of identified dentate granule cells during spatial exploration. *eLife.* 5:e20252.

- Eriksson PS, Perfilieva E, Bjork-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, Gage FH. 1998. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med*. 4:1313–1317.
- Goncalves JT, Bloyd CW, Shtrahman M, Johnston ST, Schafer ST, Parylak SL, Tran T, Chang T, Gage FH. 2016. In vivo imaging of dendritic pruning in dentate granule cells. *Nat Neurosci*. 19:788–791.
- Green EJ, Juraska JM. 1985. The dendritic morphology of hippocampal dentate granule cells varies with their position in the granule cell layer: a quantitative Golgi study. *Exp Brain Res*. 59:582–586.
- Han J, Kim HJ, Schafer ST, Paquola A, Clemenson GD, Toda T, Oh J, Pankonin AR, Lee BS, Johnston ST, et al. 2016. Functional implications of miR-19 in the migration of newborn neurons in the adult brain. *Neuron*. 91:79–89.
- Huang CC, Carcagno A. 2018. Electroporation of postimplantation mouse embryos in utero. *Cold Spring Harb Protoc*. 2018: pdb prot094060.
- Ito H, Morishita R, Iwamoto I, Nagata K. 2014. Establishment of an in vivo electroporation method into postnatal newborn neurons in the dentate gyrus. *Hippocampus*. 24:1449–1457.
- Jaffe DB, Carnevale NT. 1999. Passive normalization of synaptic integration influenced by dendritic architecture. *J Neurophysiol*. 82:3268–3285.
- Jones SP, Rahimi O, O'Boyle MP, Diaz DL, Claiborne BJ. 2003. Maturation of granule cell dendrites after mossy fiber arrival in hippocampal field CA3. *Hippocampus*. 13:413–427.
- Kempermann G, Gage FH, Aigner L, Song H, Curtis MA, Thuret S, Kuhn HG, Jessberger S, Frankland PW, Cameron HA, et al. 2018. Human adult neurogenesis: evidence and remaining questions. *Cell Stem Cell*. 23:25–30.
- Kim JY, Liu CY, Zhang F, Duan X, Wen Z, Song J, Feighery E, Lu B, Rujescu D St, Clair D, et al. 2012. Interplay between DISC1 and GABA signaling regulates neurogenesis in mice and risk for schizophrenia. *Cell*. 148:1051–1064.
- Kron MM, Zhang H, Parent JM. 2010. The developmental stage of dentate granule cells dictates their contribution to seizure-induced plasticity. *J Neurosci*. 30:2051–2059.
- Kuhn HG, Dickinson-Anson H, Gage FH. 1996. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J Neurosci*. 16:2027–2033.
- Laplagne DA, Esposito MS, Piatti VC, Morgenstern NA, Zhao C, van Praag H, Gage FH, Schinder AF. 2006. Functional convergence of neurons generated in the developing and adult hippocampus. *PLoS Biol*. 4:e409.
- Laplagne DA, Kamienkowski JE, Esposito MS, Piatti VC, Zhao C, Gage FH, Schinder AF. 2007. Similar GABAergic inputs in dentate granule cells born during embryonic and adult neurogenesis. *Eur J Neurosci*. 25:2973–2981.
- Larimer P, Strowbridge BW. 2010. Representing information in cell assemblies: persistent activity mediated by semilunar granule cells. *Nat Neurosci*. 13:213–222.
- Lefebvre JL, Sanes JR, Kay JN. 2015. Development of dendritic form and function. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 31:741–777.
- Lemaire V, Tronel S, Montaron MF, Fabre A, Dugast E, Abrous DN. 2012. Long-lasting plasticity of hippocampal adult-born neurons. *J Neurosci*. 32:3101–3108.
- Li L, Gervasi N, Girault JA. 2015. Dendritic geometry shapes neuronal cAMP signalling to the nucleus. *Nat Commun*. 6:6319.
- Llorens-Martin M, Rabano A, Avila J. 2015. The ever-changing morphology of hippocampal granule neurons in physiology and pathology. *Front Neurosci*. 9:526.
- London M, Hausser M. 2005. Dendritic computation. *Annu Rev Neurosci*. 28:503–532.
- Mainen ZF, Sejnowski TJ. 1996. Influence of dendritic structure on firing pattern in model neocortical neurons. *Nature*. 382:363–366.
- Mathews EA, Morgenstern NA, Piatti VC, Zhao C, Jessberger S, Schinder AF, Gage FH. 2010. A distinctive layering pattern of mouse dentate granule cells is generated by developmental and adult neurogenesis. *J Comp Neurol*. 518:4479–4490.
- Moser MB, Moser EI. 1998. Functional differentiation in the hippocampus. *Hippocampus*. 8:608–619.
- Muramatsu R, Ikegaya Y, Matsuki N, Koyama R. 2007. Neonatally born granule cells numerically dominate adult mice dentate gyrus. *Neuroscience*. 148:593–598.
- Nakahira E, Yuasa S. 2005. Neuronal generation, migration, and differentiation in the mouse hippocampal primordium as revealed by enhanced green fluorescent protein gene transfer by means of in utero electroporation. *J Comp Neurol*. 483:329–340.
- Nakashiba T, Cushman JD, Pelkey KA, Renaudineau S, Buhl DL, McHugh TJ, Rodriguez Barrera V, Chittajallu R, Iwamoto KS, McBain CJ, et al. 2012. Young dentate granule cells mediate pattern separation, whereas old granule cells facilitate pattern completion. *Cell*. 149:188–201.
- Navarro-Quiroga I, Chittajallu R, Gallo V, Haydar TF. 2007. Long-term, selective gene expression in developing and adult hippocampal pyramidal neurons using focal in utero electroporation. *J Neurosci*. 27:5007–5011.
- Nicola Z, Fabel K, Kempermann G. 2015. Development of the adult neurogenic niche in the hippocampus of mice. *Front Neuroanat*. 9:53.
- Ory DS, Neugeboren BA, Mulligan RC. 1996. A stable human-derived packaging cell line for production of high titer retrovirus/vesicular stomatitis virus G pseudotypes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 93:11400–11406.
- Pacary E, Guillemot F. 2014. In utero electroporation to study mouse brain development. *Methods Mol Biol*. 1082:285–293.
- Pacary E, Guillemot F. 2016. Cerebral cortex electroporation to study projection neuron migration. *Curr Protoc Neurosci*. 77:2.26.21–22.26.18.
- Pacary E, Haas MA, Wildner H, Azzarelli R, Bell DM, Abrous DN, Guillemot F. 2012. Visualization and genetic manipulation of dendrites and spines in the mouse cerebral cortex and hippocampus using in utero electroporation. *J Vis Exp*. 65:4163.
- Paxinos G, Franklin KBJ. 2012. The mouse brain in stereotaxic coordinates. 4th ed. San Diego, Calif: Elsevier Academic Press.
- Peret A, Pleau C, Pearlstein E, Scalfati T, Marti G, Michel F, Crepel V. 2018. Mature dentate granule cells show different intrinsic properties depending on the behavioural context of their activation. *bioRxiv*. 309906.
- Pierce JP, McCloskey DP, Scharfman HE. 2011. Morphometry of hilar ectopic granule cells in the rat. *J Comp Neurol*. 519:1196–1218.
- Pilaz LJ, Patti D, Marcy G, Ollier E, Pfister S, Douglas RJ, Betizeau M, Gautier E, Cortay V, Doerflinger N, et al. 2009. Forced G1-phase reduction alters mode of division, neuron number, and laminar phenotype in the cerebral cortex. *Proc Natl Acad Sci USA*. 106:21924–21929.
- Pilz GA, Bottes S, Betizeau M, Jorg DJ, Carta S, Simons BD, Helmchen F, Jessberger S. 2018. Live imaging of neurogenesis in the adult mouse hippocampus. *Science*. 359:658–662.
- Rahimi O, Claiborne BJ. 2007. Morphological development and maturation of granule neuron dendrites in the rat dentate gyrus. *Prog Brain Res*. 163:167–181.

- Ribak CE, Korn MJ, Shan Z, Obenaus A. 2004. Dendritic growth cones and recurrent basal dendrites are typical features of newly generated dentate granule cells in the adult hippocampus. *Brain Res.* 1000:195–199.
- Save L, Baude A, Cossart R. 2018. Temporal embryonic origin critically determines cellular physiology in the dentate gyrus. *Cereb Cortex.* doi:10.1093/cercor/bhy132.
- Scharfman H, Goodman J, McCloskey D. 2007. Ectopic granule cells of the rat dentate gyrus. *Dev Neurosci.* 29:14–27.
- Schlessinger AR, Cowan WM, Gottlieb DI. 1975. An autoradiographic study of the time of origin and the pattern of granule cell migration in the dentate gyrus of the rat. *J Comp Neurol.* 159:149–175.
- Schmidt-Hieber C, Jonas P, Bischofberger J. 2007. Subthreshold dendritic signal processing and coincidence detection in dentate gyrus granule cells. *J Neurosci.* 27:8430–8441.
- Snyder JS, Radik R, Wojtowicz JM, Cameron HA. 2009. Anatomical gradients of adult neurogenesis and activity: young neurons in the ventral dentate gyrus are activated by water maze training. *Hippocampus.* 19:360–370.
- Sorrells SF, Paredes MF, Cebrian-Silla A, Sandoval K, Qi D, Kelley KW, James D, Mayer S, Chang J, Auguste KI, et al. 2018. Human hippocampal neurogenesis drops sharply in children to undetectable levels in adults. *Nature.* 555:377–381.
- Spalding KL, Bergmann O, Alkass K, Bernard S, Salehpour M, Huttner HB, Bostrom E, Westerlund I, Vial C, Buchholz BA, et al. 2013. Dynamics of hippocampal neurogenesis in adult humans. *Cell.* 153:1219–1227.
- Subramanian L, Sarkar A, Shetty AS, Muralidharan B, Padmanabhan H, Piper M, Monuki ES, Bach I, Gronostajski RM, Richards LJ, et al. 2011. Transcription factor Lhx2 is necessary and sufficient to suppress astrogliogenesis and promote neurogenesis in the developing hippocampus. *Proc Natl Acad Sci USA.* 108:E265–E274.
- Sun GJ, Sailor KA, Mahmood QA, Chavali N, Christian KM, Song H, Ming GL. 2013. Seamless reconstruction of intact adult-born neurons by serial end-block imaging reveals complex axonal guidance and development in the adult hippocampus. *J Neurosci.* 33:11400–11411.
- Tronel S, Fabre A, Charrier V, Oliet SH, Gage FH, Abrous DN. 2010. Spatial learning sculpts the dendritic arbor of adult-born hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci USA.* 107:7963–7968.
- Tronel S, Lemaire V, Charrier V, Montaron MF, Abrous DN. 2015. Influence of ontogenetic age on the role of dentate granule neurons. *Brain Struct Funct.* 220:645–661.
- Urban N, Guillemot F. 2014. Neurogenesis in the embryonic and adult brain: same regulators, different roles. *Front Cell Neurosci.* 8:396.
- van Elburg RA, van Ooyen A. 2010. Impact of dendritic size and dendritic topology on burst firing in pyramidal cells. *PLoS Comput Biol.* 6:e1000781.
- Vreugdenhil E, Kolk SM, Boekhoorn K, Fitzsimons CP, Schaaf M, Schouten T, Sarabdjitsingh A, Sibug R, Lucassen PJ. 2007. Doublecortin-like, a microtubule-associated protein expressed in radial glia, is crucial for neuronal precursor division and radial process stability. *Eur J Neurosci.* 25:635–648.
- Wei L, Meaney MJ, Duman RS, Kaffman A. 2011. Affiliative behavior requires juvenile, but not adult neurogenesis. *J Neurosci.* 31:14335–14345.
- Williams PA, Larimer P, Gao Y, Strowbridge BW. 2007. Semilunar granule cells: glutamatergic neurons in the rat dentate gyrus with axon collaterals in the inner molecular layer. *J Neurosci.* 27:13756–13761.
- Wu MV, Sahay A, Duman RS, Hen R. 2015. Functional differentiation of adult-born neurons along the septotemporal axis of the dentate gyrus. *Cold Spring Harbor Perspect Biol.* 7:a018978.
- Zhao C, Teng EM, Summers RG Jr., Ming GL, Gage FH. 2006. Distinct morphological stages of dentate granule neuron maturation in the adult mouse hippocampus. *J Neurosci.* 26:3–11.

Chapitre V. Discussion générale

Mon travail de thèse s'est concentré sur l'étude du développement des NGs du GD de la FH. Depuis les travaux pionniers d'Altman et collègues dans les années 1960, il a été mis en évidence que le développement du GD est initié lors des stades tardifs de l'embryogenèse, qu'il continue – contrairement au reste du cerveau – lors de la période postnatale où une majorité des NGs est générée et se poursuit à l'âge adulte, pendant lequel des néo-neurones granulaires sont constamment ajoutés et intégrés aux circuits hippocampiques matures. Ce phénomène de néo-neurogenèse si particulier a attiré l'attention d'une large communauté scientifique et les travaux de ces 20 dernières années ont pu montrer que la génération de nouveaux NGs était un mécanisme important pour les fonctions du GD, notamment pour la mémoire et la régulation des états émotionnels. En revanche, bien que les deux premières vagues de neurogenèse produisent la majorité des NGs, peu d'études se sont appliquées à étudier leurs propriétés.

A. Les NGs issus des différentes périodes de neurogenèse sont-ils morphologiquement identiques ?

La CG du GD adulte est donc composée de NGs d'origines ontogéniques différentes, formant au moins 3 populations principales: les NGs générés lors de l'embryogenèse, les NGs générés lors des premiers jours après la naissance (période postnatale) et les NGs générés à l'âge adulte. Quelques études ont montré que les NGs issus de la phase embryonnaire occupent la partie extérieure de la CG quand les neurones issus des phases postnatales et adultes peuplent les parties plus internes (Schlessinger et al., 1975; Muramatsu et al., 2007; Mathews et al., 2010; Save et al., 2018). D'autres travaux ont mis en évidence que les neurones générés lors du développement ne sont pas impliqués de la même manière durant les tâches d'apprentissages (Tronel et al., 2015) et ne supportent pas les mêmes fonctions que les néo-neurones du GD adulte (Wei et al., 2011; Nakashiba et al., 2012). En dépit de ces différences, les néo-neurones à maturité semblent présenter des caractéristiques électrophysiologiques similaires aux neurones des vagues neurogéniques périnatales (Laplagne et al., 2006, 2007) et il est généralement admis que ces différentes populations de neurones sont morphologiquement indiscernables après maturation (Llorens-Martín et al., 2016). Or aucune analyse détaillée de la morphologie des neurones développementaux n'avait été réalisée pour confirmer ce postulat. Les quelques études sur ce sujet, quand j'ai débuté ma thèse, ne permettaient pas de dater précisément la naissance des neurones marqués (Green and Juraska, 1985; Claiborne et al., 1990; Jones et al., 2003; Beining et al., 2017) ou étaient limitées à quelques temps d'analyse ou encore se limitait à

une seule population de NGs. Ainsi, par exemple, dans les études publiées, des injections rétrovirales avaient été effectuées lors de la deuxième semaine de vie de l'animal, et ne prenaient donc pas en compte les neurones issus de la période embryonnaire (Laplagne et al., 2006; Zhao et al., 2006; Kim et al., 2012). D'autres études s'intéressant aux neurones générés lors de l'embryogenèse ont également utilisé des injections rétrovirales, cette fois-ci effectuées à E15. Cependant, le génome des rétrovirus qui s'intègre à celui des cellules en division est transmis à toutes les cellules filles de la cellule initialement transduite. Une telle stratégie marque donc une population hétérogène de neurones : ceux réellement nés à E15 mais aussi des descendants générés à des temps plus tardifs ayant potentiellement des caractéristiques morphologiques se rapprochant de celles des neurones postnataux (Laplagne et al., 2007; Mathews et al., 2010).

Pour pouvoir dater de façon précise les cellules d'intérêt nous avons utilisé la technique d'électroporation. Avec cette technique, le plasmide électroporé reste épisomique, il ne s'intègre donc pas au génome de la cellule transduite et est dilué après plusieurs divisions cellulaires. De cette façon nous avons pu montrer que les neurones générés lors des périodes embryonnaire et postnatale, développent leur arbre dendritique selon un déroulé temporel similaire. En revanche, une phase d'élagage dendritique est observée pour les neurones embryonnaires lors de la 2^{ème} semaine de leur développement et une réduction de la taille du corps cellulaire après 4 semaines de croissance. Ces phénomènes ne sont pas observés pour les NGs postnataux. La morphogenèse des populations de NGs est donc propre à chacune.

Nous avons ensuite comparé la morphologie de NGs matures (12 semaines) générés au cours des périodes embryonnaire et postnatale précoce, à celles des NGs générés en période juvénile et adulte. Dans ce cas, les neurones ont été marqués par injection rétrovirale car, à ce stade, l'électroporation est inefficace et il a été montré que les progéniteurs neuronaux se divisent peu avant maturation (Pilz et al., 2018). Nous avons ainsi montré que les NGs embryonnaires sont morphologiquement différents des autres populations. En effet, outre une position dans la partie externe de la CG, ils possèdent plusieurs dendrites apicales primaires et un arbre dendritique possédant plusieurs caractéristiques distinctes (angle de branchement plus large...). Concernant les neurones générés en période postnatale précoce, ils possèdent un arbre dendritique plus ramifié et d'une longueur totale plus élevée que les NGs des autres populations et sont positionnés au milieu de la CG adulte. En revanche les neurones issus de la période juvénile ne sont pas distinguables des neurones générés chez l'adulte (Kerloch et al., 2018). Ces

résultats révèlent donc d'importantes différences morphologiques entre les populations de NGs, une fois matures.

Afin de compléter cette analyse, il serait maintenant intéressant d'étudier les épines dendritiques au sein de ces différentes populations ainsi que la formation des premières synapses. Il a été montré, pour les néo-neurones chez la souris, que les premières "protrusions" peuvent être observées à partir de 16 jours après injection de rétrovirus et que leur densité augmente rapidement avant d'être stable vers 56 jpi (Zhao et al., 2006). Dans une autre étude, Toni et al. (2007) ont décrit la présence de synapses matures, caractérisées par la présence de densités post-synaptiques (PSD), au niveau des néo-neurones à partir de 30 jpi (Toni et al., 2007). Il serait donc intéressant d'étudier si la cinétique de développement des épines dendritiques et des synapses est similaire au sein des populations embryonnaire et postnatale. Enfin, à maturité, il serait tout aussi important de comparer ces caractéristiques morphologiques (densité, la répartition et la morphologie des épines/synapses) à celles obtenues pour des néo-neurones. Si quelques études ont essayé d'aborder cette question, les données peu détaillées ont été obtenues avec des outils mal adaptés. Ainsi, par exemple, dans une étude récente réalisée au sein de cultures organotypiques entorhino-hippocampiques de rat, il a été montré que les NGs nés à P4-P5, et marqués avec des rétrovirus, présentent les premières épines dendritiques occasionnellement à 14 jpi et de façon plus marquée à 15-16jpi (Radic et al., 2017). In vivo chez la souris, il a également été montré avec des rétrovirus injectés à P10 que les premières épines dendritiques apparaissent vers 12 jpi, suggérant ainsi que la formation des épines dendritiques commence plus précocement pour les NGs développementaux (Zhao et al., 2006).

Outre l'étude des structures permettant la réception des informations il serait aussi important d'étudier le développement de l'axone des NGs au sein du GD périnatal comparé à l'âge adulte. Dans le GD à l'âge adulte, les néo-neurones développent rapidement leur axone qui s'étend pour contacter les neurones pyramidaux du CA3 (Zhao et al., 2006; Sun et al., 2013). Des études utilisant des marqueurs rétrogrades ont pu mettre en évidence que les premiers contacts synaptiques étaient effectués après 10 jours de maturation neuronale dans le GD de rat adulte (Hastings and Gould, 1999). Il serait donc intéressant d'étudier la cinétique de croissance de l'axone au sein des populations distincte de NGs. Une des rares études réalisées à ce jour a révélé que la taille des boutons des fibres moussues des néo-neurones matures (75 jpi) était similaire à celle des neurones nés à P5 et marqués avec des rétrovirus (Toni et al., 2008).

Toutefois des différences au niveau de l'axone peuvent être attendues car si les néo-neurones du GD adulte sont en compétition avec les neurones préexistants pour établir des contacts synaptiques, le processus semble différent pour les neurones périnataux. En particulier les NGs embryonnaires effectuent les premiers contacts avec les neurones du CA3, un processus n'impliquant pas la même compétition que dans le GD adulte.

Afin de comparer l'axone des différentes populations de NGs, il nous faudra développer un nouvel outil. En effet, lorsque nous électroporons le GD à E14.5, le primordium hippocampique, donnant naissance aux neurones pyramidaux du CA1 et CA3, est également électroporé. Ainsi après électroporation d'un plasmide exprimant la GFP sous promoteur CAG à E14.5, nous observons des cellules GFP+ dans le GD mais aussi dans le CA3 ce qui empêche l'observation de fibres moussues individuelles au niveau du CA3. Aussi nous envisageons d'exprimer la GFP avec un promoteur spécifique des NGs du GD tel que le promoteur C1ql2 (Complement C1q-like protein 2) (Iijima et al., 2010; Barthet et al., 2018).

Les différences morphologiques que nous avons pu mettre en évidence au niveau dendritique entre les diverses populations de NGs suggèrent que ces neurones ne reçoivent pas le même type d'information et/ou ne transmettent pas l'information similairement. En effet la morphologie de l'arbre dendritique définit le type, la quantité d'afférences reçues et la façon de traiter les informations (Lefebvre et al., 2015). De plus, il a récemment été montré que la morphologie dendritique des NGs peut prédire leur activité au cours d'un comportement d'exploration (Diamantaki et al., 2016). Dans l'ensemble, ces données indiquent que les NGs issus des différentes périodes neurogéniques pourraient recevoir différentes afférences et contribuer différemment aux fonctions hippocampiques. Dans ce sens, il a été démontré que les NGs nés lors de la période postnatale précoce ou chez l'adulte ne modifient pas leur arborisation dendritique de la même manière en réponse à une crise d'épilepsie ou à un apprentissage (Kron et al., 2010; Tronel et al., 2010; Lemaire et al., 2012) et sont activés par des processus mnésiques différents lorsqu'ils sont matures (Tronel et al., 2015).

Dans la perspective d'étudier les afférences des NGs issus des différentes périodes neurogéniques, nous pourrions prendre avantage de la technique de marquage rétrograde par injection du virus de la rage modifié (Wickersham et al., 2007). En effet en utilisant la même stratégie de marquage des différentes populations avec l'électroporation *in vivo*, il serait possible d'induire l'expression du récepteur TVA (tumor virus receptor A) et de la glycoprotéine du virus de la rage au sein des NGs des différentes populations cibles. Puis à un temps désiré du développement neuronal, il est possible d'injecter le virus de la rage modifié infectant les

neurones exprimant le récepteur TVA, qui grâce à la glycoprotéine G, peut traverser une synapse et donc marquer les neurones effectuant directement des contacts synaptiques avec les NGs. Ainsi, nous pourrions examiner les afférences des populations de NGs à un stade de maturation choisi. De même la technique d'électroporation pourra être utilisée avec des constructions permettant l'expression de DREADDs (designer receptor exclusively activated by designer drugs). Ce type d'approche pourrait permettre de stimuler ou d'inhiber l'activité de ces neurones et donc d'examiner les conséquences fonctionnelles d'une telle manipulation.

B. Le développement des différentes populations de NGs est-il régulé de manière similaire?

Les NGs issus des vagues embryonnaire, postnatale précoce et adulte, se développent au sein d'environnements différents. Pour cette raison il est possible que la maturation et l'intégration de nouveaux neurones au sein du GD soient régulées par différents mécanismes. Au cours de cette thèse nous nous sommes intéressés au rôle joué par les protéines Rnds qui sont des régulateurs importants du développement neuronal (Azzarelli et al., 2015a, 2015b) et en particulier sur Rnd2 qui est fortement exprimée dans le GD en développement et mature.

Dans le but d'étudier les fonctions de Rnd2 dans la neurogénèse au sein du GD, nous avons adopté une stratégie de perte de fonction basée sur l'utilisation de rétrovirus. Cette approche nous a permis d'évaluer l'impact de la délétion de *Rnd2* sur le développement et l'intégration de nouveaux neurones lors de la période postnatale précoce et à l'âge adulte. Nous avons ainsi pu montrer que l'absence de *Rnd2* chez l'animal adulte, diminue la survie des néo-neurones, perturbe leur positionnement et altère leur maturation morphologique (dendrites plus développées et corps cellulaire hypertrophié). En revanche, au sein du GD postnatal précoce, seule l'arborisation dendritique des neurones nés à P0 semble être affectée par la délétion de *Rnd2*. Ces résultats supportent donc l'idée que le processus de neurogénèse hippocampique, ne soit pas régulé de la même façon par Rnd2 dans un environnement cérébral postnatal ou adulte. Toutefois il est important de préciser que ces différences de régulation pourraient reposer sur le fait que les NGs postnataux et adultes ne se développent pas de la même manière. En effet, s'il est bien établi qu'une grande partie des néo-neurones meurent rapidement après leur naissance, ce n'est pas aussi clair pour les NGs développementaux. Une étude récente chez le rat a montré que contrairement aux néo-neurones, les NGs générés à P6 ne sont pas éliminés au stade immature mais plutôt tardivement entre 2 et 6 mois après leur naissance (Cahill et al.,

2017). A l'inverse des données obtenues chez la souris au sein de notre laboratoire montrent une mort importante des NGs générés à P7 au stade immature, puisque seulement 50% de ces neurones survivent après 2 semaines post-mitotique (Koehl et al., données non publiées). En revanche aucune mort n'est observée pour les NGs générés à E17.5. Ainsi il paraît crucial de mieux caractériser encore une fois le développement des NGs développementaux.

Les contextes différents dans lesquels les NGs postnatals et adultes se développent pourraient également expliquer ces différences de régulation. Ainsi les stimuli locaux provenant des niches neurogéniques distinctes pourraient recruter Rnd2 de manière différente. Il est également possible que les effecteurs et/ou protéines interagissant avec Rnd2 soient différents, ou absents lors du développement, impliquant donc des rôles distincts. De plus, nous ne pouvons pas exclure que la cinétique d'expression de Rnd2 soit différente selon le stade ontogénétique de l'animal. Dans le GD adulte nous mettons en évidence que l'expression de Rnd2 colocalise avec la DCX, un marqueur de neurones immatures. En revanche, nous ne savons pas quand cette expression débute et se termine au cours du développement d'un néo-neurone. Une caractérisation plus précise de l'expression de Rnd2 au sein de NGs développementaux et adultes est donc nécessaire. L'expression de Rnd2 étant régulé par des facteurs de transcription spécifiques, il serait aussi intéressant de déterminer si les mêmes facteurs régulent son expression dans le GD en développement ou à l'âge adulte. Au cours du développement cérébral, le facteur de transcription Neurog2 active la transcription de Rnd2, de même que NeuroD2, Tbr2 et NeuroD1 mais dans une moindre mesure (Heng et al., 2008). D'autres travaux ont également révélé que le facteur de transcription COUP-TF1 (chicken ovalbumin upstream promoter - transcription factor I) réprime l'expression de Rnd2 au cours de la corticogenèse (Alfano et al., 2011). L'ensemble de ces facteurs de transcription sont également exprimés au sein du GD lors du développement et à l'âge adulte suggérant donc un possible rôle dans la régulation de l'expression de Rnd2.

C. Une délétion de *Rnd2* dans les NGs générés chez l'animal adulte ou le nouveau-né a-t-elle le même impact fonctionnel ?

La délétion de *Rnd2* au sein des néo-neurones altère profondément leur développement. Une partie des travaux présentés dans cette thèse mettent en évidence que cette altération est associée à une augmentation des niveaux d'anxiété. Ces résultats sont en accord avec des données de notre laboratoire et de la littérature (Ageta et al., 2008; Bergami et al., 2008; Revest

et al., 2009). Ces données ont ainsi permis d'identifier *Rnd2* comme une cible potentielle pour le traitement des troubles anxieux. La question qui se pose est de savoir si le phenotype comportemental que nous avons observé peut être reproduit en bloquant l'expression de *Rnd2* dans les neurones formés au cours du développement. Des résultats obtenus par une approche différente suggèrent que le rôle découvert pour *Rnd2* serait spécifique des néo-neurones. Cette approche est la suivante: une souris transgénique exprimant la recombinaise Cre sous le contrôle du promoteur *CaMKIIα* (calcium/calmodulin-dependent protein kinase II alpha) a été couplée à la souris *Rnd2^{flox/flox}*. Ainsi, dans les souris *CaMKIIα-Cre x Rnd2^{flox/flox}*, *Rnd2* est délété dans les neurones glutamatergiques, dont les NGs du GD, et ce dès le stade post-mitotique. Dans ces souris, la Cre est exprimée dès les premiers jours de vie (Casanova et al., 2001) et l'expression de *Rnd2* est réduite de 80% dans l'hippocampe à P21 (données non publiées). L'analyse du comportement de ces souris adultes âgées de 2 mois n'a pas révélé de modification du comportement de type anxieux. Ces résultats préliminaires suggéreraient que seule la délétion de *Rnd2* spécifiquement au sein des néo-neurones peut induire un état anxieux chez la souris adulte. Toutefois ces résultats sont préliminaires, l'analyse du comportement des souris pour lesquelles *Rnd2* a été délété, via une stratégie rétrovirale, au sein des NGs générés à P0, nous permettra une meilleure compréhension du rôle joué par *Rnd2* dans la neurogénèse postnatale précoce.

Au vu de ces résultats, il serait important d'étudier, par des techniques d'électrophysiologie, les conséquences de la délétion de *Rnd2* sur l'activité des néo-neurones ayant survécu à la délétion et sur l'activité du réseau hippocampique. En effet, il a été montré que les néo-neurones, en activant les interneurones GABAergiques du hile, peuvent inhiber l'activité des NGs matures (Drew et al., 2016). Il serait donc intéressant d'étudier l'impact de la délétion de *Rnd2* au sein des néo-neurones sur l'activité globale du GD, notamment par l'enregistrement des potentiels de champs du GD ou par l'enregistrement de l'activité des NGs matures grâce à la technique de patch clamp. Il serait également intéressant d'examiner les effets de cette délétion sur la plasticité synaptique, en étudiant les phénomènes de potentialisation et de dépression à long terme (Massa et al., 2011).

D. Conclusion générale

Ensemble les résultats de cette thèse apportent un nouveau regard sur le développement des différentes populations de NGs et indiquent que, contrairement à l'idée généralement

admise, ces populations possèdent des caractéristiques bien spécifiques qui suggèrent qu'elles pourraient contribuer distinctement aux fonctions hippocampiques.

Si la neurogénèse hippocampique des périodes embryonnaire, postnatale précoce et adulte, a effectivement été décrite chez la plupart des mammifères, l'existence de la neurogénèse au sein du cerveau humain adulte est encore très controversée. Il est néanmoins accepté que la neurogénèse au sein du GD humain ne soit pas restreint au stade embryonnaire mais qu'elle ait lieu aussi dans cette structure lors des premières années de vie (Boldrini et al., 2018; Cipriani et al., 2018; Kempermann et al., 2018; Sorrells et al., 2018). Le GD de l'homme adulte serait donc également une structure composée de populations de NGs d'origines ontogéniques distinctes, possédant des caractéristiques propres qui pourraient leur permettre de supporter des fonctions différentes au sein du GD adulte. La poursuite des efforts dans la caractérisation détaillée des populations de NGs, issues des différentes périodes de neurogénèse hippocampique, permettra une meilleure compréhension de la fonctionnalité du GD non seulement chez le rongeur mais aussi potentiellement chez l'Homme.

Par ailleurs, nos travaux montrent que Rnd2 est un régulateur critique du développement de nouveaux NGs, particulièrement au sein du GD chez l'adulte. De façon intéressante et inattendue, nous avons également mis en évidence son implication dans la régulation des comportements associés à l'anxiété, révélant ainsi une potentielle piste dans le traitement des états anxieux.

Chapitre VI.Publication supplémentaire



Regulation of cerebral cortex development by Rho GTPases: insights from *in vivo* studies

Roberta Azzarelli¹, Thomas Kerloch^{2,3} and Emilie Pacary^{2,3*}

¹ Department of Oncology, Hutchison/MRC Research Centre, Cambridge Biomedical Campus, University of Cambridge, Cambridge, UK

² Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U862, Neurocentre Magendie, Bordeaux, France

³ Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Physiopathologie de la Plasticité Neuronale, Université de Bordeaux, Bordeaux, France

Edited by:

Takeshi Kawauchi, Keio University School of Medicine / Precursory Research for Embryonic Science and Technology (PRESTO), Japan
Science and Technology Agency (JST), Japan

Reviewed by:

Troy Ghashghaie, North Carolina State University, USA
Angeliki Louvi, Yale, USA

*Correspondence:

Emilie Pacary, Neurogenesis and Physiopathology Group, INSERM U862 - Neurocentre Magendie, 146 rue Léo Saignat, 33077 Bordeaux cedex, France
e-mail: emilie.pacary@inserm.fr

The cerebral cortex is the site of higher human cognitive and motor functions. Histologically, it is organized into six horizontal layers, each containing unique populations of molecularly and functionally distinct excitatory projection neurons and inhibitory interneurons. The stereotyped cellular distribution of cortical neurons is crucial for the formation of functional neural circuits and it is predominantly established during embryonic development. Cortical neuron development is a multiphasic process characterized by sequential steps of neural progenitor proliferation, cell cycle exit, neuroblast migration and neuronal differentiation. This series of events requires an extensive and dynamic remodeling of the cell cytoskeleton at each step of the process. As major regulators of the cytoskeleton, the family of small Rho GTPases has been shown to play essential functions in cerebral cortex development. Here we review *in vivo* findings that support the contribution of Rho GTPases to cortical projection neuron development and we address their involvement in the etiology of cerebral cortex malformations.

Keywords: Rho GTPases, cerebral cortex, neuronal development, cortical malformations, GAP, GEF

INTRODUCTION

In humans, the cerebral cortex is responsible for the processes of thought, perception and memory and serves as the seat of advanced motor functions, social abilities and language. These functions relies on the proper development of two main populations of neurons, projection or pyramidal neurons, which are glutamatergic and excitatory, and interneurons, which are GABAergic and inhibitory. Neurons in the cerebral cortex are arranged into six distinct layers different in terms of connectivity, gene expression profile and birthdate (Molyneaux et al., 2007). Projection neurons originate from progenitors located in the cortex whereas interneurons are born in the ventral domains of the telencephalon and then migrate tangentially to reach the cortex (Kriegstein and Noctor, 2004).

After closure of the neural tube, the epithelium lining the ventricles becomes a specialized neuroepithelium. It consists of a single sheet of progenitor cells, called neuroepithelial cells (NEs). At early developmental stages, around E10 in mouse, NEs along the dorsal surface of lateral ventricles self-renew to expand the progenitor pool and then convert into cells expressing glial markers such as the astrocyte-specific glutamate transporter (GLAST) and brain lipid-binding protein (BLBP), the radial glial cells (RGs). The asymmetric divisions of these RGs are responsible for producing cortical projection neurons either directly or indirectly through intermediate progenitor cells (IPs) or outer radial glial cells (oRGs). Newborn projections neurons then migrate radially in a step-wise fashion to their final destination using RG fibers as a scaffold and finally undergo terminal differentiation to transmit and receive information. As neurogenesis

progresses, diverse subtypes of projection neurons are generated sequentially and their migration occurs in an inside-out manner: neurons generated first occupy the deepest layers of the future six layered neocortex whereas later born neurons by-pass earlier born neurons and settle in more superficial layers (Gupta et al., 2002).

Unlike the projection neurons, the inhibitory interneurons of the cerebral cortex are generated from distinct progenitors in the germinal zones of the ventral telencephalon, mainly within the medial and caudal ganglionic eminences. Interneurons then undertake tangential migration toward the cortex using different routes according to the time and place of birth. Upon arrival in the cortex, interneurons switch their mode of migration from tangential to radial and reach their destination layer based on their molecular subtype, origin and birthdate, on cortical cues and make local connections with pyramidal cells (Bartolini et al., 2013; Guo and Anton, 2014).

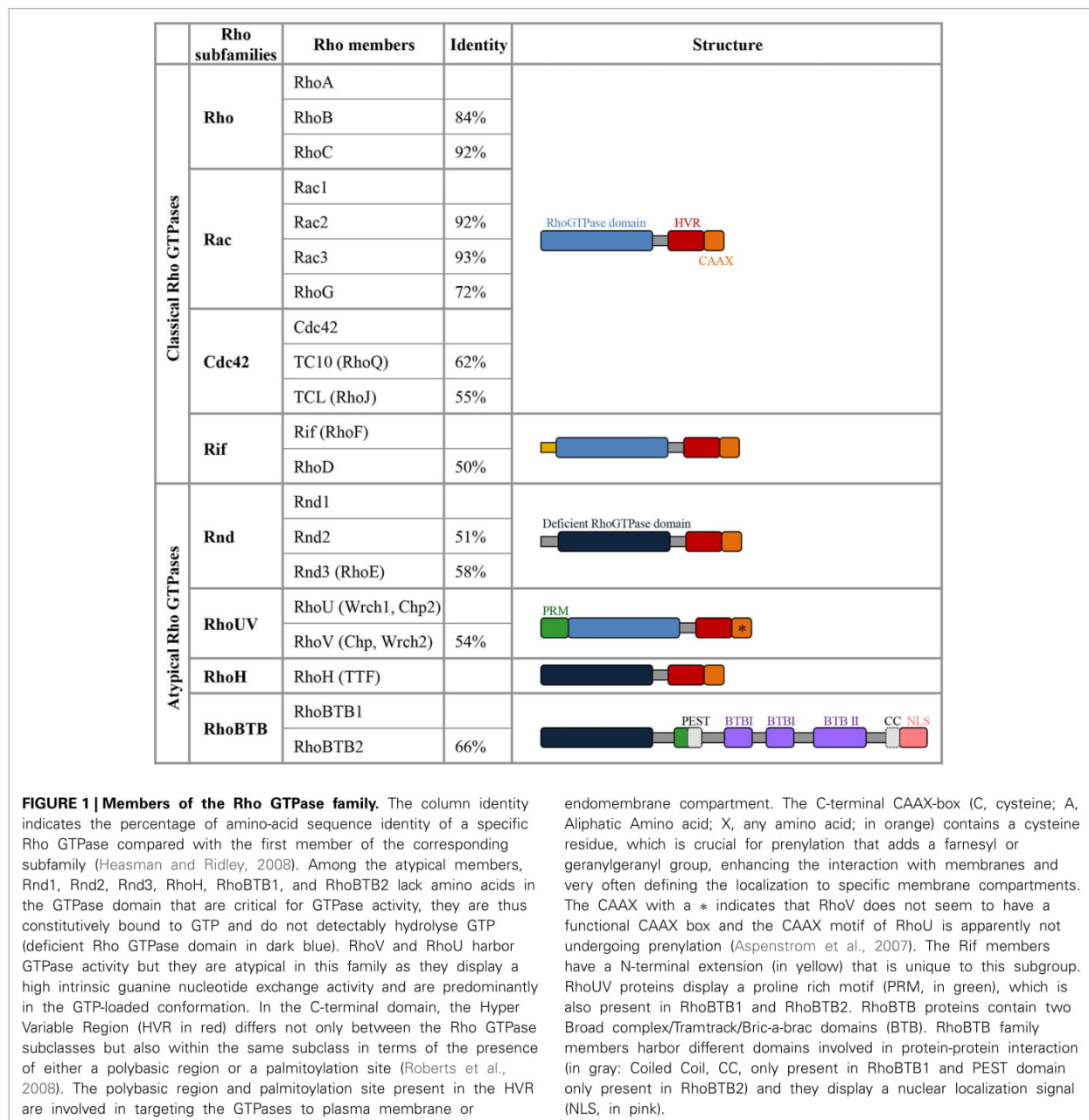
The development of each category of cortical neurons is thus a multistep process, which involves dramatic morphological changes at each step of the process. These changes are mediated by an extensive and dynamic remodeling of the cytoskeleton. Among the major regulators of cytoskeletal properties, the small signaling molecules of the Rho GTPase family play essential functions in cerebral cortex development. In this review, we will address the role of Rho GTPases in cortical projection neuron development, focusing on *in vivo* studies, and discuss how dysfunctional Rho GTPase signaling may contribute to cortical malformations.

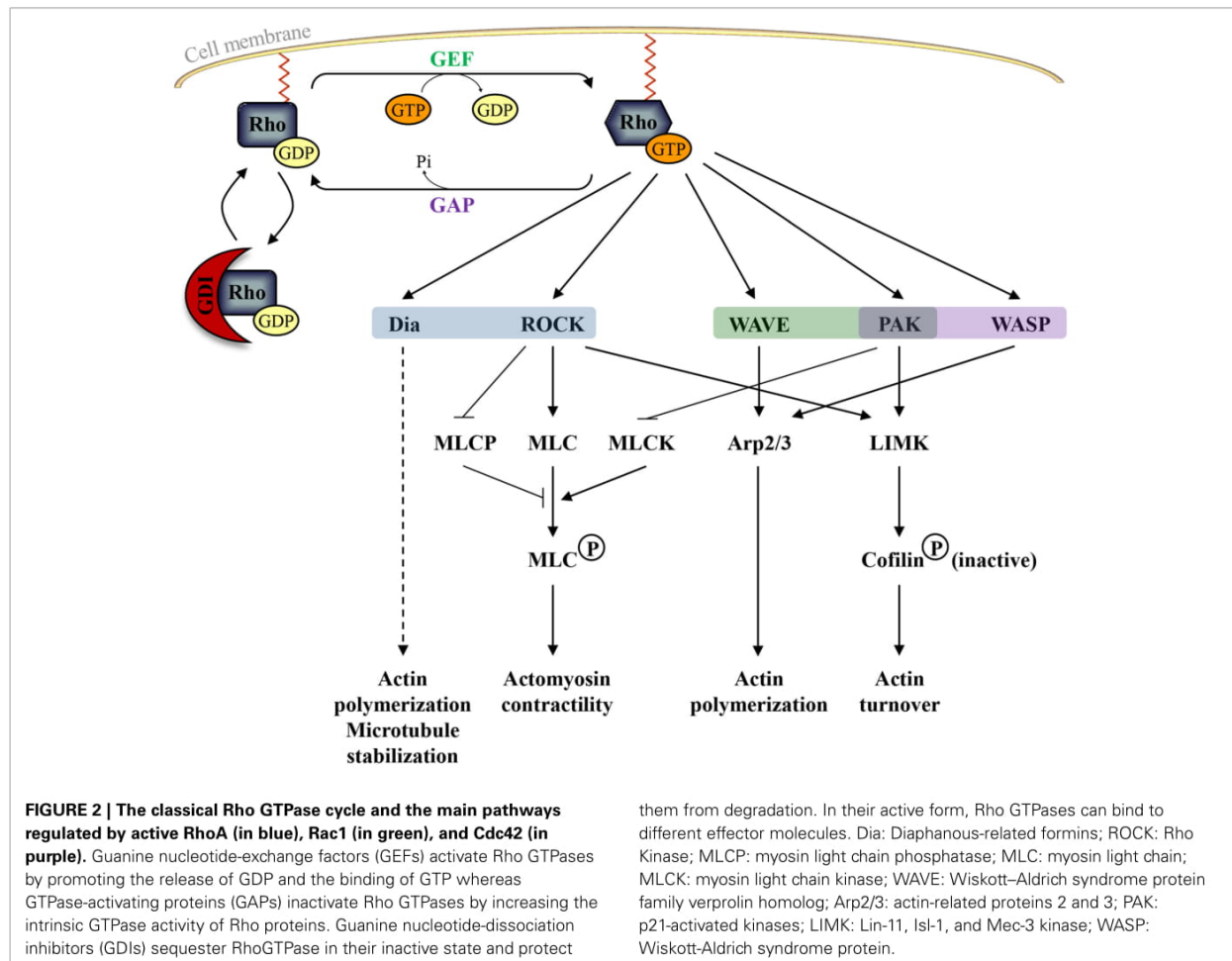
THE Rho GTPase FAMILY

The Rho family of GTPases represents a subgroup of the Ras superfamily of small GTP binding proteins (Heasman and Ridley, 2008). The most extensively studied members of the Rho family are RhoA (Ras homologous member A), Rac1 (ras related C3 botulinum toxin substrate 1) and Cdc42 (cell division cycle 42) but this family actually includes 20 members which are subdivided into 8 subgroups based on amino-acid sequence similarities (Figure 1).

Like other small GTP-binding proteins of the Ras superfamily, most Rho GTPases cycle between GTP (active) and GDP

(inactive)—bound states. The GDP/GTP cycle is promoted by the activity of two classes of molecules, guanine nucleotide exchanging factors (GEFs) and GTPase activating proteins (GAPs). GEFs facilitate the exchange of GDP with GTP, resulting in protein activation. GAPs instead stimulate the intrinsic enzymatic activity of the GTPases, which promotes hydrolysis of GTP into GDP. GAP activity therefore ends the cycle and returns the GTPases in their inactive state (Bos et al., 2007) (Figure 2). Over 80 GEFs and more than 70 GAPs have been reported, suggesting that Rho GTPase regulation is complex. In addition, Rho GTPases can bind to proteins known as guanine-nucleotide dissociation inhibitors





(GDIs). RhoGDIs sequester RhoGTPase in their inactive state and protect them from degradation (Boulter et al., 2010) (Figure 2). When bound to GTP, Rho GTPases exhibit the correct structural conformation to interact with effectors and initiate downstream signaling to regulate actin and microtubule components of the cytoskeleton (Jaffe and Hall, 2005) (Figure 2). However, some members of the family do not follow this classical scheme of activation and are described as atypical. These atypical Rho GTPases are predominantly GTP bound, owing either to aminoacid substitutions at residues that are crucial for GTPase activity (for example in Rnd proteins) or owing to increased nucleotide exchange (for example in RhoU). Therefore, their expression, localization, stability and phosphorylation control their activity rather than the GDP/GTP switch (Aspenstrom et al., 2007) (Figure 1).

Experimental data indicating the importance of the Rho family of small GTPases in cerebral cortex development have been accumulated over the past few years. Much of our understanding on their role comes from *in vitro* studies (Govek et al., 2005). Nevertheless, in the last years, the use of conditional mutant mice and the development of techniques such as *in*

utero electroporation have allowed to highlight and clarify their functions *in vivo*.

EXPRESSION OF Rho GTPases IN THE DEVELOPING CEREBRAL CORTEX

Most of these *in vivo* studies have focused on RhoA, Rac1, and Cdc42, and more recently on Rnd2 and Rnd3. The functions of the other members of the Rho GTPase family in cortical development remain largely unknown.

In the Rho subgroup, *RhoA* and *RhoB* are highly expressed in the embryonic cerebral cortex but with distinct patterns (Olenik et al., 1999; Ge et al., 2006; Heng et al., 2008). *RhoA* mRNA is mainly expressed in domains of cellular proliferation whereas *RhoB* mRNA is absent in the proliferative zones but highly expressed in the cortical plate (CP) where neurons migrate or settle at the end of their migration (Figure 3). *RhoC* mRNA is detected in the nervous system but its distribution in the developing cerebral cortex has not been thoroughly examined (Erschbamer et al., 2005). Three of the 4 vertebrate Rac-related genes, namely *Rac1*, *Rac3*, and *RhoG*, are expressed in the nervous system (Figure 3) (de Curtis, 2008). Most studies

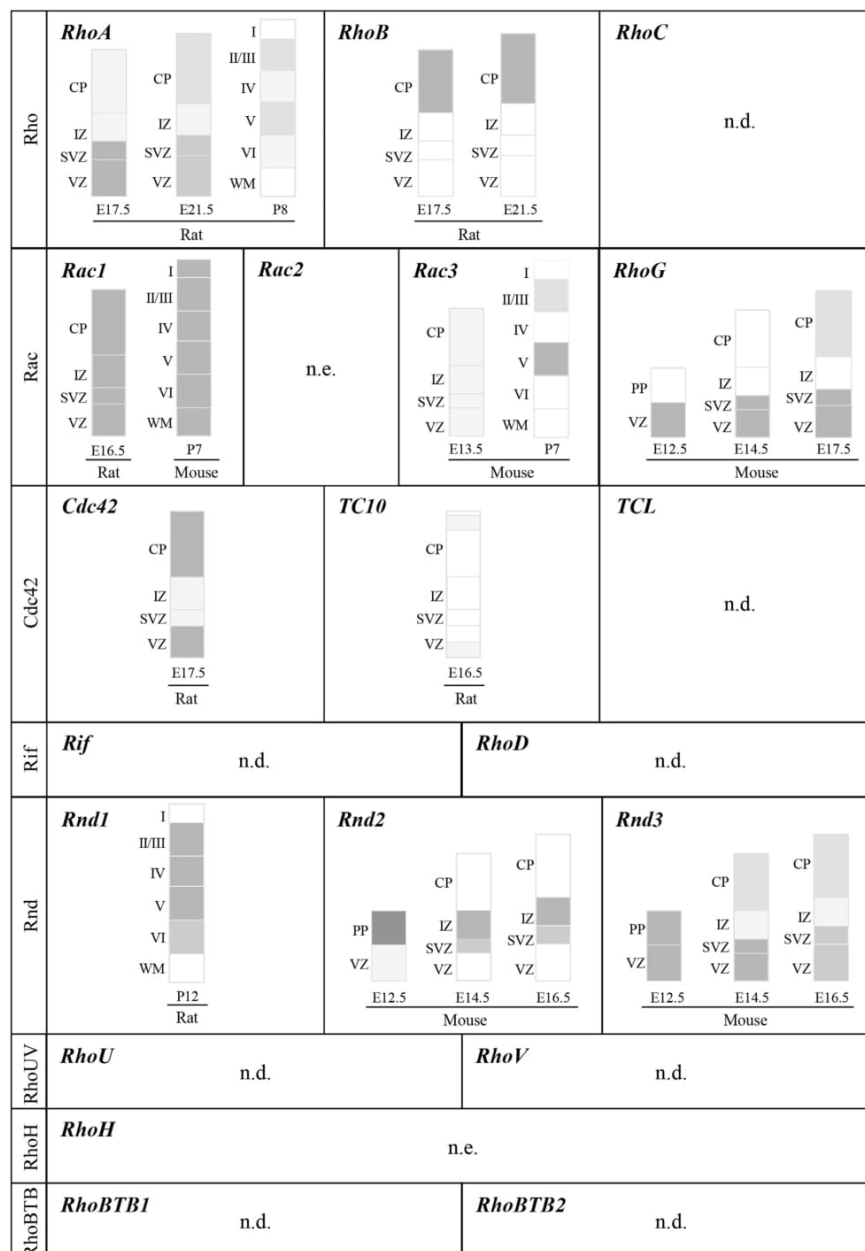


FIGURE 3 | Expression of Rho GTPase genes in the developing cerebral cortex. Schematic representation of cortical domains depicting the expression pattern of Rho GTPase genes within the murine cerebral cortex at different developmental stages. To simplify the representation, this figure does not include spatial differences, which should be however kept in mind since all cortical areas do not develop at the same rate and timing. References cited in the Section EXPRESSION OF Rho GTPases IN THE

DEVELOPING CEREBRAL CORTEX should be consulted for details on expression patterns and changes in expression during development. Dark gray and light gray indicate higher and lower relative levels of expression, respectively. VZ: ventricular zone; SVZ: ventricular zone; IZ: intermediate zone; CP: cortical plate; WM: white matter; PP: preplate; n.e.: not expressed in the brain; n.d.: expression in the cerebral cortex not determined.

on cortical neuron development have focused on *Rac1*, whereas only a few studies exist on *Rac3* and *RhoG*, despite their expression in the developing cerebral cortex. However, their temporal expression is different as illustrated by low levels of *Rac3* mRNA

in the embryonic cortex where *Rac1* and *RhoG* mRNA are highly expressed (Ishikawa et al., 2002; Bolis et al., 2003; Corbetta et al., 2005; Fujimoto et al., 2009). Instead, *Rac3* is mainly expressed in the postnatal cortex (P7) in layer V and to a lesser extent in

layers II–III (Corbetta et al., 2005). In the Cdc42 subfamily, Cdc42 is expressed throughout the developing cerebral wall (Olenik et al., 1999; Yokota et al., 2010). Cdc42 protein is particularly enriched at the apical/ventricular side of the neuroepithelium and is present in basally located post-mitotic neurons (Cappello et al., 2006). In contrast to Cdc42, *TC10* expression is very low in the embryonic cerebral cortex (Figure 3) (Tanabe et al., 2000). Its expression in the brain however increases with development (Tanabe et al., 2000; Abe et al., 2003). Similarly, very low levels of *TCL* mRNA are detected in the brain, at least in adult murine tissue (Vignal et al., 2000). Concerning the last subfamily of classical Rho GTPases, although *RhoF* and *RhoD* are expressed in the adult brain (Murphy et al., 1996; Ellis and Mellor, 2000) and have been shown to regulate neuronal development *in vitro* (Hotulainen et al., 2009; Gad and Aspenstrom, 2010), their expression pattern in the developing cerebral cortex has not been described.

Among the atypical Rho GTPases, the expression profile of Rnd members in the developing cerebral cortex has been the most well-characterized (Figure 3). At E14.5, *Rnd1* mRNA levels are very low in the cortex but they gradually increase to peak at post-natal stages (Ishikawa et al., 2003). Conversely, the expression of *Rnd2* and *Rnd3* is high in the embryonic cerebral cortex but show different distribution in the cortical domains (Figure 3) (Azzarelli et al., 2014). *RhoV* mRNA is expressed in the human fetal brain (Katoh, 2002) and *RhoU* mRNA is found in the adult human cerebral cortex (Kirikoshi and Katoh, 2002) but their expression in the developing cerebral cortex has not been explored. Like Rac2, the expression of RhoH is restricted to hematopoietic stem cells (Troeger and Williams, 2013). Finally, the three members of the RhoBTB subfamily are expressed in the brain with *RhoBTB3* showing the highest expression levels in the adult tissue (Ramos et al., 2002). However, RhoBTB3 is not included in the Rho GTPase family since it does not seem to have a GTP-binding domain, at least it does not contain a consensus GTP-binding motif (Aspenstrom et al., 2007).

Rho GTPases AND REGULATION OF CORTICAL PROJECTION NEURON DEVELOPMENT

Rho GTPases AND REGULATION OF ADHERENS JUNCTION INTEGRITY

Like NEs, RGs are highly polarized along their apico-basal axis. They are attached to the luminal surface of the ventricle on their apical side, where they form adherens junctions (AJs) with neighboring RGs (Figure 4, ①), and to the basal lamina via integrins (Gotz and Huttner, 2005). Their cell bodies are retained within the ventricular zone (VZ), a defined region next to the ventricles. AJs between RGs maintain VZ integrity and cortical architecture as well as RG behavior by anchoring a variety of proteins (N-cadherin, β -catenin, α E-catenin) to the actin cytoskeleton (Gotz and Huttner, 2005).

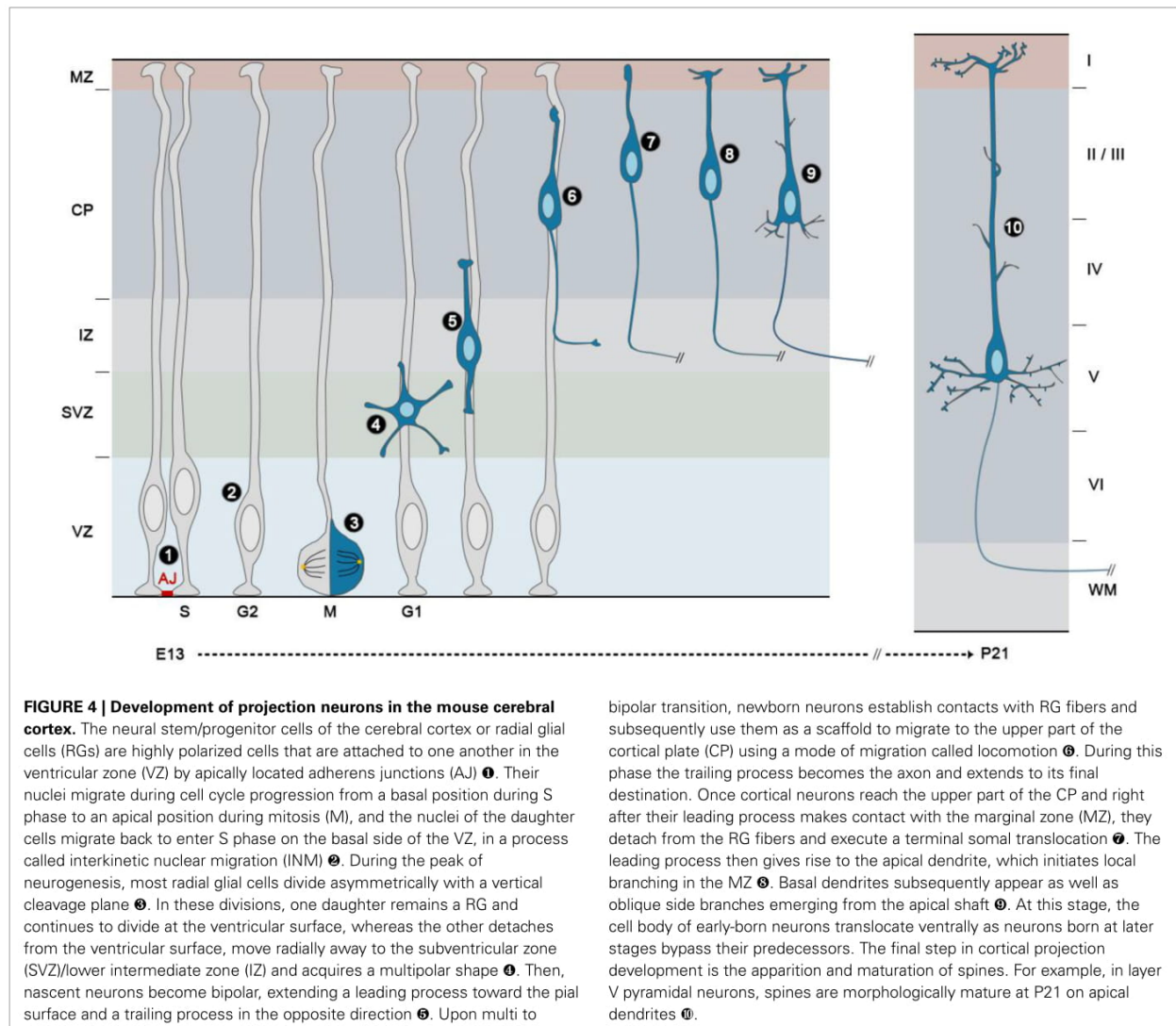
RhoA plays a critical role in the maintenance of these adherens junctional complexes. Indeed, the deletion of *RhoA* by *FoxG1^{Cre}* (Katayama et al., 2011) or *Emx1-Cre* mediated recombination (Cappello et al., 2012) leads to a disorganization of the VZ surface and to a loss of catenin expression at the apical surface around E14.5. In these mutants, rings of intense catenin expression are instead observed inside the brain mass (Katayama et al., 2011; Cappello et al., 2012). Similarly, perturbation of Rho by

electroporation either with the RhoA/B/C inhibitor C3 transferase or with *RhoA*, *RhoB*, *RhoC* shRNAs impairs the apical actin filament belt and the apico-basal polarity of electroporated cells (Thumke et al., 2011). Expression of dominant-active Rho also affects the actin structure and the apical localization of N-cadherin, suggesting that balanced Rho activity is necessary for maintaining AJ integrity in RGs (Thumke et al., 2011) (Table 1). While Rho is essential for the maintenance, Cdc42 seems to be essential for the initial formation of apical AJs since the disappearance of apical proteins (PAR6, aPKC, E-cadherin, β -catenin, F-actin and Numb) as well as the apico-basal polarity occurs as early as E10.5 in *FoxG1^{Cre} Cdc42* null embryos (Chen et al., 2006). A similar phenotype is found after deletion of *Cdc42* by *Emx1^{Cre}* or *Nestin-Cre* mediated recombinations (Cappello et al., 2006; Garvalov et al., 2007; Peng et al., 2013) (Table 1). Although Rac1 and Cdc42 share many effectors, junction formation and cell polarity during cerebral cortex development specifically require Cdc42 but not Rac1. In Rac1 mutants, VZ progenitors are not tightly packed or radially oriented as in controls. However, this phenotype is not due to an alteration of VZ progenitor polarity since the loss of *Rac1* does not affect the expression pattern of β -catenin and cadherin (Leone et al., 2010). Accordingly, the expression of phosphorylated PAK (p21-activated kinase), which is a direct downstream effector of both Rac1 and Cdc42, at the apical surface of VZ progenitors is affected by the loss of *Cdc42* but not *Rac1* (Leone et al., 2010), further demonstrating that these two Rho GTPases perform non-overlapping and non-redundant functions in the VZ. More recently, the atypical Rho GTPase Rnd3 has also been shown to maintain the integrity of the junctions between RGs through regulation of RhoA and the actin cytoskeleton (Pacary et al., 2013) (Table 1).

Rho GTPases AND REGULATION OF INTERKINETIC NUCLEAR MIGRATION

In addition to apico-basal polarity, another hallmark of NEs retained by RGs is interkinetic nuclear migration (INM), a process whereby nuclei change position along the apico-basal axis during the course of the cell cycle. In NEs, this INM spans the entire apical-basal axis of the cell, with the nucleus migrating to the basal side during the G1 phase of the cell cycle, staying at the basal side during S phase, migrating back to the apical side during the G2 phase and undergoing mitosis at the ventricular surface. In RGs, the same mitotic behavior occurs, except that is confined to the portion of the cell in the VZ (Figure 4, ②). As a consequence of this movement, the neuroepithelium and the VZ appear pseudo-stratified (Taverna and Huttner, 2010). The precise role of INM during cortical neurogenesis is still an unresolved question. INM might allow packing an increasing number of progenitor cells within a limited ventricular surface or it might regulate progenitor fate by influencing the exposure of progenitor nuclei to proliferative vs. neurogenic signals (Taverna and Huttner, 2010; Spear and Erickson, 2012).

Both microtubule-based motors and actomyosin seem to participate in either direction of INM, although to a different extent depending on the system (Taverna and Huttner, 2010; Lee and Norden, 2013). In the developing cerebral cortex, a few studies have implicated the Rho GTPases in the regulation of this process.



In particular *Cdc42*, *Rac1*, and *Rnd3* have been shown to control the basal-to-apical movement. Indeed, this movement is delayed in *Cdc42* deficient mice (Cappello et al., 2006) or after electroporation of a dominant negative (DN) form of *Rac1* (Minobé et al., 2009) (Table 1). However, it is not known whether microtubule or actomyosin networks mediate the effects of *Rac1* and *Cdc42*. In contrast, the impairment of basal to apical INM after *Rnd3* silencing in the embryonic cerebral cortex is rescued by co-expression of a constitutively active form of cofilin (cofilin^{S3A}), demonstrating that *Rnd3*-mediated disassembly of actin filaments coordinates the cellular behavior of RGs during INM at least during the apical nuclear movement (Pacary et al., 2013).

Rho GTPases AND REGULATION OF PROGENITOR CELL DIVISION, PROLIFERATION AND CELL FATE

At early stages of corticogenesis, NEs divide symmetrically to self-renew and expand their pool. Following the transition to the

RG fate, some progenitor cells begin to divide asymmetrically to generate neurons directly or indirectly through the production of IPs or oRGs (Laguesse et al., 2014).

After their generation by asymmetric division of RGs, IPs, also called basal progenitors, retract their apical and basal processes, exhibit a multipolar morphology and migrate basally (Figure 4, ❸ and ❹) before they undergo mitosis. This second pool of proliferative progenitors undergo one or more symmetric cell divisions (Noctor et al., 2004), which significantly increases the yield of cortical neurons derived from a single RG. The accumulation of these dividing progenitors in basal regions starts around E13 and it determines the formation of the subventricular zone (SVZ). Whereas NEs and RGs express identical markers like the transcription factor *Pax6* (Gotz et al., 1998), IPs are identified by the absence of *Pax6* and by the expression of the transcription factor *Tbr2* (Englund et al., 2005).

Table 1 | Regulation of cortical projection neuron development by Rho GTPases (*in vivo* studies).

Rho GTPase	Genetic modification	Analysis	Cortical phenotype(s)	References
ADHERENS JUNCTION INTEGRITY				
RhoA	<i>RhoA</i> cKO x <i>FoxG1</i> ^{Cre}	E14.5	Disorganization of VZ surface, loss of α E-catenin apical expression	Katayama et al., 2011
	<i>RhoA</i> cKO x <i>Emx1</i> -Cre	E12-E14	Loss of β -catenin, pan-cadherin, Par-3 apical expressions; disorganized arrangement of radial glia somata and processes	Cappello et al., 2012
RhoA, B, C	<i>C3-GFP</i> (E15)	E16	Loss of apico-basal polarity (round cells with abnormal processes projecting in random positions); disruption of VZ architecture, loss of apical actin filament belt and loss of apical localization of N-cadherin	Thumkeo et al., 2011
	shRNAs coelectroporation (E15)	E18	Impairment of actin belt and apico-basal polarity	Thumkeo et al., 2011
	<i>RhoV14-GFP</i> (E15)	E16	Loss of the apical process, of the actin filament belt and of apical N-cadherin expression	Thumkeo et al., 2011
Cdc42	<i>Cdc42</i> cKO x <i>FoxG1</i> ^{Cre}	E10.5	Loss of PAR6, aPKC, E-cadherin, β -catenin, F-actin and Numb apical expressions; loss of apico-basal polarity in neuroepithelial cells	Chen et al., 2006
	<i>Cdc42</i> cKO x <i>Emx1</i> ^{Cre}	E11-E14	Loss of β -catenin, F-actin, Par complex protein expressions at the apical surface; loss of the apical process	Cappello et al., 2006
	<i>Cdc42</i> cKO x <i>Nestin</i> -Cre	E18.5	Disruption of the apical surface	Garvalov et al., 2007
		E14.5	Loss of apico-basal polarity in VZ	Peng et al., 2013
Rnd3	<i>Rnd3</i> shRNA (E14.5)	E15.5	Disruption of β -catenin, N-cadherin, F-actin and ZO-1 distribution at the ventricular surface; detachment of the apical process from the ventricular surface	Pacary et al., 2013
INTERKINETIC NUCLEAR MIGRATION				
Cdc42	<i>Cdc42</i> cKO x <i>Emx1</i> ^{Cre}	E10.5	Delay of basal to apical INM (BrdU pulse)	Cappello et al., 2006
	<i>Cdc42</i> cKO x <i>Nestin</i> -Cre	E16.5	Impairment of INM (BrdU pulse)	Peng et al., 2013
Rac1	<i>DN-Rac1</i> (E13.5)	E14.5	Delay of basal to apical INM (live imaging)	Minobe et al., 2009
Rnd3	<i>Rnd3</i> shRNA (E14.5)	E15.5	Delay of basal to apical INM (BrdU pulse)	Pacary et al., 2013
CORTICAL PROGENITOR PROLIFERATION				
RhoA	<i>RhoA</i> cKO x <i>FoxG1</i> ^{Cre}	E13.5	Expansion of Pax6 ⁺ progenitor pool	Katayama et al., 2011
		E14.5	Ki67 ⁺ progenitors are intermingled with post-mitotic neurons or form rosette-like structures	
	<i>RhoA</i> cKO x <i>Emx1</i> -Cre	E14.5	↑ total number of pHH3 ⁺ cells in the caudal part of the cortex	Cappello et al., 2012
		E16.5	↑ total number of pHH3 ⁺ cells the rostral part of the cortex	
		E14.5	Aberrant location of Pax6 ⁺ and Tbr2 ⁺ cortical progenitors	
Rac1	<i>Rac1</i> cKO x <i>FoxG1</i> ^{Cre}	E16.5-E18.5	↓ Ki67 ⁺ population; acceleration of cell-cycle exit	Chen et al., 2009
	<i>Rac1</i> cKO x <i>FoxG1</i> ^{Cre}	E14.5	↓ Tbr2 ⁺ population proliferation within the SVZ; premature cell cycle exit and differentiation of Tbr2 ⁺ progenitors	Leone et al., 2010
RhoG	<i>CA-RhoG</i> (E14)	E16	↑ Ki67 ⁺ cells	Fujimoto et al., 2009
	<i>RhoG</i> shRNA (E14.5)	E16	↓ Ki67 ⁺ cells	
Rnd3	<i>Rnd3</i> shRNA (E14.5)	E16.5	↑ Tbr2 ⁺ population; ↑ pHH3 ⁺ and Ki67 ⁺ cells in the SVZ	Pacary et al., 2013
CLEAVAGE PLANE ORIENTATION				
Rnd3	<i>Rnd3</i> shRNA (E14.5)	E15.5	↑ fraction of radial glial cells dividing with an oblique or horizontal cleavage plane	Pacary et al., 2013
CELL FATE				
Cdc42	<i>Cdc42</i> cKO x <i>Emx1</i> ^{Cre}	E14	Apical to basal fate conversion	Cappello et al., 2006

(Continued)

Table 1 | Continued

Rho GTPase	Genetic modification	Analysis	Cortical phenotype(s)	References
RADIAL MIGRATION				
Rac1	<i>Rac1cKO</i> x <i>FoxG1^{Cre}</i>	E18.5	Delay in radial migration	Chen et al., 2007
	<i>Rac1cKO</i> x <i>FoxG1^{Cre}</i>	E17	Laminar disorganization; disorganization of radial glia fibers	Leone et al., 2010
	<i>DN-Rac1</i> (E14.5)	E17	Cells fail to extend a leading process	Kawauchi et al., 2003
		P0, P4	Accumulation of cells in the IZ	
	<i>CA-Rac1</i> (E15.5)	P2	Cells fail to extend a leading process	Konno et al., 2005
	<i>DN-Rac1</i> (E15.5)	P2	Accumulation of cells in the IZ	
	<i>CA-Rac1</i> or <i>DN-Rac1</i> (E14.5)	E18.5	Accumulation of cells in the IZ	Yang et al., 2012a
	<i>Rac1</i> shRNA (E14.5)	E18.5	Accumulation of cells in the IZ; defect in the formation of the proximal cytoplasmic dilation in the leading process	Yang et al., 2012a
	<i>WT-Rac1</i> (E14.5)	E18.5	Promotion of neuronal migration	Yang et al., 2012a
Rnd2	<i>Rnd2</i> shRNA (E14.5)	E17.5	↓ fraction of cells reaching the CP; multipolar cells with longer processes in the IZ	Heng et al., 2008; Pacary et al., 2011
Rnd3	<i>Rnd3</i> shRNA (E14.5)	E17.5	↓ fraction of cells reaching the CP; multiple thin processes extending from the enlarged leading process in CP; impairment of the centrosome-nucleus coupling	Pacary et al., 2011
Cdc42	<i>CA-Cdc42</i> or <i>DN-Cdc42</i> (E15.5)	P2	Inhibition of radial migration	Konno et al., 2005
RhoA	<i>DN-RhoA</i> (E14.5)	E17.5	Promotion of neuronal migration	Nguyen et al., 2006
	<i>RhoA</i> shRNA (E14.5)	E17.5	Defects in neuronal migration	Pacary et al., 2011
	<i>WT-RhoA</i> or <i>RhoA S26A</i> (higher RhoA activity) (E14.5)	E17.5	Defects in neuronal migration	Tang et al., 2014
	<i>RhoAcKO</i> x <i>Emx1-Cre</i>	E17.5	Migration defects secondary to radial glia scaffold disruption; normal migration of mutant cells in a wild-type environment	Cappello et al., 2012
	<i>RhoAcKO</i> electroporation with Cre (E14)	E17	Faster migration	Cappello et al., 2012
	<i>RhoAcKO</i> electroporation with a fast cycling RhoA mutant (E14)	E17	Delay in migration	Cappello et al., 2012
AXON DEVELOPMENT				
Cdc42	<i>Cdc42cKO</i> x <i>Nestin-Cre</i>	E18.5	Few, short and sparse axonal tracts	Garvalov et al., 2007
	<i>Cdc42cKO</i> x <i>GFAP-Cre</i>	P0 P14	↓ or loss of axonal tracts Disruption of callosal axon growth and organization	Yokota et al., 2010
Rac1	<i>Rac1cKO</i> x <i>FoxG1^{Cre}</i>	E18.5	Absence of anterior commissure, failure of corpus callosal axons to cross the midline, defasciculation or projection defects of thalamocortical and corticothalamic axons	Chen et al., 2007
	<i>Rac1cKO</i> x <i>Emx1^{Cre}</i>	Adult	Impaired formation of fiber tracts in the corpus callosum and anterior commissure	Kassai et al., 2008
DENDRITE DEVELOPMENT				
Cdc42	pNeuroD1- <i>CA-Cdc42</i> (E15.5)	P23	↓ dendrite branching and complexity in layer II/III pyramidal neurons	Rosario et al., 2012
CELL DEATH				
RhoA	Mouse line expressing <i>DN-RhoA</i> in neurons	P5	↓ apoptosis in the somatosensory cortex	Sanno et al., 2010
		P65	↑ density and absolute number of neurons in the somatosensory cortex (projection neurons)	
Rac1	<i>Rac1cKO</i> x <i>FoxG1^{Cre}</i>	E14.5- E18.5	↑ active Caspase-3 ⁺ and TUNEL ⁺ cells	Chen et al., 2007
	<i>Rac1cKO</i> x <i>FoxG1^{Cre}</i>	E14.5- E17.5	↑ number of TUNEL ⁺ cells at E14.5 but no difference at E17.5	Leone et al., 2010

VZ: ventricular zone, SVZ: subventricular zone, IZ: intermediate zone, CP: cortical plate, INM: interkinetic nuclear migration, CA: constitutively active, DN: dominant-negative.

oRGs, also known as basal radial glia cells, were first discovered in human and ferret brains (Fietz et al., 2010; Hansen et al., 2010), and were initially proposed to be a specific feature of gyrencephalic brains. However, they have also been identified in the rodent brain, where they account for less than 10% of total cortical progenitors vs. 40% in human (Hansen et al., 2010; Wang et al., 2011), and in lissencephalic primate brains (Garcia-Moreno et al., 2012; Kelava et al., 2012). oRGs arise from the division of RGs as they delaminate from the apical surface and translocate their nuclei in the outer portion of the SVZ, where they start dividing. To note, this translocation of the soma along the basal fiber toward the CP, a process termed mitotic somal translocation, requires activation of the Rho effector ROCK (Ostrem et al., 2014). In contrast to IPs, oRGs maintain molecular characteristics of RGs such as expression of Pax6 and can divide either symmetrically to expand their number or asymmetrically to self-renew and give birth to new neurons (Hansen et al., 2010; Reillo et al., 2011).

The balance between proliferation and differentiation of these different categories of progenitors is tightly regulated and is fundamental for the generation of appropriate number of cortical neurons. Among the Rho GTPases, RhoA, Rac1, RhoG, and Rnd3 have a crucial role in the control of this balance. Indeed, conditional deletion of *RhoA* in cortical progenitors using *FoxG1^{Cre}* mice causes hyperproliferation, which results in the expansion of the progenitor pool and exencephaly-like protrusions (Katayama et al., 2011). Similarly, the loss of *RhoA* by *Emx1-Cre* mediated recombination increases proliferation in a region-specific manner within the cerebral cortex, starting at occipital regions at E14 and later at E16 in rostral parts, and this phenotype is associated with an aberrant location of Pax6+ and Tbr2+ progenitors (Cappello et al., 2012) (Table 1). In contrast to RhoA, the forebrain-specific loss of *Rac1* by *FoxG1^{Cre}* leads to a SVZ-specific reduction in proliferation, a concomitant increase in cell cycle exit and premature differentiation (Chen et al., 2009; Leone et al., 2010) (Table 1). How RhoA and Rac1 differently affect proliferation of cortical progenitors is not known. However, studies in other cellular systems have shown that RhoA and Rac1 influence the levels of cyclins during G1 progression. Interestingly, Rac1, but not Rho, stimulate cyclinD1 transcription when ectopically expressed in cells (Jaffe and Hall, 2005). In addition, RhoA might regulate proliferation of cortical progenitors during cytokinesis through its action on F-actin and myosin II into the actomyosin contractile ring (Marzesco et al., 2009) or through its action on actomyosin filaments at the cell cortex which influence mitotic spindles and the plane of cell division (see next paragraph) (Jaffe and Hall, 2005). Rnd3 has also been shown to control specifically the proliferation of basal progenitors via cyclinD1 but in an opposite manner, i.e., *Rnd3* silencing increases SVZ proliferation (Pacary et al., 2013). Finally, RhoG, another Rac-related Rho GTPase expressed in the VZ/SVZ (Figure 3), also promotes neural progenitor cell proliferation in the mouse cerebral cortex (Table 1) through phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) signaling (Fujimoto et al., 2009).

In the developing cerebral cortex, cleavage plane orientation remains predominantly vertical (planar division) during the period of symmetrical division prior to neurogenesis, and throughout the period of asymmetrical division during

neurogenesis (Figure 4, ④) (Morin and Bellaiche, 2011). In these asymmetric divisions, one daughter remains a RG and continues to divide at the ventricular surface, whereas the other loses its apical attachment and becomes an IP. Fewer RGs undergo oblique or horizontal divisions, and these divisions have been proposed to generate oRGs (Morin and Bellaiche, 2011; Shitamukai and Matsuzaki, 2012).

In the mouse cerebral cortex, *Rnd3* is required to maintain the vertical orientation of the cleavage plane during RG divisions. Indeed, when *Rnd3* is knockdown the fraction of RGs dividing with an oblique or horizontal cleavage plane is increased (Pacary et al., 2013). Interestingly *Rnd3*-silenced cells prematurely leave the VZ, enter the SVZ while transiently maintaining their radial glial molecular phenotype, thus showing similarities with oRGs (Pacary et al., 2013). In addition, co-electroporation of cofilin^{S3A} restores vertical cleavage-plane orientation in *Rnd3*-silenced progenitors, thus indicating that *Rnd3* maintains the vertical orientation of apical divisions by remodeling the actin cytoskeleton (Pacary et al., 2013). RhoA might be also important to determine the orientation of cortical progenitor divisions as suggested by a study in the chick neuroepithelium, in which the expression of a DN form of RhoA results in random spindle orientation (Roszko et al., 2006). Inversely, deletion of *Cdc42* does not influence spindle orientation in the developing cerebral cortex (Cappello et al., 2006). However, as mentioned previously, the loss of *Cdc42* causes defects in apical process maintenance, thereby leading to an increased number of progenitors dividing at basal rather than apical positions. These progenitors convert to an SVZ fate as shown by the increase of Tbr2+ progenitors and a decrease of Pax6+ population in the mutants, which ultimately leads to a higher rate of neuron generation (Cappello et al., 2006).

Rho GTPases AND REGULATION OF RADIAL MIGRATION

After detachment from the ventricular surface in the VZ, nascent neurons move radially away to the SVZ/lower intermediate zone (IZ), where they acquire a multipolar shape (Figure 4, ④). During this phase, multipolar neurons actively extend and retract dynamic processes and tend to migrate tangentially in an apparent random fashion (Noctor et al., 2004; Jossin and Cooper, 2011). Then, neurons become bipolar, extending a leading process toward the pial surface and a trailing process in the opposite direction (nascent axon) (Figure 4, ⑤). Upon multi to bipolar transition, neurons establish dynamic contacts with RG fibers and subsequently use them as a scaffold to migrate to the upper part of the CP using a mode of migration called locomotion (Figure 4, ⑥). This movement is characterized by repetitive cycles of synchronized steps. First, a cytoplasmic dilation forms in the proximal region of the leading process. Second, the centrosome moves toward the swelling and finally the nucleus translocates toward the centrosome, a process known as nucleokinesis. This migration cycle then starts again conferring a saltatory advancement to the locomoting neurons. Finally, once cortical neurons have reached the uppermost area of the CP and right after their leading process makes contact with the MZ, they detach from the RG fibers and execute a terminal somal translocation to settle in their appropriate final position (Figure 4, ⑦) (Nadarajah et al., 2001). Rac1, Rnd2, and Rnd3 are three Rho GTPases with specific functions

in the control of the migratory process in the developing cerebral cortex: Rac1 signaling regulates leading process formation (Kawauchi et al., 2003; Konno et al., 2005), Rnd2 is critical for the multi to bipolar transition (Heng et al., 2008; Pacary et al., 2011) and Rnd3 is important for nuclear-centrosome coupling during locomotion (Pacary et al., 2011).

Conditional knockout of *Rac1* in the forebrain, *in utero* electroporation of DN or constitutively active (CA) forms of Rac1 as well as *Rac1* shRNA or wild-type Rac1 have demonstrated a requirement for this Rho GTPase in radial migration (Kawauchi et al., 2003; Konno et al., 2005; Chen et al., 2007; Kassai et al., 2008; Yang et al., 2012a). *Rac1* deletion using the *FoxG1^{Cre}* (Chen et al., 2007) or *Emx1^{Cre}* line (Kassai et al., 2008) disturbs radial migration, but the defects observed in these mice are less severe than those observed after electroporation of the DN form of Rac1 (N17-Rac1). While the migration of nascent neurons seems to be only delayed in the mutants, the inhibition of Rac1 activity with N17-Rac1 leads to an accumulation of electroporated cells in the IZ (Kawauchi et al., 2003; Konno et al., 2005; Yang et al., 2012a). In addition, N17-Rac1 expressing cells in this cortical domain fail to extend a leading process and are instead round, with short and irregular processes (Kawauchi et al., 2003). Interestingly, the electroporation of CA-Rac1 (*V12Rac1*) induces a similar phenotype (Konno et al., 2005; Yang et al., 2012a) indicating that cycles of Rac1 activation and inactivation and thus a fine regulation of Rac1 activity is important for proper morphological polarization and migration. The difference obtained between conditional knockout mice and the electroporation of dominant mutant might reflect the ability of this mutant as well as of CA mutant to interfere with the activity of other Rho GTPases, possibly through the competitive binding with regulators like RhoGDIs (Boulter et al., 2010). Nevertheless, the requirement of Rac1 for proper radial migration has been further confirmed recently with *Rac1* shRNA (Yang et al., 2012a). Indeed, the silencing of *Rac1* blocks radial migration and disrupts the formation of the proximal cytoplasmic dilation in the leading process of migratory cortical neurons (Yang et al., 2012a). Interestingly, in this study, the authors also show that electroporation of wild-type *Rac1* promotes neuronal migration and that POSH, a Rac1-interacting scaffold protein, recruits activated Rac1 to the plasma membrane. At this site, activated Rac1 regulates actin remodeling and controls the dilation of the leading process, two key events that promote centrosomal movement and soma translocation (Yang et al., 2012a). To note, another report provides the evidence that migration defects caused by loss of *Rac1* in *Foxg1^{Cre}* mice may be due, at least in part, to defects in radial glial organization (Leone et al., 2010).

In vivo loss of function studies on the atypical Rho GTPase Rnd3 revealed that its knockdown in migrating neurons results in enlarged leading processes with numerous branches and increases centrosome-nucleus distance in the CP, indicative of disrupted nuclear-centrosome coupling during locomotion (Pacary et al., 2011). In contrast, *Rnd2*-deficient neurons fail to leave the IZ and display long processes at the multipolar stage, suggesting that Rnd2 is critical for the multipolar to bipolar transition that occurs in the IZ (Heng et al., 2008; Pacary et al., 2011). In addition, the two proteins fail to compensate for each other during neuronal

migration, further indicating that they play distinct roles in this process (Pacary et al., 2011). Despite these different functions, both Rnd2 and Rnd3 regulate neuronal migration by inhibiting RhoA. Indeed, FRET analysis *in vivo* showed that *Rnd2* or *Rnd3* silencing increases RhoA activity in cortical cells and *RhoA* knockdown rescues the migratory defects associated with *Rnd2* or *Rnd3* loss of function. The inhibitory effect of Rnd3 on RhoA activity depends on its interactions with p190RhoGAP, whereas Rnd2's RhoA inhibitory activity does not. Further, although both Rnd2 and Rnd3 regulate actin dynamics in migrating neurons, only Rnd3 promotes neuronal migration by inhibiting RhoA-mediated actin polymerization and remodeling (Pacary et al., 2011). Interestingly, the distinct subcellular localization of Rnd2 and Rnd3 and the resultant modulation of RhoA activity in different cell compartments underlie the difference in their effects. Rnd3 owes its distinct role in neuronal migration to its localization and interaction with RhoA at the plasma membrane. Rnd2 is expressed in early endosomes and can replace Rnd3 in migrating neurons if it is targeted to the plasma membrane by replacement of its carboxyl-terminal domain with that of Rnd3 (Pacary et al., 2011). However, the mechanisms by which Rnd2 promotes neuronal migration and inhibits RhoA remains unknown. The finding that Rnd3 and Rnd2 control different phases of radial migration by inhibiting RhoA in different cell compartments suggests that in cortical neurons, RhoA acts dynamically in different cellular domains to control different aspects of the migratory process.

The functions of the other most studied members of the Rho GTPase family, RhoA and Cdc42, in the control of radial migration are less well-understood. When DN-Cdc42 (*N17Cdc42*) or CA-Cdc42 (*V12Cdc42*) are electroporated *in utero*, radial migration is inhibited but this effect is not as strong as that seen with DN-Rac1 or CA-Rac1 (Konno et al., 2005). In addition, the role played by Cdc42 in migrating neurons might be different from that of Rac1 since the former is mainly localized to the perinuclear region on the side of the leading process whereas the latter is expressed at the plasma membrane (Konno et al., 2005). Similarly, strict regulation of RhoA levels and activity appear to be required for radial migration *in vivo* (Nguyen et al., 2006; Pacary et al., 2011; Cappello et al., 2012; Azzarelli et al., 2014; Tang et al., 2014). The general view proposes that RhoA activity must be down-regulated to promote radial migration of pyramidal neurons. However, the analysis of *RhoA* knockout using *Emx1-Cre* suggests that RhoA is dispensable for radial migration. In this mutant, the deletion of *RhoA* generates migration defects that are only secondary to radial glia scaffold disruption. Indeed, when *RhoA* knockout cells are transplanted in a wild type environment, they migrate normally, suggesting that there is no cell-autonomous requirement for RhoA activity during radial migration (Cappello et al., 2012). How to reconcile the data showing the requirement of RhoA for radial migration with the fact that *RhoA*-depleted neurons normally migrate in a wild type environment is still an open question. One possibility is that compensatory mechanisms might occur to replace RhoA function in *RhoA* conditional knockout cortices. Indeed, it has been shown that the related GTPase RhoB is strongly up-regulated in the absence of RhoA (Ho et al., 2008). RhoB and RhoC might substitute for RhoA

activity during cortical neuron migration. These compensatory mechanisms may be in operation only when *RhoA* expression is completely abrogated by knockout deletion.

Rho GTPases AND REGULATION OF NEURONAL POLARIZATION

Cortical neurons exist in a number of different shapes and sizes, although a mature neuron typically has several dendrites that receive inputs from presynaptic neurons and one axon that relays information to post-synaptic neurons. The formation of axon-dendrite polarity is thus crucial for a neuron to establish the precise information flow within the brain. Axons and dendrites differ in morphology, function, and protein and organelle composition. Although the development of these processes has been studied extensively *in vitro* using cultured embryonic hippocampal neurons, the corresponding developmental processes *in vivo* are still unclear. During corticogenesis, early electron microscopic studies revealed that projection neurons initiate their axons during migration whereas significant dendrite growth occurs after the cells have reached their final position (Shoukimas and Hinds, 1978).

Rho GTPases and regulation of axon formation, growth, guidance and branching

Time-lapse imaging revealed that multipolar cells in the IZ, after extending and retracting their short processes for several hours, suddenly elongate a long process tangentially. These cells then transformed into a bipolar shape, extending a pia-directed leading process (future apical dendrite), and migrate radially leaving the tangential process behind, forming an “L-shaped” axon (Figure 4, 6) (Hatanaka and Yamauchi, 2013). Thus, during migration, the trailing process becomes the axon and extends while being guided to its final destination. Interestingly, a recent study has shown that the interaction between multipolar cells and the preexisting axons of early-born neurons is critical for axon specification. Indeed, once one of the neurites of a multipolar cell contacts the pioneering axons from the early-born cortical neurons, this neurite is stabilized, becomes the axon and extends rapidly (Namba et al., 2014). The duration of axon elongation is however variable according to the targeted area, which is more or less distant according to the final layer position of the cortical neuron (Molyneaux et al., 2007). For example, axons of corticofugal neurons in layer V reach the spinal cord around postnatal day P7 in mouse. Finally, upon reaching its target area, extensive axonal branching occurs during the formation of presynaptic contacts with specific post-synaptic partners (during the second and third postnatal week in the mouse cortex) (Lewis et al., 2013).

The regulation of axon development by Rho GTPases has been mainly studied *in vitro* and reviewed elsewhere (Govek et al., 2005; Hall and Lalli, 2010). However, their specific roles *in vivo* are less well-understood. *Cdc42* seems however to be clearly required during cerebral cortex development for the efficient establishment of axonal polarity and growth. Indeed, cortices of *Cdc42* conditional knockout mice crossed with *Nestin-Cre* mice exhibit a widespread reduction of axonal tracts (Garvalov et al., 2007). This phenotype is accompanied by a specific increase in the phosphorylation (inactivation) of the *Cdc42* effector cofilin (Garvalov et al., 2007). The axonal defects in *Cdc42* knockouts might be

due to the increased levels of inactive cofilin since the deletion of this actin depolymerizing protein results in polarity defects analogous to the ones seen after *Cdc42* ablation (Flynn et al., 2012). In agreement with these data, the growth and organization of callosal axonal fiber tracts are also disrupted in *Cdc42* deficient mice obtained after mating *Cdc42* floxed mice with *hGFAP-Cre* line (Yokota et al., 2010). In addition to *Cdc42*, a role for *Rnd2* in cortical axon extension has been suggested in a study showing that COUP-TFI, a transcription factor crucial for corticogenesis and arealization, promotes callosal axon elongation by finely regulating *Rnd2* expression levels (Alfano et al., 2011).

In contrast to *Cdc42*, the loss of *Rac1*, using *Foxg1-Cre* mice, does not prevent axonal outgrowth in cortical neurons (Chen et al., 2007). However, in these mutants, the anterior commissure is absent, and the axons of the corpus callosum and the hippocampal commissure fail to cross the midline. A similar phenotype is observed in *Rac1/Emx1^{Cre}* knockout mutants (Kassai et al., 2008), demonstrating that *Rac1* controls axon guidance rather than neuritogenesis. In addition, the thalamocortical and corticothalamic axons show defasciculation or projection defects in *Rac1/FoxG1-Cre* mutants (Chen et al., 2007), whereas corticospinal and corticothalamic projections are not affected in *Rac1/Emx1^{Cre}* mice (Kassai et al., 2008). This phenotypic discrepancy might be due to the different pattern of *Cre* expression in these two *Rac1* mutants. Indeed, in *FoxG1-Cre* mice, the recombinase is expressed in other regions than the telencephalon such as the thalamus (Hebert and McConnell, 2000) which might affect the development of thalamocortical projections. To note, *Rac3*, the other member of the *Rac* subfamily expressed in the brain, does not seem to have redundant functions with *Rac1* since *Rac3* knockouts do not show any obvious developmental defects in the cortex (Corbetta et al., 2005).

The *in vivo* role of *RhoA* in cortical axon development has not been thoroughly examined but the cortical axons in *RhoA/Emx1-Cre* knockout mutants show correct morphology and projections (Cappello et al., 2012). Nevertheless, *RhoA* might act as a mediator for activity-dependent branch formation as suggested by a study performed in cortical explants (Ohnami et al., 2008).

RhoGTPases and dendrite/spine formation

In contrast to the axon, dendrites in cortical neurons form after migration ends. These structures are highly branched and this feature gives them the appearance of a tree. Initially, all excitatory cortical neurons exhibit the common shape of “pyramid,” which is characterized by a prominent apical dendrite. This first dendrite derives from the leading process and branches out in an apical tuft that terminates in layer I (Figure 4, 8). With time, basal dendrites appear as well as oblique side branches emerging from the apical shaft (Figure 4, 9) (Whitford et al., 2002). The dendritic trees and consequently the overall neuronal shapes vary greatly within the cortex, with neurons of layers II, III, V, and VI acquiring a pyramidal morphology, whereas those of layer IV predominantly having non-pyramidal morphologies. Therefore, even if the initial stages of dendrite formation are very similar, further maturation determines the final neuronal morphology. For example, spiny stellate neurons in layer IV start out with a pyramidal morphology, but then acquire a stellate morphology, by

retracting their apical dendrite at an early postnatal age (Vercelli et al., 1992).

The final step in the acquisition of a mature dendritic morphology is the development of spines (Figure 4, ⑩). These small dendritic protrusions, which contain receptors and other proteins necessary for synaptic transmission, begin to appear in the first postnatal week in mice, when the arborization of the apical and basal dendrites becomes more complex. When pyramidal neurons reach their mature morphology, they have a highly complex dendritic arbor and are covered with spines. The timing of spine development is variable among neurons that occupy different layers or cortical areas (Huttenlocher and Dabholkar, 1997; Whitford et al., 2002).

The role of Rho GTPases in dendrite and spine formation has been mainly addressed in culture. By manipulating Rho, Rac1, and Cdc42 activities in a number of experimental systems, it has become clear that each of these Rho GTPases plays a prominent role in the development of dendrite structure and that interplay between them determines the complexity of the dendritic tree (Newey et al., 2005). Studies are generally consistent with a key role for RhoA in controlling dendritic length and for Rac and Cdc42 in regulating dendrite branching and remodeling. More precisely, RhoA activation has a negative effect on dendritic arbor growth, whereas Rac1 and Cdc42 activation promote this process. Similarly, RhoA inhibits, whereas Rac1 and Cdc42 promote spine formation and maintenance (Newey et al., 2005). However, considering the large body of *in vitro* work, it is surprising how little is known about their roles *in vivo* in the context of cortical development. To our knowledge, only one study has addressed this role directly *in vivo*. Rosario and colleagues have shown that *in utero* electroporation of a CA form of Cdc42 under the control of the post-mitotic promoter NeuroD1 decreases dendrite branching and complexity in layer II/III pyramidal neurons at postnatal stages (Rosario et al., 2012). The other evidences are indirect and come from *in vivo* studies showing involvement of Rho GTPase regulators, namely GAPs and GEFs, in this process. These regulators include GAPs, such as NOMA-GAP, srGAP2 (also called FNBP2), Myo9b and RICS, as well as GEFs like kalirin (see Section Upstream Regulators of Rho GTPases and Cortical Projection Neuron Development and Table 2).

Rho GTPases AND REGULATION OF CORTICAL NEURON DEATH/SURVIVAL

Programmed neuronal cell death, or apoptosis, is essential for proper cerebral cortex development, resulting in the refinement of nascent neuronal innervation and network formation (Nikolic et al., 2013). In the mouse, neuronal apoptosis takes place in the first 30 postnatal days, with a peak at P5, mostly pronounced in cortical layers II–IV. This wave of apoptosis accounts for a loss of approximately 30% of neuronal content in the cerebral cortex from birth to adulthood (Heumann et al., 1978; Heumann and Leuba, 1983).

Among the Rho GTPases, RhoA is of particular interest with respect to regulation of postnatal apoptosis in the cerebral cortex. Indeed, by engineering a mouse line in which a dominant-negative RhoA mutant (N19-RhoA) is specifically expressed in neurons, Sanno and colleagues have demonstrated that the

inhibition of RhoA activity reduces the amount of apoptosis occurring in the postnatal cortex and results in a concomitant increase in the density and absolute number of neurons in the adult cortex (Sanno et al., 2010). Interestingly, the change in neuronal density in the N19-RhoA cortex is attributable to an increase in the number of excitatory projection neurons and not in that of the interneuron population, which originates in the ventral telencephalon (Sanno et al., 2010).

Besides the well-established programmed cell death naturally occurring in the postnatal brain, more recent studies indicate the existence of an earlier wave of programmed cell death affecting neural progenitors and nascent neurons (Yeo and Gautier, 2004). This early wave of cell death appears to play an even more critical role in determining the final size of the brain (de la Rosa and de Pablo, 2000; Kuan et al., 2000). In mouse, this death occurs between E12 and E16 within the VZ and IZ of the cerebral cortex (Blaschke et al., 1996, 1998; Thomaidou et al., 1997). Interestingly, the forebrain specific deletion of *Rac1* mediated by *FoxG1^{Cre}* enhances apoptosis in VZ and SVZ progenitors, mainly around E14.5 (Chen et al., 2009; Leone et al., 2010); this effect partially contributes to a decrease in neural progenitors observed during mid-to-late telencephalic development (Chen et al., 2009). While Rac1 is required for survival of both VZ and SVZ progenitors, Cdc42 plays a dispensable role in cell survival during corticogenesis, as indicated by a comparable number of apoptotic cells in the cortex of control mice and *Cdc42/Nestin-Cre* knockout mutants (Peng et al., 2013).

UPSTREAM REGULATORS OF Rho GTPases AND CORTICAL PROJECTION NEURON DEVELOPMENT

A number of *in vivo* studies showing involvement of GEFs and GAPs in cortical projection neuron development further support a critical role of the Rho GTPase family in this process and are summarized in Table 2. Studying the functions of GAPs and GEFs not only provides an indirect way to clarify the roles played by Rho GTPases in specific steps of corticogenesis, but it also contributes to the overall understanding of the entire pathways activated downstream of Rho proteins. For example, the loss of NOMA-GAP, a Cdc42-specific GAP, leads to an oversimplification of cortical dendritic arborization, as well as an hyperactivation of Cdc42. Remarkably, these dendritic defects can be partially restored by genetic reduction of post-mitotic *Cdc42* levels, demonstrating that the post-mitotic inhibition of Cdc42, mediated by NOMA-GAP, is a necessary requirement for dendritic branching during cortical development (Rosario et al., 2012). In this study, the authors further show that *in utero* expression of active cofilin is sufficient to restore postnatal dendritic complexity in *NOMA-GAP*-deficient animals. Therefore, these data support a model, whereby, during cortical dendritic development, cofilin activation is positively regulated by NOMA-GAP through the inhibition of Cdc42 (Rosario et al., 2012). Interestingly, only the dendritic complexity of layer II/III neurons is affected by the genetic ablation of *NOMA-GAP*, whereas layer V pyramidal neurons develop normal dendrites. How *NOMA-GAP* regulates dendrite development only in specific layers, although this GAP is expressed in all cortical layers (Rosario et al., 2012), is still an open question. It is possible that other Cdc42-GAPs, which

Table 2 | Regulation of cortical projection neuron development by GAPs and GEFs (*in vivo* studies).

Genetic modification	Analysis	Cortical phenotype(s)	References
Rho GAPs			
Myo9b: Myo9b regulates dendrite development			
Myo9b miRNA (E15.5)	P3	↓ dendrite length and number in layer II/III pyramidal neurons	Long et al., 2013
p190-A Rho GAP: p190RhoGAP regulates cortical axon development			
p190-A RhoGAP KO	E17.5	Agenesis of the corpus callosum (failure of callosal axons to cross the midline), absence of anterior and hippocampal commissures	Brouns et al., 2000
	E16.5	Defects in axon outgrowth, guidance and fasciculation	Brouns et al., 2001
p190-B Rho GAP: p190-B Rho GAP regulates cortical axon development			
p190-B RhoGAP KO	E18.5	Deficits in the formation of the corpus callosum and anterior commissure; deficits in neuronal differentiation	Matheson et al., 2006
RICS: RICS regulates dendrite development			
RICS miRNA (E15.5)	P3	↓ dendrite length and number in layer II/III pyramidal neurons	Long et al., 2013
Rac GAPs			
α2-Chimaerin: α2-Chimaerin regulates corticospinal axon guidance			
α2-Chimaerin KO	Adult	Inappropriate midline crossing of corticospinal axons in the spinal cord	Beg et al., 2007; Wegmeyer et al., 2007
srGAP2: srGAP2 regulates radial migration, promotes spine maturation and limits spine density			
srGAP2 shRNA (E14.5)	E18.5	Acceleration of radial migration, ↓ leading process branching	Charrier et al., 2012
srGAP2 KO x Thy1-YFP	P18-P21	↓ width of spine heads, ↑ length of spine necks in apical oblique dendrites of layer V pyramidal neurons; ↑ density of dendritic spines	Charrier et al., 2012
Cdc42 GAPs			
NOMA-GAP: NOMA-GAP regulates dendrite complexity			
NOMA-GAP KO	E18.5, P5	Weak cortical MAP2 staining particularly in upper layers	Rosario et al., 2012
	Adult	↓ dendrite complexity in layer II/III pyramidal neurons (no modification in layer V)	
Rho GEFs			
Lfc (RhoA GEF): Lfc regulates cortical progenitor proliferation, neuronal production and mitotic spindle orientation			
Lfc shRNA (E13.5)	E15.5	↑ Ki67 ⁺ , ↑ Pax6 ⁺ and ↓ Tbr2 ⁺ electroporated cells	Gauthier-Fisher et al., 2009
	E15.5–24 h after BrdU injection	↑ BrdU ⁺ Ki67 ⁺ electroporated cells	
	E16	↑ apical cell divisions with a vertical plane of division	
	E17.5, P3	↓ HuD ⁺ and ↓Tuj1 ⁺ electroporated cells	
Rac/Cdc42 GEFs			
DOCK7 (Rac/Cdc42 GEF): DOCK7 regulates cortical progenitor proliferation, neuronal production and INM			
DOCK7 shRNA (E13.5)	E15.5–2 h after BrdU injection	↑ BrdU ⁺ and ↑ pHH3 ⁺ electroporated cells in the VZ; ↑ BrdU ⁺ nuclei at the apical surface	Yang et al., 2012a
	E15.5–15 min, 2, 4 or 6 h after BrdU injection	Acceleration of basal to apical INM	
	E15.5–24 h after BrdU injection	↑ BrdU ⁺ Ki67 ⁺ electroporated cells	
	E15.5	↑ PAX6 ⁺ and ↓ Tbr2 ⁺ electroporated cells	
	P1.5	↓ Tuj1 ⁺ electroporated cells	
DOCK7 overexpression (E13.5)	E15.5–2 h after BrdU injection	↓ BrdU ⁺ and pHH3 ⁺ electroporated cells in the VZ; ↑ BrdU ⁺ nuclei on the basal side of VZ	
	E15.5–15 min, 2, 4 or 6 h after BrdU injection	Delay of basal to apical INM; ↑ BrdU ⁺ pHH3 ⁺ cells at basal positions	
	E15.5–24 h after BrdU injection	↑ BrdU ⁺ Ki67 ⁺ electroporated cells	
	E15.5	↑ PAX6 ⁺ and ↓ Tbr2 ⁺ electroporated cells	
	P1.5	↓ Tuj1 ⁺ electroporated cells	

(Continued)

Table 2 | Continued

Genetic modification	Analysis	Cortical phenotype(s)	References
Kalirin (Rac GEF): Kalirin regulates dendrite complexity and spine stability			
<i>Kalirin</i> KO	Adult (12 week old)	↓ spine density on oblique dendrites in layer V pyramidal neurons of the frontal cortex (no modification at 3 week old)	Cahill et al., 2009
	Adult (3 month old)	↓ dendrite branching and complexity in layer V pyramidal neurons	Xie et al., 2010
P-Rex1 (Rac GEF): P-Rex1 regulates radial migration			
<i>DN-like P-Rex1</i> (E14)	P0	Accumulation of electroporated cells in the IZ	Yoshizawa et al., 2005
Tiam1 (Rac GEF): Tiam1 regulates radial migration			
<i>DN-Tiam1</i> (E14.5)	P0, P4	Accumulation of electroporated cells in the IZ	Kawauchi et al., 2003

are selectively expressed in the unaffected layers, might substitute for the loss of *NOMA-GAP* function. Alternatively, some neurons might be more sensitive to *NOMA-GAP* activity, because they exhibit higher active Cdc42 levels, which could be the result of layer-specific environmental signals or differentially expressed Cdc42-GEFs.

One difficulty with these studies is to determine whether the phenotype observed is due to the inhibition or activation of a specific Rho GTPase or of several members, since these regulators usually show activity against multiple Rho GTPases. For instance, RICS has been classified in **Table 2** as a Rho GAP, because the defects on dendrites induced by RICS knockdown are rescued by an inhibition of RhoA signaling (Long et al., 2013) and might thus be due to a modulation of Rho activity. However, it has been shown that RICS prefers Cdc42 over Rac1 or RhoA as a substrate (Simo and Cooper, 2012). Also, it is important to remember that some of the phenotypes described in **Table 2** might not be related to the GAP or GEF activity itself, but other protein domains might be involved. For example, α 2-chimaerin, a Rac-GAP, has been shown to regulate radial migration, not through its GAP activity, which is instead dispensable, but through the association with the microtubule-associated protein CRMP-2 (Ip et al., 2012). Similarly, DOCK7 is a Rac-GEF that controls INM independently of its GEF activity (Yang et al., 2012b). The functions of GAPs and GEFs that are independent from GTPase activation or GDP-GTP exchange, respectively, have not been included in **Table 2**.

Rho GTPases AND CEREBRAL CORTEX MALFORMATIONS

As described previously, the development of the cerebral cortex is remarkably complex and tightly organized. Disruption of any of the overlapping steps that contribute to this process can result in profound and stereotypical cortical malformations. In view of the multiple regulatory functions played by Rho GTPases during cerebral cortex development, it is thus not surprising that their forebrain specific suppression leads to cortical malformations. Accordingly, Cappello et al. found that *Emx1-Cre* mediated deletion of *RhoA* causes three types of malformations in the mouse cerebral cortex (Cappello et al., 2012; Cappello, 2013). First, the adult mutant cerebral cortex is about 1.3-fold thicker than control. This megalencephaly phenotype has been linked to the increased proliferation observed in the *RhoA* conditional

mutant (see Section Rho GTPases and Regulation of Progenitor Cell Division, Proliferation and Cell Fate and **Table 1**). The second malformation observed in these mutants is a subcortical band heterotopia, which is characterized by a heterotopic cortex formed of ectopic neurons embedded within the white matter and underlying a normotopic cortex. Interestingly, the formation of this double cortex may not result from direct defects in migrating neurons, but rather from defective radial glia fibers that neurons use as a scaffold to migrate. Indeed, as mentioned previously (see Section Rho GTPases and Regulation of Radial Migration and **Table 1**), *RhoA* null neurons migrate normally when transplanted into wild-type cerebral cortex, whereas the converse is not the case, probably because of the strongly disorganized RG processes in the mutant cortices (Cappello et al., 2012). The last cortical abnormality observed in *Emx1-Cre RhoA* null mutants is the formation of cobblestones or neuronal ectopias at the basal side of the developing cerebral cortex. These neuronal protrusions beyond layer I may result from the increase speed of migrating nascent neurons and/or from the aberrant RG endfeet (Cappello, 2013). Interestingly, *FoxG1^{Cre} RhoA*-deficient embryos also exhibit expansion of the neural progenitor pool and exencephaly-like protrusions (Katayama et al., 2011).

In contrast to *RhoA* deletion, which induces excessive proliferation, *Rac1* loss of function in the mouse cerebral cortex reduces progenitor cell proliferation and increases apoptosis, which may be the major causes of microcephaly observed in the mutants (Chen et al., 2009; Leone et al., 2010). The suppression of *Cdc42* in the cortex also affects the overall cortical morphology. Indeed, *Cdc42*-deficient telencephalon fails to bulge or separate into two cerebral hemispheres, resulting in holoprosencephaly (Chen et al., 2006). This phenotype may result from the essential role of Cdc42 in establishing the apico-basal polarity of RGs and subsequently of the telencephalic neuroepithelium, which is needed for the expansion and bifurcation of cerebral hemispheres (Chen et al., 2006).

Interestingly, *NOMA-GAP* deficiency also leads to a decrease of cortical thickness in different cortical areas (Rosario et al., 2012). This reduction was observed in adult mice, but also at early post-natal stages, suggesting that cortical thinning is due to a defective developmental process. Since the absence of *NOMA-GAP* does not impact the early stages of cortical development, including

neuronal birth, survival, fate determination and migration, cortical thinning in these mutants may arise from defective formation of cortical dendritic trees (Rosario et al., 2012).

CONCLUDING REMARKS

Altogether the above studies highlight the crucial roles played by the Rho GTPase family in the regulation of cerebral cortex development and emphasize that a better understanding of these functions might help to clarify the etiology of several cortical malformations. Further work is required to fully characterize the contribution of the different Rho GTPases expressed in the developing cerebral cortex as well as the downstream signaling involved and the mechanisms regulating their expression and/or activity. Another major challenge for the future will be to understand how the signals through the different Rho GTPases as well as the other small GTPases of the Ras superfamily (Ras, Rab, Ran, Arf) are integrated in nascent cortical neurons and how they are spatially and temporally controlled during cortical development.

Abnormal signaling through Rho GTPases is associated with cognitive dysfunction (Newey et al., 2005; De Filippis et al., 2014) and recent findings have showed their involvement in the development and progression of neurodegenerative diseases (Antoine-Bertrand et al., 2011). Studies on Rho GTPase functions *in vivo* thus represent an underexplored territory that may hold therapeutic potential.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by INSERM and Marie Curie Actions (Intra European Fellowship). Roberta Azzarelli is supported by a Medical Research Council (MRC) post-doctoral fellowship and Thomas Kerloch is recipient of a studentship from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

REFERENCES

- Abe, T., Kato, M., Miki, H., Takenawa, T., and Endo, T. (2003). Small GTPase Tc10 and its homologue RhoT induce N-WASP-mediated long process formation and neurite outgrowth. *J. Cell Sci.* 116, 155–168. doi: 10.1242/jcs.00208
- Alfano, C., Viola, L., Heng, J. I., Pirozzi, M., Clarkson, M., Flore, G., et al. (2011). COUP-TFI promotes radial migration and proper morphology of callosal projection neurons by repressing Rnd2 expression. *Development* 138, 4685–4697. doi: 10.1242/dev.068031
- Antoine-Bertrand, J., Villemure, J. F., and Lamarche-Vane, N. (2011). Implication of rho GTPases in neurodegenerative diseases. *Curr. Drug Targets* 12, 1202–1215. doi: 10.2174/138945011795906543
- Aspenstrom, P., Ruusala, A., and Pacholsky, D. (2007). Taking Rho GTPases to the next level: the cellular functions of atypical Rho GTPases. *Exp. Cell Res.* 313, 3673–3679. doi: 10.1016/j.yexcr.2007.07.022
- Azzarelli, R., Pacary, E., Garg, R., Garcez, P., van den Berg, D., Riou, P., et al. (2014). An antagonistic interaction between PlexinB2 and Rnd3 controls RhoA activity and cortical neuron migration. *Nat. Commun.* 5, 3405. doi: 10.1038/ncomms4405
- Bartolini, G., Ciceri, G., and Marin, O. (2013). Integration of GABAergic interneurons into cortical cell assemblies: lessons from embryos and adults. *Neuron* 79, 849–864. doi: 10.1016/j.neuron.2013.08.014
- Beg, A. A., Sommer, J. E., Martin, J. H., and Scheiffele, P. (2007). alpha2-Chimaerin is an essential EphA4 effector in the assembly of neuronal locomotor circuits. *Neuron* 55, 768–778. doi: 10.1016/j.neuron.2007.07.036
- Blaschke, A. J., Staley, K., and Chun, J. (1996). Widespread programmed cell death in proliferative and postmitotic regions of the fetal cerebral cortex. *Development* 122, 1165–1174.
- Blaschke, A. J., Weiner, J. A., and Chun, J. (1998). Programmed cell death is a universal feature of embryonic and postnatal neuroproliferative regions throughout the central nervous system. *J. Comp. Neurol.* 396, 39–50.
- Bolis, A., Corbetta, S., Cioce, A., and de Curtis, I. (2003). Differential distribution of Rac1 and Rac3 GTPases in the developing mouse brain: implications for a role of Rac3 in Purkinje cell differentiation. *Eur. J. Neurosci.* 18, 2417–2424. doi: 10.1046/j.1460-9568.2003.02938.x
- Bos, J. L., Rehmann, H., and Wittinghofer, A. (2007). GEFs and GAPs: critical elements in the control of small G proteins. *Cell* 129, 865–877. doi: 10.1016/j.cell.2007.05.018
- Boulter, E., Garcia-Mata, R., Guilluy, C., Dubash, A., Rossi, G., Brennwald, P. J., et al. (2010). Regulation of Rho GTPase crosstalk, degradation and activity by RhoGDI1. *Nat. Cell Biol.* 12, 477–483. doi: 10.1038/ncb2049
- Brouns, M. R., Matheson, S. F., Hu, K. Q., Delalle, I., Caviness, V. S., Silver, J., et al. (2000). The adhesion signaling molecule p190 RhoGAP is required for morphogenetic processes in neural development. *Development* 127, 4891–4903.
- Brouns, M. R., Matheson, S. F., and Settleman, J. (2001). p190 RhoGAP is the principal Src substrate in brain and regulates axon outgrowth, guidance and fasciculation. *Nat. Cell Biol.* 3, 361–367. doi: 10.1038/35070042
- Cahill, M. E., Xie, Z., Day, M., Photowala, H., Barbolina, M. V., Miller, C. A., et al. (2009). Kalirin regulates cortical spine morphogenesis and disease-related behavioral phenotypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 13058–13063. doi: 10.1073/pnas.0904636106
- Cappello, S. (2013). Small Rho-GTPases and cortical malformations: fine-tuning the cytoskeleton stability. *Small GTPases* 4, 51–56. doi: 10.4161/sptg.23093
- Cappello, S., Attardo, A., Wu, X., Iwasato, T., Itohara, S., Wilsch-Brauninger, M., et al. (2006). The Rho-GTPase cdc42 regulates neural progenitor fate at the apical surface. *Nat. Neurosci.* 9, 1099–1107. doi: 10.1038/nn1744
- Cappello, S., Bohringer, C. R., Bergami, M., Conzelmann, K. K., Ghanem, A., Tomassy, G. S., et al. (2012). A radial glia-specific role of RhoA in double cortex formation. *Neuron* 73, 911–924. doi: 10.1016/j.neuron.2011.12.030
- Charrier, C., Joshi, K., Coutinho-Budd, J., Kim, J. E., Lambert, N., de Marchena, J., et al. (2012). Inhibition of SRGAP2 function by its human-specific paralogs induces neoteny during spine maturation. *Cell* 149, 923–935. doi: 10.1016/j.cell.2012.03.034
- Chen, L., Liao, G., Waclaw, R. R., Burns, K. A., Linquist, D., Campbell, K., et al. (2007). Rac1 controls the formation of midline commissures and the competency of tangential migration in ventral telencephalic neurons. *J. Neurosci.* 27, 3884–3893. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3509-06.2007
- Chen, L., Liao, G., Yang, L., Campbell, K., Nakafuku, M., Kuan, C. Y., et al. (2006). Cdc42 deficiency causes Sonic hedgehog-independent holoprosencephaly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 16520–16525. doi: 10.1073/pnas.0603531103
- Chen, L., Melendez, J., Campbell, K., Kuan, C. Y., and Zheng, Y. (2009). Rac1 deficiency in the forebrain results in neural progenitor reduction and microcephaly. *Dev. Biol.* 325, 162–170. doi: 10.1016/j.ydbio.2008.10.023
- Corbetta, S., Gualdoni, S., Albertinazzi, C., Paris, S., Croci, L., Consalez, G. G., et al. (2005). Generation and characterization of Rac3 knockout mice. *Mol. Cell. Biol.* 25, 5763–5776. doi: 10.1128/MCB.25.13.5763-5776.2005
- de Curtis, I. (2008). Functions of Rac GTPases during neuronal development. *Dev. Neurosci.* 30, 47–58. doi: 10.1159/000109851
- De Filippis, B., Romano, E., and Laviola, G. (2014). Aberrant Rho GTPases signaling and cognitive dysfunction: *in vivo* evidence for a compelling molecular relationship. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 46P2, 285–301. doi: 10.1016/j.neubiorev.2014.06.007
- de la Rosa, E. J., and de Pablo, F. (2000). Cell death in early neural development: beyond the neurotrophic theory. *Trends Neurosci.* 23, 454–458. doi: 10.1016/S0166-2236(00)01628-3
- Ellis, S., and Mellor, H. (2000). The novel Rho-family GTPase rif regulates coordinated actin-based membrane rearrangements. *Curr. Biol.* 10, 1387–1390. doi: 10.1016/S0960-9822(00)00777-6
- Englund, C., Fink, A., Lau, C., Pham, D., Daza, R. A., Bulfone, A., et al. (2005). Pax6, Tbr2, and Tbr1 are expressed sequentially by radial glia, intermediate progenitor cells, and postmitotic neurons in developing neocortex. *J. Neurosci.* 25, 247–251. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2899-04.2005
- Erschbamer, M. K., Hofstetter, C. P., and Olson, L. (2005). RhoA, RhoB, RhoC, Rac1, Cdc42, and Tc10 mRNA levels in spinal cord, sensory ganglia, and corticospinal tract neurons and long-lasting specific changes following spinal cord injury. *J. Comp. Neurol.* 484, 224–233. doi: 10.1002/cne.20471
- Fietz, S. A., Kelava, I., Vogt, J., Wilsch-Brauninger, M., Stenzel, D., Fish, J. L., et al. (2010). OSVZ progenitors of human and ferret neocortex are epithelial-like and expand by integrin signaling. *Nat. Neurosci.* 13, 690–699. doi: 10.1038/nn.2553

- Flynn, K. C., Hellal, F., Neukirchen, D., Jacob, S., Tahirovic, S., Dupraz, S., et al. (2012). ADF/cofilin-mediated actin retrograde flow directs neurite formation in the developing brain. *Neuron* 76, 1091–1107. doi: 10.1016/j.neuron.2012.09.038
- Fujimoto, S., Negishi, M., and Katoh, H. (2009). RhoG promotes neural progenitor cell proliferation in mouse cerebral cortex. *Mol. Biol. Cell* 20, 4941–4950. doi: 10.1091/mbc.E09-03-0200
- Gad, A. K., and Aspenstrom, P. (2010). Rif proteins take to the RhoD: Rho GTPases at the crossroads of actin dynamics and membrane trafficking. *Cell. Signal.* 22, 183–189. doi: 10.1016/j.cellsig.2009.10.001
- Garcia-Moreno, F., Vasistha, N. A., Trevia, N., Bourne, J. A., and Molnar, Z. (2012). Compartmentalization of cerebral cortical germinal zones in a lissencephalic primate and gyrencephalic rodent. *Cereb. Cortex* 22, 482–492. doi: 10.1093/cercor/bhr312
- Garvalov, B. K., Flynn, K. C., Neukirchen, D., Meyn, L., Teusch, N., Wu, X., et al. (2007). Cdc42 regulates cofilin during the establishment of neuronal polarity. *J. Neurosci.* 27, 13117–13129. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3322-07.2007
- Gauthier-Fisher, A., Lin, D. C., Greeve, M., Kaplan, D. R., Rottapel, R., and Miller, F. D. (2009). Lfc and Tctex-1 regulate the genesis of neurons from cortical precursor cells. *Nat. Neurosci.* 12, 735–744. doi: 10.1038/nn.2339
- Ge, W., He, F., Kim, K. J., Bianchi, B., Coskun, V., Nguyen, L., et al. (2006). Coupling of cell migration with neurogenesis by proneural bHLH factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 1319–1324. doi: 10.1073/pnas.0510419103
- Gotz, M., and Huttner, W. B. (2005). The cell biology of neurogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 777–788. doi: 10.1038/nrm1739
- Gotz, M., Stoykova, A., and Gruss, P. (1998). Pax6 controls radial glia differentiation in the cerebral cortex. *Neuron* 21, 1031–1044. doi: 10.1016/S0896-6273(00)80621-2
- Govek, E. E., Newey, S. E., and Van Aelst, L. (2005). The role of the Rho GTPases in neuronal development. *Genes Dev.* 19, 1–49. doi: 10.1101/gad.1256405
- Guo, J., and Anton, E. S. (2014). Decision making during interneuron migration in the developing cerebral cortex. *Trends Cell Biol.* 24, 342–351. doi: 10.1016/j.tcb.2013.12.001
- Gupta, A., Tsai, L. H., and Wynshaw-Boris, A. (2002). Life is a journey: a genetic look at neocortical development. *Nat. Rev. Genet.* 3, 342–355. doi: 10.1038/nrg799
- Hall, A., and Lalli, G. (2010). Rho and Ras GTPases in axon growth, guidance, and branching. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2:a001818. doi: 10.1101/cshperspect.a001818
- Hansen, D. V., Lui, J. H., Parker, P. R., and Kriegstein, A. R. (2010). Neurogenic radial glia in the outer subventricular zone of human neocortex. *Nature* 464, 554–561. doi: 10.1038/nature08845
- Hatanaka, Y., and Yamauchi, K. (2013). Excitatory cortical neurons with multipolar shape establish neuronal polarity by forming a tangentially oriented axon in the intermediate zone. *Cereb. Cortex* 23, 105–113. doi: 10.1093/cercor/bhr383
- Heasman, S. J., and Ridley, A. J. (2008). Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from *in vivo* studies. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 690–701. doi: 10.1038/nrm2476
- Hebert, J. M., and McConnell, S. K. (2000). Targeting of cre to the Foxg1 (BF-1) locus mediates loxP recombination in the telencephalon and other developing head structures. *Dev. Biol.* 222, 296–306. doi: 10.1006/dbio.2000.9732
- Heng, J. I., Nguyen, L., Castro, D. S., Zimmer, C., Wildner, H., Armant, O., et al. (2008). Neurogenin 2 controls cortical neuron migration through regulation of Rnd2. *Nature* 455, 114–118. doi: 10.1038/nature07198
- Heumann, D., and Leuba, G. (1983). Neuronal death in the development and aging of the cerebral cortex of the mouse. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 9, 297–311. doi: 10.1111/j.1365-2990.1983.tb00116.x
- Heumann, D., Leuba, G., and Rabinowicz, T. (1978). Postnatal development of the mouse cerebral neocortex. IV. Evolution of the total cortical volume, of the population of neurons and glial cells. *J. Hirnforsch.* 19, 385–393.
- Ho, T. T., Merajver, S. D., Lapiere, C. M., Nusgens, B. V., and Deroanne, C. F. (2008). RhoA-GDP regulates RhoB protein stability. Potential involvement of RhoGDIalpha. *J. Biol. Chem.* 283, 21588–21598. doi: 10.1074/jbc.M710033200
- Hotulainen, P., Llano, O., Smirnov, S., Tanhuanpaa, K., Faix, J., Rivera, C., et al. (2009). Defining mechanisms of actin polymerization and depolymerization during dendritic spine morphogenesis. *J. Cell Biol.* 185, 323–339. doi: 10.1083/jcb.200809046
- Huttenlocher, P. R., and Dabholkar, A. S. (1997). Regional differences in synaptogenesis in human cerebral cortex. *J. Comp. Neurol.* 387, 167–178.
- Ip, J. P., Shi, L., Chen, Y., Itoh, Y., Fu, W. Y., Betz, A., et al. (2012). alpha2-chimaerin controls neuronal migration and functioning of the cerebral cortex through CRMP-2. *Nat. Neurosci.* 15, 39–47. doi: 10.1038/nn.2972
- Ishikawa, Y., Katoh, H., Nakamura, K., Mori, K., and Negishi, M. (2002). Developmental changes in expression of small GTPase RhoG mRNA in the rat brain. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 106, 145–150. doi: 10.1016/S0169-328X(02)00413-8
- Ishikawa, Y., Katoh, H., and Negishi, M. (2003). A role of Rnd1 GTPase in dendritic spine formation in hippocampal neurons. *J. Neurosci.* 23, 11065–11072.
- Jaffe, A. B., and Hall, A. (2005). Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 21, 247–269. doi: 10.1146/annurev.cellbio.21.020604.150721
- Jossin, Y., and Cooper, J. A. (2011). Reelin, Rap1 and N-cadherin orient the migration of multipolar neurons in the developing neocortex. *Nat. Neurosci.* 14, 697–703. doi: 10.1038/nn.2816
- Kasai, H., Terashima, T., Fukaya, M., Nakao, K., Sakahara, M., Watanabe, M., et al. (2008). Rac1 in cortical projection neurons is selectively required for midline crossing of commissural axonal formation. *Eur. J. Neurosci.* 28, 257–267. doi: 10.1111/j.1460-9568.2008.06343.x
- Katayama, K., Melendez, J., Baumann, J. M., Leslie, J. R., Chauhan, B. K., Nemkul, N., et al. (2011). Loss of RhoA in neural progenitor cells causes the disruption of adherens junctions and hyperproliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 7607–7612. doi: 10.1073/pnas.1101347108
- Katoh, M. (2002). Molecular cloning and characterization of WRCH2 on human chromosome 15q15. *Int. J. Oncol.* 20, 977–982. doi: 10.3892/ijo.20.5.977
- Kawauchi, T., Chihama, K., Nabeshima, Y., and Hoshino, M. (2003). The *in vivo* roles of STEF/Tiam1, Rac1 and JNK in cortical neuronal migration. *EMBO J.* 22, 4190–4201. doi: 10.1093/emboj/cdg413
- Kelava, I., Reillo, I., Murayama, A. Y., Kalinka, A. T., Stenzel, D., Tomancak, P., et al. (2012). Abundant occurrence of basal radial glia in the subventricular zone of embryonic neocortex of a lissencephalic primate, the common marmoset *Callithrix jacchus*. *Cereb. Cortex* 22, 469–481. doi: 10.1093/cercor/bhr301
- Kirikoshi, H., and Katoh, M. (2002). Expression of WRCH1 in human cancer and down-regulation of WRCH1 by beta-estradiol in MCF-7 cells. *Int. J. Oncol.* 20, 777–783. doi: 10.3892/ijo.20.4.777
- Konno, D., Yoshimura, S., Hori, K., Maruoka, H., and Sobue, K. (2005). Involvement of the phosphatidylinositol 3-kinase/rac1 and cdc42 pathways in radial migration of cortical neurons. *J. Biol. Chem.* 280, 5082–5088. doi: 10.1074/jbc.M408251200
- Kriegstein, A. R., and Nöctor, S. C. (2004). Patterns of neuronal migration in the embryonic cortex. *Trends Neurosci.* 27, 392–399. doi: 10.1016/j.tins.2004.05.001
- Kuan, C. Y., Roth, K. A., Flavell, R. A., and Rakic, P. (2000). Mechanisms of programmed cell death in the developing brain. *Trends Neurosci.* 23, 291–297. doi: 10.1016/S0166-2236(00)01581-2
- Laguette, S., Peyre, E., and Nguyen, L. (2014). Progenitor genealogy in the developing cerebral cortex. *Cell Tissue Res.* doi: 10.1007/s00441-014-1979-5. [Epub ahead of print].
- Lee, H. O., and Norden, C. (2013). Mechanisms controlling arrangements and movements of nuclei in pseudostratified epithelia. *Trends Cell Biol.* 23, 141–150. doi: 10.1016/j.tcb.2012.11.001
- Leone, D. P., Srinivasan, K., Brakebusch, C., and McConnell, S. K. (2010). The rho GTPase Rac1 is required for proliferation and survival of progenitors in the developing forebrain. *Dev. Neurobiol.* 70, 659–678. doi: 10.1002/dneu.20804
- Lewis, T. L. Jr., Courchet, J., and Polleux, F. (2013). Cell biology in neuroscience: cellular and molecular mechanisms underlying axon formation, growth, and branching. *J. Cell Biol.* 202, 837–848. doi: 10.1083/jcb.201305098
- Long, H., Zhu, X., Yang, P., Gao, Q., Chen, Y., and Ma, L. (2013). Myo9b and RICS modulate dendritic morphology of cortical neurons. *Cereb. Cortex* 23, 71–79. doi: 10.1093/cercor/bhr378
- Marzesso, A. M., Mora-Bermudez, F., and Huttner, W. B. (2009). Neurogenesis in G minor. *Nat. Neurosci.* 12, 669–671. doi: 10.1038/nn0609-669
- Matheson, S. F., Hu, K. Q., Brouns, M. R., Sordella, R., Vanderheide, J. D., and Settleman, J. (2006). Distinct but overlapping functions for the closely related p190 RhoGAPs in neural development. *Dev. Neurosci.* 28, 538–550. doi: 10.1159/000095116
- Minobe, S., Sakakibara, A., Ohdachi, T., Kanda, R., Kimura, M., Nakatani, S., et al. (2009). Rac is involved in the interkinetic nuclear migration of cortical progenitor cells. *Neurosci. Res.* 63, 294–301. doi: 10.1016/j.neures.2009.01.006

- Molyneaux, B. J., Arlotta, P., Menezes, J. R., and Macklis, J. D. (2007). Neuronal subtype specification in the cerebral cortex. *Nat. Rev. Neurosci.* 8, 427–437. doi: 10.1038/nrn2151
- Morin, X., and Bellaiche, Y. (2011). Mitotic spindle orientation in asymmetric and symmetric cell divisions during animal development. *Dev. Cell* 21, 102–119. doi: 10.1016/j.devcel.2011.06.012
- Murphy, C., Saffrich, R., Grummt, M., Gourmier, H., Rybin, V., Rubino, M., et al. (1996). Endosome dynamics regulated by a Rho protein. *Nature* 384, 427–432. doi: 10.1038/384427a0
- Nadarajah, B., Brunstrom, J. E., Grutzendler, J., Wong, R. O., and Pearlman, A. L. (2001). Two modes of radial migration in early development of the cerebral cortex. *Nat. Neurosci.* 4, 143–150. doi: 10.1038/83967
- Namba, T., Kibe, Y., Funahashi, Y., Nakamura, S., Takano, T., Ueno, T., et al. (2014). Pioneering axons regulate neuronal polarization in the developing cerebral cortex. *Neuron* 81, 814–829. doi: 10.1016/j.neuron.2013.12.015
- Newey, S. E., Velamoor, V., Govek, E. E., and Van Aelst, L. (2005). Rho GTPases, dendritic structure, and mental retardation. *J. Neurobiol.* 64, 58–74. doi: 10.1002/neu.20153
- Nguyen, L., Besson, A., Heng, J. I., Schuurmans, C., Teboul, L., Parras, C., et al. (2006). p27kip1 independently promotes neuronal differentiation and migration in the cerebral cortex. *Genes Dev.* 20, 1511–1524. doi: 10.1101/gad.377106
- Nikolic, M., Gardner, H. A., and Tucker, K. L. (2013). Postnatal neuronal apoptosis in the cerebral cortex: physiological and pathophysiological mechanisms. *Neuroscience* 254, 369–378. doi: 10.1016/j.neuroscience.2013.09.035
- Noctor, S. C., Martinez-Cerdeno, V., Ivic, L., and Kriegstein, A. R. (2004). Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases. *Nat. Neurosci.* 7, 136–144. doi: 10.1038/nn1172
- Ohnami, S., Endo, M., Hirai, S., Uesaka, N., Hatanaka, Y., Yamashita, T., et al. (2008). Role of RhoA in activity-dependent cortical axon branching. *J. Neurosci.* 28, 9117–9121. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1731-08.2008
- Olenik, C., Aktories, K., and Meyer, D. K. (1999). Differential expression of the small GTP-binding proteins RhoA, RhoB, Cdc42u and Cdc42b in developing rat neocortex. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 70, 9–17. doi: 10.1016/S0169-328X(99)00121-7
- Ostrem, B. E., Lui, J. H., Gertz, C. C., and Kriegstein, A. R. (2014). Control of outer radial glial stem cell mitosis in the human brain. *Cell Rep.* 8, 656–664. doi: 10.1016/j.celrep.2014.06.058
- Pacary, E., Azzarelli, R., and Guillemot, F. (2013). Rnd3 coordinates early steps of cortical neurogenesis through actin-dependent and -independent mechanisms. *Nat. Commun.* 4, 1635. doi: 10.1038/ncomms2614
- Pacary, E., Heng, J., Azzarelli, R., Riou, P., Castro, D., Lebel-Potter, M., et al. (2011). Proneural transcription factors regulate different steps of cortical neuron migration through Rnd-mediated inhibition of RhoA signaling. *Neuron* 69, 1069–1084. doi: 10.1016/j.neuron.2011.02.018
- Peng, X., Lin, Q., Liu, Y., Jin, Y., Druso, J. E., Antonyak, M. A., et al. (2013). Inactivation of Cdc42 in embryonic brain results in hydrocephalus with ependymal cell defects in mice. *Protein Cell* 4, 231–242. doi: 10.1007/s13238-012-2098-2
- Ramos, S., Khademi, F., Somesh, B. P., and Rivero, F. (2002). Genomic organization and expression profile of the small GTPases of the RhoBTB family in human and mouse. *Gene* 298, 147–157. doi: 10.1016/S0378-1119(02)00980-0
- Reillo, I., de Juan Romero, C., Garcia-Cabezas, M. A., and Borrell, V. (2011). A role for intermediate radial glia in the tangential expansion of the mammalian cerebral cortex. *Cereb. Cortex* 21, 1674–1694. doi: 10.1093/cercor/bhq238
- Roberts, P. J., Mitin, N., Keller, P. J., Chenette, E. J., Madigan, J. P., Currin, R. O., et al. (2008). Rho Family GTPase modification and dependence on CAAX motif-signaled posttranslational modification. *J. Biol. Chem.* 283, 25150–25163. doi: 10.1074/jbc.M800882200
- Rosario, M., Schuster, S., Juttner, R., Parthasarathy, S., Tarabykin, V., and Birchmeier, W. (2012). Neocortical dendritic complexity is controlled during development by NIMA-GAP-dependent inhibition of Cdc42 and activation of cofilin. *Genes Dev.* 26, 1743–1757. doi: 10.1101/gad.191593.112
- Roszkowski, I., Afonso, C., Henrique, D., and Mathis, L. (2006). Key role played by RhoA in the balance between planar and apico-basal cell divisions in the chick neuroepithelium. *Dev. Biol.* 298, 212–224. doi: 10.1016/j.ydbio.2006.06.031
- Sanno, H., Shen, X., Kuru, N., Bormuth, I., Bobsin, K., Gardner, H. A., et al. (2010). Control of postnatal apoptosis in the neocortex by RhoA-subfamily GTPases determines neuronal density. *J. Neurosci.* 30, 4221–4231. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3318-09.2010
- Shitamukai, A., and Matsuzaki, F. (2012). Control of asymmetric cell division of mammalian neural progenitors. *Dev. Growth Differ.* 54, 277–286. doi: 10.1111/j.1440-169X.2012.01345.x
- Shoukimas, G. M., and Hinds, J. W. (1978). The development of the cerebral cortex in the embryonic mouse: an electron microscopic serial section analysis. *J. Comp. Neurol.* 179, 795–830. doi: 10.1002/cne.901790407
- Simo, S., and Cooper, J. A. (2012). Regulation of dendritic branching by Cdc42 GAPs. *Genes Dev.* 26, 1653–1658. doi: 10.1101/gad.199034.112
- Spear, P. C., and Erickson, C. A. (2012). Interkinetic nuclear migration: a mysterious process in search of a function. *Dev. Growth Differ.* 54, 306–316. doi: 10.1111/j.1440-169X.2012.01342.x
- Tanabe, K., Tachibana, T., Yamashita, T., Che, Y. H., Yoneda, Y., Ochi, T., et al. (2000). The small GTP-binding protein TC10 promotes nerve elongation in neuronal cells, and its expression is induced during nerve regeneration in rats. *J. Neurosci.* 20, 4138–4144.
- Tang, J., Ip, J. P., Ye, T., Ng, Y. P., Yung, W. H., Wu, Z., et al. (2014). Cdk5-dependent Mst3 phosphorylation and activity regulate neuronal migration through RhoA inhibition. *J. Neurosci.* 34, 7425–7436. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5449-13.2014
- Taverna, E., and Huttner, W. B. (2010). Neural progenitor nuclei IN motion. *Neuron* 67, 906–914. doi: 10.1016/j.neuron.2010.08.027
- Thomaidou, D., Mione, M. C., Cavanagh, J. F., and Parnavelas, J. G. (1997). Apoptosis and its relation to the cell cycle in the developing cerebral cortex. *J. Neurosci.* 17, 1075–1085.
- Thumke, D., Shinohara, R., Watanabe, K., Takebayashi, H., Toyoda, Y., Tohyama, K., et al. (2011). Deficiency of mDia, an actin nucleator, disrupts integrity of neuroepithelium and causes periventricular dysplasia. *PLoS ONE* 6:e25465. doi: 10.1371/journal.pone.0025465
- Troeger, A., and Williams, D. A. (2013). Hematopoietic-specific Rho GTPases Rac2 and RhoH and human blood disorders. *Exp. Cell Res.* 319, 2375–2383. doi: 10.1016/j.yexcr.2013.07.002
- Vercelli, A., Assal, F., and Innocenti, G. M. (1992). Emergence of callosally projecting neurons with stellate morphology in the visual cortex of the kitten. *Exp. Brain Res.* 90, 346–358. doi: 10.1007/BF00227248
- Vignal, E., De Toledo, M., Comunale, F., Ladopoulos, A., Gauthier-Rouviere, C., Blangy, A., et al. (2000). Characterization of TCL, a new GTPase of the rho family related to TC10 and Cdc42. *J. Biol. Chem.* 275, 36457–36464. doi: 10.1074/jbc.M003487200
- Wang, X., Tsai, J. W., Lamonica, B., and Kriegstein, A. R. (2011). A new subtype of progenitor cell in the mouse embryonic neocortex. *Nat. Neurosci.* 14, 555–561. doi: 10.1038/nn.2807
- Wegmeyer, H., Egea, J., Rabe, N., Gezelius, H., Filosa, A., Enjin, A., et al. (2007). EphA4-dependent axon guidance is mediated by the RacGAP alpha2-chimaerin. *Neuron* 55, 756–767. doi: 10.1016/j.neuron.2007.07.038
- Whitford, K. L., Dijkhuizen, P., Polleux, F., and Ghosh, A. (2002). Molecular control of cortical dendrite development. *Annu. Rev. Neurosci.* 25, 127–149. doi: 10.1146/annurev.neuro.25.112701.142932
- Xie, Z., Cahill, M. E., and Penzes, P. (2010). Kalirin loss results in cortical morphological alterations. *Mol. Cell. Neurosci.* 43, 81–89. doi: 10.1016/j.mcn.2009.09.006
- Yang, T., Sun, Y., Zhang, F., Zhu, Y., Shi, L., Li, H., et al. (2012a). POSH localizes activated Rac1 to control the formation of cytoplasmic dilation of the leading process and neuronal migration. *Cell Rep.* 2, 640–651. doi: 10.1016/j.celrep.2012.08.007
- Yang, Y. T., Wang, C. L., and Van Aelst, L. (2012b). DOCK7 interacts with TACC3 to regulate interkinetic nuclear migration and cortical neurogenesis. *Nat. Neurosci.* 15, 1201–1210. doi: 10.1038/nn.3171
- Yeo, W., and Gautier, J. (2004). Early neural cell death: dying to become neurons. *Dev. Biol.* 274, 233–244. doi: 10.1016/j.ydbio.2004.07.026
- Yokota, Y., Eom, T. Y., Stanco, A., Kim, W. Y., Rao, S., Snider, W. D., et al. (2010). Cdc42 and Gsk3 modulate the dynamics of radial glial growth, inter-radial glial interactions and polarity in the developing cerebral cortex. *Development* 137, 4101–4110. doi: 10.1242/dev.048637

Yoshizawa, M., Kawauchi, T., Sone, M., Nishimura, Y. V., Terao, M., Chihama, K., et al. (2005). Involvement of a Rac activator, P-Rex1, in neurotrophin-derived signaling and neuronal migration. *J. Neurosci.* 25, 4406–4419. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4955-04.2005

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Received: 22 October 2014; accepted: 11 December 2014; published online: 07 January 2015.

Citation: Azzarelli R, Kerloch T and Pacary E (2015) Regulation of cerebral cortex development by Rho GTPases: insights from in vivo studies. *Front. Cell. Neurosci.* 8:445. doi: 10.3389/fncel.2014.00445

This article was submitted to the journal *Frontiers in Cellular Neuroscience*.

Copyright © 2015 Azzarelli, Kerloch and Pacary. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Chapitre VII.Références

- Abrous DN, Adriani W, Montaron M-F, Aurousseau C, Rougon G, Le Moal M, Piazza PV (2002) Nicotine self-administration impairs hippocampal plasticity. *J Neurosci* 22:3656–3662.
- Abrous DN, Wojtowicz JM (2015) Interaction between Neurogenesis and Hippocampal Memory System: New Vistas. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 7:a018952.
- Acsady L, Kamondi A, Sik A, Freund T, Buzsaki G (1998) GABAergic cells are the major postsynaptic targets of mossy fibers in the rat hippocampus. *J Neurosci* 18:3386–3403.
- Adlaf EW, Vaden RJ, Niver AJ, Manuel AF, Onyilo VC, Araujo MT, Dieni CV, Vo HT, King GD, Wadiche JI, Overstreet-Wadiche L (2017) Adult-born neurons modify excitatory synaptic transmission to existing neurons. *Elife* 6.
- Ageta H, Murayama A, Migishima R, Kida S, Tsuchida K, Yokoyama M, Inokuchi K (2008) Activin in the Brain Modulates Anxiety-Related Behavior and Adult Neurogenesis. *PLoS One* 3.
- Aimone JB, Li Y, Lee SW, Clemenson GD, Deng W, Gage FH (2014) Regulation and function of adult neurogenesis: from genes to cognition. *Physiol Rev* 94:991–1026.
- Alfano C, Viola L, Heng JI-T, Pirozzi M, Clarkson M, Flore G, De Maio A, Schedl A, Guillemot F, Studer M (2011) COUP-TFI promotes radial migration and proper morphology of callosal projection neurons by repressing Rnd2 expression. *Development* 138:4685–4697.
- Altman J (1962) Are new neurons formed in the brains of adult mammals? *Science* 135:1127–1128.
- Altman J (1963) Autoradiographic investigation of cell proliferation in the brains of rats and cats. *Anat Rec* 145:573–591.
- Altman J (1966) Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. II. A longitudinal investigation of the kinetics, migration and transformation of cells incorporating tritiated thymidine in infant rats, with special reference to postnatal neurogenesis in some brain regions. *The Journal of Comparative Neurology* 128:431–473.
- Altman J, Bayer S (1975) Postnatal Development of the Hippocampal Dentate Gyrus Under Normal and Experimental Conditions. In: *The Hippocampus: Volume 1: Structure and Development* (Isaacson RL, Pribram KH, eds), pp 95–122. Boston, MA: Springer US.
- Altman J, Bayer SA (1990a) Mosaic organization of the hippocampal neuroepithelium and the multiple germinal sources of dentate granule cells. *The Journal of Comparative Neurology* 301:325–342.
- Altman J, Bayer SA (1990b) Migration and distribution of two populations of hippocampal granule cell precursors during the perinatal and postnatal periods. *The Journal of Comparative Neurology* 301:365–381.
- Altman J, Das GD (1965) Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol* 124:319–335.

- Altman J, Das GD (1966) Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. I. A longitudinal investigation of the kinetics, migration and transformation of cells incorporating tritiated thymidine in neonate rats, with special reference to postnatal neurogenesis in some brain regions. *The Journal of Comparative Neurology* 126:337–389.
- Alvarez-Buylla A, Lim DA (2004) For the long run: maintaining germinal niches in the adult brain. *Neuron* 41:683–686.
- Amaral DG (1978) A Golgi study of cell types in the hilar region of the hippocampus in the rat. *J Comp Neurol* 182:851–914.
- Amaral DG, Lavenex P (2006) Hippocampal Neuroanatomy. In: *The Hippocampus Book*, pp 37–114. Oxford University Press.
- Amaral DG, Witter MP (1989) The three-dimensional organization of the hippocampal formation: A review of anatomical data. *Neuroscience* 31:571–591.
- Amaral DG, Witter MP (1995) The Hippocampal Formation. In: *The Rat Nervous System*, Academic Press. Paxinos G.
- Amrein I, Slomianka L, Lipp H-P (2004) Granule cell number, cell death and cell proliferation in the dentate gyrus of wild-living rodents. *European Journal of Neuroscience* 20:3342–3350.
- Anacker C, Luna VM, Stevens GS, Millette A, Shores R, Jimenez JC, Chen B, Hen R (2018) Hippocampal neurogenesis confers stress resilience by inhibiting the ventral dentate gyrus. *Nature* 559:98–102.
- Angevine JBJ (1965) Time of neuron origin in the hippocampal region. An autoradiographic study in the mouse. *Exp Neurol Suppl:Suppl 2*:1-70.
- Aoki J, Katoh H, Mori K, Negishi M (2000) Rnd1, a Novel Rho Family GTPase, Induces the Formation of Neuritic Processes in PC12 Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 278:604–608.
- Arruda-Carvalho M, Sakaguchi M, Akers KG, Josselyn SA, Frankland PW (2011) Posttraining Ablation of Adult-Generated Neurons Degrades Previously Acquired Memories. *Journal of Neuroscience* 31:15113–15127.
- Azzarelli R, Guillemot F, Pacary E (2015a) Function and regulation of Rnd proteins in cortical projection neuron migration. *Frontiers in Neuroscience* 9.
- Azzarelli R, Kerloch T, Pacary E (2015b) Regulation of cerebral cortex development by Rho GTPases: insights from in vivo studies. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 8.
- Azzarelli R, Pacary E, Garg R, Garcez P, van den Berg D, Riou P, Ridley AJ, Friedel RH, Parsons M, Guillemot F (2014) An antagonistic interaction between PlexinB2 and Rnd3 controls RhoA activity and cortical neuron migration. *Nature Communications* 5.

- Bakker A, Kirwan CB, Miller M, Stark CEL (2008) Pattern separation in the human hippocampal CA3 and dentate gyrus. *Science* 319:1640–1642.
- Ballester-Lurbe B, Poch E, Mocholí E, Guasch RM, Pérez-Roger I, Terrado J (2009) RhoE is spatiotemporally regulated in the postnatal mouse CNS. *Neuroscience* 163:586–593.
- Bannerman DM, Rawlins JNP, McHugh SB, Deacon RMJ, Yee BK, Bast T, Zhang W-N, Pothuizen HHJ, Feldon J (2004) Regional dissociations within the hippocampus--memory and anxiety. *Neurosci Biobehav Rev* 28:273–283.
- Barthet G, Jorda-Siquier T, Ruli-Masante J, Bernadou F, Mueller U, Mulle C (2018) Presenilin-mediated cleavage of APP regulates synaptotagmin-7 and presynaptic plasticity.
- Bayer SA (1980) Development of the hippocampal region in the rat I. Neurogenesis examined with 3H-thymidine autoradiography. *The Journal of Comparative Neurology* 190:87–114.
- Beining M, Jungenitz T, Radic T, Deller T, Cuntz H, Jedlicka P, Schwarzacher SW (2017) Adult-born dentate granule cells show a critical period of dendritic reorganization and are distinct from developmentally born cells. *Brain Structure and Function* 222:1427–1446.
- Bektic J, Pfeil K, Berger AP, Ramoner R, Pelzer A, Schäfer G, Kofler K, Bartsch G, Klocker H (2005) Small G-protein RhoE is underexpressed in prostate cancer and induces cell cycle arrest and apoptosis. *The Prostate* 64:332–340.
- Bergami M, Rimondini R, Santi S, Blum R, Götz M, Canossa M (2008) Deletion of TrkB in adult progenitors alters newborn neuron integration into hippocampal circuits and increases anxiety-like behavior. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:15570–15575.
- Bessa JM, Ferreira D, Melo I, Marques F, Cerqueira JJ, Palha JA, Almeida OFX, Sousa N (2009) The mood-improving actions of antidepressants do not depend on neurogenesis but are associated with neuronal remodeling. *Molecular Psychiatry* 14:764–773.
- Blackstad TW (1956) Commissural connections of the hippocampal region in the rat, with special reference to their mode of termination. *The Journal of Comparative Neurology* 105:417–537.
- Blanchard RJ, Blanchard DC (1969) Crouching as an index of fear. *Journal of Comparative and Physiological Psychology* 67:370–375.
- Boldrini M, Fulmore CA, Tartt AN, Simeon LR, Pavlova I, Poposka V, Rosoklija GB, Stankov A, Arango V, Dwork AJ, Hen R, Mann JJ (2018) Human Hippocampal Neurogenesis Persists throughout Aging. *Cell Stem Cell* 22:589–599.e5.
- Bos JL, Rehmann H, Wittinghofer A (2007) GEFs and GAPs: Critical Elements in the Control of Small G Proteins. *Cell* 129:865–877.
- Boswell SA, Ongusaha PP, Nghiem P, Lee SW (2007) The Protective Role of a Small GTPase RhoE against UVB-induced DNA Damage in Keratinocytes. *Journal of Biological Chemistry* 282:4850–4858.

- Boulter E, Garcia-Mata R, Guilluy C, Dubash A, Rossi G, Brennwald PJ, Burridge K (2010) Regulation of Rho GTPase crosstalk, degradation and activity by RhoGDI1. *Nature Cell Biology* 12:477–483.
- Boutin C, Diestel S, Desoeuvre A, Tiveron M-C, Cremer H (2008) Efficient In Vivo Electroporation of the Postnatal Rodent Forebrain. *Ché A, ed. PLoS ONE* 3:e1883.
- Breunig JJ, Sarkisian MR, Arellano JI, Morozov YM, Ayoub AE, Sojitra S, Wang B, Flavell RA, Rakic P, Town T (2008) Primary cilia regulate hippocampal neurogenesis by mediating sonic hedgehog signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105:13127–13132.
- Bruel-Jungerman E, Davis S, Rampon C, Laroche S (2006) Long-term potentiation enhances neurogenesis in the adult dentate gyrus. *J Neurosci* 26:5888–5893.
- Brunne B, Zhao S, Derouiche A, Herz J, May P, Frotscher M, Bock HH (2010) Origin, maturation, and astroglial transformation of secondary radial glial cells in the developing dentate gyrus. *Glia*:n/a-n/a.
- Burd GD, Nottebohm F (1985) Ultrastructural characterization of synaptic terminals formed on newly generated neurons in a song control nucleus of the adult canary forebrain. *J Comp Neurol* 240:143–152.
- Burghardt NS, Park EH, Hen R, Fenton AA (2012) Adult-born hippocampal neurons promote cognitive flexibility in mice. *Hippocampus* 22:1795–1808.
- Cahill SP, Yu RQ, Green D, Todorova EV, Snyder JS (2017) Early survival and delayed death of developmentally-born dentate gyrus neurons. *Hippocampus* 27:1155–1167.
- Cappaert NLM, Van Strien NM, Witter MP (2015) Chapter 20 - Hippocampal Formation. In: *The Rat Nervous System (Fourth Edition)* (Paxinos G, ed), pp 511–573. San Diego: Academic Press.
- Cario-Toumaniantz C, Reillaudoux G, Sauzeau V, Heutte F, Vaillant, Finet M, Chardin P, Loirand G, Pacaud P (2003) Modulation of RhoA-Rho kinase-mediated Ca²⁺ sensitization of rabbit myometrium during pregnancy - role of Rnd3. *The Journal of Physiology* 552:403–413.
- Casanova E, Fehsenfeld S, Mantamadiotis T, Lemberger T, Greiner E, Stewart AF, Schütz G (2001) A CamKII α iCre BAC allows brain-specific gene inactivation: CamKII α iCre BAC Allows Brain-Specific Gene Inactivation. *genesis* 31:37–42.
- Chancey JH, Adlaf EW, Sapp MC, Pugh PC, Wadiche JI, Overstreet-Wadiche LS (2013) GABA Depolarization Is Required for Experience-Dependent Synapse Unsilencing in Adult-Born Neurons. *Journal of Neuroscience* 33:6614–6622.
- Chardin P (2006a) Function and regulation of Rnd proteins. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 7:54–62.
- Chardin P (2006b) Function and regulation of Rnd proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7.

- Chen J, Kelz MB, Zeng G, Sakai N, Steffen C, Shockett PE, Picciotto MR, Duman RS, Nestler EJ (1998) Transgenic animals with inducible, targeted gene expression in brain. *Mol Pharmacol* 54:495–503.
- Cheng X, Hsu C -m., Currle DS, Hu JS, Barkovich AJ, Monuki ES (2006) Central Roles of the Roof Plate in Telencephalic Development and Holoprosencephaly. *Journal of Neuroscience* 26:7640–7649.
- Chiarugi P, Giannoni E (2008) Anoikis: A necessary death program for anchorage-dependent cells. *Biochemical Pharmacology* 76:1352–1364.
- Christie KJ, Turbic A, Turnley AM (2013) Adult hippocampal neurogenesis, Rho kinase inhibition and enhancement of neuronal survival. *Neuroscience* 247:75–83.
- Cipriani S, Ferrer I, Aronica E, Kovacs GG, Verney C, Nardelli J, Khung S, Delezoide A-L, Milenkovic I, Rasika S, Manivet P, Benifla J-L, Deriot N, Gressens P, Adle-Biasette H (2018) Hippocampal Radial Glial Subtypes and Their Neurogenic Potential in Human Fetuses and Healthy and Alzheimer’s Disease Adults. *Cerebral Cortex* 28:2458–2478.
- Claiborne BJ, Amaral DG, Cowan WM (1986) A light and electron microscopic analysis of the mossy fibers of the rat dentate gyrus. *The Journal of Comparative Neurology* 246:435–458.
- Claiborne BJ, Amaral DG, Cowan WM (1990) Quantitative, three-dimensional analysis of granule cell dendrites in the rat dentate gyrus. *The Journal of Comparative Neurology* 302:206–219.
- Clelland CD, Choi M, Romberg C, Clemenson GD, Fragniere A, Tyers P, Jessberger S, Saksida LM, Barker RA, Gage FH, Bussey TJ (2009) A Functional Role for Adult Hippocampal Neurogenesis in Spatial Pattern Separation. *Science* 325:210–213.
- Couillard-Despres S, Winner B, Karl C, Lindemann G, Schmid P, Aigner R, Laemke J, Bogdahn U, Winkler J, Bischofberger J, Aigner L (2006) Targeted transgene expression in neuronal precursors: watching young neurons in the old brain. *European Journal of Neuroscience* 24:1535–1545.
- Couillard-Despres S, Winner B, Schaubeck S, Aigner R, Vroemen M, Weidner N, Bogdahn U, Winkler J, Kuhn H-G, Aigner L (2005) Doublecortin expression levels in adult brain reflect neurogenesis. *European Journal of Neuroscience* 21:1–14.
- D’Arcangelo G, Nakajima K, Miyata T, Ogawa M, Mikoshiba K, Curran T (1997) Reelin Is a Secreted Glycoprotein Recognized by the CR-50 Monoclonal Antibody. *The Journal of Neuroscience* 17:23–31.
- David DJ, Samuels BA, Rainer Q, Wang J-W, Marsteller D, Mendez I, Drew M, Craig DA, Guiard BP, Guilloux J-P, Artymyshyn RP, Gardier AM, Gerald C, Antonijevic IA, Leonardo ED, Hen R (2009) Neurogenesis-Dependent and -Independent Effects of Fluoxetine in an Animal Model of Anxiety/Depression. *Neuron* 62:479–493.

- Decourt B, Bouleau Y, Dulon D, Hafidi A (2005) Expression analysis of neuroleukin, calmodulin, cortactin, and Rho7/Rnd2 in the intact and injured mouse brain. *Developmental Brain Research* 159:36–54.
- Deisseroth K, Singla S, Toda H, Monje M, Palmer TD, Malenka RC (2004) Excitation-neurogenesis coupling in adult neural stem/progenitor cells. *Neuron* 42:535–552.
- Deng W, Saxe MD, Gallina IS, Gage FH (2009) Adult-born hippocampal dentate granule cells undergoing maturation modulate learning and memory in the brain. *J Neurosci* 29:13532–13542.
- Dennis CV, Suh LS, Rodriguez ML, Kril JJ, Sutherland GT (2016) Human adult neurogenesis across the ages: An immunohistochemical study. *Neuropathol Appl Neurobiol* 42:621–638.
- DerMardirossian C, Bokoch GM (2005) GDIs: central regulatory molecules in Rho GTPase activation. *Trends in Cell Biology* 15:356–363.
- Desmond NL, Levy WB (1985) Granule cell dendritic spine density in the rat hippocampus varies with spine shape and location. *Neuroscience Letters* 54:219–224.
- Dhaliwal J, Lagace DC (2011) Visualization and genetic manipulation of adult neurogenesis using transgenic mice: Adult neurogenesis and transgenic mice. *European Journal of Neuroscience* 33:1025–1036.
- Diamantaki M, Frey M, Berens P, Preston-Ferrer P, Burgalossi A (2016) Sparse activity of identified dentate granule cells during spatial exploration. *Elife* 5.
- Doetsch F, Caillé I, Lim DA, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (1999) Subventricular Zone Astrocytes Are Neural Stem Cells in the Adult Mammalian Brain. *Cell* 97:703–716.
- Dotti C, Sullivan C, Banker G (1988) The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture. *The Journal of Neuroscience* 8:1454–1468.
- Dotti CG, Banker G (1991) Intracellular organization of hippocampal neurons during the development of neuronal polarity. *Journal of Cell Science* 1991:75–84.
- Drapeau E, Mayo W, Aurousseau C, Le Moal M, Piazza P-V, Abrous DN (2003) Spatial memory performances of aged rats in the water maze predict levels of hippocampal neurogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100:14385–14390.
- Drew LJ, Kheirbek MA, Luna VM, Denny CA, Cloyd MA, Wu MV, Jain S, Scharfman HE, Hen R (2016) Activation of local inhibitory circuits in the dentate gyrus by adult-born neurons. *Hippocampus* 26:763–778.
- Duan X, Chang JH, Ge S, Faulkner RL, Kim JY, Kitabatake Y, Liu X, Yang C-H, Jordan JD, Ma DK, Liu CY, Ganesan S, Cheng H-J, Ming G, Lu B, Song H (2007) Disrupted-In-Schizophrenia 1 Regulates Integration of Newly Generated Neurons in the Adult Brain. *Cell* 130:1146–1158.

- Dupret D, Fabre A, Döbrössy MD, Panatier A, Rodríguez JJ, Lamarque S, Lemaire V, Olier SHR, Piazza P-V, Abrous DN (2007) Spatial Learning Depends on Both the Addition and Removal of New Hippocampal Neurons. *PLoS Biol* 5.
- Dupret D, Revest J-M, Koehl M, Ichas F, De Giorgi F, Costet P, Abrous DN, Piazza PV (2008) Spatial relational memory requires hippocampal adult neurogenesis. *PLoS ONE* 3:e1959.
- Eichenbaum H, Stewart C, Morris R (1990) Hippocampal representation in place learning. *The Journal of Neuroscience* 10:3531–3542.
- Eliwa H, Belzung C, Surget A (2017) Adult hippocampal neurogenesis: Is it the alpha and omega of antidepressant action? *Biochem Pharmacol* 141:86–99.
- Encinas JM, Michurina TV, Peunova N, Park J-H, Tordo J, Peterson DA, Fishell G, Koulakov A, Enikolopov G (2011) Division-coupled astrocytic differentiation and age-related depletion of neural stem cells in the adult hippocampus. *Cell Stem Cell* 8:566–579.
- Endl E, Hollmann C, Gerdes J (2001) Chapter 18 Antibodies against the Ki-67 protein: Assessment of the growth fraction and tools for cell cycle analysis. In: *Methods in Cell Biology*, pp 399–418. Elsevier.
- Eriksson PS, Perfilieva E, Björk-Eriksson T, Alborn A-M, Nordborg C, Peterson DA, Gage FH (1998) Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nature Medicine* 4:1313–1317.
- Espósito MS, Piatti VC, Laplagne DA, Morgenstern NA, Ferrari CC, Pitossi FJ, Schinder AF (2005) Neuronal differentiation in the adult hippocampus recapitulates embryonic development. *J Neurosci* 25:10074–10086.
- Etienne-Manneville S, Hall A (2002) Rho GTPases in cell biology. *Nature* 420:629–635.
- Faigle R, Song H (2013) Signaling mechanisms regulating adult neural stem cells and neurogenesis. *Biochim Biophys Acta* 1830:2435–2448.
- Falconer DS (1951) Two new mutants, “trembler” and “reeler”, with neurological actions in the house mouse (*Mus musculus* L.). *J Genet* 50:192–201.
- Fanselow MS (1980) Conditioned and unconditional components of post-shock freezing. *Pavlov J Biol Sci* 15:177–182.
- Fanselow MS, Dong H-W (2010) Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures? *Neuron* 65:7–19.
- Farioli-Vecchioli S, Saraulli D, Costanzi M, Pacioni S, Cinà I, Aceti M, Micheli L, Bacci A, Cestari V, Tirone F (2008) The Timing of Differentiation of Adult Hippocampal Neurons Is Crucial for Spatial Memory. *PLOS Biology* 6:e246.
- Favaro R, Valotta M, Ferri ALM, Latorre E, Mariani J, Giachino C, Lancini C, Tosetti V, Ottolenghi S, Taylor V, Nicolis SK (2009) Hippocampal development and neural stem cell maintenance require Sox2-dependent regulation of Shh. *Nature Neuroscience* 12:1248–1256.

- Fiegen D, Blumenstein L, Stege P, Vetter IR, Ahmadian MR (2002) Crystal structure of Rnd3/RhoE: functional implications. *FEBS Letters*:5.
- Filippov V, Kronenberg G, Pivneva T, Reuter K, Steiner B, Wang LP, Yamaguchi M, Kettenmann H, Kempermann G (2003) Subpopulation of nestin-expressing progenitor cells in the adult murine hippocampus shows electrophysiological and morphological characteristics of astrocytes. *Mol Cell Neurosci* 23:373–382.
- Forster E, Tielsch A, Saum B, Weiss KH, Johanssen C, Graus-Porta D, Muller U, Frotscher M (2002) Reelin, Disabled 1, and α 1 integrins are required for the formation of the radial glial scaffold in the hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99:13178–13183.
- Foster R, Hu KQ, Lu Y, Nolan KM, Thissen J, Settleman J (1996) Identification of a novel human Rho protein with unusual properties: GTPase deficiency and in vivo farnesylation. *Molecular and Cellular Biology* 16:2689–2699.
- Freund TF, Buzsáki G (1998) Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus* 6:347–470.
- Frotscher M, Haas CA, Forster E (2003) Reelin controls granule cell migration in the dentate gyrus by acting on the radial glial scaffold. *Cereb Cortex* 13:634–640.
- Fujita H, Katoh H, Ishikawa Y, Mori K, Negishi M (2002) Rapostlin Is a Novel Effector of Rnd2 GTPase Inducing Neurite Branching. *Journal of Biological Chemistry* 277:45428–45434.
- Furtak SC, Wei S-M, Agster KL, Burwell RD (2007) Functional neuroanatomy of the parahippocampal region in the rat: The perirhinal and postrhinal cortices. *Hippocampus* 17:709–722.
- Gadea G, Toledo M de, Anguille C, Roux P (2007) Loss of P53 Promotes RhoA-ROCK-Dependent Cell Migration and Invasion in 3D Matrices. *The Journal of Cell Biology* 178:23–30.
- Galichet C, Guillemot F, Parras CM (2008) Neurogenin 2 has an essential role in development of the dentate gyrus. *Development* 135:2031–2041.
- Gao Z, Ure K, Ables JL, Lagace DC, Nave K-A, Goebbels S, Eisch AJ, Hsieh J (2009) Neurod1 is essential for the survival and maturation of adult-born neurons. *Nature Neuroscience* 12:1090–1092.
- Garavini H, Riento K, Phelan JP, McAlister MSB, Ridley AJ, Keep NH (2002) Crystal Structure of the Core Domain of RhoE/Rnd3: A Constitutively Activated Small G Protein α , β . *Biochemistry* 41:6303–6310.
- Garcia ADR, Doan NB, Imura T, Bush TG, Sofroniew MV (2004) GFAP-expressing progenitors are the principal source of constitutive neurogenesis in adult mouse forebrain. *Nat Neurosci* 7:1233–1241.
- Garthe A, Behr J, Kempermann G (2009) Adult-Generated Hippocampal Neurons Allow the Flexible Use of Spatially Precise Learning Strategies Earley RL, ed. *PLoS ONE* 4:e5464.

- Ge S, Goh ELK, Sailor KA, Kitabatake Y, Ming G, Song H (2006) GABA regulates synaptic integration of newly generated neurons in the adult brain. *Nature* 439:589–593.
- Ge S, Yang C-H, Hsu K-S, Ming G-L, Song H (2007) A critical period for enhanced synaptic plasticity in newly generated neurons of the adult brain. *Neuron* 54:559–566.
- Gebara E, Bonaguidi MA, Beckervordersandforth R, Sultan S, Udry F, Gijis P-J, Lie DC, Ming G-L, Song H, Toni N (2016) Heterogeneity of Radial Glia-Like Cells in the Adult Hippocampus. *Stem Cells* 34:997–1010.
- Gilbert PE, Kesner RP, Lee I (2001) Dissociating hippocampal subregions: double dissociation between dentate gyrus and CA1. *Hippocampus* 11:626–636.
- Gleeson JG, Lin PT, Flanagan LA, Walsh CA (1999) Doublecortin Is a Microtubule-Associated Protein and Is Expressed Widely by Migrating Neurons. *Neuron* 23:257–271.
- Goh LL, Manser E (2012) The GTPase-deficient Rnd Proteins Are Stabilized by Their Effectors. *Journal of Biological Chemistry* 287:31311–31320.
- Goldman SA, Nottebohm F (1983) Neuronal production, migration, and differentiation in a vocal control nucleus of the adult female canary brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 80:2390–2394.
- Gonçalves JT, Bloyd CW, Shtrahman M, Johnston ST, Schafer ST, Parylak SL, Tran T, Chang T, Gage FH (2016) In vivo imaging of dendritic pruning in dentate granule cells. *Nature Neuroscience* 19:788–791.
- Gonzales RB, DeLeon Galvan CJ, Rangel YM, Claiborne BJ (2001) Distribution of thorny excrescences on CA3 pyramidal neurons in the rat hippocampus. *The Journal of Comparative Neurology* 430:357–368.
- Gossen M, Bujard H (1992) Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:5547–5551.
- Gould E, Beylin A, Tanapat P, Reeves A, Shors TJ (1999a) Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation. *Nat Neurosci* 2:260–265.
- Gould E, Reeves AJ, Fallah M, Tanapat P, Gross CG, Fuchs E (1999b) Hippocampal neurogenesis in adult Old World primates. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:5263–5267.
- Gould E, Tanapat P, McEwen BS, Flügge G, Fuchs E (1998) Proliferation of granule cell precursors in the dentate gyrus of adult monkeys is diminished by stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:3168–3171.
- Gould E, Woolley CS, McEwen BS (1991) Naturally occurring cell death in the developing dentate gyrus of the rat. *J Comp Neurol* 304:408–418.
- Govek E-E, Newey SE, Van Aelst L (2005) The role of the Rho GTPases in neuronal development. *Genes Dev* 19:1–49.
- Gratzner HG (1982) Monoclonal antibody to 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine: A new reagent for detection of DNA replication. *Science* 218:474–475.

- Green EJ, Juraska JM (1985) The dendritic morphology of hippocampal dentate granule cells varies with their position in the granule cell layer: a quantitative Golgi study. *Experimental Brain Research* 59.
- Grise F, Bidaud A, Moreau V (2009) Rho GTPases in hepatocellular carcinoma. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* 1795:137–151.
- Grove EA, Tole S, Limon J, Yip L, Ragsdale CW (1998) The hem of the embryonic cerebral cortex is defined by the expression of multiple Wnt genes and is compromised in Gli3-deficient mice. :11.
- Halasy K, Somogyi P (1993) Subdivisions in the Multiple GABAergic Innervation of Granule Cells in the Dentate Gyrus of the Rat Hippocampus. *European Journal of Neuroscience* 5:411–429.
- Han ZS, Buhl EH, Lorinczi Z, Somogyi P (1993) A high degree of spatial selectivity in the axonal and dendritic domains of physiologically identified local-circuit neurons in the dentate gyrus of the rat hippocampus. *Eur J Neurosci* 5:395–410.
- Hand R, Bortone D, Mattar P, Nguyen L, Heng JI-T, Guerrier S, Boutt E, Peters E, Barnes AP, Parras C, Schuurmans C, Guillemot F, Polleux F (2005) Phosphorylation of Neurogenin2 Specifies the Migration Properties and the Dendritic Morphology of Pyramidal Neurons in the Neocortex. *Neuron* 48:45–62.
- Hastings NB, Gould E (1999) Rapid extension of axons into the CA3 region by adult-generated granule cells. *The Journal of Comparative Neurology* 413:146–154.
- Hayashi K, Kubo K, Kitazawa A, Nakajima K (2015) Cellular dynamics of neuronal migration in the hippocampus. *Frontiers in Neuroscience* 9.
- Heinrich C, Gascón S, Masserdotti G, Lepier A, Sanchez R, Simon-Ebert T, Schroeder T, Götz M, Berninger B (2011) Generation of subtype-specific neurons from postnatal astroglia of the mouse cerebral cortex. *Nature Protocols* 6:214–228.
- Heins N, Malatesta P, Cecconi F, Nakafuku M, Tucker KL, Hack MA, Chapouton P, Barde Y-A, Götz M (2002) Erratum: Glial cells generate neurons: the role of the transcription factor Pax6. *Nature Neuroscience* 5:308–315.
- Heng JI-T, Nguyen L, Castro DS, Zimmer C, Wildner H, Armant O, Skowronska-Krawczyk D, Bedogni F, Matter J-M, Hevner R, Guillemot F (2008) Neurogenin 2 controls cortical neuron migration through regulation of Rnd2. *Nature* 455:114–118.
- Hill AS, Sahay A, Hen R (2015) Increasing Adult Hippocampal Neurogenesis is Sufficient to Reduce Anxiety and Depression-Like Behaviors. *Neuropsychopharmacology* 40:2368–2378.
- Hjorth-Simonsen A, Jeune B (1972) Origin and termination of the hippocampal perforant path in the rat studied by silver impregnation. *J Comp Neurol* 144:215–232.
- Hodge RD, Nelson BR, Kahoud RJ, Yang R, Mussar KE, Reiner SL, Hevner RF (2012) Tbr2 Is Essential for Hippocampal Lineage Progression from Neural Stem Cells to Intermediate Progenitors and Neurons. *Journal of Neuroscience* 32:6275–6287.

- Hodge RG, Ridley AJ (2016) Regulating Rho GTPases and their regulators. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 17:496–510.
- Hsieh J (2012) Orchestrating transcriptional control of adult neurogenesis. *Genes Dev* 26:1010–1021.
- Iijima T, Miura E, Watanabe M, Yuzaki M (2010) Distinct expression of C1q-like family mRNAs in mouse brain and biochemical characterization of their encoded proteins: Expression and biochemical properties of C1ql subfamily. *European Journal of Neuroscience*:no-no.
- Ikrar T, Guo N, He K, Besnard A, Levinson S, Hill A, Lee H-K, Hen R, Xu X, Sahay A (2013) Adult neurogenesis modifies excitability of the dentate gyrus. *Front Neural Circuits* 7:204.
- Indra AK, Warot X, Brocard J, Bornert JM, Xiao JH, Chambon P, Metzger D (1999) Temporally-controlled site-specific mutagenesis in the basal layer of the epidermis: comparison of the recombinase activity of the tamoxifen-inducible Cre-ER(T) and Cre-ER(T2) recombinases. *Nucleic Acids Res* 27:4324–4327.
- Ishikawa Y, Katoh H, Negishi M (2003) A Role of Rnd1 GTPase in Dendritic Spine Formation in Hippocampal Neurons. *The Journal of Neuroscience* 23:11065–11072.
- Ito H, Morishita R, Iwamoto I, Nagata K (2014) Establishment of an in vivo electroporation method into postnatal newborn neurons in the dentate gyrus. *Hippocampus* 24:1449–1457.
- Jeon C-Y, Moon M-Y, Kim J-H, Kim H-J, Kim J-G, Li Y, Jin J-K, Kim P-H, Kim H-C, Meier KE, Kim Y-S, Park J-B (2012) Control of neurite outgrowth by RhoA inactivation: cAMP regulates RhoA activity in PC12 cells. *Journal of Neurochemistry* 120:684–698.
- Johansson CB, Svensson M, Wallstedt L, Janson AM, Frisén J (1999) Neural stem cells in the adult human brain. *Exp Cell Res* 253:733–736.
- Jones SP, Rahimi O, O’Boyle MP, Diaz DL, Claiborne BJ (2003) Maturation of granule cell dendrites after mossy fiber arrival in hippocampal field CA3. *Hippocampus* 13:413–427.
- Kaplan MS, Bell DH (1983) Neuronal proliferation in the 9-month-old rodent-radioautographic study of granule cells in the hippocampus. *Exp Brain Res* 52:1–5.
- Kaplan MS, Bell DH (1984) Mitotic neuroblasts in the 9-day-old and 11-month-old rodent hippocampus. *J Neurosci* 4:1429–1441.
- Kaplan MS, McNelly NA, Hinds JW (1985) Population dynamics of adult-formed granule neurons of the rat olfactory bulb. *J Comp Neurol* 239:117–125.
- Kee N, Sivalingam S, Boonstra R, Wojtowicz J. (2002) The utility of Ki-67 and BrdU as proliferative markers of adult neurogenesis. *Journal of Neuroscience Methods* 115:97–105.
- Kempermann G (2003) Early determination and long-term persistence of adult-generated new neurons in the hippocampus of mice. *Development* 130:391–399.
- Kempermann G (2008) The neurogenic reserve hypothesis: what is adult hippocampal neurogenesis good for? *Trends in Neurosciences* 31:163–169.

- Kempermann G (2011) Seven principles in the regulation of adult neurogenesis: Regulation of adult neurogenesis. *European Journal of Neuroscience* 33:1018–1024.
- Kempermann G, Gage FH, Aigner L, Song H, Curtis MA, Thuret S, Kuhn HG, Jessberger S, Frankland PW, Cameron HA, Gould E, Hen R, Abrous DN, Toni N, Schinder AF, Zhao X, Lucassen PJ, Frisén J (2018) Human Adult Neurogenesis: Evidence and Remaining Questions. *Cell Stem Cell* 23:25–30.
- Kempermann G, Jessberger S, Steiner B, Kronenberg G (2004) Milestones of neuronal development in the adult hippocampus. *Trends in Neurosciences* 27:447–452.
- Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH (1997) More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature* 386:493–495.
- Kerloch T, Clavreul S, Goron A, Abrous DN, Pacary E (2018) Dentate Granule Neurons Generated During Perinatal Life Display Distinct Morphological Features Compared With Later-Born Neurons in the Mouse Hippocampus. *Cereb Cortex*.
- Kheirbek MA, Drew LJ, Burghardt NS, Costantini DO, Tannenholz L, Ahmari SE, Zeng H, Fenton AA, Hen R (2013) Differential control of learning and anxiety along the dorsoventral axis of the dentate gyrus. *Neuron* 77:955–968.
- Kheirbek MA, Tannenholz L, Hen R (2012) NR2B-dependent plasticity of adult-born granule cells is necessary for context discrimination. *J Neurosci* 32:8696–8702.
- Khwaja A (1999) Akt is more than just a Bad kinase: Apoptosis. *Nature* 401:33–34.
- Kim JY, Duan X, Liu CY, Jang M-H, Guo JU, Pow-anpongkul N, Kang E, Song H, Ming G (2009) DISC1 Regulates New Neuron Development in the Adult Brain via Modulation of AKT-mTOR Signaling through KIAA1212. *Neuron* 63:761–773.
- Kim JY, Liu CY, Zhang F, Duan X, Wen Z, Song J, Feighery E, Lu B, Rujescu D, St Clair D, Christian K, Callicott JH, Weinberger DR, Song H, Ming G (2012) Interplay between DISC1 and GABA Signaling Regulates Neurogenesis in Mice and Risk for Schizophrenia. *Cell* 148:1051–1064.
- Klein RM, Aplin AE (2009) Rnd3 Regulation of the Actin Cytoskeleton Promotes Melanoma Migration and Invasive Outgrowth in Three Dimensions. *Cancer Research* 69:2224–2233.
- Knoth R, Singec I, Ditter M, Pantazis G, Capetian P, Meyer RP, Horvat V, Volk B, Kempermann G (2010) Murine features of neurogenesis in the human hippocampus across the lifespan from 0 to 100 years. *PLoS ONE* 5:e8809.
- Köhler C (1985) Intrinsic projections of the retrohippocampal region in the rat brain. I. The subicular complex. *Journal of Comparative Neurology* 236:504–522.
- Komander D, Garg R, Wan PTC, Ridley AJ, Barford D (2008) Mechanism of multi-site phosphorylation from a ROCK-I:RhoE complex structure. *The EMBO Journal* 27:3175–3185.

- Kornack DR, Rakic P (1999) Continuation of neurogenesis in the hippocampus of the adult macaque monkey. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:5768–5773.
- Kron MM, Zhang H, Parent JM (2010) The Developmental Stage of Dentate Granule Cells Dictates Their Contribution to Seizure-Induced Plasticity. *Journal of Neuroscience* 30:2051–2059.
- Kuhn HG, Dickinson-Anson H, Gage FH (1996) Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J Neurosci* 16:2027–2033.
- Lagace DC, Whitman MC, Noonan MA, Ables JL, DeCarolus NA, Arguello AA, Donovan MH, Fischer SJ, Farnbauch LA, Beech RD, DiLeone RJ, Greer CA, Mandyam CD, Eisch AJ (2007) Dynamic Contribution of Nestin-Expressing Stem Cells to Adult Neurogenesis. *Journal of Neuroscience* 27:12623–12629.
- Laplagne DA, Espósito MS, Piatti VC, Morgenstern NA, Zhao C, van Praag H, Gage FH, Schinder AF (2006) Functional Convergence of Neurons Generated in the Developing and Adult Hippocampus Macklis J, ed. *PLoS Biology* 4:e409.
- Laplagne DA, Kamienkowski JE, Espósito MS, Piatti VC, Zhao C, Gage FH, Schinder AF (2007) Similar GABAergic inputs in dentate granule cells born during embryonic and adult neurogenesis: GABAergic inhibition in embryo- and adult-born neurons. *European Journal of Neuroscience* 25:2973–2981.
- Laurberg S (1979) Commissural and intrinsic connections of the rat hippocampus. *The Journal of Comparative Neurology* 184:685–708.
- Lavado A, Lagutin OV, Chow LML, Baker SJ, Oliver G (2010) Prox1 is required for granule cell maturation and intermediate progenitor maintenance during brain neurogenesis. *PLoS Biol* 8.
- Lee H, Kang E, GoodSmith D, Yoon DY, Song H, Knierim JJ, Ming G, Christian KM (2015) DISC1-mediated dysregulation of adult hippocampal neurogenesis in rats. *Frontiers in Systems Neuroscience* 9.
- Lee SM, Tole S, Grove E, McMahon AP (2000) A local Wnt-3a signal is required for development of the mammalian hippocampus. *Development* 127:457–467.
- Lefebvre JL, Sanes JR, Kay JN (2015) Development of Dendritic Form and Function. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 31:741–777.
- Lemaire V, Tronel S, Montaron M-F, Fabre A, Dugast E, Abrous DN (2012) Long-lasting plasticity of hippocampal adult-born neurons. *J Neurosci* 32:3101–3108.
- Lewis PF, Emerman M (1994) Passage through mitosis is required for oncoretroviruses but not for the human immunodeficiency virus. *Journal of Virology* 68:510–516.
- Li K, Lu Y, Liang J, Luo G, Ren G, Wang X, Fan D (2009a) RhoE enhances multidrug resistance of gastric cancer cells by suppressing Bax. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 379:212–216.

- Li Y-H, Ghavampour S, Bondallaz P, Will L, Grenningloh G, Püschel AW (2009b) Rnd1 regulates axon extension by enhancing the microtubule destabilizing activity of SCG10. *Journal of Biological Chemistry* 284:16060.3-16060.
- Lie D-C, Colamarino SA, Song H-J, Désiré L, Mira H, Consiglio A, Lein ES, Jessberger S, Lansford H, Dearie AR, Gage FH (2005) Wnt signalling regulates adult hippocampal neurogenesis. *Nature* 437:1370–1375.
- Lim DA, Tramontin AD, Trevejo JM, Herrera DG, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (2000) Noggin Antagonizes BMP Signaling to Create a Niche for Adult Neurogenesis. *Neuron* 28:713–726.
- Lin X, Liu B, Yang X, Yue X, Diao L, Wang J, Chang J (2013) Genetic deletion of Rnd3 results in aqueductal stenosis leading to hydrocephalus through up-regulation of Notch signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110:8236–8241.
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods* 25:402–408.
- Llorens-Martín M, Rábano A, Ávila J (2016) The Ever-Changing Morphology of Hippocampal Granule Neurons in Physiology and Pathology. *Frontiers in Neuroscience* 9.
- Lugert S, Basak O, Knuckles P, Haussler U, Fabel K, Götz M, Haas CA, Kempermann G, Taylor V, Giachino C (2010) Quiescent and active hippocampal neural stem cells with distinct morphologies respond selectively to physiological and pathological stimuli and aging. *Cell Stem Cell* 6:445–456.
- Ma DK, Marchetto MC, Guo JU, Ming G, Gage FH, Song H (2010) Epigenetic choreographers of neurogenesis in the adult mammalian brain. *Nat Neurosci* 13:1338–1344.
- Madigan JP, Bodemann BO, Brady DC, Dewar BJ, Keller PJ, Leitges M, Philips MR, Ridley AJ, Der CJ, Cox AD (2009) Regulation of Rnd3 localization and function by protein kinase C α -mediated phosphorylation. *Biochemical Journal* 424:153–161.
- Madsen T., Kristjansen PE., Bolwig T., Wörtwein G (2003) Arrested neuronal proliferation and impaired hippocampal function following fractionated brain irradiation in the adult rat. *Neuroscience* 119:635–642.
- Mangale VS, Hirokawa KE, Satyaki PRV, Gokulchandran N, Chikbire S, Subramanian L, Shetty AS, Martynoga B, Paul J, Mai MV, Li Y, Flanagan LA, Tole S, Monuki ES (2008) Lhx2 Selector Activity Specifies Cortical Identity and Suppresses Hippocampal Organizer Fate. *Science* 319:304–309.
- Marie-Claire C, Salzmann J, David A, Courtin C, Canestrelli C, Noble F (2007) Rnd family genes are differentially regulated by 3,4-methylenedioxymethamphetamine and cocaine acute treatment in mice brain. *Brain Research* 1134:12–17.
- Markakis EA, Gage FH (1999) Adult-generated neurons in the dentate gyrus send axonal projections to field CA3 and are surrounded by synaptic vesicles. *Journal of Comparative Neurology* 406:449–460.

- Massa F, Koehl M, Koelh M, Wiesner T, Grosjean N, Revest J-M, Piazza P-V, Abrous DN, Oliet SHR (2011) Conditional reduction of adult neurogenesis impairs bidirectional hippocampal synaptic plasticity. *Proc Natl Acad Sci USA* 108:6644–6649.
- Mathews EA, Morgenstern NA, Piatti VC, Zhao C, Jessberger S, Schinder AF, Gage FH (2010) A distinctive layering pattern of mouse dentate granule cells is generated by developmental and adult neurogenesis. *J Comp Neurol* 518:4479–4490.
- McAvoy KM, Scobie KN, Berger S, Russo C, Guo N, Decharatanachart P, Vega-Ramirez H, Miake-Lye S, Whalen M, Nelson M, Bergami M, Bartsch D, Hen R, Berninger B, Sahay A (2016) Modulating Neuronal Competition Dynamics in the Dentate Gyrus to Rejuvenate Aging Memory Circuits. *Neuron* 91:1356–1373.
- McColl B, Garg R, Riou P, Riento K, Ridley AJ (2016) Rnd3-induced cell rounding requires interaction with Plexin-B2. *Journal of Cell Science:jcs.192211*.
- Meshi D, Drew MR, Saxe M, Ansorge MS, David D, Santarelli L, Malapani C, Moore H, Hen R (2006) Hippocampal neurogenesis is not required for behavioral effects of environmental enrichment. *Nat Neurosci* 9:729–731.
- Miller JA, Nathanson J, Franjic D, Shim S, Dalley RA, Shapouri S, Smith KA, Sunkin SM, Bernard A, Bennett JL, Lee C-K, Hawrylycz MJ, Jones AR, Amaral DG, Sestan N, Gage FH, Lein ES (2013) Conserved molecular signatures of neurogenesis in the hippocampal subgranular zone of rodents and primates. *Development* 140:4633–4644.
- Miller MW, Nowakowski RS (1988) Use of bromodeoxyuridine-immunohistochemistry to examine the proliferation, migration and time of origin of cells in the central nervous system. *Brain Res* 457:44–52.
- Mocholí E, Ballester-Lurbe B, Arqué G, Poch E, Peris B, Guerri C, Dierssen M, Guasch RM, Terrado J, Pérez-Roger I (2011) RhoE deficiency produces postnatal lethality, profound motor deficits and neurodevelopmental delay in mice. *PLoS ONE* 6:e19236.
- Mongiat LA, Espósito MS, Lombardi G, Schinder AF (2009) Reliable activation of immature neurons in the adult hippocampus. *PLoS ONE* 4:e5320.
- Mori K, Amano M, Takefuji M, Kato K, Morita Y, Nishioka T, Matsuura Y, Murohara T, Kaibuchi K (2009) Rho-kinase Contributes to Sustained RhoA Activation through Phosphorylation of p190A RhoGAP. *Journal of Biological Chemistry* 284:5067–5076.
- Morris RG, Garrud P, Rawlins JN, O’Keefe J (1982) Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature* 297:681–683.
- Morshead CM, Reynolds BA, Craig CG, McBurney MW, Staines WA, Morassutti D, Weiss S, van der Kooy D (1994) Neural stem cells in the adult mammalian forebrain: a relatively quiescent subpopulation of subependymal cells. *Neuron* 13:1071–1082.
- Mu Y, Lee SW, Gage FH (2010) Signaling in adult neurogenesis. *Curr Opin Neurobiol* 20:416–423.
- Mu Y, Zhao C, Toni N, Yao J, Gage FH (2015) Distinct roles of NMDA receptors at different stages of granule cell development in the adult brain. *eLife* 4.

- Muramatsu R, Ikegaya Y, Matsuki N, Koyama R (2007) Neonatally born granule cells numerically dominate adult mice dentate gyrus. *Neuroscience* 148:593–598.
- Nadiminty N, Dutt S, Tepper C, Gao AC (2009) Microarray analysis reveals potential target genes of NF- κ B/p52 in LNCaP prostate cancer cells. *The Prostate*:n/a-n/a.
- Nakahira E, Yuasa S (2005) Neuronal generation, migration, and differentiation in the mouse hippocampal primordium as revealed by enhanced green fluorescent protein gene transfer by means of in utero electroporation. *The Journal of Comparative Neurology* 483:329–340.
- Nakamura K, Yamashita Y, Tamamaki N, Katoh H, Kaneko T, Negishi M (2006) In vivo function of Rnd2 in the development of neocortical pyramidal neurons. *Neuroscience Research* 54:149–153.
- Nakashiba T, Cushman JD, Pelkey KA, Renaudineau S, Buhl DL, McHugh TJ, Rodriguez Barrera V, Chittajallu R, Iwamoto KS, McBain CJ, Fanselow MS, Tonegawa S (2012) Young dentate granule cells mediate pattern separation, whereas old granule cells facilitate pattern completion. *Cell* 149:188–201.
- Namba T, Ming G, Song H, Waga C, Enomoto A, Kaibuchi K, Kohsaka S, Uchino S (2011) NMDA receptor regulates migration of newly generated neurons in the adult hippocampus via Disrupted-In-Schizophrenia 1 (DISC1): NMDA-R signaling regulates cell migration via DISC1. *Journal of Neurochemistry* 118:34–44.
- Navarro-Quiroga I, Chittajallu R, Gallo V, Haydar TF (2007) Long-Term, Selective Gene Expression in Developing and Adult Hippocampal Pyramidal Neurons Using Focal In Utero Electroporation. *Journal of Neuroscience* 27:5007–5011.
- Nicholson DW, Ali A, Thornberry NA, Vaillancourt JP, Ding CK, Gallant M, Gareau Y, Griffin PR, Labelle M, Lazebnik YA (1995) Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature* 376:37–43.
- Nishi M, Takeshima H, Houtani T, Nakagawara K, Noda T, Sugimoto T (1999) RhoN, a novel small GTP-binding protein expressed predominantly in neurons and hepatic stellate cells. *Molecular Brain Research* 67:74–81.
- Nobes CD, Lauritzen I, Mattei M-G, Paris S, Hall A, Chardin P (1998) A New Member of the Rho Family, Rnd1, Promotes Disassembly of Actin Filament Structures and Loss of Cell Adhesion. *The Journal of Cell Biology* 141:187–197.
- Nolte C, Matyash M, Pivneva T, Schipke CG, Ohlemeyer C, Hanisch U-K, Kirchhoff F, Kettenmann H (2001) GFAP promoter-controlled EGFP-expressing transgenic mice: A tool to visualize astrocytes and astrogliosis in living brain tissue. *Glia* 33:72–86.
- Nottebohm F (1985) Neuronal replacement in adulthood. *Ann N Y Acad Sci* 457:143–161.
- Nowakowski RS, Lewin SB, Miller MW (1989) Bromodeoxyuridine immunohistochemical determination of the lengths of the cell cycle and the DNA-synthetic phase for an anatomically defined population. *J Neurocytol* 18:311–318.

- Oinuma I, Katoh H, Harada A, Negishi M (2003) Direct Interaction of Rnd1 with Plexin-B1 Regulates PDZ-RhoGEF-mediated Rho Activation by Plexin-B1 and Induces Cell Contraction in COS-7 Cells. *Journal of Biological Chemistry* 278:25671–25677.
- Oinuma I, Kawada K, Tsukagoshi K, Negishi M (2012) Rnd1 and Rnd3 targeting to lipid raft is required for p190 RhoGAP activation Kaibuchi K, ed. *Molecular Biology of the Cell* 23:1593–1604.
- Oishi K, Watatani K, Itoh Y, Okano H, Guillemot F, Nakajima K, Gotoh Y (2009) Selective induction of neocortical GABAergic neurons by the PDK1-Akt pathway through activation of Mash1. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106:13064–13069.
- O'Mara SM, Commins S, Anderson M, Gigg J (2001) The subiculum: a review of form, physiology and function. *Progress in Neurobiology* 64:129–155.
- Ongusaha PP, Kim H-G, Boswell SA, Ridley AJ, Der CJ, Dotto GP, Kim Y-B, Aaronson SA, Lee SW (2006) RhoE Is a Pro-Survival p53 Target Gene that Inhibits ROCK I-Mediated Apoptosis in Response to Genotoxic Stress. *Current Biology* 16:2466–2472.
- Oppenheim RW (1991) Cell death during development of the nervous system. *Annu Rev Neurosci* 14:453–501.
- Orban PC, Chui D, Marth JD (1992) Tissue- and site-specific DNA recombination in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:6861–6865.
- Ory DS, Neugeboren BA, Mulligan RC (1996) A stable human-derived packaging cell line for production of high titer retrovirus/vesicular stomatitis virus G pseudotypes. *PNAS* 93:11400–11406.
- Overstreet-Wadiche L, Bromberg DA, Bensen AL, Westbrook GL (2005) GABAergic Signaling to Newborn Neurons in Dentate Gyrus. *Journal of Neurophysiology* 94:4528–4532.
- Pacary E, Azzarelli R, Guillemot F (2013) Rnd3 coordinates early steps of cortical neurogenesis through actin-dependent and -independent mechanisms. *Nature Communications* 4.
- Pacary E, Haas MA, Wildner H, Azzarelli R, Bell DM, Abrous DN, Guillemot F (2012) Visualization and Genetic Manipulation of Dendrites and Spines in the Mouse Cerebral Cortex and Hippocampus using In utero Electroporation. *Journal of Visualized Experiments*.
- Pacary E, Heng J, Azzarelli R, Riou P, Castro D, Lebel-Potter M, Parras C, Bell DM, Ridley AJ, Parsons M, Guillemot F (2011) Proneural Transcription Factors Regulate Different Steps of Cortical Neuron Migration through Rnd-Mediated Inhibition of RhoA Signaling. *Neuron* 69:1069–1084.
- Palmer TD, Willhoite AR, Gage FH (2000) Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis. *J Comp Neurol* 425:479–494.
- Paton JA, Nottebohm FN (1984) Neurons generated in the adult brain are recruited into functional circuits. *Science* 225:1046–1048.

- Peris B, Gonzalez-Granero S, Ballester-Lurbe B, García-Verdugo J-M, Pérez-Roger I, Guerri C, Terrado J, Guasch RM (2012) Neuronal polarization is impaired in mice lacking RhoE expression: RhoE regulates neuronal polarization. *Journal of Neurochemistry* 121:903–914.
- Pierce JP, McCloskey DP, Scharfman HE (2011) Morphometry of hilar ectopic granule cells in the rat. *The Journal of Comparative Neurology* 519:1196–1218.
- Pilpel N, Landeck N, Klugmann M, Seeburg PH, Schwarz MK (2009) Rapid, reproducible transduction of select forebrain regions by targeted recombinant virus injection into the neonatal mouse brain. *Journal of Neuroscience Methods* 182:55–63.
- Pilz G-A, Bottes S, Betizeau M, Jörg DJ, Carta S, Simons BD, Helmchen F, Jessberger S (2018) Live imaging of neurogenesis in the adult mouse hippocampus. *Science* 359:658–662.
- Piquet L, Robbe T, Neaud V, Basbous S, Rosciglione S, Saltel F, Moreau V (2018) Rnd3/RhoE expression is regulated by G-actin through MKL1-SRF signaling pathway. *Exp Cell Res* 370:227–236.
- Pleasure SJ, Collins AE, Lowenstein DH (2000) Unique Expression Patterns of Cell Fate Molecules Delineate Sequential Stages of Dentate Gyrus Development. *The Journal of Neuroscience* 20:6095–6105.
- Poch E, Miñambres R, Mocholí E, Ivorra C, Pérez-Aragó A, Guerri C, Pérez-Roger I, Guasch RM (2007) RhoE interferes with Rb inactivation and regulates the proliferation and survival of the U87 human glioblastoma cell line. *Experimental Cell Research* 313:719–731.
- Püschel AW (2007) GTPases in semaphorin signaling. *Adv Exp Med Biol* 600:12–23.
- Raber J, Rola R, LeFevour A, Morhardt D, Curley J, Mizumatsu S, VandenBerg SR, Fike JR (2004) Radiation-Induced Cognitive Impairments are Associated with Changes in Indicators of Hippocampal Neurogenesis. *Radiation Research* 162:39–47.
- Radic T, Jungenitz T, Singer M, Beining M, Cuntz H, Vlachos A, Deller T, Schwarzacher SW (2017) Time-lapse imaging reveals highly dynamic structural maturation of postnatally born dentate granule cells in organotypic entorhino-hippocampal slice cultures. *Scientific Reports* 7.
- Raftopoulou M, Hall A (2004) Cell migration: Rho GTPases lead the way. *Developmental Biology* 265:23–32.
- Rahimi O, Claiborne BJ (2007) Morphological development and maturation of granule neuron dendrites in the rat dentate gyrus. In: *Progress in Brain Research*, pp 167–181.
- Ramón y Cajal S (1893) Estructura del asta de Ammon y fascia dentata. In: *Anales de la Sociedad Española de Historia Natural*, pp 53–125.
- Ramón y Cajal S (1995) *Histology of the Nervous System of Man and Vertebrates*.

- Revest J-M, Dupret D, Koehl M, Funk-Reiter C, Grosjean N, Piazza P-V, Abrous DN (2009) Adult hippocampal neurogenesis is involved in anxiety-related behaviors. *Molecular Psychiatry* 14:959–967.
- Ribak CE, Seress L (1983) Five types of basket cell in the hippocampal dentate gyrus: a combined Golgi and electron microscopic study. *J Neurocytol* 12:577–597.
- Rickmann M, Amaral DG, Cowan WM (1987) Organization of radial glial cells during the development of the rat dentate gyrus. *The Journal of Comparative Neurology* 264:449–479.
- Ridley AJ (2001) Rho GTPases and cell migration. *J Cell Sci* 114:2713–2722.
- Riento K, Totty N, Villalonga P, Garg R, Guasch R, Ridley AJ (2005) RhoE function is regulated by ROCK I-mediated phosphorylation. *The EMBO Journal* 24:1170–1180.
- Riou P, Kjær S, Garg R, Purkiss A, George R, Cain RJ, Bineva G, Reymond N, McColl B, Thompson AJ, O'Reilly N, McDonald NQ, Parker PJ, Ridley AJ (2013) 14-3-3 Proteins Interact with a Hybrid Prenyl-Phosphorylation Motif to Inhibit G Proteins. *Cell* 153:640–653.
- Riou P, Villalonga P, Ridley AJ (2010) Rnd proteins: Multifunctional regulators of the cytoskeleton and cell cycle progression. *BioEssays* 32:986–992.
- Roberts PJ, Mitin N, Keller PJ, Chenette EJ, Madigan JP, Currin RO, Cox AD, Wilson O, Kirschmeier P, Der CJ (2008) Rho Family GTPase Modification and Dependence on C AAX Motif-signaled Posttranslational Modification. *Journal of Biological Chemistry* 283:25150–25163.
- Rubin AN, Kessaris N (2013) PROX1: a lineage tracer for cortical interneurons originating in the lateral/caudal ganglionic eminence and preoptic area. *PLoS ONE* 8:e77339.
- Sahay A, Scobie KN, Hill AS, O'Carroll CM, Kheirbek MA, Burghardt NS, Fenton AA, Dranovsky A, Hen R (2011) Increasing adult hippocampal neurogenesis is sufficient to improve pattern separation. *Nature* 472:466–470.
- Santarelli L (2003) Requirement of Hippocampal Neurogenesis for the Behavioral Effects of Antidepressants. *Science* 301:805–809.
- Save L, Baude A, Cossart R (2018) Temporal Embryonic Origin Critically Determines Cellular Physiology in the Dentate Gyrus. *Cerebral Cortex*.
- Saxe MD, Battaglia F, Wang J-W, Malleret G, David DJ, Monckton JE, Garcia ADR, Sofroniew MV, Kandel ER, Santarelli L, Hen R, Drew MR (2006) Ablation of hippocampal neurogenesis impairs contextual fear conditioning and synaptic plasticity in the dentate gyrus. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:17501–17506.
- Schlessinger AR, Cowan WM, Gottlieb DI (1975) An autoradiographic study of the time of origin and the pattern of granule cell migration in the dentate gyrus of the rat. *J Comp Neurol* 159:149–175.

- Schmidt-Hieber C, Jonas P, Bischofberger J (2004) Enhanced synaptic plasticity in newly generated granule cells of the adult hippocampus. *Nature* 429:184–187.
- Scholzen T, Gerdes J (2000) The Ki-67 protein: From the known and the unknown. *Journal of Cellular Physiology* 182:311–322.
- Schwab MH, Bartholomae A, Heimrich B, Feldmeyer D, Druffel-Augustin S, Goebbels S, Naya FJ, Zhao S, Frotscher M, Tsai M-J, Nave K-A (2000) Neuronal Basic Helix-Loop-Helix Proteins (NEX and BETA2/Neuro D) Regulate Terminal Granule Cell Differentiation in the Hippocampus. *The Journal of Neuroscience* 20:3714–3724.
- Seabra MC (1998) Membrane Association and Targeting of Prenylated Ras-like GTPases. *Cellular Signalling* 10:167–172.
- Seress L, Pokorny J (1981) Structure of the granular layer of the rat dentate gyrus. A light microscopic and Golgi study. *J Anat* 133:181–195.
- Shors TJ, Miesegaes G, Beylin A, Zhao M, Rydel T, Gould E (2001) Neurogenesis in the adult is involved in the formation of trace memories. *Nature* 410:372–376.
- Shors TJ, Townsend DA, Zhao M, Kozorovitskiy Y, Gould E (2002) Neurogenesis may relate to some but not all types of hippocampal-dependent learning. *Hippocampus* 12:578–584.
- Sierra A, Encinas JM, Deudero JJP, Chancey JH, Enikolopov G, Overstreet-Wadiche LS, Tsirka SE, Maletic-Savatic M (2010) Microglia Shape Adult Hippocampal Neurogenesis through Apoptosis-Coupled Phagocytosis. *Cell Stem Cell* 7:483–495.
- Sik A, Penttonen M, Buzsáki G (1997) Interneurons in the Hippocampal Dentate Gyrus: an In Vivo intracellular Study. *European Journal of Neuroscience* 9:573–588.
- Snyder JS, Hong NS, McDonald RJ, Wojtowicz JM (2005) A role for adult neurogenesis in spatial long-term memory. *Neuroscience* 130:843–852.
- Song H, Stevens CF, Gage FH (2002) Astroglia induce neurogenesis from adult neural stem cells. *Nature* 417:39–44.
- Song J, Zhong C, Bonaguidi MA, Sun GJ, Hsu D, Gu Y, Meletis K, Huang ZJ, Ge S, Enikolopov G, Deisseroth K, Luscher B, Christian KM, Ming G, Song H (2012) Neuronal circuitry mechanism regulating adult quiescent neural stem-cell fate decision. *Nature* 489:150–154.
- Soriano E, Frotscher M (1989) A GABAergic axo-axonic cell in the fascia dentata controls the main excitatory hippocampal pathway. *Brain Res* 503:170–174.
- Sorrells SF, Paredes MF, Cebrian-Silla A, Sandoval K, Qi D, Kelley KW, James D, Mayer S, Chang J, Augustine KI, Chang EF, Gutierrez AJ, Kriegstein AR, Mathern GW, Oldham MC, Huang EJ, Garcia-Verdugo JM, Yang Z, Alvarez-Buylla A (2018) Human hippocampal neurogenesis drops sharply in children to undetectable levels in adults. *Nature* 555:377–381.

- Spalding KL, Bergmann O, Alkass K, Bernard S, Salehpour M, Huttner HB, Boström E, Westerlund I, Vial C, Buchholz BA, Possnert G, Mash DC, Druid H, Frisén J (2013) Dynamics of Hippocampal Neurogenesis in Adult Humans. *Cell* 153:1219–1227.
- Steward O, Scoville SA (1976) Cells of origin of entorhinal cortical afferents to the hippocampus and fascia dentata of the rat. *J Comp Neurol* 169:347–370.
- Sugiyama T, Osumi N, Katsuyama Y (2013) The germinal matrices in the developing dentate gyrus are composed of neuronal progenitors at distinct differentiation stages: Expression of Neurogenic TFS During DG Development. *Developmental Dynamics* 242:1442–1453.
- Suh H, Consiglio A, Ray J, Sawai T, D'Amour KA, Gage FH (2007) In vivo fate analysis reveals the multipotent and self-renewal capacities of Sox2+ neural stem cells in the adult hippocampus. *Cell Stem Cell* 1:515–528.
- Sultan S, Li L, Moss J, Petrelli F, Cassé F, Gebara E, Lopatar J, Pfrieger FW, Bezzi P, Bischofberger J, Toni N (2015) Synaptic Integration of Adult-Born Hippocampal Neurons Is Locally Controlled by Astrocytes. *Neuron* 88:957–972.
- Sun GJ, Sailor KA, Mahmood QA, Chavali N, Christian KM, Song H, Ming G -I. (2013) Seamless Reconstruction of Intact Adult-Born Neurons by Serial End-Block Imaging Reveals Complex Axonal Guidance and Development in the Adult Hippocampus. *Journal of Neuroscience* 33:11400–11411.
- Sun W (2004) Programmed Cell Death of Adult-Generated Hippocampal Neurons Is Mediated by the Proapoptotic Gene Bax. *Journal of Neuroscience* 24:11205–11213.
- Surget A, Tanti A, Leonardo ED, Laugeray A, Rainer Q, Touma C, Palme R, Griebel G, Ibarguen-Vargas Y, Hen R, Belzung C (2011) Antidepressants recruit new neurons to improve stress response regulation. *Molecular Psychiatry* 16:1177–1188.
- Svitkina T, Lin W-H, Webb DJ, Yasuda R, Wayman GA, Van Aelst L, Soderling SH (2010) Regulation of the Postsynaptic Cytoskeleton: Roles in Development, Plasticity, and Disorders. *Journal of Neuroscience* 30:14937–14942.
- Swanson L, Cowan W (1975) Hippocampo-hypothalamic connections: origin in subicular cortex, not ammon's horn. *Science* 189:303–304.
- Swanson LW, Wyss JM, Cowan WM (1978) An autoradiographic study of the organization of intrahippocampal association pathways in the rat. *The Journal of Comparative Neurology* 181:681–715.
- Talens-Visconti R, Peris B, Guerri C, Guasch RM (2010) RhoE stimulates neurite-like outgrowth in PC12 cells through inhibition of the RhoA/ROCK-I signalling. *Journal of Neurochemistry* 112:1074–1087.
- Tanaka H, Fujita H, Katoh H, Mori K, Negishi M (2002) Vps4-A (vacuolar protein sorting 4-A) is a binding partner for a novel Rho family GTPase, Rnd2. *Biochemical Journal* 365:349–353.
- Tanaka H, Katoh H, Negishi M (2006) Pragmin, a Novel Effector of Rnd2 GTPase, Stimulates RhoA Activity. *Journal of Biological Chemistry* 281:10355–10364.

- Tashiro A, Sandler VM, Toni N, Zhao C, Gage FH (2006) NMDA-receptor-mediated, cell-specific integration of new neurons in adult dentate gyrus. *Nature* 442:929–933.
- Tashiro A, Zhao C, Gage FH (2007) Retrovirus-mediated single-cell gene knockout technique in adult newborn neurons in vivo. *Nature Protocols* 1:3049–3055.
- Toda T, Parylak SL, Linker SB, Gage FH (2018) The role of adult hippocampal neurogenesis in brain health and disease. *Molecular Psychiatry*.
- Tomita K (2000) Mammalian achaete-scute and atonal homologs regulate neuronal versus glial fate determination in the central nervous system. *The EMBO Journal* 19:5460–5472.
- Tong Y, Chugha P, Hota PK, Alviani RS, Li M, Tempel W, Shen L, Park H-W, Buck M (2007) Binding of Rac1, Rnd1, and RhoD to a Novel Rho GTPase Interaction Motif Destabilizes Dimerization of the Plexin-B1 Effector Domain. *Journal of Biological Chemistry* 282:37215–37224.
- Toni N, Laplagne DA, Zhao C, Lombardi G, Ribak CE, Gage FH, Schinder AF (2008) Neurons born in the adult dentate gyrus form functional synapses with target cells. *Nat Neurosci* 11:901–907.
- Toni N, Sultan S (2011) Synapse formation on adult-born hippocampal neurons: Adult neurogenesis and synaptogenesis. *European Journal of Neuroscience* 33:1062–1068.
- Toni N, Teng EM, Bushong EA, Aimone JB, Zhao C, Consiglio A, van Praag H, Martone ME, Ellisman MH, Gage FH (2007) Synapse formation on neurons born in the adult hippocampus. *Nat Neurosci* 10:727–734.
- Tozuka Y, Fukuda S, Namba T, Seki T, Hisatsune T (2005) GABAergic excitation promotes neuronal differentiation in adult hippocampal progenitor cells. *Neuron* 47:803–815.
- Treves A, Tashiro A, Witter MP, Moser EI (2008) What is the mammalian dentate gyrus good for? *Neuroscience* 154:1155–1172.
- Tronel S, Belnoue L, Grosjean N, Revest J-M, Piazza P-V, Koehl M, Abrous DN (2012) Adult-born neurons are necessary for extended contextual discrimination. *Hippocampus* 22:292–298.
- Tronel S, Fabre A, Charrier V, Oliet SHR, Gage FH, Abrous DN (2010) Spatial learning sculpts the dendritic arbor of adult-born hippocampal neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107:7963–7968.
- Tronel S, Lemaire V, Charrier V, Montaron M-F, Abrous DN (2015) Influence of ontogenetic age on the role of dentate granule neurons. *Brain Struct Funct* 220:645–661.
- Tyburczy ME, Kotulska K, Pokarowski P, Mieczkowski J, Kucharska J, Grajkowska W, Roszkowski M, Jozwiak S, Kaminska B (2010) Novel Proteins Regulated by mTOR in Subependymal Giant Cell Astrocytomas of Patients with Tuberous Sclerosis Complex and New Therapeutic Implications. *The American Journal of Pathology* 176:1878–1890.

- Uesugi K, Oinuma I, Katoh H, Negishi M (2009) Different Requirement for Rnd GTPases of R-Ras GAP Activity of Plexin-C1 and Plexin-D1. *Journal of Biological Chemistry* 284:6743–6751.
- Urbán N, Guillemot F (2014) Neurogenesis in the embryonic and adult brain: same regulators, different roles. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 8.
- Vadodaria KC, Jessberger S (2013) Maturation and integration of adult born hippocampal neurons: signal convergence onto small Rho GTPases. *Frontiers in Synaptic Neuroscience* 5.
- van Praag H, Kempermann G, Gage FH (1999) Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nat Neurosci* 2:266–270.
- van Praag H, Schinder AF, Christie BR, Toni N, Palmer TD, Gage FH (2002) Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature* 415:1030–1034.
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F (2002) Chromatin signatures of pluripotent cell lines. *Genome Biology* 3:research0034.1.
- Villalonga P, de Mattos SF, Ridley AJ (2009) RhoE Inhibits 4E-BP1 Phosphorylation and eIF4E Function Impairing Cap-dependent Translation. *Journal of Biological Chemistry* 284:35287–35296.
- Villalonga P, Guasch RM, Riento K, Ridley AJ (2004) RhoE Inhibits Cell Cycle Progression and Ras-Induced Transformation. *Molecular and Cellular Biology* 24:7829–7840.
- Vivar C, Potter MC, Choi J, Lee J, Stringer TP, Callaway EM, Gage FH, Suh H, van Praag H (2012) Monosynaptic inputs to new neurons in the dentate gyrus. *Nature Communications* 3.
- Wakita Y, Kakimoto T, Katoh H, Negishi M (2011) The F-BAR Protein Rapostlin Regulates Dendritic Spine Formation in Hippocampal Neurons. *Journal of Biological Chemistry* 286:32672–32683.
- Wei L, Meaney MJ, Duman RS, Kaffman A (2011) Affiliative behavior requires juvenile, but not adult neurogenesis. *J Neurosci* 31:14335–14345.
- Weiss KH, Johanssen C, Tielsch A, Herz J, Deller T, Frotscher M, Förster E (2003) Malformation of the radial glial scaffold in the dentate gyrus of reeler mice, scrambler mice, and ApoER2/VLDLR-deficient mice. *The Journal of Comparative Neurology* 460:56–65.
- Wennerberg K (2005) The Ras superfamily at a glance. *Journal of Cell Science* 118:843–846.
- Wennerberg K, Forget M-A, Ellerbroek SM, Arthur WT, Burrridge K, Settleman J, Der CJ, Hansen SH (2003) Rnd Proteins Function as RhoA Antagonists by Activating p190 RhoGAP. *Current Biology* 13:1106–1115.
- Wickersham IR, Lyon DC, Barnard RJO, Mori T, Finke S, Conzelmann K-K, Young JAT, Callaway EM (2007) Monosynaptic Restriction of Transsynaptic Tracing from Single, Genetically Targeted Neurons. *Neuron* 53:639–647.
- Wilkinson G, Dennis D, Schuurmans C (2013) Proneural genes in neocortical development. *Neuroscience* 253:256–273.

- Williams PA, Larimer P, Gao Y, Strowbridge BW (2007) Semilunar Granule Cells: Glutamatergic Neurons in the Rat Dentate Gyrus with Axon Collaterals in the Inner Molecular Layer. *Journal of Neuroscience* 27:13756–13761.
- Wu Q, Li Y, Xiao B (2013) DISC1-related signaling pathways in adult neurogenesis of the hippocampus. *Gene* 518:223–230.
- Xu L, Tang X, Wang Y, Xu H, Fan X (2015) Radial Glia, the Keystone of the Development of the Hippocampal Dentate Gyrus. *Molecular Neurobiology* 51:131–141.
- Ye G, Yi S, Gamkrelidze G, Pasternak JF, Trommer BL (2005) AMPA and NMDA receptor-mediated currents in developing dentate gyrus granule cells. *Developmental Brain Research* 155:26–32.
- Yeh C-Y, Asrican B, Moss J, Quintanilla LJ, He T, Mao X, Cassé F, Gebara E, Bao H, Lu W, Toni N, Song J (2018) Mossy Cells Control Adult Neural Stem Cell Quiescence and Maintenance through a Dynamic Balance between Direct and Indirect Pathways. *Neuron* 99:493–510.e4.
- Zhao C, Teng EM, Summers RGJ, Ming G-L, Gage FH (2006) Distinct morphological stages of dentate granule neuron maturation in the adult mouse hippocampus. *J Neurosci* 26:3–11.
- Zhao S, Chai X, Förster E, Frotscher M (2004) Reelin is a positional signal for the lamination of dentate granule cells. *Development* 131:5117–5125.