



HAL
open science

Etude de la neurogenèse hippocampique adulte et des fonctions cognitives chez trois souris modèles de déficience intellectuelle

Charlotte Castillon

► **To cite this version:**

Charlotte Castillon. Etude de la neurogenèse hippocampique adulte et des fonctions cognitives chez trois souris modèles de déficience intellectuelle. Neurobiologie. Université Paris Saclay (COMUE), 2018. Français. NNT : 2018SACLS049 . tel-04025685

HAL Id: tel-04025685

<https://theses.hal.science/tel-04025685>

Submitted on 13 Mar 2023

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.

Etude de la neurogenèse hippocampique adulte et des fonctions cognitives chez trois souris modèles de déficience intellectuelle

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay
préparée à l'Université Paris-Sud

École doctorale n°568 : Signalisations et Réseaux Intégratifs en
Biologie (BIOSIGNE)
Spécialité de doctorat: Sciences de la vie et de la santé

Thèse présentée et soutenue à Orsay, le 12 mars 2018, par

Charlotte CASTILLON

Composition du Jury :

Michael SCHUMACHER DR, (INSERM, U-PSud UMR S_1195, Le Kremlin-Bicêtre)	Président
Claire RAMPON DR, CRCA (CNRS UMR5169, Toulouse)	Rapporteur
Yann HERAULT DR, IGBMC (CNRS UMR7104 / INSERM U1258, Illkirch)	Rapporteur
Marika NOSTEN-BERTRAND CR, IFM (INSERM, UPMC UMR_S839, Paris)	Examinatrice
Serge LAROCHE DRCE, Neuro-PSI (CNRS, U-PSud UMR9197, Orsay)	Directeur de thèse
Roseline POIRIER MCF, Neuro-PSI (CNRS, U-PSud UMR9197, Orsay)	Co-Directrice de thèse

Remerciements

Si pour certains doctorants (que je ne citerai pas ;)) les mots viennent à manquer au moment des remerciements, c'est pourtant à ce moment précis que je me demande comment ne pas rendre cette partie trop longue !

J'adresse tout d'abord mes remerciements les plus sincères à tous les membres du jury qui ont accepté d'examiner ce travail. Je remercie Dr Claire Rampon et Dr Yann Hérault d'avoir accepté d'être rapporteurs, Dr Marika Nosten-Bertrand d'avoir accepté d'être examinateur et enfin Dr Michael Schumacher d'avoir accepté de présider ma soutenance de thèse. Bien évidemment, je remercie l'école doctorale BIOSIGNE et le ministère pour m'avoir accordée une bourse pour la réalisation de mon doctorat. Je remercie également Laurent Surdi de l'ED pour sa disponibilité et son aide pour toutes les démarches administratives. Un grand merci également aux Dr Marika Nosten-Bertrand et Dr Denis David pour leurs conseils précieux lors de mon oral de mi-parcours de thèse.

Puis viens le tour des deux personnes les plus importantes, sans qui ce travail n'aurait pas aboutit : Roseline et Serge. Je vous remercie infiniment de m'avoir ouvert les portes du labo, de m'avoir offert la possibilité de réaliser ce projet et de m'avoir fait confiance. Vous avez, selon moi, joué vos rôles de directeur de thèse à merveille en me formant tout au long de ces trois années (et plus !). Vous m'avez guidée dans le monde scientifique, permis de découvrir tout un ensemble de choses plus passionnantes les unes que les autres et soutenue lors d'événements/passages bien moins passionnants...ou faciles ! Tels de vrais second « parents » !

Roseline, j'ai tellement de chose à dire que je ne sais pas par où commencer... Dès mon petit stage d'été tu m'as accordé ta confiance. Au cours de toutes ces années, tu m'as appris à développer mon esprit critique, à être rigoureuse et à être encore plus perfectionniste ! Je te remercie **énormément** pour ta disponibilité et pour tout le temps que tu m'as accordé (même les soirs et les week-ends !). Ton soutien à toutes épreuves, ton énorme investissement, mais aussi ton humour et ta bonne humeur ont été une excellente source d'énergie. Tu as rapidement réussi à me transmettre ta grande motivation, sans limites, entraînant des journées manip ultras chargées digne d'un marathon, mais toujours réussies ! De toute façon quelque soit la situation, « ça va le faire ! ». Partager le bureau avec toi a été un réel plaisir, siège de discussions scientifiques, non scientifiques, rigolades mais jamais d'engueulades ! Tu l'auras compris, réaliser cette thèse à tes côtés a été un réel plaisir et je pense sincèrement qu'un grand nombre de doctorants serait envieux de l'encadrement dont j'ai bénéficié !! En y réfléchissant, depuis ces presque 5 ans, je n'ai que des bons souvenirs ! Et pour cela MERCI !

Serge, je te remercie pour avoir partagé avec moi une partie de tes connaissances scientifiques et pour m'avoir aiguillée quand cela était nécessaire. Un grand merci pour tout le temps que tu m'as accordé pour faire des répétitions, ainsi que pour tes corrections et pour toutes les questions que tu m'as posées pour me tester !! Et pour tous les bons moments passés au laboratoire et lors des congrès.

Je souhaite également à remercier Cyrille Vaillend et Jean-Vianney Barnier pour m'avoir fait confiance sur l'étude de leur modèle murin, pour toutes les discussions scientifiques que nous avons partagées et pour leur contribution tout au long de mon doctorat. Je tiens également à remercier Valérie Enderlin, pour m'avoir formée aux Western blot... et à astiquer les moindres recoins de la paillasse !! Un grand merci également pour tout le temps que tu as passé sur mes expériences et sur mon projet. Un grand merci également à Sandrine Guyon, pour m'avoir formé à l'utilisation du confocal et pour tous les conseils techniques dont tu m'as fait part. Et bien sûr, je vous remercie également tous les quatre, pour tous les très bons autres moments que nous avons eu la chance de passer ensemble au laboratoire mais également lors de certains congrès !

Je tiens également à remercier toute l'équipe animalerie, qui a beaucoup changée tout au long de ma thèse, pour le soin avec lequel vous vous êtes occupé des animaux, ainsi que pour toute l'aide technique que vous m'avez apportée. Un grand merci aux immunobiologistes Nathalie et Bernadette, pour vos conseils et pour m'avoir formée sur les divers appareils.

Un grand merci également à Aline Marigetto, pour m'avoir fait partager sa tâche comportementale (très complexe !), ainsi que pour tous les échanges et tous les conseils qu'elle m'a donnés.

Je tiens également à remercier Konstantina, toi qui a réalisé un énorme travail sur un des modèles et qui m'a permis de pratiquer l'anglais avec plus d'aisance ! Je tiens également à remercier tous les autres stagiaires qui ont participé à mes travaux de thèse : Baptiste, Lucie, Wendy, Sylvain et Alice. Et surtout un grand merci à toi Laurine, pour tout ce que tu as apporté à ma thèse, à ta bonne humeur, à ta sympathie et à tous ces week-ends « manip » très sympathiques ! J'espère sincèrement que tu prennes le relais !!

Enfin, le tiens à remercier toutes les personnes qui occupent ce labo ! Merci à Jean-Marc, pour tes discussions, ta gentillesse et ta disponibilité ! Merci également à toutes les personnes qui ont rendu les repas du midi très sympathiques : Serge, Sabrina, Nicolas, Catherine, Nicole, Valérie, Nathalie, Bernadette, Bruno, Pascale... et tous les autres ! Un grand merci également à tout les doctorants/stagiaires qui peuplent le labo (ou qui ont peuplé le labo!). J'ai apprécié chaque moment passé à vos côtés, qu'ils soient au labo ou en dehors: chaque "student club" et repas de Noël, chaque discussions, scientifiques comme non scientifiques, ainsi que les différents colloques ! Alex, Claire, Nathalie, Lucille, Charlotte, Kevin, Mehdi, Faouzi, Aurore, Sumen, Victor, Ophélie, Laetitia, merci à vous ! Un grand merci à toi aussi, Steeve pour m'avoir montré les manipulations durant mon premier stage

au labo! Enfin, un grand merci à toi Bruno, pour m'avoir permis de me vider la tête pendant tous ces kilomètres parcourus en courant ! C'est un peu grâce à toi que j'ai continué à courir et que je ne suis pas devenue folle !!

J'ai également eu la chance, au cours de mon doctorat, de réaliser un monitorat, je tiens donc à remercier toute l'équipe d'enseignement de biologie qui m'a accueillie, pour m'avoir fait découvrir le monde des professeurs : les moments sympas, ainsi que les contraintes : Heather, Micaela, Laurence, Mathis, Simon, Romain, Séverine, Solal, Aurore, Amine. Je tiens à remercier très chaleureusement Mica et Laurence douées d'une gentillesse incroyable avec qui j'ai partagé de très bons moments. Et puisque vous êtes inséparables (haha !), je remercie d'une pierre de coup, le duo Romain & Simon, les exclus du 430 et les grands gagnants du barbecue de l'institut, pour tous ces bons moments passés en enseignements et au labo, mais également en congrès et lors des soirées ! A continuer ! ;)

Un grand merci à ma grande copine de fac, Delph, c'était vraiment un très grand plaisir de pouvoir travailler et rigoler à tes côtés pendant les études et le stage de M2 ! Et quoi de plus réjouissant pour moi de pouvoir que de te citer dans mon manuscrit !!!

J'en arrive enfin à mes « deux familles » comme j'aime les appeler. A vous mes amis de très longue date, les meilleurs (!!!). Un grand merci pour l'intérêt que vous avez porté à mon projet et pour votre soutien durant ces longues études : « Elles vont bien tes souris ? », « Au fait quand est-ce que tu soutiens ? », « On pourra venir ? ». J'espère que vous aurez survécu à ma soutenance !! Béno, Manu, RB, Cha, Jade, Alex, Arnaud, Arthur, Hélo, Gautier, Etienne, Oli, Guigui, Cawo, Sandrine, Aline, Romain...

Je tiens tout particulièrement à te remercier RB, toi qui étais présent à toutes les étapes de mon parcours. J'ai beaucoup apprécié ton énorme soutien et ton réconfort en fin de thèse qui était plus que nécessaire !!!

Enfin à ma famille, la vraie cette fois ci, Maman, Papa, Nico, Ysolde, Lou, vous qui êtes présents depuis le début de cette aventure, qui m'avez encouragé et énormément soutenue (même quand c'est devenu très difficile !). Je vous remercie pour tout le réconfort que vous m'avez apporté. J'ai réellement une chance incroyable de vous avoir à mes côtés ! Merci maman de me chouchouter toujours autant ! Papa, le deal est remporté ! Et tu vois Nico, j'aurai mis du temps mais ça y est, mes études sont enfin finies !!

Enfin, je remercie les deux personnes les plus importantes, celles qui sont la source de ma motivation depuis maintenant bien plus de 11 ans... Mamie France et Mamie Odette, c'est à vous deux que je dédie cette thèse.

Communications orales et affichées

- **Nationales**

Adult hippocampal neurogenesis and cognitive functions in three mouse model of intellectual disability. Journée de l'école doctorale BioSigne, 2017. [Communication orale](#).

Castillon C, Barnier JV, Laroche S, Poirier R. (2017). The R67C intellectual disability mutation of the *pak3* gene impairs adult hippocampal neurogenesis and cognitive functions. Ecole thématique TransMem, Porquerolles, 2017. [Communication affichée](#).

Castillon C, Lunion S, Desvignes N, Hanauer A, Laroche S, Poirier R. (2017). Transient delayed maturation of adult hippocampal newborn neurons and impaired cognitive functions in a mouse model of the Coffin-Lowry intellectual disability syndrome. Ecole thématique TransMem, Porquerolles, 2017. [Communication affichée](#).

Castillon C, Lunion S, Desvignes N, Hanauer A, Laroche S, Poirier R. (2016). Adult hippocampal neurogenesis in a mouse model of the Coffin-Lowry intellectual disability syndrome. Journée de l'école doctorale BioSigne, 2016. [Communication affichée](#).

Castillon C, Barnier JV, Laroche S, Poirier R. (2016). Cognitive functions and adult hippocampal neurogenesis in R67C-KI-*pak3* mouse model of intellectual disability. 2ème journées thématiques des Neurosciences, Tours, 2016 [Communication affichée](#) et [présentation flash](#).

Castillon C, Barnier JV, Laroche S, Poirier R. (2016). Cognitive functions and adult hippocampal neurogenesis in R67C-KI-*pak3* mouse model of intellectual disability. GDR Neuromem, Lacanau, 2016 [Communication affichée](#).

Castillon C, Barnier JV, Laroche S, Poirier R. (2015). Cognitive functions and adult hippocampal neurogenesis in R67C-KI-*pak3* mouse model of intellectual disability. Journée de l'école doctorale BioSigne, 2015. [Communication affichée](#).

- **Internationales**

Castillon C, Barnier JV, Laroche S, Poirier R. (2017). The R67C intellectual disability mutation of the *pak3* gene impairs adult hippocampal neurogenesis and cognitive functions. NeuroFrance, Bordeaux, 2017. [Communication affichée](#).

Castillon C, Barnier JV, Laroche S, Poirier R. (2016). Alterations of adult hippocampal neurogenesis in R67C-KI-*pak3* mouse model of intellectual disability. Eurogenesis Meeting, Bordeaux, 2016. [Communication affichée](#).

Castillon C, Lunion S, Desvignes N, Hanauer A, Laroche S, Poirier R. (2016). Adult hippocampal neurogenesis in a mouse model of the Coffin-Lowry intellectual disability syndrome. Eurogenesis Meeting, Bordeaux, 2016. [Communication affichée](#).

Sommaire

Communications orales et affichées.....	7
Abréviations	13
Figures et Tableaux.....	15
Préambule	17

Introduction.....

19

I. La déficience intellectuelle	21
1.1. Définition	21
1.2. Les causes de la déficience intellectuelle	22
a. Causes environnementales	22
b. Causes génétiques	23
1.3. Les DI liées au chromosome X.....	25
1.4. Troubles mnésiques observés dans la DI.....	28
1.5. Mécanismes sous-jacents à la DI.....	30
a. Altération de la prolifération au cours du développement.....	31
b. Migration neuronale	32
c. Synaptogenèse, morphologie des dendrites et plasticité synaptique	33
d. Signalisation cellulaire et processus épigénétiques.....	38
II. La neurogenèse hippocampique adulte.....	40
2.1. Description générale.....	41
2.2. Déroulement de la neurogenèse hippocampique adulte.....	43
a. Propriétés des cellules précurseurs	43
i. Cellules de Type 1	43
ii. Cellules de Type 2	43
iii. Cellules de Type 3	45
b. Maturation morphologique et synaptique.....	45
c. Régulation de la neurogenèse hippocampique adulte	49
2.3. Neurogenèse hippocampique adulte et fonctions cognitives	51
a. Corrélations positives.....	52
b. Rôle des nouveaux neurones dans les processus mnésiques	53

c.	Rôle de la neurogenèse adulte dans la gestion des interférences	56
d.	Rôle de la neurogenèse adulte dans la séparation de patterns	57
e.	Neurogenèse adulte et oubli	59
III.	Modèles murins d'étude de la DI	62
3.1.	Le syndrome de Coffin-Lowry	62
a.	Structure des protéines RSK	63
b.	Expression tissulaire.....	64
c.	Rôle de la protéine RSK2	65
d.	Modèle murin <i>Rsk2</i> -KO	66
3.2.	La déficience intellectuelle non syndromique liée à PAK3	68
a.	Structure de la protéine PAK3	69
b.	Expression tissulaire de PAK3	70
c.	Rôle de la protéine PAK3.....	71
d.	Modèles murins <i>Pak3</i> -KO et <i>Pak3</i> -R67C	73
3.3.	La Dystrophie musculaire de Duchenne	75
a.	Structure du gène <i>dmd</i> et des dystrophines	75
b.	Déficience intellectuelle dans la DMD	76
c.	Expression tissulaire de la Dp71	78
d.	Rôle de la protéine Dp71.....	78
e.	Modèle murin <i>Dp71</i> -KI	79

Objectifs de la thèse	81
------------------------------------	----

Matériels et Méthodes	85
------------------------------------	----

I.	Animaux.....	87
II.	Procédures comportementales	87
2.1.	Tâche d'apprentissage et de mémoire spatiale en labyrinthe aquatique :	88
a.	Version massée.....	89
b.	Version distribuée.....	89
2.2.	Tâches comportementales en labyrinthe radial :.....	90
a.	Mémoire de travail en labyrinthe radial :.....	91
b.	Tâche de non-appariement retardé en labyrinthe radial.....	91
c.	Tâche de non-appariement retardé avec essais successif en labyrinthe radial	92
2.3.	Séparation de pattern en reconnaissance d'objets:.....	94

III.	Etude de la neurogenèse	96
3.1.	Administration de la BrdU.....	96
3.2.	Perfusion intracardiaque et préparation des tissus	96
3.3.	Immunohistochimie.....	96
3.4.	Immunofluorescence.....	97
3.5.	Quantification des cellules BrdU ⁺ / Zif268 ⁺ / ki67 ⁺ et des cellules DCX ⁺	98
3.6.	Analyse et quantification des doubles et triples marquages :.....	98
a.	Analyse des cellules BrdU ⁺	98
b.	Analyse des cellules triplement marquées DCX ⁺ Zif268 ⁺ NeuN ⁺	98
c.	Quantification des cellules NeuN ⁺ et des cellules doublement marquées Zi268 ⁺ /NeuN ⁺	99
d.	Analyses phénotypiques des cellules ki67 ⁺ BrdU ⁺ âgés de 3 jours et DCX ⁺ :	99
IV.	Mesure des dendrites.....	99
V.	Analyses statistiques	99
Résultats		101
I.	Etude de la neurogenèse adulte et des fonctions cognitives associées, chez le modèle murin Rsk2-KO	103
1.1.	L'absence de RSK2 entraîne un retard de maturation des neurones immatures chez la souris <i>Rsk2</i> -KO sans affecter la prolifération et la survie neuronale	104
1.2.	L'absence de RSK2 affecte l'effet de l'apprentissage spatial sur la régulation de la neurogenèse adulte dans le GD et altère le recrutement par l'apprentissage des neurones immatures et matures.....	105
1.3.	La fonction de séparation de patterns est altérée chez les souris <i>Rsk2</i> -KO	106
Article 1		109
II.	Etude de la neurogenèse adulte et des fonctions cognitives associées chez le modèle murin <i>Pak3</i> -R67C	125
2.1.	Caractérisation comportementale de la souris <i>Pak3</i> -R67C.	126
2.2.	La mutation R67C du gène <i>Pak3</i> entraîne une mort accélérée transitoire des nouveaux neurones durant leur période critique de maturation	129
2.3.	Le gène <i>Pak3</i> contrôle le recrutement des nouveaux neurones dans les réseaux impliqués dans les processus mnésiques.....	130
Article 2		133
III.	Etude de la neurogenèse adulte et des fonctions cognitives, chez le modèle murin <i>Dp71</i> -KI169	170
3.1.	L'absence de la <i>Dp71</i> entraîne un déficit de reconnaissance de la localisation d'objets....	170
3.2.	La perte de la <i>Dp71</i> affecte la survie des nouveaux neurones de l'hippocampe dorsal	172

3.3. Etude du rôle de la Dp71 dans la maturation neuronale, la différenciation gliale, et la maturation dendritique.....	174
3.4. Discussion des résultats obtenus pour le modèle <i>Dp71-KI</i>	176
Discussion générale	179
I. Fonctions cognitives chez les trois souris modèles de DI.....	184
II. Etude de certains mécanismes sous-jacents à la DI.....	189
2.1. Neurogenèse hippocampique adulte	189
2.2. Mécanismes moléculaires potentiels	194
2.3. Morphologie des dendrites.....	195
III. Validité et pertinence des modèles murins de DI utilisés	199
IV. Perspectives thérapeutiques	200
V. Conclusion	203
Annexe	205
Annexe 1.....	206
Bibliographie	209

Abréviations

ADN : Acide DésoxyriboNucléique	CREB : cAMP-response element binding protein
AGC : cAMP-dependent-protein kinase/ protein kinase G/protein kinase C)	CREBBP : CREB-binding protein
AGC : Protéine A, G et C	CT : Domaine Carboxy-terminal
AID : Domaine auto-inhibiteur	CTKD : Domaine C-terminal
AMPA : Amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionic acid	DAB : 3,3- diaminobenzidine-tetrahydrochloride
ANOVA : Analysis of variance	DAGC : Dystrophin Associated Glycoprotein Complex
AQP4 : aquaporines	DCX : Doublecortine
Ara-C : cytosine-β-d-arabinofuranoside	DI : Déficience Intellectuelle
Arc : Activity-regulated cytoskeleton	DLT : Dépression à long terme
ARN : Acide Ribo Nucléique	DMD : Dystrophie Musculaire de Duchenne
ASPM : Abnormal spindle-like microcephaly-associated	DNMP : Delayed non-matching to place
ATF4 : Activating transcription factor 4	DNMTs : ADN méthyltransférases impliquées dans la méthylation des îlots CpG
BAD : BCL2-Associated Death promoter	EHMTs : The euchromatin histone methyltransferases
Bcl2 : B-Cell Lymphoma 2	EP300 : Histone acetyltransferase p300
BDNF : Brain-Derived Neurotrophic Factor	ERK1/2 : Extracellular signal-regulated kinase1 and 2
BrdU : 5-Bromo-2-deoxyUridine	fmr1 : Fragile X Mental Retardation 1
CA : Corne d'Ammon	FMRP : Fragile X Mental Retardation Protein
CAMK : calcium/calmodulin-dependent kinase	FOXP1 : Forkhead box protein G1
CBP : CREB-binding protein	GABA : acide γ-aminobutyrique
Cdc42 : Cell division control protein 42 homolog	GD : Gyrus Denté
CDK2 : Cyclin-dependent kinase 2	GFAP : Glial Fibrillary Acidic Protein
CDK5RAP2 : cyclin-dependent kinase 5 regulatory associated protein 2	GluR : Glutamate receptor
CE : cortex entorhinal	GSK3β : Glycogen Synthase Kinase 3 Beta
CENPJ : centromere-associated protein J	HCl : Acide Chlorhydrique
CLS : Syndrome de Coffin-Lowry	
CP : Plaque Corticale	
CR : Domaine Riche en cystéine	

HDAC4 : Histone deacetylase 4

IEGs : Gènes Immédiats précoces

IL1RAPL1 : Interleukin 1 Receptor Accessory Protein Like 1

IR : Irradiés

IRM : Imagerie cérébrale par Résonance Magnétique

ITn : Nombre d'essais interférents

IZ : zone intermédiaire

KCC2 : K+Cl- isoforme 2

KDM5C : Lysine Demethylase 5C

KO : Knock-out

LIMK : LIM kinase

LIMK1 : LIM kinase 1

LIS1 : lissencephaly-1

L-PLT : phase tardive de la PLT

MAM : acétate de méthyl-azoxy-méthanol

MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase

MeCP2 : méthyl-CpG-2

mGluR : metabotropic Glutamate Receptor

MSK : Mitogen and Stress activated Kinase

MT : Mémoire de Travail

Myt1 : Myelin Transcription Factor 1

NeuN : Neuronal Nuclei

NeuroD : Neurogenic Differentiation

NIR : Non irradiés

NKCC1 : Na+K+Cl-isoforme 1

NMDA : N-methyl-d-aspartate

NT : Domaine amino-terminal

NTKD : Domaine N-terminal

Ophn1 : Oligonephrin-1

OPS : Object pattern separation task

Pak3 : P21-activated kinase 3

PA : Potentiel d'action

PBD : Domaine de liaison aux GTPases

PB : Phosphate buffer

PK1 : sérine/thréonine kinase 3-Phosphoinositide-Dependant protein Kinase 1

PFA : paraformaldehyde

P-H3 : phospho histone H3

PHF8 : PHD Finger Protein 8

PI : Interférence Proactive

PLD1 : Phospholipase D1

PLT : Potentialisation à Long Terme

Prox-1 : prospero-related homeobox 1

PSD : postsynaptic density

PTP-δ : receptor protein tyrosine phosphatase

QI : Quotient Intellectuel

RELN : reelin

RI : Intervalle de Rétention

RPS6KA3 : Ribosomal Protein S6 Kinase, 90kDa polypeptide 3

RSK2 : 290-kDa ribosomal S6 kinase 2

SGZ : zone sous-granulaire

Sox2 : Sex determining region Y-box 2

SVZ : zone sous-ventriculaire

Tbr2 : T-box brain protein 2

TeTX : Toxine Tétanique

TUBA1A : Alpha tubuline 1A

TMZ : Témazolomide

WAIS : Wechsler Adult Intelligence Scale

WISC IV : Wechsler Intelligence Scale for Children

WT : Wild-type

XLID : X-Linked Intellectual Disability

Figures et Tableaux

Introduction

Figure 1 : Nombre de gènes liés à la DI identifiés en fonction des années.

Figure 2 : Gènes localisés sur le chromosome X connus comme étant impliqués dans les DI liés à l'X.

Figure 3 : Localisation (A) et fonctions des protéines (B) codées par des gènes impliqués dans les DI liés à l'X.

Figure 4 : Représentation schématique de l'organisation neuronale dans le cortex.

Figure 5 : Déficience intellectuelle et morphologie des épines dendritiques.

Figure 6 : Voies neuronales communément impliquées dans la DI.

Figure 7 : Représentation de certaines voies de signalisation cellulaires impliquées dans la transmission synaptique et la plasticité.

Figure 8 : Régions neurogéniques du cerveau adulte de rongeurs.

Figure 9 : Schéma du circuit neuronal de l'hippocampe de rongeurs.

Figure 10 : Neurogenèse adulte dans le GD de l'hippocampe.

Figure 11 : Maturation et migration des cellules néoformées de la SGZ au sein de la couche granulaire du GD.

Figure 12 : Maturation morphologique des nouveaux neurones du GD.

Figure 13 : Effet du GABA sur les neurones immatures et matures.

Figure 14 : Expression de Zif268 dans un nouveau neurone et dans les neurones matures du GD de l'hippocampe.

Figure 15 : Période critique d'intégration des nouveaux neurones hippocampique.

Figure 16 : La séparation de patterns permet de faire la distinction entre deux événements avec de nombreuses similitudes.

Figure 17 : Test de séparation de patterns en labyrinthe radial de Clelland *et al.* (2009).

Figure 18 : La neurogenèse facilite la flexibilité cognitive en facilitant la formation de nouvelles mémoires distinctes.

Figure 19 : Schéma représentant la structure générale des protéines RSKs.

Figure 20 : Exemple de cibles cytotogiques et nucléaires des protéines RSKs.

Figure 21 : Schéma de la structure de la protéine PAK3 et localisation des mutations identifiées actuellement et conduisant à une DI.

Figure 22 : Voies de signalisation des protéines PAK impliquées dans la plasticité synaptique et les déficits cognitifs.

Figure 23 : Organisation du gène de la dystrophine et des produits issus de ce gène.

Figure 24 : Répartition des patients DMD en fonction de leurs quotients intellectuels.

Tableau 1 : Signes cliniques observés chez l'Homme selon les différentes mutations du gène *pak3* connues.

Tableau 2 : Comparaison des résultats observés chez les trois modèles murins de DI.

Matériels et Méthodes

Figure 25 : Dispositif expérimental du labyrinthe aquatique.

Figure 26 : Dispositif du labyrinthe radial.

Figure 27 : Réalisation d'un essai dans la tâche de séparation de patterns en labyrinthe radial (Clelland *et al.* 2009).

Figure 28 : Tâche de non-appariement retardé avec essais successifs en labyrinthe radial (Al Abed *et al.* 2016).

Figure 29 : Tâche de séparation de patterns selon un protocole de reconnaissance d'objets.

Résultats

Figure 30 : Schéma récapitulatif des résultats obtenus chez la souris mutante *Pak3-R67C*.

Figure 31 : Performances des souris *Dp71-KI* en séparation de patterns dans le test de reconnaissance spatiale d'objets (van Hagen *et al.* 2015).

Figure 32 : Volumes en mm³ du GD dorsal et des couches granulaires qui le compose chez les souris WT et *Dp71-KI*.

Figure 33 : Prolifération cellulaire chez les souris *Dp71-KI*.

Figure 34 : Survie cellulaire chez les souris *Dp71-KI*.

Figure 35 : Différenciation et maturation cellulaire chez les souris *Dp71-KI*.

Figure 36 : Maturation morphologique des nouveaux neurones chez les souris *Dp71-KI*.

Figure 37 : Représentation schématique des isoformes de la Dp71.

Discussion

Figure 38 : Représentation schématique illustrant certaines des voies de signalisation neuronales impliquées dans la DI.

Figure 39 : Maturation morphologique des nouveaux neurones chez les souris *Rsk2-KO*, *Pak3-R67C* et *Dp71-KI*.

Tableau 3A : Troubles comportementaux observés chez différents modèles de souris de DI.

Tableau 3B : Altération de la neurogenèse adulte observés chez différents modèles de souris de DI.

Tableau 3C : Altérations des épines et des dendrites, de la PLT, ainsi que de l'expression de ERK observés chez différents modèles de souris de DI.

Annexe 1

Figure 40 : Dispositif expérimental utilisé pour la tâche de discrimination contextuelle (Sahay *et al.* 2011).

Figure 41 : Résultats obtenus lors de la tâche de discrimination contextuelle.

Préambule

La Déficience Intellectuelle (DI) est, au sens de l'Organisation Mondiale de la Santé, la capacité sensiblement réduite de comprendre une information nouvelle ou complexe, et d'apprendre et d'appliquer de nouvelles compétences. Ces déficiences sont associées à une aptitude diminuée à faire face à toute situation de manière indépendante (troubles du fonctionnement social), un trouble qui s'installe au cours du développement et exerce un effet durable sur la vie adulte. La DI est une maladie complexe compte tenu des signes cliniques extrêmement hétérogènes, des étiologies multiples et multifactorielles, allant de causes génétiques à des origines nutritionnelles, métaboliques, neurotoxiques ou infectieuses. L'ensemble de ces causes et conséquences observées suggèrent par ailleurs qu'il n'existe pas une, mais plusieurs formes de DI. Jusqu'aux années 2000, les patients étaient diagnostiqués « atteints de retard mental ». Ce terme a été progressivement puis définitivement remplacé par « Déficiant Intellectuel ». A travers le monde, les performances intellectuelles sont évaluées à partir de tests cognitifs standardisés comme le WAIS (Wechsler Adult Intelligence Scale) ou le WISC IV (Wechsler Intelligence Scale for Children). En raison de l'importance de la prévalence de ce trouble psychiatrique (1 à 3% de la population mondiale), des nécessités d'assistance et de médication des patients tout au long de leur vie mais aussi de l'impact social et émotionnel sur les patients et leurs familles, il demeure important de comprendre les phénomènes à l'origine de la DI afin d'envisager des stratégies adaptées d'apprentissages, d'accompagnements, de soutien et de traitements thérapeutiques.

Depuis les années 1990 et le lancement de la cartographie des gènes, le nombre de gènes et de mutations génétiques responsables des DI sont en constante augmentation. Mais au-delà de la caractérisation de ces nouveaux gènes, les défis d'aujourd'hui sont de mieux comprendre l'ensemble des mécanismes physiopathologiques sous-jacents et d'identifier des processus cellulaires communs dans lesquels interviennent les produits de ces gènes, deux objectifs de recherche qui ne sont pas encore assez développés mais dont les résultats pourraient amener à des cibles thérapeutiques potentielles.

Mon travail de thèse porte sur l'étude d'un de ces mécanismes cellulaires, récemment mis en cause dans les DI et dont les altérations pourraient contribuer aux déficits cognitifs associés aux DI : la neurogenèse hippocampique adulte. En effet, contrairement au dogme longtemps admis, le cerveau adulte est capable de donner naissance à de nouveaux neurones tous les jours, en particulier dans l'hippocampe. Ce phénomène correspond à une forme de plasticité qui joue un rôle crucial dans

la mémoire. En effet, lors d'un apprentissage, certains de ces nouveaux neurones sont sélectionnés pour survivre et s'intégrer aux réseaux neuronaux déjà présents afin de participer à la mise en mémoire des souvenirs.

Afin de mener à bien cette étude, trois modèles murins différents de DI ont été étudiés : la souris invalidée pour le gène *Rsk2*, modèle du syndrome de Coffin Lowry, la souris *Pak3-R67C*, modèle porteur d'une mutation ponctuelle du gène *Pak3* qui conduit à une forme de DI non syndromique chez l'Homme, et la souris *Dp71-KI*, modèle de la myopathie de Duchenne et porteuse d'une mutation du gène de la dystrophine (*dmd*). Ces trois gènes d'intérêt codent des protéines qui participent à différentes voies de signalisation susceptibles de moduler des étapes de la neurogenèse adulte. Ainsi, leurs mutations peuvent conduire, *in fine*, à des dysfonctionnements communs de cette forme de plasticité essentielle aux fonctions cognitives dépendantes de l'hippocampe, ce qui pourrait expliquer certains des dysfonctionnements cognitifs observés dans les DI (problèmes d'apprentissage, de mémoire, de raisonnement, d'attention...).

Ainsi, les principales données relatives aux domaines de la neurobiologie abordées au cours de ce doctorat seront résumées dans mon introduction : la première partie sera consacrée à la présentation des DI et des différents mécanismes connus pour être altérés dans ce trouble psychiatrique. Dans une deuxième partie, je détaillerai le processus de neurogenèse hippocampique adulte et sa contribution aux processus mnésiques. Enfin, je présenterai les trois modèles murins analysés dans cette étude, ainsi que les gènes/protéines impliqués. Après avoir retracé le contexte dans lequel s'inscrit mon étude, mon manuscrit de thèse se poursuivra par la présentation des résultats obtenus chez le modèle murin *Rsk2-KO* qui ont donné lieu à la publication d'un article dans le journal « *Neurobiology of disease* », puis par la présentation des résultats obtenus pour le modèle *Pak3-R67C* regroupés dans un article en préparation. Enfin je présenterai les premières données obtenues sur l'étude du modèle *Dp71-KI* avant de mettre en relation les données obtenues chez les trois modèles dans le cadre d'une discussion générale.

Introduction

I. La déficience intellectuelle

1.1. Définition

La déficience intellectuelle (DI) est un trouble mental affectant 1 à 3% de la population mondiale. Dans son manuel de recensement des troubles psychiatriques (DSM V, 2013), l'Association Américaine de Psychiatrie définit la DI comme l'apparition, au cours de la période développementale, de déficits du fonctionnement intellectuel, ainsi que de déficits du fonctionnement adaptatif. Le fonctionnement intellectuel est évalué à partir des capacités de raisonnement, de résolution de problèmes, de planification, de pensée abstraite, de jugement, d'apprentissage scolaire et d'apprentissage lié à l'expérience. Ces déficits sont détectés par des évaluations cliniques individuelles qui permettent de donner une valeur de quotient intellectuel (QI). Le QI moyen de la population est placé entre 85 et 115. On parle de déficit du fonctionnement intellectuel lorsque le QI est inférieur à 70. Plus le QI est faible ($QI < 70$), plus le déficit sera profond. Le fonctionnement adaptatif comprend, quant à lui trois domaines :

- *Conceptuel ou académique*, qui prend en compte les compétences mnésiques, le langage, l'écriture, la lecture, le raisonnement mathématique ou encore la capacité à résoudre des problèmes.
- *Social*, qui implique la conscience d'autrui, des émotions et des expériences, l'empathie, la capacité à établir des relations sociales et/ou amicales, ainsi que la capacité à communiquer aisément avec les autres.
- *Pratique*, qui implique une certaine autonomie dans différents domaines de la vie quotidienne tels que les soins personnels, la gestion de l'argent, l'organisation du travail scolaire ou encore la capacité à assumer des responsabilités professionnelles.

En fonction de la sévérité des déficits du fonctionnement adaptatif, quatre niveaux de DI sont principalement diagnostiqués : DI légère, modérée, sévère et profonde. La DI légère est 10 à 12 fois plus fréquente que la DI sévère (pour revues, Moser, 2004 ; van Bokhoven, 2011).

Enfin, lorsque la DI est associée à des signes cliniques, radiologiques, métaboliques ou biologiques (dysmorphies, anomalies neuromusculaires, malformations cérébrales ou cardiaques, défauts métaboliques) elle est alors qualifiée de syndromique. Si le patient ne présente aucun signe clinique supplémentaire, la DI est dite non-syndromique. Cependant la frontière entre syndromique et non syndromique n'est pas si aisée à établir car des signes cliniques, notamment métaboliques,

peuvent être décelés ou apparaître ultérieurement au diagnostic de la DI (Frints *et al.* 2002, Ropers & Hamel, 2005).

1.2. Les causes de la déficience intellectuelle

Les causes associées aux DI sont multiples, très hétérogènes et dans certains cas, très rares. Les DI peuvent être dues dans 15% des cas à des facteurs environnementaux qui surviennent au cours de la période développementale et dans 25% des cas à des facteurs génétiques. Les 60% de cas restants sont encore inexpliqués et impliquent probablement des combinaisons de facteurs multigéniques et environnementaux. La progression rapide des nouvelles technologies promet d'accroître la compréhension de l'étiologie des DI en identifiant des gènes potentiellement mutés encore méconnus et les mécanismes sous-jacents qui contribuent à son développement (pour revue, Ellison *et al.* 2013).

a. Causes environnementales

Les causes des DI de nature environnementale peuvent survenir à différentes étapes de la vie des individus atteints :

- Durant la période prénatale (80% des cas), certains comportements à risque de la mère durant la grossesse, comme la malnutrition, le syndrome d'alcoolisme maternel ou bien l'exposition à des substances toxiques peuvent provoquer une forme de DI chez l'enfant. On retrouve également la contraction de maladies transmissibles telles que la rubéole et la toxoplasmose, ou d'infections telles que la listéria ou la méningite, qui peuvent entraîner une DI chez l'enfant. Plus récemment, il a été montré que depuis l'apparition du virus Zika, transmis par les moustiques, le nombre de microcéphalies chez le nouveau-né a augmenté de façon spectaculaire. Les scientifiques ne parviennent pas encore à expliquer comment le virus provoque la pathologie, mais le risque de développer une des formes de DI pour ces enfants est très élevé. Enfin, la grossesse entraîne également d'importantes modifications de la fonction thyroïdienne maternelle, susceptibles de favoriser l'apparition d'une hypothyroïdie ou son aggravation, particulièrement en cas de carence iodée ou d'auto-immunité. De par le rôle des hormones thyroïdiennes dans tout un ensemble de processus impliqués durant le développement, l'hypothyroïdie maternelle affecte le développement neurologique de l'enfant à l'origine des DI (Henrichs *et al.* 2013).

- Au cours de la période périnatale (10% des cas), des complications survenant durant l'accouchement telles que l'hypoxie/anoxie périnatale ou des hémorragies cérébro-méningées peuvent conduire ultérieurement à des DI.
- Enfin, durant la période post-natale (10% des cas), des lésions traumatiques, des épisodes d'intoxications, d'infections (bactériennes ou virales), d'affections cérébrales (tumeurs cérébrales, hydrocéphalies, encéphalites aiguës), de malnutrition ou encore un environnement socioculturel défavorable pour l'enfant peuvent affecter le développement cérébral et conduire là encore à des DI (pour revues, Ropers, 2010 ; Vissers *et al.* 2015 ; DSM V, 2013).

b. Causes génétiques

Environ 1/3 des gènes humains (≈ 7000 gènes) est exprimé au niveau du cerveau et participe à son développement et son fonctionnement. L'altération de l'un ou l'autre de ces gènes pourrait donc affecter le développement cognitif. Deux grandes causes génétiques majeures menant à des DI ont été mises en évidence : les aberrations chromosomiques et les mutations génétiques.

i. Les anomalies chromosomiques

Depuis les années 1960-1970, la mise en place de l'étude du caryotype est devenue un test de routine pour mettre en évidence de potentielles anomalies chromosomiques qui représentent actuellement la cause majeure des DI (fréquence globale de 0,9% à la naissance d'individus vivants). Les anomalies chromosomiques touchent aussi bien les autosomes que les chromosomes sexuels, et correspondent à des modifications du nombre de chromosomes par perte ou gain d'un chromosome complet, ou d'anomalies de structures chromosomiques telles que des délétions, duplications, dérivés de translocations ou d'inversions.

La présence d'un chromosome surnuméraire correspond à une trisomie ; la plus fréquente est la trisomie 21 qui représente 7 à 11% de l'ensemble des DI (Oeseburg *et al.* 2011), avec une prévalence de 6 naissances sur 10000 en France (Inserm. Déficiences intellectuelles. Collection Expertise collective. Montrouge : EDP Sciences, 2016). La découverte d'un troisième chromosome 21 chez ces patients date de 1959 par l'équipe française de J Lejeune, M Gautier et R Turpin. Les patients présentent une DI variable (le plus souvent légère, mais pouvant être également sévère), une hypotonie musculaire et une hyperlaxité ligamentaire quasi-constantes qui sont souvent accompagnées de signes morphologiques caractéristiques (nuque plate, visage rond, petit nez...) et de diverses malformations potentielles (malformations cardiaques et digestives, cataracte, retard de croissance... ; Document ORPHANET ORPHA:870).

Outre la trisomie 21, il existe également d'autres cas de trisomies viables associées à des cas de DI. Par exemple, des patients atteints de trisomie mosaïque du chromosome 8 ou Syndrome de Warkany, présentent une DI modérée (Document ORPHANET 2009: ORPHA:96061). Des trisomies affectant les chromosomes sexuels sont également associés à des retards d'apprentissage et de développement du langage (syndrome de Klinefelter : XXY ; syndrome du triple X ; syndrome de Jacob XYY ; Documents ORPHANET : ORPHA:484-3375-2848).

Enfin, d'autres anomalies chromosomiques peuvent également être à l'origine de DI. C'est le cas de la délétion du bras court du chromosome 5 qui conduit au syndrome du « cri du chat » caractérisé par une DI profonde (Document ORPHANET 2006: ORPHA:281), ou une microdélétion située sur le chromosome 7 qui conduit au syndrome de Williams qui associe une DI et des anomalies développementales (malformations cardiaques et retard psychomoteur). Cette microdélétion contient au moins 29 gènes dont le gène *limk* (LIM kinase) qui permet la synthèse de la LIMK1 (LIM kinase 1), une kinase qui joue un rôle important dans le cytosquelette d'actine et qui sera mentionnée plus tard dans le manuscrit.

ii. Les mutations génétiques

Depuis les années 1990, avec l'apport de nouvelles techniques de séquençage permettant de détecter des mutations génétiques, le nombre de diagnostics de DI a augmenté de 6 à 10% (pour revue, Vissers *et al.* 2015). Une observation intéressante concerne le sex-ratio chez les patients atteints de DI. En effet, la prévalence de DI chez les garçons est 30% à 40% plus élevée que chez les filles (pour revue, Vissers *et al.* 2015) suggérant un rôle central des gènes du chromosome X dans les fonctions cognitives et/ou dans le développement du système nerveux central (Schalock *et al.* 2011). C'est d'ailleurs en 1991 que le premier gène responsable de DI, localisé sur le chromosome X a été mis en évidence : il s'agit du gène *fmr1* (fragile X mental retardation 1) dont les mutations sont responsables du syndrome de l'X Fragile (Pieretti *et al.* 1991). Depuis lors, les recherches de mutations génétiques à l'origine de DI montrent que des gènes impliqués sont présents sur l'ensemble des chromosomes. Les formes observées sont soit autosomiques dominantes, autosomiques récessives et/ou liées au chromosome X (pour revue, Héron & des Portes, 2008).

Grâce au progrès continu de la recherche et à l'apport des nouvelles technologies, il y a eu depuis les années 1990 une avancée remarquable dans la compréhension de l'étiologie de la DI. Aujourd'hui, plus de 700 gènes impliqués dans la DI ont été recensés, dont 122 gènes situés sur le chromosome X et environ 600 sur les autosomes (Figure 1 ; pour revue, Vissers *et al.* 2015 ; Kochinke *et al.* 2016 ; Data from Greenwood genetic center updated April 2017, www.ggc.org/research). La découverte de nouvelles mutations et/ou de gènes impliqués dans des DI (autosomiques ou liées à l'X) risque encore d'augmenter dans les années à venir, notamment avec la fréquence élevée de

mutations *de novo* qui sont à l'origine de 13 à 35% des cas de DI sévères (pour revue, Vissers *et al.* 2015).

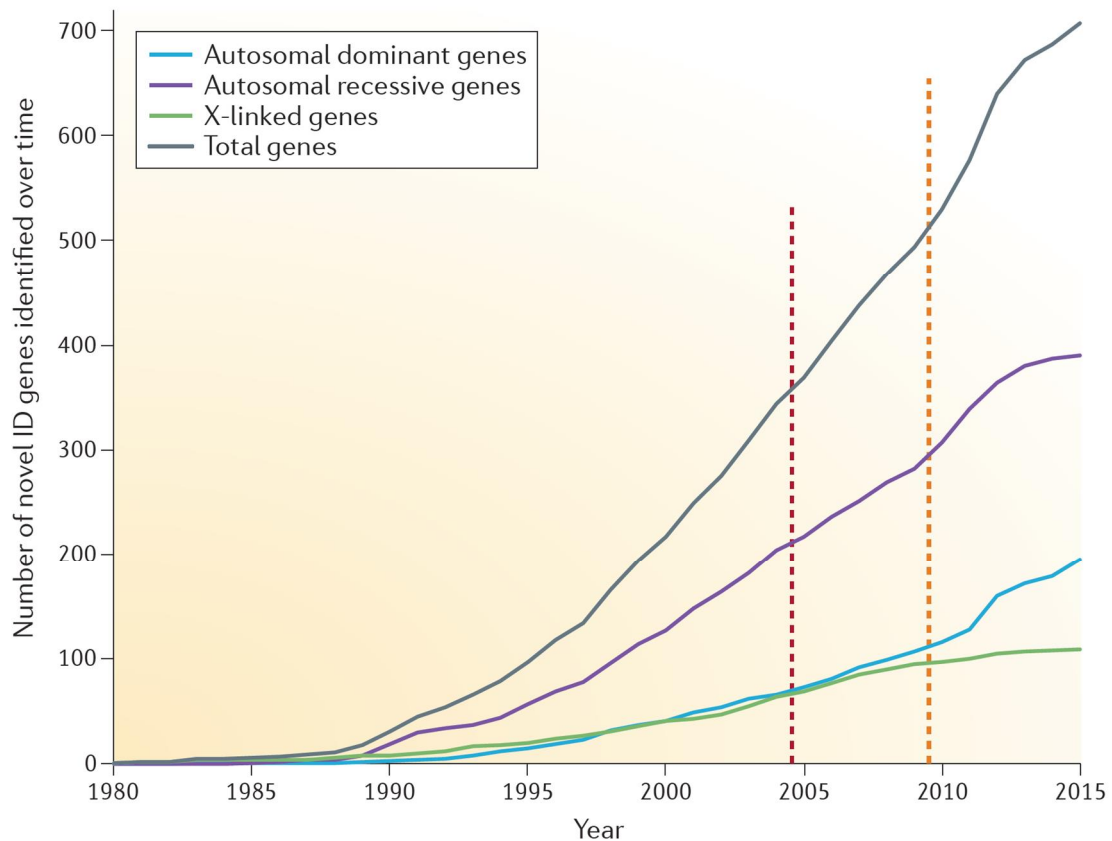


Figure 1 : Nombre de gènes liés à la DI identifiés en fonction des années.

Graphique montrant l'augmentation de la découverte du nombre de gènes impliqués dans des formes de DI en fonction des années. La courbe verte représente le nombre de gènes liés à l'X, la courbe bleue représente le nombre de gènes autosomiques dominants, la courbe violette représente le nombre de gènes autosomiques récessifs et la courbe grise le nombre total de gènes identifiés. Pour revue, Vissers *et al.* 2015

1.3. Les DI liées au chromosome X

Chez l'Homme, 5 à 10 % des DI sont dues à des mutations de gènes du chromosome X (XLID ; X-Linked Intellectual Disability) avec plus de 215 syndromes répertoriés (Chiurazzi *et al.* 2008 ; Tarpey *et al.* 2009 ; Lubs *et al.* 2012) et plus d'une centaine de gènes impliqués, répartis sur la totalité du chromosome X (Lubs *et al.* 2012 ; pour revue, Vissers *et al.* 2015 ; Figure 2). La très grande majorité des cas de XLID est causée par des mutations ponctuelles inactivant ces gènes, et environ 10 % des cas de XLID seraient liés à des anomalies telles qu'une délétion ou une duplication touchant ces gènes.

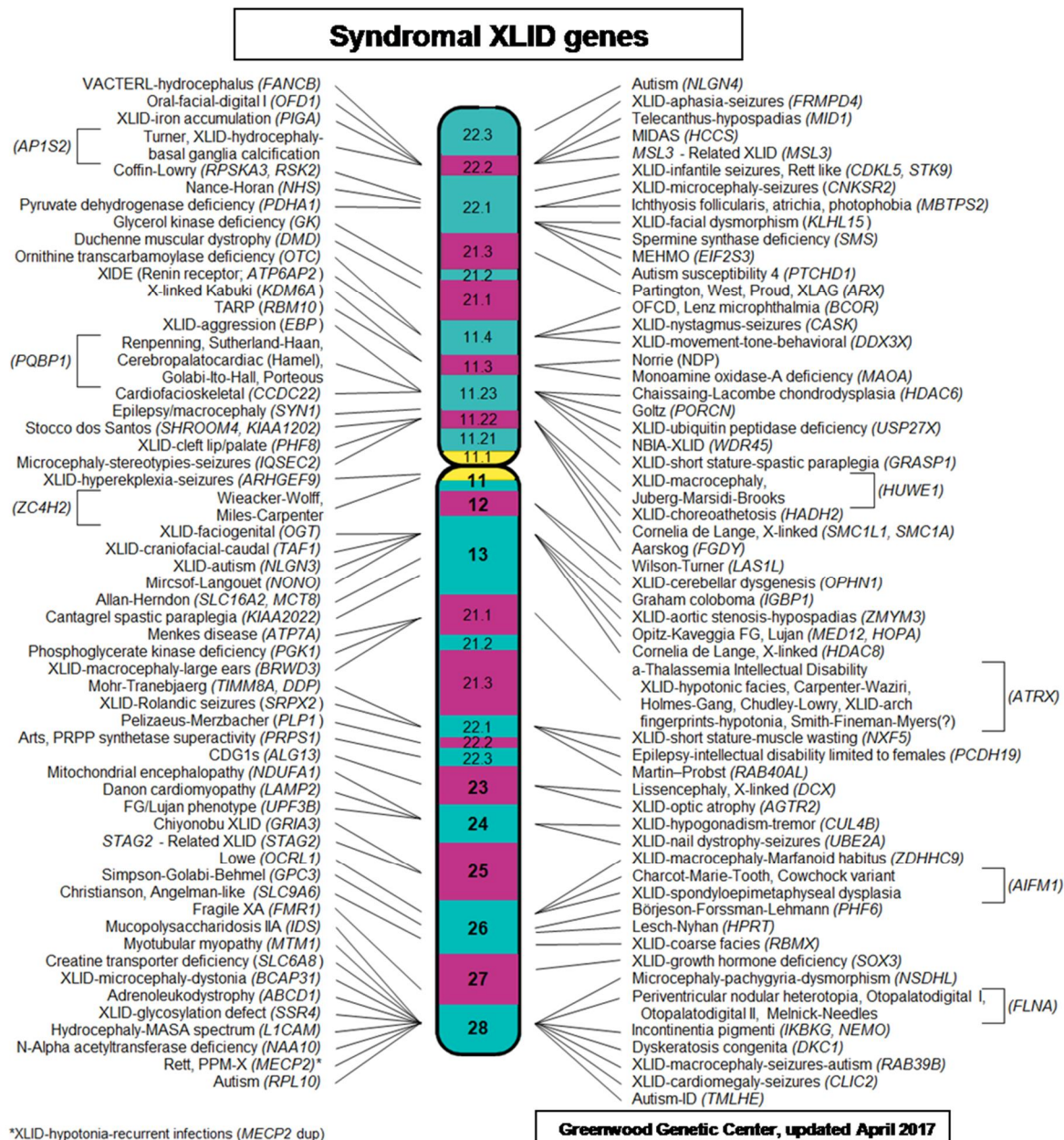


Figure 2 : Gènes localisés sur le chromosome X connus comme étant impliqués dans les DI liées à l’X.
Greenwood genetic center updated April 2017, www.ggc.org/research

Parmi les nombreux syndromes impliquant des gènes localisés sur l’X, les deux plus fréquents et par conséquent les plus intensément étudiés, sont le syndrome de l’X fragile et le syndrome de Rett.

- Le syndrome de l’X fragile est la cause la plus fréquente de DI héréditaire (1/5000 naissances de garçons, 1/9000 naissances de filles, environ 0,5% des DI et 20% des XLID, (pour revue, Vissers *et al.* 2015). Les individus atteints montrent principalement une DI de sévérité variable pouvant être associée à des problèmes d’attention, des troubles du comportement et des troubles autistiques. On retrouve également des signes physiques plutôt discrets : visage étroit

et allongé, oreilles et front proéminents, hyperlaxité des doigts, pieds plats et macro-orchidie chez le garçon après la puberté (Document ORPHANET 2012). Les filles ont généralement des manifestations moins prononcées que les garçons. Leurs principales difficultés concernent les apprentissages et certaines présentent des troubles de l'attention et de l'hyperactivité. Près de la moitié d'entre elles n'a aucune manifestation physique et/ou cognitive du syndrome.

Dans ce syndrome, on constate qu'une séquence de trois bases (triplet CGG), située en 5'UTR du gène *fmr1*, est répétée un nombre anormal de fois alors que classiquement elle n'est pas répétée plus de 50 fois (Verkerk *et al.* 1991). Chez les personnes atteintes du syndrome, le nombre de répétitions dépasse 300 et il se produit alors généralement une modification chimique de l'ADN (hyperméthylation) qui a pour conséquence d'empêcher le décodage du gène et la production de la protéine FMRP (Fragile X Mental Retardation Protein) codée par ce gène. La protéine FMRP est une protéine de liaison de l'ARN (Acide Ribo Nucléique) qui régule la synthèse protéique et d'autres voies de signalisation dendritiques (pour revue Bhakar, *et al.* 2012).

- Le syndrome de Rett est la deuxième cause de DI sévère d'origine génétique chez la femme. Ce syndrome ne touche que les filles (1 fille sur 12000) et se traduit par un trouble grave et global du développement du système nerveux central. Les filles atteintes montrent une DI sévère. Le développement est normal durant la période périnatale jusqu'à 6 à 18 mois, puis s'installent un ralentissement du développement et une régression rapide des capacités intellectuelles et de la communication, associés à une microcéphalie, des stéréotypies manuelles, des troubles de motricité et des fonctions autonomes (Document ORPHANET 2007 ORPHA:778). En 1999, le gène *MeCP2* (méthyl-CpG-2), situé sur le bras long du chromosome X, est mis en cause dans ce syndrome (Amir *et al.* 1999). Les mutations de ce gène sont généralement des mutations *de novo* (90% des cas) et sont dominantes. Ce gène code la protéine de liaison MECP2, un régulateur transcriptionnel qui se lie à l'ADN (Acide DésoxyriboNucléique) méthylé et influence ainsi la transcription des gènes. D'autres gènes mutés ont également été décrits comme impliqués dans le syndrome de Rett, tel que le gène *foxg1* (situé sur le chromosome 14) qui code le facteur de transcription FOXG1 (Forkhead box protein G1). On parle alors de syndromes de Rett « atypiques » puisque ces patients ne présentent pas tous les critères diagnostics du syndrome de Rett typique.

Compte tenu de leur fréquence, ces 2 syndromes font l'objet d'une recherche intensive concernant les gènes impliqués et leurs mécanismes sous-jacents dans l'espoir de trouver des pistes thérapeutiques. Toutefois, parmi les 215 syndromes décrits, des pathologies plus rares ne bénéficient pas d'autant de recherche mais leurs études contribuent de manière équivalente à la compréhension des mécanismes altérés dans les DI.

Au cours de mes travaux de thèse, nous nous sommes focalisés sur l'étude de trois autres gènes localisés sur le chromosome X et dont les mutations sont responsables de DI dans des pathologies plus rares. Ces 3 pathologies seront décrites en troisième partie de l'introduction du manuscrit. Brièvement, il s'agit du :

- syndrome de Coffin Lowry dont le gène impliqué est *rsk2* (ribosomal S6 kinase 2)
- une DI non syndromique liée au gène *pak3* (p21-activated kinase 3)
- la DI de la myopathie de Duchenne dont le gène impliqué est *dmd* (dystrophie musculaire de Duchenne).

1.4. Troubles mnésiques observés dans la DI

Comme nous l'avons vu précédemment, la DI se définit par des altérations du fonctionnement intellectuel associées à des défauts du fonctionnement adaptatif. Dans cette définition générale, il convient de s'intéresser plus précisément aux types de dysfonctionnements cognitifs observés et en particulier à l'analyse spécifique des fonctions mnésiques des patients DI. La majorité des études ne mentionne qu'une valeur de quotient intellectuel et quelques signes cliniques observés tels que l'hyperactivité ou encore des traits autistiques. Cependant, quelques études se sont attelées à décrire plus précisément les altérations des fonctions mnésiques observées chez des patients DI.

Les quelques études citées ci-dessous présentent des résultats obtenus chez des patients trisomiques 21, atteints du syndrome de Williams ou atteints de l'X Fragile, trois pathologies que j'ai mentionnées précédemment en partie I.1.2.b et I.1.3. Parmi les types de mémoire, plusieurs études se sont focalisées sur la mémoire de travail (MT). Celle-ci implique le stockage à court terme, la récupération et le traitement de l'information et joue un rôle central dans l'acquisition de nombreuses compétences comme le langage, la lecture, le calcul, le raisonnement, etc. (Barrouillet & Camos, 2007 ; Engel de Abreu *et al.* 2010 ; Bussy & Rigard, 2013). Les résultats obtenus par ces études indiquent une altération de la MT chez les patients « Williams » (Carney *et al.* 2013), trisomique 21 (Lanfranchi *et al.* 2010) et les patients « X fragile » (Jäkälä, 1997 ; Baker *et al.* 2011). Concernant la mémoire à long terme, les patients trisomiques présentent une altération de la mémoire explicite mais pas de la mémoire implicite alors que les patients « Williams » présentent quant à eux des altérations des deux types de mémoires et surtout dans leur capacité à apprendre de nouveaux gestes/fonctions (mémoire implicite ; Vicari, 2001). Chez les patients « Williams », la mémoire épisodique est également altérée (Greer *et al.* 2014), alors qu'elle n'est pas atteinte chez les patients atteints du syndrome de Rett. A ma connaissance, les possibles altérations de la mémoire épisodique n'ont pas été testées chez des patients souffrants d'un autre syndrome. Enfin, des altérations de la mémoire spatiale ont également été mises en évidence chez les patients

« Williams » (Mangan, 1992) et trisomiques. Ces derniers présentent un retard d'apprentissage associé à des déficits de rappel de l'emplacement d'un objet précédemment observé (Bellugi *et al.* 1994; O'Hearn *et al.* 2005). Par ailleurs, une étude comparative entre des patients « X fragile » et le modèle murin correspondant a permis de mettre en évidence une altération de la mémoire spatiale en utilisant le même paradigme expérimental chez l'Homme et la souris (Macleod *et al.* 2010).

De manière plus globale à la DI, il a été mis en évidence que les patients présentant une DI légère ont plus de difficulté à adapter les informations apprises dans un contexte à d'autres contextes (Wenar & Kerig, 2006). Par exemple, un patient peut découvrir un mot nouveau dans un certain type de document, mais peut avoir des difficultés à le reconnaître dans un autre type de document. Il peut également avoir des difficultés à généraliser ce qu'il a appris dans le cadre scolaire pour l'adapter à la communauté. Enfin, certains patients DI présentent également des difficultés pour changer leur habitudes, leur environnement, leur stratégie, autrement dit, ils semblent beaucoup moins flexibles, ce qui peut être notamment très invalidant si l'espace dans lequel ils évoluent change ; c'est le cas des patients « X fragile » et trisomique 21 (Lanfranchi *et al.* 2010).

Cependant, l'ensemble de ces résultats reste à nuancer car ils peuvent être dépendants à la fois des patients, mais également des autres symptômes associés à la pathologie. Par exemple, j'ai mentionné l'existence de déficits de MT chez les patients DI. La MT est composée, entre autres, d'une « boucle phonologique » et du « calepin visuo-spatial » (Baddeley, 1986 et 2003). Seulement, dans de nombreux cas de DI, les patients peuvent présenter des troubles du langage ou des troubles visuo-spatiaux associés au syndrome : par exemple dans la trisomie 21 et le syndrome de l'X fragile, l'aide d'un support visuel pour la mémorisation des informations sera importante en raison des troubles de la mémoire verbale (Vicari *et al.* 2005), ce qui ne sera pas le cas pour les enfants porteurs du syndrome de Williams qui eux présentent des troubles visuo-spatiaux mais aucun trouble du langage (Thibaut & Fayasse 2009). Chaque test doit donc être adapté en fonction des patients et des syndromes. De même, chez les patients DI, il est courant d'observer des troubles de l'attention et de la concentration qui, dans une certaine mesure, peuvent influencer les problèmes d'apprentissage et de mémoire. C'est le cas des patients « Williams » (Menghini *et al.* 2010) et des patients « X fragile » (Bussy & Kientz, 2012). Au fond, chez les patients DI, les difficultés à mettre en place des stratégies d'apprentissage sont d'autant plus évidentes que la charge cognitive de la tâche à réaliser est importante (Bray *et al.* 1994 et 1998).

En conclusion, compte tenu de l'hétérogénéité des différents symptômes des patients DI et de leurs différentes capacités (QI, capacités visuelles, verbales...) qui influent sur la réalisation des tests, les performances mnésiques restent encore difficile à évaluer.

1.5. Mécanismes sous-jacents à la DI

Depuis la découverte de gènes responsables de DI qu'elles soient liées à l'X ou pas, plusieurs études se sont intéressées aux rôles, localisations, ainsi qu'à la nature des protéines produites à partir de ces gènes. D'une manière générale, ces différents gènes codent des enzymes (51%), des médiateurs de la transduction du signal (12%) des régulateurs de transcription (7%) des protéines de liaison (8%) ou encore des protéines de transport (8%) (pour revue, Vaillend *et al.* 2008). Ainsi, l'ensemble de ces protéines couvre un large ensemble de fonctions biologiques comprenant l'organisation et la fonction nucléaire, les principales voies métaboliques et de signalisation, les synthèses macromoléculaires et les modifications post-traductionnelles, la régulation et l'organisation du cytosquelette, la communication cellulaire, le transport intracellulaire, etc. (pour revue, Vaillend *et al.* 2008). A titre d'exemple, la figure 3 montre la localisation et les fonctions des protéines codées par des gènes impliqués dans les DI spécifiquement liées à l'X. Ces différentes protéines sont localisées dans tous les compartiments cellulaires, en majorité dans le noyau et le cytoplasme (Chiurazzi *et al.* 2008 ; Figure 3).

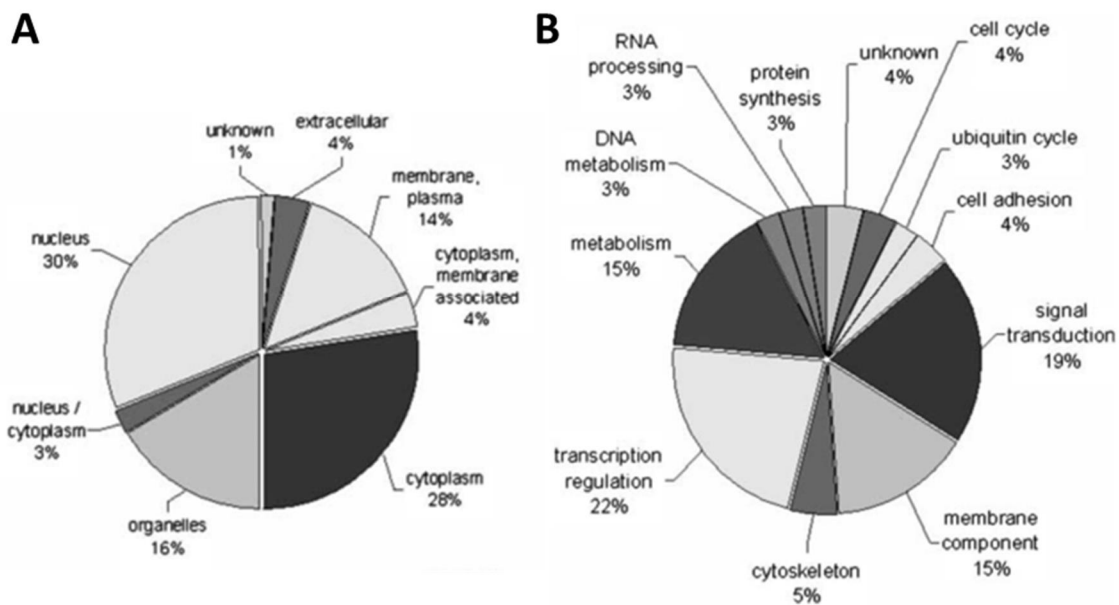


Figure 3 : Localisations (A) et fonctions des protéines (B) codées par des gènes impliqués dans les DI liées à l'X. Les pourcentages représentent la proportion des protéines localisées dans un compartiment cellulaire donné (A) ou la proportion de protéines impliquées dans différentes fonctions (B), d'après Chiurazzi *et al.* 2008.

En résumé, les rôles, localisations et natures des protéines impliquées dans la DI sont très divers. Cette grande variabilité montre la difficulté que représentent l'identification et la compréhension des mécanismes impliqués dans les DI. Plus récemment, les progrès dans le domaine de la neuroradiologie et le développement de l'imagerie cérébrale par résonance magnétique (IRM) ont permis d'apporter de nouvelles informations sur les altérations structurales observées chez les

patients DI, donnant ainsi de nouvelles pistes à explorer quant aux potentiels mécanismes altérés. Ces examens permettent, dans près de 30% des cas de DI, de déceler une anomalie ou une malformation cérébrale qui traduisent généralement une altération du développement cérébral pendant la vie intra-utérine (Inserm. Déficiences intellectuelles. Collection Expertise collective. Montrouge : EDP Sciences, 2016). La nature des malformations est fonction du moment durant lequel l'altération du développement apparaît. Ainsi, la survenue peut être précoce au moment de l'induction ventrale (5-10^e semaines de vie embryonnaire) et peut être à l'origine par exemple des agénésies du corps calleux. Elles peuvent également être un peu plus tardives, lors de la prolifération neuronale (7-16^e semaines de vie embryonnaire) à l'origine des micro- et macroencéphalies ou bien lors de la migration neuronale, à l'origine notamment des lissencéphalies. Enfin elles peuvent également être très tardives (22^e semaine de vie embryonnaire à 2 ans en post-natal) lors de l'organisation et de la myélinisation à l'origine par exemple de retard de myélinisation.

a. Altération de la prolifération au cours du développement

La neurogenèse embryonnaire, étape cruciale au développement du cerveau, correspond à la formation et à la prolifération des cellules neuronales. Diverses altérations de la prolifération cellulaire, de la détermination du devenir cellulaire ou de la mort cellulaire programmée au cours de la période embryonnaire ont été mises en évidence dans plusieurs cas de DI. Par exemple, les microcéphalies qui sont caractérisées par une circonférence du cerveau réduite, sont le plus souvent la conséquence d'une réduction du nombre de neurones. L'étude de ces cas a apporté de nombreuses informations sur les mécanismes moléculaires et cellulaires qui sous-tendent la neurogenèse embryonnaire « normale ». Par exemple, plusieurs protéines agissent au moment de la mitose, contrôlent le nombre de cellules générées et sont ainsi impliquées dans les microcéphalies. Parmi ces protéines et en conditions normales, la Microcephalin empêche l'entrée prématurée des cellules en phase de mitose durant le développement (checkpoint arrest G2-M) (Alderton *et al.* 2006). Les protéines « Abnormal spindle-like microcephaly-associated » (ASPM), « cyclin-dependent kinase 5 regulatory associated protein 2 » (CDK5RAP2) et « centromere-associated protein J » (CENPJ), de par leur localisation au niveau du fuseau mitotique, contribuent toutes trois à la formation de neurones en jouant un rôle au moment de la mitose (Bond *et al.* 2005 ; Fish *et al.* 2006). Lorsqu'elles sont altérées, ces quatre protéines vont entraîner une perturbation de la phase de mitose du cycle cellulaire et vont être responsables, individuellement, de microcéphalie chez le modèle rongeur. L'étude des syndromes microcéphaliques malformatifs a ainsi révélé plusieurs gènes régulateurs de la taille du cerveau, codant non seulement des protéines pro-mitotiques et pro-apoptotiques mais aussi des facteurs de transcription, comme FOXG1, qui peuvent aussi entraîner un défaut de prolifération des progéniteurs neuronaux et une différenciation trop précoce (Florian *et al.* 2012). Outre les cas de microcéphalies, des altérations de prolifération cellulaire au cours du

développement cérébral ont également été détectées dans différentes DI. Par exemple, chez les patients trisomiques 21, une diminution globale de la prolifération a été observée *in vivo* chez la souris (Contestabile *et al.* 2007 ; Moldrich *et al.* 2009), ainsi que dans une étude *in vivo* à partir de foetus humains (Guidi *et al.* 2008). Au contraire, chez les modèles de l'X Fragile c'est cependant une augmentation de la prolifération qui est observé chez les souris *in vivo* (Tervonen *et al.* 2009), ainsi que *in vitro* sur des cellules souches neurales humaines (Castren *et al.* 2005). Enfin, dans le syndrome de Rett, aucun défaut de la prolifération cellulaire n'a été mis en évidence durant le développement (Kishi & Macklis, 2004 ; Tsujimura *et al.* 2009).

b. Migration neuronale

Dans un bon nombre de cas, les DI sont associées à des malformations cérébrales ou dysgénésies majeures et/ou mineures pouvant fréquemment affecter différentes structures telles que le corps calleux, le septum pellucidum, le système ventriculaire, le cortex cérébral, le cervelet ou encore les espaces liquidiens péricérébraux. Ces malformations souvent détectées par IRM, sont essentiellement dues à des altérations de la migration des précurseurs cellulaires qui peuvent être d'origine génétique et/ou environnementales. Parmi ces dysgénésies cérébrales, la lissencéphalie classique entraîne chez les patients la présence d'un cerveau lisse et d'un cortex très épais. La lissencéphalie est la conséquence d'un défaut dans la migration des neurones et touche principalement le cortex cérébral. En conditions normales, après leur naissance dans le télencéphale, une partie des neurones migre pour former un cortex en 6 couches (Figure 4). En conditions pathologiques, les neurones ne migrent pas et restent « bloqués », ils forment ainsi un cortex en 2, 3 ou 4 couches au lieu de 6 (Figure 4). Les quatre gènes les plus connus dont les altérations entraînent des lissencéphalies sont lissencephaly-1 (LIS1), le gène doublecortin (DCX), l'alpha tubuline 1A (TUBA1A) et la reelin (RELN) (Figure 4). Une caractéristique commune aux modèles murins correspondants est leur défaut de lamination de l'hippocampe et du cortex (pour revue, Moon & Wynshaw-Boris, 2013) excepté chez le mutant DCX^{-/-} où il a été observé un défaut de lamination dans l'hippocampe mais pas dans le néocortex (Corbo *et al.* 2002).

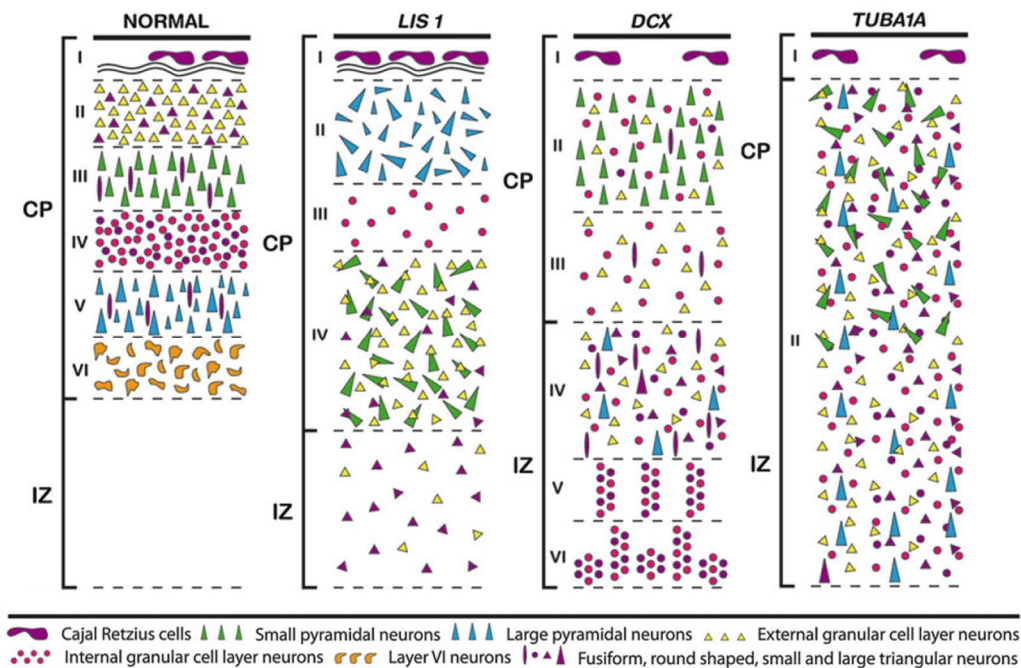


Figure 4 : Représentation schématique de l'organisation neuronale dans le cortex.

Localisation de différentes populations neuronales dans le cortex de cerveaux normaux et lissencéphaliques, mettant en évidence les différences de défauts de lamination corticale. Plaque corticale CP, zone intermédiaire IZ. D'après Friocourt *et al.* 2011.

c. Synaptogenèse, morphologie des dendrites et plasticité synaptique

Depuis les années 1970, l'ensemble des études post-mortem réalisées chez les patients DI ont mis en évidence des altérations au niveau neuronal, et en particulier dans la morphologie et la densité des épines dendritiques (Fiala *et al.* 2002). Ces mêmes altérations ont souvent été également observées chez les modèles murins correspondants. Par exemple, les neurones présents au sein du cortex cérébral des patients trisomiques 21 présentent une réduction de la longueur et du nombre de ramifications de l'arbre dendritique, ainsi qu'une réduction de la densité des épines dendritiques (Takashima *et al.* 1981). C'est également ce qu'on peut observer chez une des souris modèles de la trisomie 21, la souris Ts65Dn (Dierssen *et al.* 2003 ; Figure 5A). Cette diminution de la densité des épines dendritiques est aussi rapportée dans le syndrome de Rett (Belichenko *et al.* 1997 ; Kishi & Macklis, 2004 ; Figure 5A). En revanche, une augmentation de la densité d'épines dendritiques immatures, longues et fines des neurones de l'hippocampe et du néocortex (Wisniewski *et al.* 1991 ; Grossman *et al.* 2006 ; Figure 5A-B) est caractéristique du syndrome de l'X fragile chez l'Homme et le modèle murin correspondant (*Fmr1-KO* ; Figure 5A).

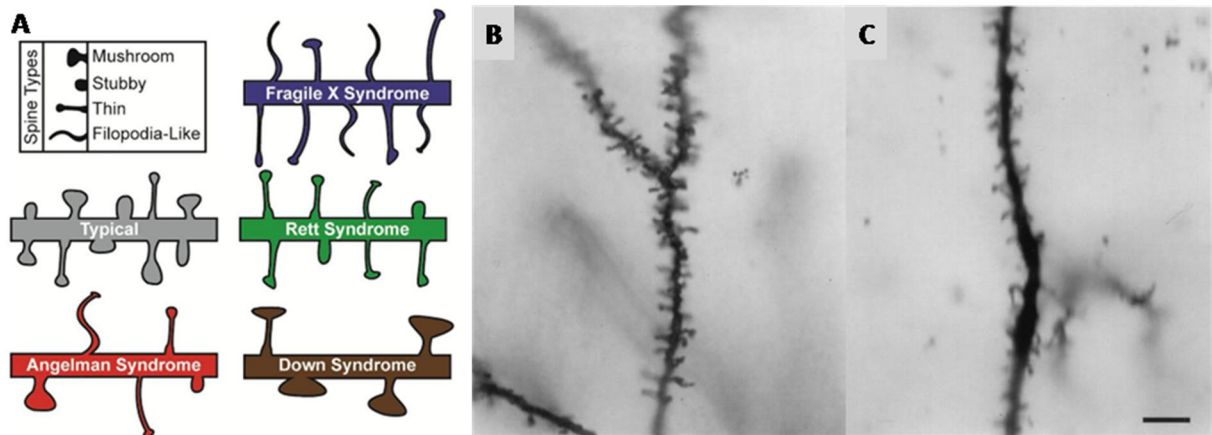


Figure 5 : Déficience intellectuelle et morphologie des épines dendritiques.

(A) Morphologie des épines dendritiques dans plusieurs syndromes impliquant une DI. (B) Dendrite apicale de neurone pyramidal de la souris transgénique *Fmr1*-KO (X Fragile). (C) Dendrite apicale de neurone pyramidal d'une souris contrôle (Barre d'échelle = 10 μ m). D'après Phillips *et al.* 2015 et Comery *et al.* 1997.

Les synapses sont portées par les épines dendritiques qui sont émises depuis la dendrite. Il y a plus de quarante ans, c'est la découverte d'anomalies de la densité et de la structure des épines dendritiques associées à la DI qui a orienté les recherches des bases physiopathologiques de la DI vers la synapse (Purpura, 1974). A ce niveau, il est intéressant de constater que plus de 50% des protéines liées aux DI sont localisées dans les compartiments pré ou post-synaptiques et sont retrouvées dans des voies de signalisation impliquées dans les étapes clés de la communication synaptique, suggérant un potentiel dysfonctionnement de la synapse (pour revues, Ropers & Hamel, 2005 ; Vaillend *et al.* 2008 ; Figure 7).

Au niveau de la synapse excitatrice, face au bouton pré-synaptique, plus de mille protéines sont localisées dans une zone appelée PSD (postsynaptic density ; Figure 6 point 2). Cette zone assure l'interface entre les molécules d'adhésion et le cytosquelette d'actine permettant l'ancrage des récepteurs à la membrane. Des mutations conduisant à des altérations de molécules d'adhésion comme IL1RAPL1 (Ramos-Brossier *et al.* 2015) ou la Neuroligine 4 (Laumonnier *et al.* 2004), qui interagissent avec PTP- δ ou la β -neurexine, perturbent la synaptogenèse (Figure 6 points 1 et 2 et Figure 7). Avant d'obtenir une synapse mature, un certain nombre de processus va être mis en place : activation de gènes codant des protéines synaptiques, formation et transport de vésicules, formation de jonctions entre deux neurones, remodelage des compartiments pré et post-synaptique puis, par la suite, intégration des neurones fonctionnels en fonction de l'activité neuronale. Ces remodelages sont largement dépendants de la balance entre les transmissions excitatrice et inhibitrice, ainsi que des mécanismes de plasticité synaptique notamment lors de la transmission glutamatergique. L'expression de récepteurs du glutamate de type AMPA (Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid) à la surface post-synaptique conditionne la réponse de la synapse qui peut être soit facilitée ou inhibée lors des phénomènes de potentialisation à long terme (PLT) ou dépression à long terme (DLT). La PLT correspond à une augmentation durable de l'efficacité

synaptique. La PLT mobilise plusieurs récepteurs et voies de signalisation, déclenche une réorganisation du cytosquelette d'actine et au final entraîne la formation de nouvelles épines dendritiques (Segal, 2005). Les modifications de la force synaptique et les remodelages structuraux des réseaux neuronaux pendant l'apprentissage sont à la base des processus de mémorisation et sont maintenus pendant la vie adulte (Morris & Frey, 1997).

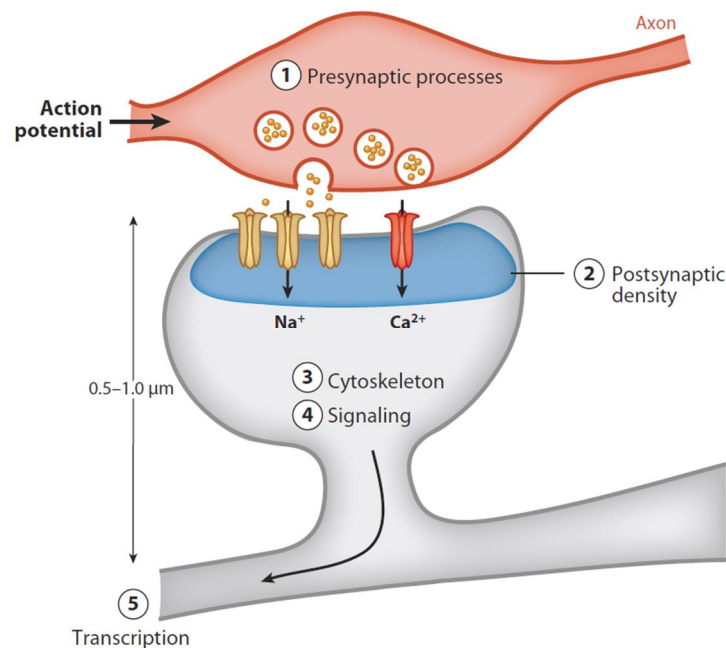


Figure 6 : Voies neuronales communément impliquées dans la DI.

Structure schématique d'une synapse entre l'axone d'un neurone présynaptique et l'épine dendritique d'un neurone post-synaptique. Pour revue, van Bokhoven, 2011.

Ainsi, en conditions non pathologiques, les modifications de la morphologie des épines dendritiques résultent du remodelage de la membrane et du cytosquelette d'actine et sont fortement régulées par de nombreuses molécules au cours de la synaptogenèse, ainsi qu'au cours de l'activité neuronale du réseau. L'identification de mutations de gènes codant des molécules impliquées dans la synaptogenèse ou la transmission synaptique (Weiler *et al.* 1997 ; Billuart *et al.* 1998 ; D'Adamo *et al.* 1998) a confirmé que les pathologies de la synapse ou « synaptopathies » sont impliquées non seulement dans les DI mais également dans d'autres phénotypes co-morbides tels que l'autisme (Grant, 2012). Dans ces conditions, des altérations de la morphologie des épines et des synapses sont parfois corrélées à des changements de l'efficacité de la transmission synaptique ce qui pourrait contribuer aux déficits cognitifs observés. En effet, cette association entre défauts de morphologie des épines et/ou densité des épines et altérations de la PLT a été observée dans plusieurs modèles murins de DI précédemment cités. Brièvement, dans l'hippocampe, le modèle murin *Limk1-KO* (syndrome de Williams) montre une augmentation de la PLT alors que les souris

MeCP2-KO (syndrome de Rett) et les souris modèles du syndrome d'Angelman présentent une diminution de la PLT (Jiang *et al.* 1998 ; Meng Y *et al.* 2002 ; Moretti *et al.* 2006). En l'absence de FMRP (*Fmr1*-KO), l'induction de la DLT, dépendante des récepteurs mGluR (metabotropic Glutamate receptor), est largement facilitée, conduisant à un retrait excessif de récepteurs AMPA et à une diminution de la PLT (Bagni & Oostra, 2013 ; Tian *et al.* 2017). Ces résultats ont été confirmés chez un modèle zebrafish KO pour *fmr1* qui montre également une augmentation de la DLT (Huber *et al.* 2002 ; Ng *et al.* 2013). Toutefois, il est également envisageable que l'altération de l'un des deux processus soit indépendante de l'autre, ce qui est par exemple le cas chez un modèle murin de DI dépourvu du gène de l'oligonephrin-1 (*Ophn1*) qui présente une diminution de la densité des épines dendritiques sans aucune altération de la PLT ou de la DLT (Khelifaoui *et al.* 2007). Cependant, le dilemme demeure quant à savoir si les changements observés dans la morphologie / densité dendritique chez les patients DI sont dus à la perte de molécules intrinsèques ou en raison d'une réponse compensatoire pour réduire ou augmenter l'activité neuronale qui est altérée en fonction pathologique (Fiala *et al.* 2002).

Parmi les trois protéines étudiées au cours de mon doctorat (PAK3, RSK2 et DMD), l'une est localisée à la membrane synaptique (DMD), une intervient dans la voie Rac-Cdc42 (Cell division control protein 42 homolog) /PAK3/LIMK1 et la dernière, RSK2, est un effecteur situé en aval de la voie Ras/ERK (Figure 7). En conséquence, comme il vient d'être mentionné, les altérations de chacune de ces protéines localisées à la synapse peuvent entraîner, en fonction de leur rôle, des répercussions sur la libération des vésicules présynaptiques, l'organisation des complexes protéiques de la membrane post-synaptique, le réarrangement du cytosquelette d'actine, la plasticité synaptique, ou encore la synaptogenèse.

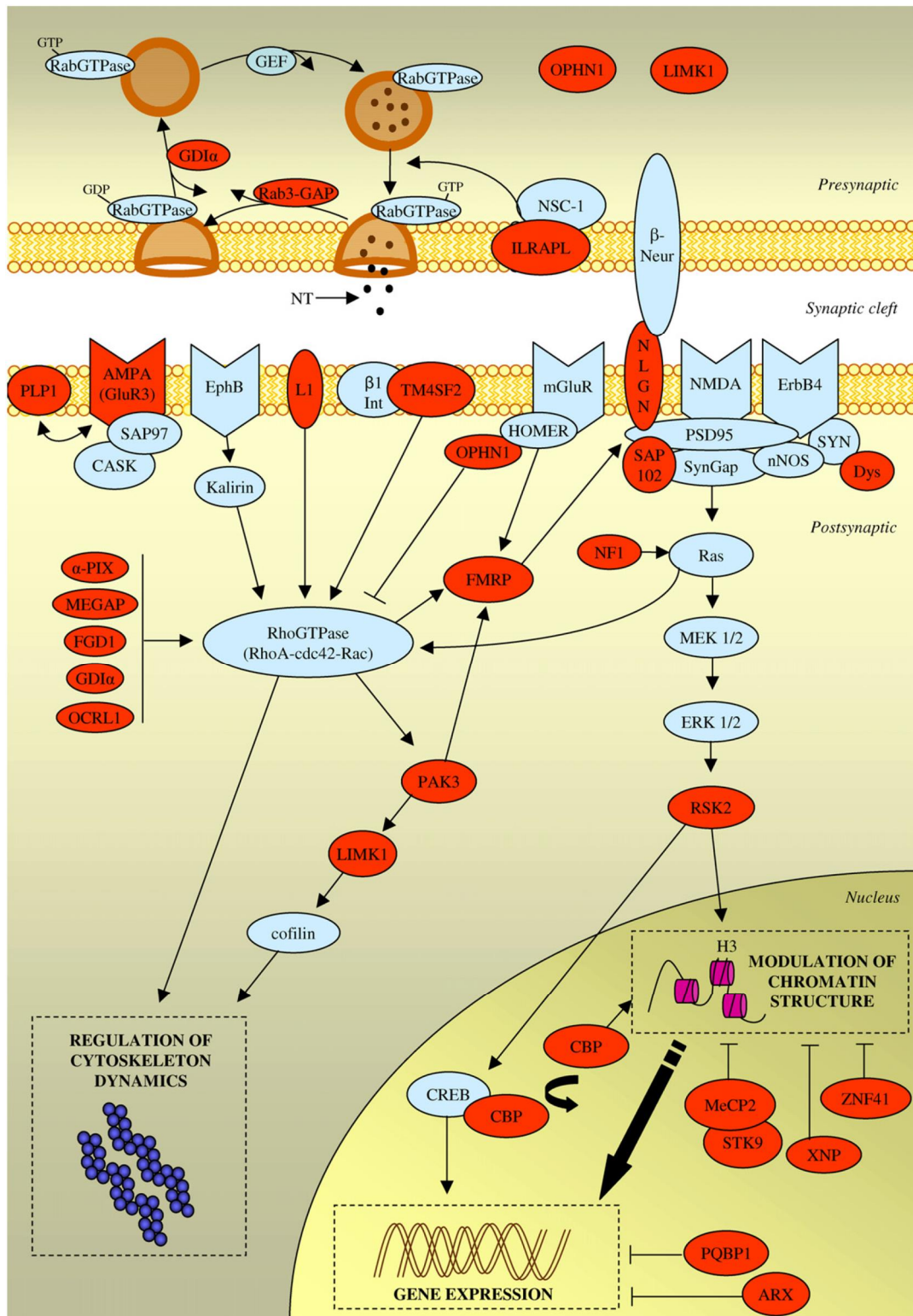


Figure 7 : Représentation de certaines voies de signalisation cellulaires impliquées dans la transmission synaptique et la plasticité.

Les voies de signalisation indiquées contrôlent le cycle de libération des vésicules présynaptiques, l'organisation des complexes protéiques post-synaptiques liés à la membrane, la structure de la chromatine et de l'expression des gènes et la régulation de la dynamique du cytosquelette.

Les protéines impliquées dans des DI sont notées en rouge. Pour revue, Vaillend *et al.* 2008.

d. Signalisation cellulaire et processus épigénétiques

Enfin, parmi les voies de signalisation moléculaire qui régulent la transcription, la voie ERK/MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) est activée au cours des phénomènes de plasticité synaptique et de mémorisation et conduit à l'expression des gènes précoces tels que *zif268*, *arc* (Activity-regulated cytoskeleton), *c-fos* ou *bdnf* (Brain-Derived Neurotrophic Factor) via des facteurs de transcription tels que CREB (calcium/cAMP response element binding protein) (Figure 6 point 5). En amont de la voie ERK/MAPK, de petites protéines appelées protéines Ras, telles que NF1 (neurofibromatose 1) qui permettent l'activation de la voie, sont également responsables de DI en cas d'altération du gène. D'autre part, notre protéine d'intérêt RSK2, située dans la voie ERK/MAPK, est également responsable de DI en cas de mutation du gène (Pereira *et al.* 2010). La phosphorylation de RSK2 par ERK conduit notamment à l'ouverture de la chromatine facilitant l'accès des facteurs de transcription aux promoteurs cibles. Parmi les gènes associés à la DI, plus de 10% d'entre eux codent des protéines impliquées dans les processus épigénétiques du génome ou sont des composants des complexes entraînant des modifications de la structure de la chromatine (Kleefstra *et al.* 2014). Durant les premiers stades de développement, un remodelage important de la chromatine a lieu, il n'est donc pas surprenant que la mutation de gènes codant des facteurs épigénétiques provoque de graves altérations du développement. Plusieurs gènes responsables de DI codent des histones acétyltransférases, histones déacétylases, histones méthyltransferases, histones déméthylases, les enzymes d'ubiquitination des histones ou des DNA méthyltransferases, des protéines nécessaires pour modifier la chromatine afin de faciliter sa compaction ou décompaction dans les nucléosomes puis dans les chromosomes (pour revue, Lopez-Atalaya & Barco, 2014). Parmi celles-ci, on peut distinguer les protéines qui apposent ces modifications épigénétiques (RSK, CREBBP, EP300, EHMTs, DNMTs), celles qui les lient et modifient la structure de la chromatine en ajoutant par exemple sur des groupements méthyls (MeCP2, MEDs, ARIDs, CHDs) et enfin celles qui retirent ces groupements méthyls (KDM5C, HDAC4, PHF8) (Bienvenu & Chelly, 2006 ; Kleefstra *et al.* 2014). Ensemble, ces protéines sont nécessaires au bon déroulement des processus cellulaires tels que la transcription, la réplication et la réparation de l'ADN. Par exemple, dans le syndrome de Rubinstein-Taybi, le gène en cause est *CREBBP*. Il code la protéine CBP (CREB-binding protein) qui présente une activité histone acétyltransférase et stabilise les interactions protéiques avec le complexe de transcription (Ogryzko *et al.* 1996). Ce gène est connu pour jouer des rôles importants dans le développement embryonnaire, le contrôle de la croissance et l'homéostasie en couplant le remodelage de la chromatine et la reconnaissance des facteurs de transcription.

En résumé, plusieurs mécanismes sous-jacents à la DI ont été mis évidence durant le développement jusqu'à l'âge adulte. Parmi les 700 gènes responsables de DI répertoriés, une partie d'entre eux est impliquée dans les programmes neurodéveloppementaux entraînant des malformations cérébrales (défaut de neurogenèse embryonnaire, de migration neuronale). Une

autre partie d'entre eux n'apporte aucun changement majeur observable de la structure et de l'architecture du cerveau (Ellison *et al.* 2013) mais intervient au niveau cellulaire et / ou moléculaire dans des processus indispensables au bon fonctionnement cognitif comme dans les mécanismes moléculaires importants pour l'organisation et la plasticité des synapses (pour revue, voir Vaillend *et al.* 2008). D'autre part, plus récemment, plusieurs études ont également mis en évidence des altérations de la neurogenèse hippocampique adulte, un autre mécanisme de plasticité qui joue un rôle important dans l'apprentissage et la mémoire et qui pourrait donc également contribuer aux déficits cognitifs associés à la DI. Ce processus sera développé au chapitre suivant.

II. La neurogenèse hippocampique adulte

La neurogenèse, qui correspond à la capacité du cerveau à fabriquer de nouveaux neurones fonctionnels à partir de cellules souches neurales, a longtemps été considérée par la communauté scientifique comme se déroulant uniquement au cours du développement embryonnaire et durant une courte période post-natale. Cependant, au cours des années 1960-1970, la technique d'autoradiographie de la thymidine tritiée a permis de montrer la présence de cellules prolifératives dans le cerveau adulte de rongeurs, ce qui a ensuite été validé comme étant des neurones (Altman & Das, 1965 ; Kaplan & Hinds, 1977). Toutefois, ces résultats ont été largement ignorés par la communauté scientifique. C'est seulement dans les années 1990, avec notamment le développement de la technique de l'intégration de la 5-Bromo-2-deoxyUridine (BrdU), un analogue de la thymidine qui s'intègre en phase S du cycle cellulaire, que de nombreuses études ont permis de confirmer que la neurogenèse perdure tout au long de la vie de l'individu dans certaines structures du cerveau. La détection de la BrdU est rapide et précise et permet, lorsqu'elle est couplée à la détection de marqueurs spécifiques, d'identifier sans ambiguïté le phénotype des cellules formées en microscopie confocale. Depuis, la neurogenèse adulte a été décrite chez de nombreuses espèces animales : poissons, oiseaux... (pour revue, Nottebohm, 2002), ainsi que chez différentes espèces de mammifères (pour revue, Cayre *et al.* 2002) et y compris dans le cerveau humain (Eriksson *et al.* 1998 ; Bergmann *et al.* 2015).

Cependant, chez les rongeurs, la neurogenèse adulte est principalement restreinte à deux zones du cerveau : la zone sous-granulaire (SGZ) du gyrus denté (GD) de l'hippocampe et la zone sous-ventriculaire (SVZ), située dans la paroi des ventricules latéraux et à partir de laquelle les nouveaux neurones migrent jusqu'aux bulbes olfactifs (Figure 8). Plus récemment, la présence de neurogenèse adulte a été confirmée dans l'hypothalamus (pour revue, Cheng, 2013). Sa présence a également été rapportée dans le néocortex, le cortex piriforme, l'amygdale, le striatum et la substance noire. Toutefois, à l'heure actuelle les taux observés dans ces zones cérébrales sont extrêmement faibles. Des études ultérieures devront donc être menées pour confirmer ces résultats, ainsi que pour démontrer que ces cellules partagent les propriétés des cellules souches neuronales et que les nouvelles cellules générées sont fonctionnellement intégrées dans ces zones cérébrales (pour revue, Gould, 2007 ; Migaud *et al.* 2010 ; Figure 8).

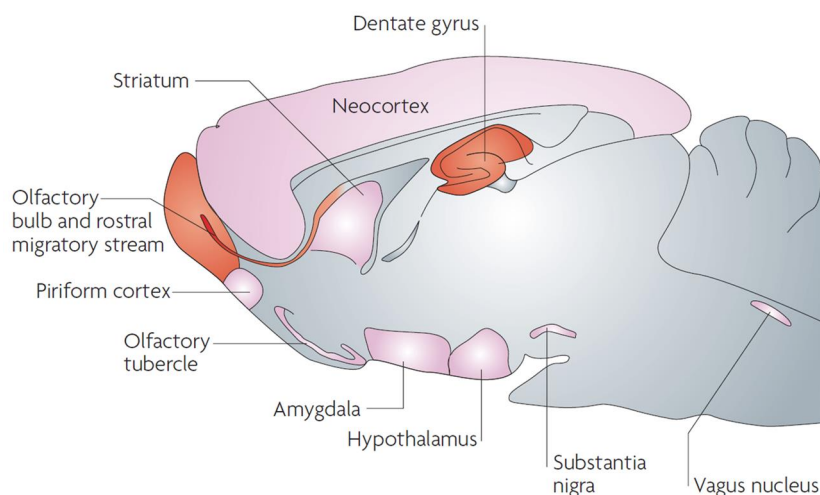


Figure 8 : Régions neurogéniques du cerveau adulte de rongeurs.

Schéma d'une coupe sagittale de cerveau de rongeur mettant en évidence les régions neurogéniques confirmées (rouge) et encore controversées (rose). D'après Gould *et al.* 2007.

Mes travaux de thèse se sont concentrés sur l'étude de la neurogenèse adulte au sein du gyrus denté de l'hippocampe chez les trois modèles murins de DI dont les gènes impliqués seront présentés dans le chapitre suivant.

2.1. Description générale

Anatomiquement, l'hippocampe se situe dans la partie interne du lobe temporal. Il est composé de différents sous-champs : le GD et la Corne d'Ammon (CA) elle-même divisée en trois sous parties (CA1, CA2, CA3 ; The Hippocampus Book ; Andersen *et al.* 2007 ; Figure 9). La CA est principalement constituée de cellules pyramidales alors que le GD est constitué de cellules granulaires (estimée à environ 1 million par GD chez le rat ; Bayer *et al.* 1982). L'hippocampe est également composé, en plus faible quantité, de cellules gliales et d'interneurones inhibiteurs.

L'hippocampe est une région du cerveau qui combine constamment des flux d'informations. Au niveau de la connectivité, les cellules pyramidales du cortex entorhinal (CE ; parties médiane et latérale) envoient leurs axones, formant la voie perforante, vers le GD pour contacter les cellules granulaires (Figure 9A ; Witter, 2007). Les axones des cellules granulaires, les fibres moussues, contactent les cellules pyramidales du CA3 qui, à leur tour, envoient des axones, appelés les collatérales de Schaffer vers les neurones pyramidaux de CA1 formant la voie tri-synaptique classique (CE → DG → CA3 → CA1 ; Figure 9A). Les axones des neurones pyramidaux de CA1 projettent ensuite sur le cortex entorhinal (couches IV, V, VI) en passant par le subiculum, certains axones se projetant sur l'aire prélimbique du cortex préfrontal. Les cellules pyramidales de CA1 et CA3 reçoivent également des afférences du cortex entorhinal respectivement par la voie temporo-ammonique directe et la voie perforante (Figure 9B). Il existe également des projections du CA3 vers le GD.

Bien que les circuits de base de l'hippocampe soient remarquablement similaires le long de l'axe septotemporal, les connexions sont cependant différentes pour les régions dorsale et ventrale. En effet, alors que l'hippocampe dorsal reçoit des informations sensorielles provenant des régions corticales, l'hippocampe ventral est beaucoup plus étroitement lié aux structures sous-corticales, telles que l'amygdale, et l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (Bannerman *et al.* 2004).

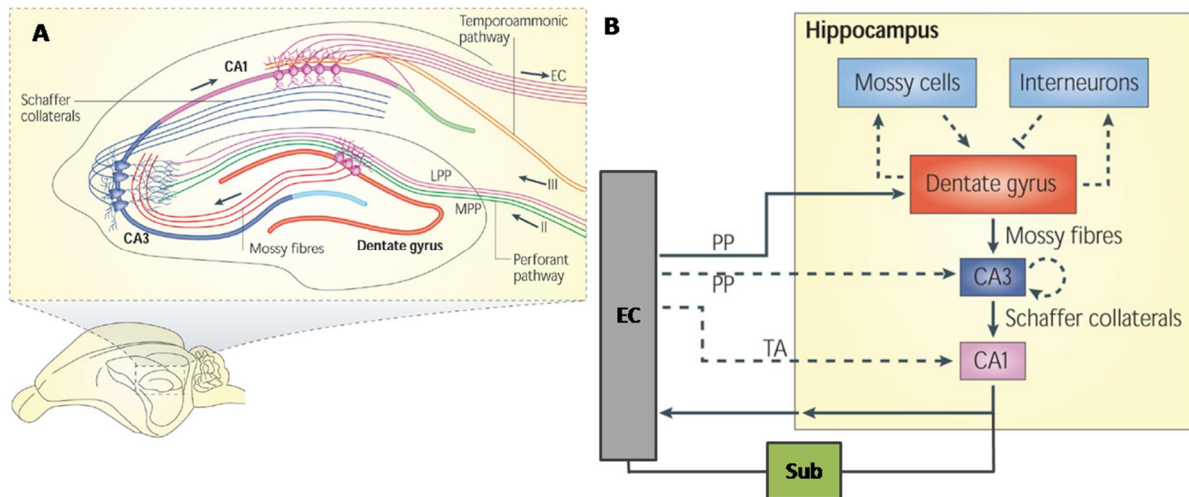


Figure 9 : Schéma du circuit neuronal de l'hippocampe de rongeurs.

(A) Formation hippocampique. (B) Réseau neuronal hippocampique présentant la voie tri synaptique. EC: cortex entorhinal ; LPP: voie perforante latérale ; MPP: voie perforante médiane ; PP: voie perforante ; TA : voie temporo-ammonique ; Sub : subiculum. D'après Deng *et al.* 2010.

C'est uniquement au sein du GD de l'hippocampe que des nouveaux neurones vont être ajoutés tout au long de la vie et vont pouvoir s'intégrer dans les circuits hippocampiques préexistants et devenir fonctionnels (van Praag *et al.* 2002). Grâce à la technique de détection de la BrdU, il a été montré qu'environ 9000 nouvelles cellules sont ajoutées par jour dans le GD du rat juvénile (âgés de 5 semaines ; Cameron & McKay, 2001). A titre indicatif, chez l'Homme, la datation au ^{14}C suite à son incorporation dans les nouveaux neurones du GD, a permis de faire l'estimation qu'environ 700 nouveaux neurones étaient formés dans chaque hippocampe, chaque jour (Spalding *et al.* 2013). Les cellules nouvellement formées donnent majoritairement (70-80% environ) des cellules granulaires (Kempermann *et al.* 2003 ; Ming & Song, 2005; Zhao *et al.* 2006 ; Aimone *et al.* 2014) et environ 20% se différencient en interneurons ou en cellules gliales, majoritairement en astrocytes, mais également en cellules microgliales et en oligodendrocytes (Steiner *et al.* 2004).

2.2. Déroutement de la neurogenèse hippocampique adulte

a. Propriétés des cellules précurseurs

Au cours de la neurogenèse chez l'adulte, un certain nombre de catégories de cellules précurseurs se succèdent reflétant ainsi les différentes étapes d'un processus de développement (Figure 10).

i. Cellules de Type 1

Les cellules de type 1 ou cellules souches neurales, sont initialement présentes dans la SGZ du GD. Ce sont des cellules souches multipotentes capables de donner naissance à la fois à des cellules gliales et à des neurones. Elles sont caractérisées par un taux de division lent et donnent naissance par division asymétrique à une cellule de même type maintenant ainsi la population stable (capacité d'autorenouvellement) et à une cellule de type 2 (Seri & Alvarez-Buylla, 2002 ; Filippov *et al.* 2003). Elles sont caractérisées par un corps cellulaire triangulaire avec de longs prolongements apicaux qui atteignent la partie interne de la couche granulaire du GD de l'hippocampe. Elles expriment la GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein), protéine typique des astrocytes et de la glie radiaire, et présentent des propriétés morphologiques et électrophysiologiques comparables à celles des astrocytes (propriétés passives membranaires et courants potassiques ; Filippov *et al.* 2003 ; Fukuda *et al.* 2003). Elles expriment également la nestine et sox2 (Sex determining region Y-box 2 ; pour revue, Kempermann *et al.* 2015 ; Figure 10).

ii. Cellules de Type 2

Les cellules de type 2 sont des cellules progénitrices transitoires. Ces cellules n'expriment plus la GFAP, continuent d'exprimer la nestine, expriment la NeuroD (Neurogenic Differentiation) et la protéine Prox-1 (prospero-related homeobox 1 ; Encinas *et al.* 2006 ; Figure 10). Approximativement 70-80% de ces précurseurs commencent à se différencier en neurones (Cameron *et al.* 1993 ; Cameron & McKay, 2001). La population de cellules de type 2 est séparée en deux sous-types en fonction de l'avancement de leur développement : les cellules de type 2a et de type 2b. Les cellules de type 2a expriment toujours les marqueurs des cellules souches comme sox2 et sont caractérisées par un fort taux de division (von Bohlen & Halbach, 2007). Les cellules 2b expriment la DCX, une protéine associée aux microtubules, importante dans le développement neuronal (des Portes *et al.* 1998 ; Corbo *et al.* 2002 ; Kempermann *et al.* 2003 ; Figure 10). Ces cellules de type 2b expriment également le facteur de transcription Tbr2 (T-box brain protein 2, aussi appelé *Eomes*) et sont toujours capables de proliférer (Urbán & Guillemot, 2014). Par la suite, les cellules de type 2b donnent les cellules de type 3 qui sont des cellules engagées dans la voie neuronale : les neuroblastes (pour revue, Doetsch, 2003).

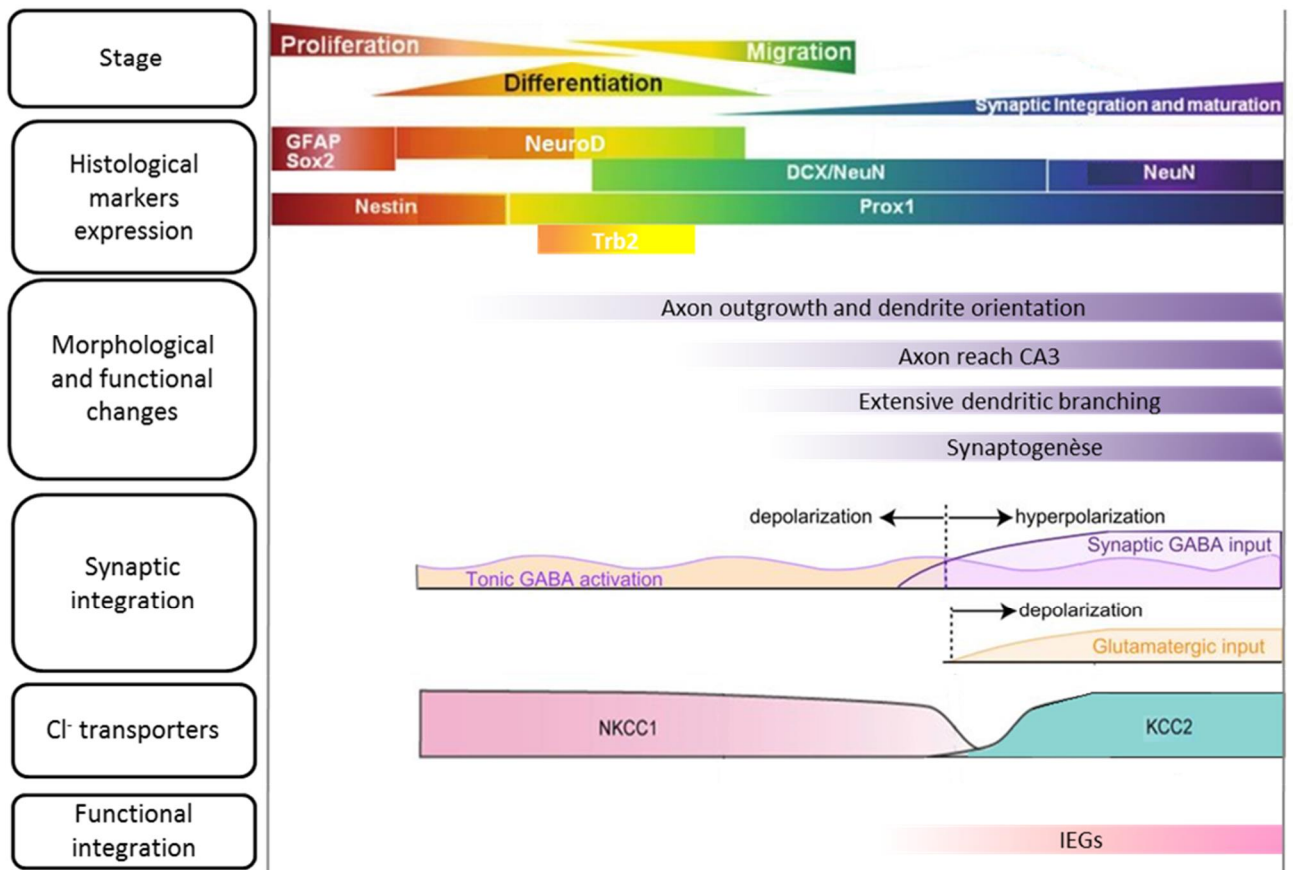
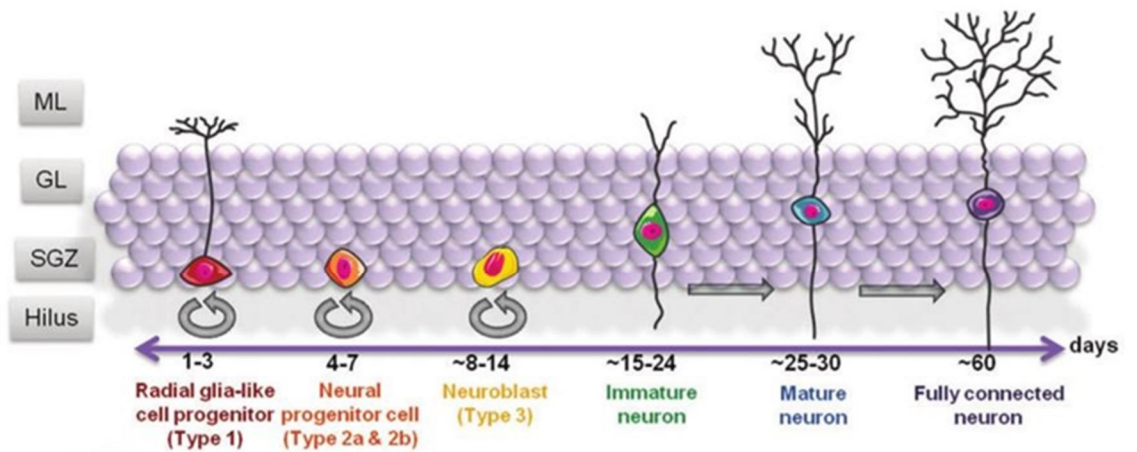


Figure 10 : Neurogenèse adulte dans le GD de l'hippocampe.

La figure représente la couche granulaire du GD et le processus de maturation des cellules nouvellement formées. Les cellules expriment différents marqueurs en fonction de leur type. Sont également montrés : les étapes de l'intégration synaptique, l'expression des co-transporteurs Cl⁻, les changements morphologiques et fonctionnels et l'intégration fonctionnelle avec l'expression des IEGs. ML, couche moléculaire ; GL, couche granulaire. D'après Ming & Song, 2011 ; Bergami & Berninger, 2012 ; Aguilar-Arredondo *et al.* 2015 ; Catavero *et al.* 2017.

iii. Cellules de Type 3

Bien qu'elles soient déjà engagées dans la voie de la différenciation neuronale, les cellules de type 3 sont encore capables de proliférer mais leur activité proliférative est faible. Les neuroblastes sont caractérisés par l'expression de la DCX, Tbr2, NeuroD et Prox1, mais ils n'expriment plus la nestine (Figure 10). Une fois sorties du cycle, ces cellules neuronales immatures poursuivent leur maturation.

b. Maturation morphologique et synaptique

Dès leur première semaine de développement, les nouvelles cellules vont commencer leur différenciation et migrer sur une courte distance au sein de la couche granulaire du GD (Kuhn *et al.* 1996 ; Espósito *et al.* 2005). On observe alors le démarrage de la croissance d'un axone et des dendrites primaires (Espósito *et al.* 2005 ; Zhao *et al.* 2006). A ce stade de maturation, ces nouveaux neurones immatures sont toniquement activés par le GABA ambiant (Espósito *et al.* 2005 ; Ge *et al.* 2006 ; Figures 10 et 11). Les épines dendritiques n'étant pas encore développées, il n'y a pas encore d'afférences glutamatergiques (Espósito *et al.* 2005 ; Zhao *et al.* 2006).

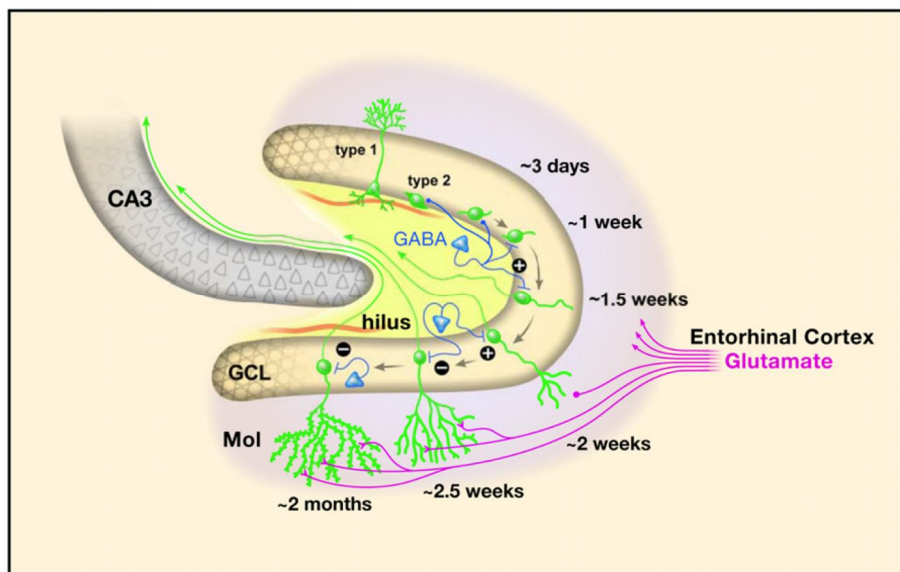


Figure 11 : Maturation et migration des cellules néoformées de la SGZ au sein de la couche granulaire du GD. Durant la 1^{ère} semaine, les nouveaux neurones reçoivent des afférences GABAergiques (bleu) qui deviennent hyperpolarisantes durant la 3^e semaine. Les afférences glutamatergiques (en rose) sont observées à partir de la 2^e semaine en parallèle des efférences vers l'aire CA3. D'après Zhao *et al.* 2008.

La seconde semaine est caractérisée par une croissance rapide des dendrites et le commencement de la synaptogenèse, deux événements cruciaux pour l'intégration dans le réseau synaptique du GD. Dès 10-11 jours, les axones des neurones immatures atteignent la couche CA3 de

l'hippocampe, formant les premières synapses glutamatergiques excitatrices avec les neurones pyramidaux de CA3 et entraînant l'émission des premiers potentiels d'action (PA) (Zhao *et al.* 2006 ; Mongiat *et al.* 2009 ; Figure 12). Les nouveaux neurones reçoivent également leurs premières afférences glutamatergiques provenant du cortex entorhinal (Espósito *et al.* 2005 ; Zhao *et al.* 2006 ; Figure 11).

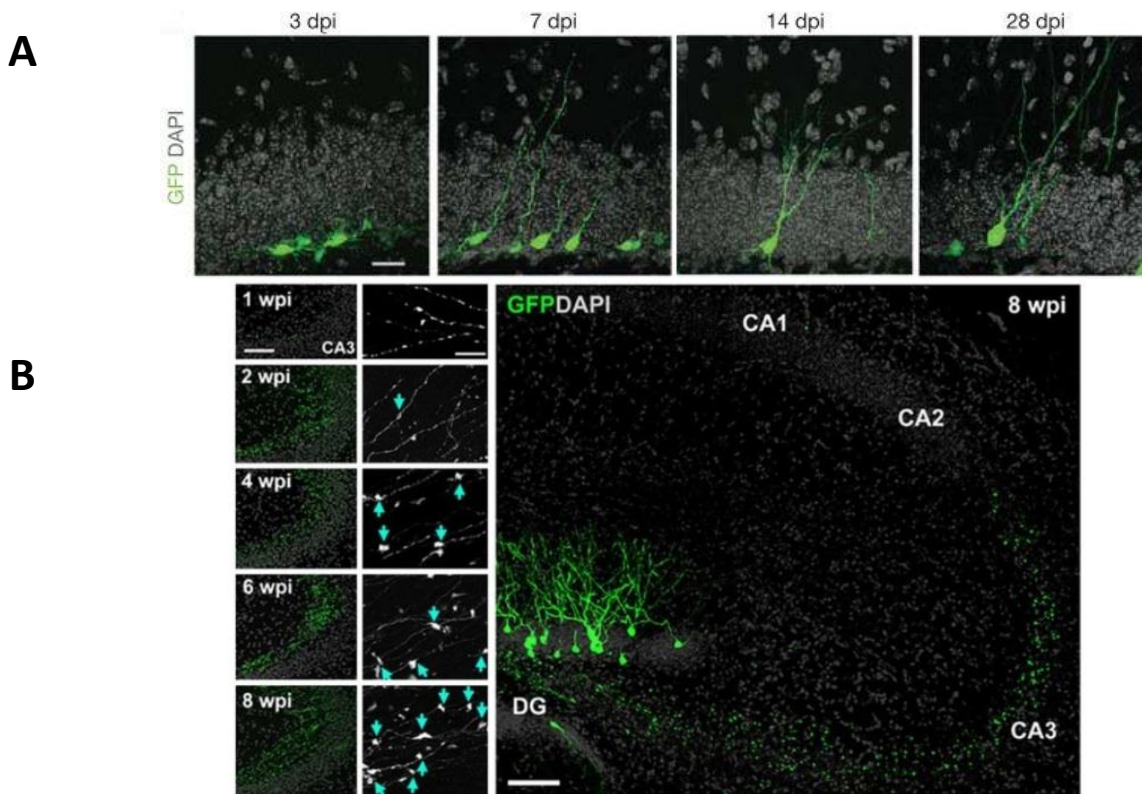


Figure 12 : Maturation morphologique des nouveaux neurones du GD.

Les nouveaux neurones sont marqués grâce à l'injection d'un vecteur rétroviral GFP. (A) Maturation morphologique de l'arborisation dendritique des nouveaux neurones à différents temps après leur naissance. dpi : day(s) post-injection. Extrait de Ge *et al.* 2006. (B) Connexions axonales des nouveaux neurones âgés de 1 à 8 semaines sur les cellules pyramidales de l'aire CA3 de l'hippocampe. wpi : week(s) post-injection. Extrait de Faulkner *et al.* 2008.

A partir de cette étape, les nouveaux neurones expriment à la fois des récepteurs glutamatergiques et GABAergiques. De plus, durant cette période, deux co-transporteurs du chlore, $\text{Na}^+\text{K}^+\text{Cl}^-$ isoforme 1 (NKCC1) et K^+Cl^- isoforme 2 (KCC2), vont moduler la concentration de Cl^- intracellulaire et jouer ainsi un rôle clé dans la régulation de l'activité de ces neurones. Ainsi, pendant les deux premières semaines, les neurones immatures présentent une concentration intracellulaire de Cl^- importante due à la forte expression des co-transporteurs NKCC1 qui laissent entrer le Cl^- (Ge *et al.* 2006 ; Figure 13). Un effet dépolarisant est alors observé en réponse au neuromédiateur acide gamma-aminobutyrique (GABA) qui laisse sortir le Cl^- par ses canaux ouverts (Overstreet-Wadiche *et al.* 2005).

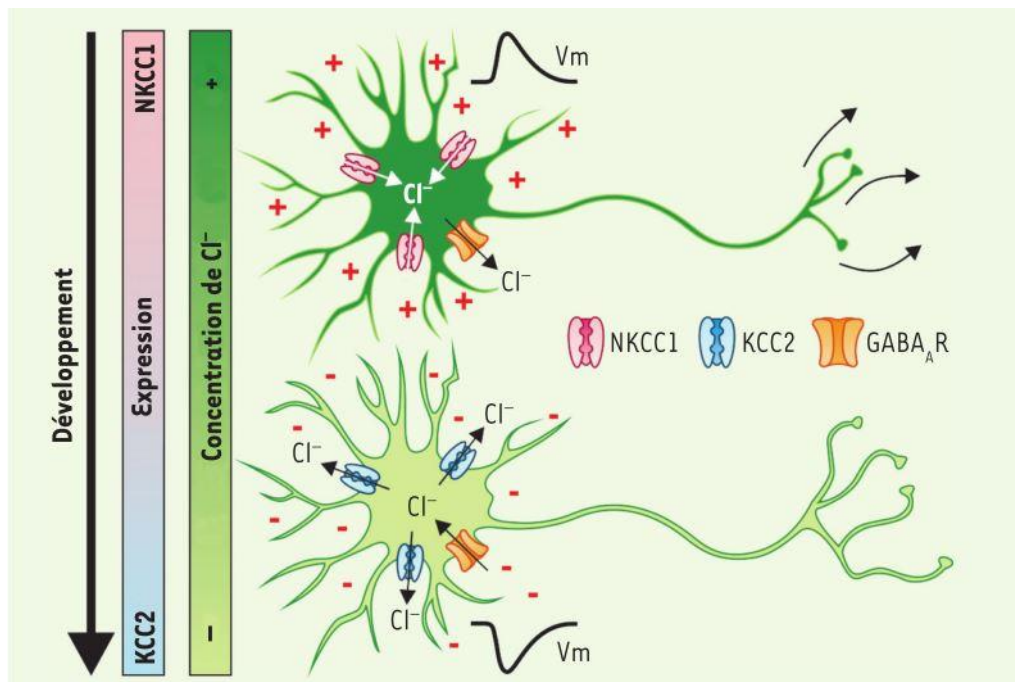


Figure 13 : Effet du GABA sur les neurones immatures et matures.

Au stade immature (en haut), l'activation des récepteurs GABA_A engendre une dépolarisation (+) due à une forte expression de NKCC1 (rose) qui importe le Cl⁻ à l'intérieur de la cellule. Cette forte [Cl⁻]_i (vert) entraîne une dépolarisation du potentiel membranaire (V_m) lors de l'ouverture des canaux Cl⁻. Au stade plus mature, (en bas), l'activation des récepteurs GABA_A induit une hyperpolarisation (-) due à une forte expression de KCC2 et une expression quasi-nulle de NKCC1. Ceci entraîne une baisse de la [Cl⁻]_i et une hyperpolarisation du V_m lors de la stimulation des récepteurs GABA_A. Bergeron *et al.* 2014.

Au cours de la 3^e semaine, l'expression de NKCC1 diminue et les cellules commencent à exprimer KCC2 qui couple le mouvement des ions K⁺ à celui du Cl⁻ vers l'extérieur des neurones, permettant à la concentration intracellulaire de chlore d'être maintenue basse (Ge *et al.* 2006). Ces changements induisent un effet hyperpolarisant et fortement inhibiteur du GABA qui permet cette fois-ci l'entrée de Cl⁻ à l'intérieur du neurone (Figure 13). La transmission GABAergique devient alors identique à celle observée chez les neurones matures. Durant cette période, les nouveaux neurones continuent d'étendre leurs dendrites dans la couche moléculaire permettant d'établir la majeure partie des connexions synaptiques (Figure 12). Les afférences glutamatergiques provenant du cortex entorhinal sont, quant à elles, de plus en plus nombreuses (Espósito *et al.* 2005 ; Zhao *et al.* 2006).

A partir de la 4^e semaine, les nouveaux neurones reçoivent des entrées excitatrices et inhibitrices, génèrent des PA comme les neurones matures et libèrent des neuromédiateurs vers les neurones post-synaptiques (Ge *et al.* 2007 ; Deng *et al.* 2010 ; Mongiat & Schinder, 2011). Ces cellules granulaires continuent de développer leur arborisation pendant encore plusieurs semaines (Zhao *et al.* 2006 ; Toni & Sultan, 2011). Des études en microscopie ont montré que la synaptogenèse, ainsi que la maturation des épines dendritiques des fibres moussues se poursuit jusqu'à 8 semaines après la naissance des nouveaux neurones (Zhao *et al.* 2006 ; Toni *et al.* 2007). Récemment, une étude sur des nouveaux neurones de 21 à 77 jours montre qu'après stimulation de

la voie perforante, seuls les jeunes neurones de 28 à 35 jours répondent à la stimulation en remodelant leurs dendrites. Ces résultats suggèrent tout d'abord que les jeunes neurones répondent davantage aux stimulations que les neurones matures (Beining *et al.* 2017). En effet, il a été montré que ces nouveaux neurones sont hautement excitables (Dieni & Rees, 2003 ; Espósito *et al.* 2005 ; Mongiat *et al.* 2009). Chez la souris, les nouveaux neurones âgés de 1 à 3 semaines présentent des propriétés membranaires qui leur permettent de générer des PA plus facilement que des neurones plus matures (seuil de génération des PA plus bas), même s'ils n'émettent qu'un ou que quelques PA (Mongiat *et al.* 2009). Ils présentent également des taux plus élevés de PLT (Ge *et al.* 2007) dû partiellement à l'absence de la forte inhibition GABAergique sur les neurones immatures (Ge *et al.* 2008).

Pour finir, une fois que les nouveaux neurones sont devenus morphologiquement identiques aux neurones matures, il reste à mettre en évidence qu'ils sont bien intégrés dans les réseaux de l'hippocampe. L'induction pharmacologique ou comportementale de l'expression de gènes immédiats précoces (IEGs) dans les nouveaux neurones est couramment utilisée comme indice d'activation et d'intégration des nouveaux neurones au sein des réseaux puisqu'ils sont induits en réponse à une activité synaptique (Figure 14 ; Jessberger & Kempermann, 2003). Les IEGs sont des gènes dont l'expression est induite rapidement et transitoirement en réponse à des signaux extracellulaires. Les gènes les plus couramment analysés sont *arc*, *zif268* et *c-fos* (Guzowski *et al.* 2001). Chez la souris, l'injection de kainate n'induit pas d'expression des IEGs (*c-fos*, *zif268*) dans les neurones de 2 semaines mais induit une expression dans 25% des nouveaux neurones âgés de 3 semaines, dans 50% de ceux âgés de 4 semaines et dans 80% de ceux âgés de 7 semaines, suggérant que les nouveaux neurones, dès 3 semaines, sont potentiellement capables de participer à la mise en mémoire d'une information (Jessberger & Kempermann, 2003). De même chez le rat, les nouveaux neurones expriment *zif268* en réponse à la PLT dès 2 semaines mais pas à 1 semaine (Bruehl-Jungermann *et al.* 2006). D'autre part, chez la souris, la réexposition à un environnement enrichi familial induit une forte activation des nouveaux neurones âgés de 1 à 3 semaines au moment de la première exposition (Tashiro *et al.* 2007). L'ensemble de ces résultats suggère donc que les nouveaux neurones peuvent être recrutés par l'activité synaptique avant même qu'ils ne soient complètement matures. Par ailleurs, au laboratoire, Veyrac *et al.* (2013) ont montré que l'expression de *zif268* par les nouveaux neurones entre 2 et 3 semaines est indispensable à la maturation et au recrutement des jeunes neurones lors d'un apprentissage spatial. Cette étude a révélé un mécanisme précédemment inconnu pour le contrôle de la maturation fonctionnelle et du recrutement dépendant de l'expérience des nouveaux neurones qui dépend de l'expression du gène *zif268*.

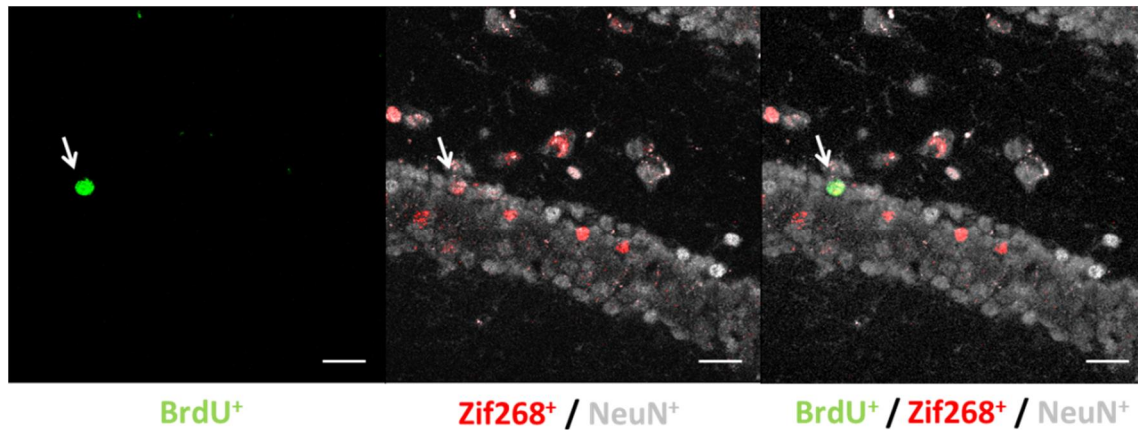


Figure 14 : Expression de Zif268 dans un nouveau neurone et dans les neurones matures du GD de l'hippocampe.

Images obtenues en microscopie confocale représentant une cellule BrdU⁺ (vert) âgée de 49-53 jours exprimant le marqueur Zif268 (rouge) et NeuN (Neuronal Nuclei ; gris) chez une souris WT (Wild-Type). Barre d'échelle = 10 μ m. (Castillon *et al.* 2018).

c. Régulation de la neurogenèse hippocampique adulte

La neurogenèse hippocampique adulte est une forme de plasticité cérébrale qui est influencée par de nombreux facteurs externes. En effet, au cours des 4 premières semaines après leur naissance, durant leur processus de maturation, les cellules nouvellement formées sont soumises à un processus de sélection et vont soit, pour 20 à 30% d'entre elles, s'intégrer aux réseaux pré existants de l'hippocampe (Carlén *et al.* 2002) et devenir indistinguables de la population de cellules granulaires qui composent le GD (van Praag *et al.* 2002), soit être éliminées par apoptose (Dayer *et al.* 2003 ; Gould *et al.* 1999). Ces processus de survie / mort cellulaire sont régulés par un certain nombre de facteurs intrinsèques tels que les facteurs génétiques, épigénétiques et les facteurs de transcription. Des facteurs extrinsèques influencent également la survie des nouveaux neurones. Parmi eux, certains comme le vieillissement, le stress, la prise de drogues ou d'alcool, le manque de sommeil, sont négatifs et accélèrent la mort neuronale des jeunes neurones alors que d'autres facteurs comme l'enrichissement environnemental, la PLT, l'exercice physique et certaines hormones sont bénéfiques et permettent alors d'augmenter la survie des nouveaux neurones (Aimone *et al.* 2014).

De nombreuses études ont également mis en évidence que l'apprentissage est un facteur influençant particulièrement la neurogenèse hippocampique adulte. Cependant, ses effets restent controversés (Lafenetre *et al.* 2011). A l'origine de ce débat, la démonstration de Gould *et al.* (1999) qui ont montré que des rats préalablement injectés à la BrdU une semaine avant un entraînement en piscine de Morris, présentent un plus grand nombre de cellules BrdU suite à l'apprentissage, par rapport aux rats de contrôle sans apprentissage. La même année, van Praag *et al.* (1999) n'ont cependant pas observé d'influence de l'apprentissage en piscine de Morris sur la prolifération et la

survie des nouvelles cellules chez des souris préalablement injectées à la BrdU. Depuis ces premières publications, de nombreuses autres études ont montré soit une augmentation de la prolifération et de la survie des nouveaux neurones suite à la réalisation d'un apprentissage dépendant de l'hippocampe (Ambrogini *et al.* 2000 ; Döbrössy *et al.* 2003 ; Leuner *et al.* 2004 ; Hairston *et al.* 2005 ; Olariu *et al.* 2005 ; Epp *et al.* 2007 ; Veyrac *et al.* 2013), soit que l'apprentissage n'a aucun effet sur la survie des nouveaux neurones (Snyder *et al.* 2005 ; Mohapel *et al.* 2006 ; Epp *et al.* 2007 ; pour revue, voir Ehninger & Kempermann, 2006) ou encore que l'apprentissage spatial diminue la survie des nouveaux neurones (Ambrogini *et al.* 2004 ; Olariu *et al.* 2005 ; Mohapel *et al.* 2006 ; Epp *et al.* 2011). Pour résumer, l'ensemble de ces études met en évidence que l'apprentissage d'une tâche dépendante de l'hippocampe peut influencer positivement mais aussi négativement la survie des nouveaux neurones, suggérant qu'il existe des conditions particulières dans lesquelles la survie est améliorée et d'autres où elle est diminuée.

Depuis le début de ces études, des auteurs ont souligné l'existence de paramètres importants modulant l'effet de l'apprentissage sur la survie neuronale. Par exemple, l'espèce, le sexe, la souche génétique ou le protocole utilisé sont des facteurs importants à prendre en compte lors de l'analyse de la neurogenèse. Pour illustrer ce dernier paramètre, Olariu *et al.* (2005) ont montré qu'en fonction du nombre d'essais réalisé par l'animal durant l'acquisition, le taux de neurogenèse ne sera pas affecté de la même manière. En effet, plusieurs études ont mis en évidence que la réalisation d'un faible nombre d'essais est associée à une augmentation de la survie cellulaire alors que la réalisation d'un grand nombre d'essais est sans effet sur la survie, ou associée à une diminution (pour revues, Leuner *et al.* 2006 ; Waddell & Shors, 2008 ; Curlik & Shors, 2011). Autre paramètre, il semblerait que la difficulté de la tâche influence également la survie cellulaire. Epp *et al.* en 2010 ont testé chez le rat plusieurs protocoles d'apprentissage de difficulté croissante en piscine de Morris et ont montré une diminution progressive de la survie des nouveaux neurones en fonction de l'augmentation de la difficulté de la tâche. De même, un protocole de mémoire de travail en labyrinthe aquatique, plus difficile comparé au protocole de mémoire de référence, induit également une diminution de la survie (Xu *et al.* 2011). Ces résultats démontrent que la difficulté/qualité de l'apprentissage semble avoir un impact négatif sur la survie cellulaire. Toutefois, ces conclusions restent à nuancer, car d'autres études montrent que plus l'apprentissage est difficile, plus la présence de nouveaux neurones serait nécessaire et que de ce fait la survie des nouveaux neurones serait augmentée (pour revue, Leuner *et al.* 2006 ; Waddell *et al.* 2011).

Enfin, d'autres auteurs ont également apporté de nouvelles informations en étudiant précisément les différentes phases d'un apprentissage spatial en piscine de Morris qui se déroule sur plusieurs jours : une première phase où les performances s'améliorent rapidement (acquisition) et une deuxième phase où les performances se stabilisent (stabilisation). Brièvement, la phase d'acquisition favoriserait la survie de cellules âgées d'au moins 1 semaine tout en promouvant l'apoptose des neurones immatures produits pendant cette phase (Dupret & Abrous, 2010). En fin

d'apprentissage, une fois la tâche maîtrisée, la prolifération des cellules progénitrices et leur survie seraient influencées positivement (Döbrössy *et al.* 2003). Ces données indiquent donc que chaque phase d'un apprentissage spatial (acquisition, stabilisation), quand il est pratiqué sur plusieurs jours, influence différemment la prolifération des cellules progénitrices et la survie de nouveaux neurones de différents âges.

Dernier point mais pas des moindres, il apparaît que les études précédemment citées ont parfois ciblé des populations de neurones d'âges différents au début de la tâche comportementale. En effet, l'âge des nouveaux neurones au moment de l'apprentissage influence de façon cruciale leur survie à court et long terme (pour revue, Epp *et al.* 2013). L'ensemble des études réalisées chez le rat s'accorde sur le fait que la survie des nouveaux neurones est améliorée lorsque ceux-ci sont âgés d'environ 1 à 2 semaines au moment de l'apprentissage, alors que ceux qui sont plus jeunes seraient éliminés (Gould *et al.* 1999 ; Ambrogini *et al.* 2004 ; Dupret *et al.* 2007 ; Epp *et al.* 2007).

En résumé, l'ensemble de ces données suggère que des apprentissages spatiaux dépendants de l'hippocampe peuvent avoir un double effet sur la survie des nouveaux neurones du GD en favorisant soit leur élimination lorsqu'ils sont très immatures, soit leur survie lorsqu'ils ont atteint un niveau critique de maturation. D'autre part, de manière non négligeable, de nombreuses conditions (type de tâche, protocole, difficulté...) influencent également l'effet de l'apprentissage sur la survie des nouveaux neurones.

2.3. Neurogenèse hippocampique adulte et fonctions cognitives

Nous avons vu au paragraphe précédent que la neurogenèse hippocampique adulte est un processus dynamique, complexe et finement régulé, ce qui laisse supposer que ces nouveaux neurones ont un rôle particulier dans les fonctions hippocampiques. L'hippocampe est une structure cérébrale fortement impliquée dans les processus mnésiques, mais également dans des mécanismes de régulation de l'humeur, ainsi que dans différents processus cognitifs (pour revue, Treves *et al.* 2008). Plus précisément, compte tenu de ses connexions, l'hippocampe ventral est plus impliqué dans le traitement émotionnel, tel que l'anxiété (Bannerman *et al.* 2003 ; McHugh *et al.* 2011) alors que l'hippocampe dorsal est impliqué dans les processus cognitifs tels que la mémoire spatiale (Moser & Moser, 1998). Toutefois les mécanismes exacts intervenant dans ces processus n'ont pas encore été totalement élucidés. Au sein de l'hippocampe dorsal, certains travaux ont montré que les différentes sous-régions de l'hippocampe – CA1, CA2, CA3 et GD – ont des contributions spécifiques, dans les processus d'apprentissage et de mémoire (Hunsaker & Kesner, 2008). Notamment, dans les années 80, les premières expériences de lésions du GD révèlent d'importants déficits de navigation spatiale en piscine de Morris suggérant un rôle du GD de l'hippocampe dans l'intégration des informations (Sutherland *et al.* 1983 ; McNaughton *et al.* 1989 ; Nanry *et al.* 1989). D'autres études

ont montré spécifiquement que le GD et CA3 de l'hippocampe dorsal sont fortement impliqués dans la fonction de séparation de patterns (McHugh *et al.* 2007), fonction qui permet de faire la distinction entre deux contextes/deux événements qui présentent de nombreuses similitudes (pour revue, Yassa & Stark, 2011).

Compte tenu de l'implication de l'hippocampe dans la mémoire, la découverte de la neurogenèse adulte a logiquement conduit à s'interroger sur le rôle fonctionnel de ces nouveaux neurones dans les processus cognitifs.

a. Corrélations positives

Les premières études à suspecter un rôle de la neurogenèse dans la mémoire se sont principalement basées sur des approches corrélatives qui ont consisté à analyser les effets des variations de la neurogenèse adulte sur la mémoire. De nombreux travaux ont ainsi mis en évidence qu'il existe une corrélation positive entre le niveau de prolifération et/ou de survie des nouveaux neurones et les performances mnésiques (pour revues, voir Castilla-Ortega *et al.* 2011 ; Marin-Burgin & Schinder, 2011).

Au paragraphe 2.2.c, nous avons vu que plusieurs facteurs régulent positivement ou négativement la neurogenèse. Il a été mis en évidence que ces mêmes facteurs sont associés à des modifications des capacités mnésiques. Par exemple, certains facteurs intrinsèques comme le fond génétique influence la neurogenèse adulte. Les souris de fond génétique DBA/2 qui présentent naturellement un faible niveau de neurogenèse à l'état basal, présentent également de moins bonnes performances en apprentissage spatial en piscine de Morris par rapport à des souris de fond génétique C57BL/6 qui présentent un fort taux de neurogenèse à l'état basal (Kempermann & Gage, 2002). Autre argument, les facteurs extrinsèques tels que l'exposition à des environnements enrichis ou l'exercice physique volontaire augmentent la survie des nouveaux neurones et en parallèle améliorent les performances mnésiques notamment lors de la réalisation de tâches dépendantes de l'hippocampe (pour revue, Aasebø *et al.* 2011). Inversement, les facteurs extrinsèques défavorisant la survie des nouveaux neurones (le stress et l'âge par exemple) entraînent en parallèle des altérations des performances mnésiques (Drapeau *et al.* 2003 ; Lu *et al.* 2003 ; Zhao *et al.* 2003 ; Driscoll *et al.* 2006). Cependant, il existe également des résultats contradictoires rapportant, par exemple, que chez des rats âgés, la baisse naturelle de la neurogenèse n'est pas toujours associée à des déficits cognitifs en piscine de Morris (Merrill *et al.* 2003).

Bien qu'intéressantes, ces études ne permettent pas d'établir un lien de causalité entre le niveau de neurogenèse et les performances mnésiques et il est, de plus, fortement envisageable que d'autres variables influencent indépendamment la neurogenèse hippocampique adulte et les performances mnésiques.

b. Rôle des nouveaux neurones dans les processus mnésiques

Compte tenu de l'hétérogénéité des résultats obtenus dans ces études corrélatives, de nombreuses études ont utilisé des méthodes expérimentales d'ablation / de diminution de la neurogenèse adulte afin de déterminer sa fonction dans la cognition (pour revue, Marín-Burgin & Schinder, 2011). Dans la littérature, différentes approches permettant de bloquer la neurogenèse ont été utilisées :

- Pharmacologiques : injections d'antimitotiques tels que le MAM (acétate de méthyl-azoxy-méthanol), le TMZ (témozolomide) ou l'Ara-C (cytosine- β -d-arabinofuranoside).
- L'irradiation (rayons X, rayons gamma, neutrons), soit de la tête entière, soit de l'hippocampe, soit du GD, qui abolit de façon plus ou moins importante la formation de nouveaux neurones.
- Les modèles animaux transgéniques, qui peuvent offrir l'avantage d'inhiber précisément des nouveaux neurones d'un âge précis, à un moment donné du protocole et durant une durée choisie.

Toutefois, les résultats obtenus après altération de la neurogenèse adulte sont contrastés et parfois contradictoires selon la méthode de blocage utilisée, sa durée et selon le type de tâche étudié.

Premièrement, une grande partie de ces études de blocage de la neurogenèse hippocampique adulte a montré qu'il entraîne des déficits d'acquisition et de mémoire dans diverses tâches mnésiques dépendantes de l'hippocampe. Ces études ont commencé par l'étude de Shors *et al.* (2001). Dans leur étude, l'injection de MAM pendant 14 jours a réduit la production de nouveaux neurones d'environ 80% et a provoqué un déficit d'acquisition dans une tâche de conditionnement de trace du clignement palpébral. Le déficit est réversible puisque trois semaines après cessation du traitement MAM, les animaux ayant récupéré des niveaux normaux de neurogenèse ont acquis de nouveau le réflexe palpébral conditionné. Ces premières observations mettent donc en avant que les nouveaux neurones sont nécessaires pour l'acquisition de cette tâche dépendante de l'hippocampe. D'autres études ont mis en évidence que l'ablation de la neurogenèse adulte entraîne également des déficits de mémoire de travail (Iwata *et al.* 2008 ; Saxe *et al.* 2007), de mémoire de peur au contexte (Shors *et al.* 2002 ; Saxe *et al.* 2006) et de mémoire spatiale (Raber *et al.* 2004 ; Rola *et al.* 2004 ; Imayoshi *et al.* 2008 ; Lemaire *et al.* 2012). Cependant, certaines études n'ont pas rapporté de déficit d'apprentissage ou de mémoire dans des tâches dépendantes de l'hippocampe telles que la mémoire spatiale en piscine de Morris ou en conditionnement de peur au contexte, suite à l'ablation de la neurogenèse (Madsen *et al.* 2003 ; Raber *et al.* 2004 ; Meshi *et al.* 2006 ; Ko *et al.* 2009 ; Deng W *et al.* 2009 ; Goodman *et al.* 2010). Par ailleurs, lorsque Martinez-Canabal *et al.* (2012) testent l'effet de l'ablation de la neurogenèse sur l'apprentissage spatial en piscine de Morris, ils précisent que l'inhibition de la neurogenèse adulte par le TMZ induit un léger retard d'apprentissage spatial chez des souris juvéniles âgées de 1 à 2 mois mais pas chez des souris adultes (2-3 mois) ou plus âgées (11-12 mois) suggérant que, chez les juvéniles, la suppression de la neurogenèse peut altérer le

fonctionnement de l'hippocampe, alors qu'à l'âge adulte et durant le vieillissement, les neurones préexistants peuvent compenser le manque de nouveaux neurones hippocampiques (Martinez-Canabal *et al.* 2012). De plus, en 2005, il a été montré au laboratoire qu'un traitement au MAM durant 14 jours bloque l'amélioration des performances dans un test de reconnaissance d'objets (24 et 48 heures après l'exploration), suite à l'exposition dans un environnement enrichi (Bruehl-Jungerman *et al.* 2005), suggérant que la neurogenèse adulte est nécessaire aux effets bénéfiques de l'enrichissement sur les performances mnésiques de reconnaissance. Enfin, plusieurs études ont également mis en évidence que la neurogenèse hippocampique est nécessaire à la flexibilité comportementale. En piscine de Morris, Garthe *et al.* (2009) montrent que la diminution de la neurogenèse par utilisation du TMZ altère la précision de la navigation spatiale lorsque la plateforme a été changée de place.

Quelques années plus tard, le développement de nouvelles technologies a permis une avancée considérable dans la compréhension du rôle des nouveaux neurones lors notamment de la phase de rappel. Par exemple, l'étude d'un modèle de souris transgéniques permettant d'abolir spécifiquement les nouveaux neurones, a permis de mettre en évidence que leur élimination après l'apprentissage entraîne une dégradation de la mémoire lors de tâches de discrimination de peur au contexte et de piscine de Morris. L'ablation de ces nouveaux neurones, même un mois après l'apprentissage, entraîne une altération équivalente de la mémoire spatiale dans la tâche de la piscine de Morris, suggérant que les nouveaux neurones sont des composants durables de la mémoire (Arruda-Carvalho *et al.* 2011). Enfin, le développement des outils d'optogénétique a permis de préciser également un peu plus les données obtenues par ablation totale de la neurogenèse. Ainsi, dans l'étude de Gu *et al.* (2012) réalisée chez la souris, seuls les nouveaux neurones âgés de 4 semaines au moment de l'apprentissage sont impliqués dans la mémoire spatiale, l'inactivation des nouveaux neurones hippocampiques âgés de 2 ou 8 semaines n'ayant pas d'incidence sur la mémoire spatiale. Ces données suggèrent que les nouveaux neurones doivent avoir atteint un certain niveau de maturation pour être recrutés bien qu'ils soient encore relativement immatures au moment de l'apprentissage.

L'ensemble des études d'ablation de la neurogenèse a donc tendance à s'accorder sur le fait que les nouveaux neurones participent à la mise en mémoire d'une information et à son rappel à long terme. Toutefois les résultats restent contrastés et ce même parfois pour des tâches de mémoire identiques. Afin de confirmer que les nouveaux neurones sont impliqués dans les processus mnésiques, plusieurs études ont aussi examiné le recrutement des nouveaux neurones en utilisant l'expression des IEGs comme marqueurs d'activation suite à un apprentissage ou au rappel. Des protocoles basés sur l'analyse de l'activation des nouveaux neurones par colocalisation de la BrdU et des IEGs ont permis de déterminer que des nouveaux neurones de 1-4 semaines sont recrutés dans

les circuits de la mémoire spatiale et que la survie et l'activation des cellules dépendent de leur âge lors de l'apprentissage. En effet, certaines études montrent que des nouveaux neurones, même très jeunes, peuvent participer à des processus de mémoire même à très long terme (Tashiro *et al.* 2007 ; Trouche *et al.* 2009) et que, en général, le recrutement ne se fait pas avant 1 semaine d'âge.

L'ensemble de ces travaux, bien qu'ils soient basés sur des protocoles divers, coïncide sur le fait que c'est au cours d'une période particulière, nommée période critique, comprise entre 1 à 4 semaines après leur naissance, que les nouveaux neurones de l'hippocampe sont plus sensibles aux stimuli de l'environnement et susceptibles de participer aux processus mnésiques dépendants de l'hippocampe (Figure 15). Comme présenté dans le paragraphe II.2.2.c, c'est durant cette même période que les nouveaux neurones, sélectionnés pour survivre ou mourir, présentent des caractéristiques morphologiques et électrophysiologiques particulières et notamment une hyperexcitabilité et une capacité accrue de plasticité synaptique qui pourraient permettre leur recrutement préférentiel au cours de l'apprentissage et lors de la consolidation mnésique.

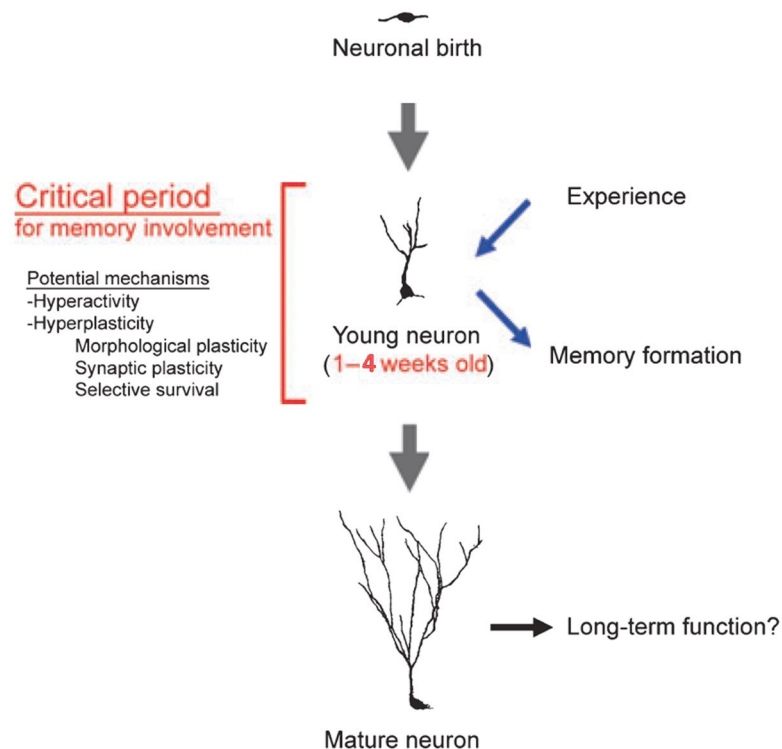


Figure 15 : Période critique d'intégration des nouveaux neurones hippocampiques.

S'ils sont recrutés par un apprentissage, les nouveaux neurones s'intègrent au sein des réseaux préexistants de l'hippocampe lorsqu'ils se situent dans une période critique située entre 1 et 4 semaines après leur naissance afin de participer aux processus mnésiques dépendants de l'hippocampe. D'après Aasebø *et al.* 2011

Cependant, il reste encore des controverses. Certains auteurs montrent également que des nouveaux neurones de 4-6 semaines au moment de l'apprentissage peuvent être recrutés par l'apprentissage et le rappel de la tâche (Farioli-Vecchioli *et al.* 2008 ; Tronel *et al.* 2015 ; Huckleberry

et al. 2015). Toutefois, il semble que l'activation de ces nouveaux neurones ne soit pas spécifique, à proprement parler, d'un apprentissage, puisqu'ils sont également activés par l'exploration d'un nouvel environnement et par l'exercice physique. Dans ces situations, les animaux mémorisent cependant, un grand nombre d'informations dont des informations spatiales (Sandoval *et al.* 2011 ; Clark *et al.* 2012 ; Huckleberry *et al.* 2015). D'autres auteurs montrent également une activation préférentielle des nouveaux neurones par rapport aux préexistants lorsqu'ils sont âgés de 4 à 10 semaines, mais pas lorsqu'ils sont plus jeunes (Kee *et al.* 2007 ; Farioli-Vecchioli *et al.* 2008 ; Stone *et al.* 2011).

L'ensemble de ces données laisse donc suggérer que les nouveaux neurones âgés entre 2 et 6 semaines peuvent être recrutés selon les tâches et les conditions expérimentales.

c. Rôle de la neurogenèse adulte dans la gestion des interférences

Lorsque deux apprentissages différents se succèdent, on peut observer un effet d'interférence de l'un sur l'autre. Ainsi, lorsqu'on observe une détérioration de la rétention du deuxième apprentissage suite au premier apprentissage, on parle alors d'interférence proactive. A l'inverse, si la rétention du premier apprentissage est altérée suite à la réalisation d'un deuxième apprentissage on parle alors d'interférences rétroactives.

Le rôle des nouveaux neurones dans la gestion des interférences a été testé chez le rat dans une tâche de discrimination en condition de faibles ou fortes interférences (Winocur *et al.* 2012). Les faibles/fortes interférences, dans ce cas-ci rétroactives, ont été générées en jouant sur les indices spatiaux. Leurs résultats montrent que les rats irradiés font beaucoup plus d'erreurs en condition de fortes interférences rétroactives qu'en faibles interférences. Ils concluent alors que la neurogenèse adulte fait donc bien partie des mécanismes qui contrôlent l'effet des interférences sur la mémoire et notamment en conditions de fortes interférences rétroactives (Winocur *et al.* 2012). La participation de nouveaux neurones dans la gestion des interférences semble donc être un moyen indispensable pour encoder des informations de façon efficace. Au niveau fonctionnel, les nouveaux neurones pourraient aider le GD à éviter l'effet néfaste des interférences lors de l'exposition à de nouveaux environnements en supposant que les anciens neurones sont plutôt stables et conservent alors un codage optimal nécessaire pour les environnements connus alors que les nouveaux neurones sont plus « plastiques », ce qui leur permettrait de s'adapter aux caractéristiques du nouvel environnement en limitant alors la survenue d'interférences (Kempermann & Wiskott, 2004 ; Wiskott *et al.* 2006). Toutefois, une étude a tout de même révélé que la suppression de la neurogenèse hippocampique par irradiation peut produire une facilitation « paradoxale » de l'apprentissage en labyrinthe radial dans des conditions d'interférences proactives élevées et lorsque le délai entre les essais augmente entre 30s et 50s au lieu de 1s durant l'entraînement (Saxe *et al.* 2007). Une des possibles explications serait que l'élimination de la neurogenèse adulte permette la réduction des

chevauchements entre les réseaux de neurones qui sont formés lors d'essais distincts, ce qui permettrait la réduction des effets des interférences.

d. Rôle de la neurogenèse adulte dans la séparation de patterns

Une des tâches primordiales d'un système de mémoire fonctionnel est de pouvoir encoder des informations très similaires sans qu'elles interfèrent entre elles ou avec les mémoires préalablement établies. Le GD a été proposé pour accomplir cette fonction en désaccordant des représentations contextuelles similaires à travers le processus computationnel de séparation de patterns. Cette fonction permet la formation de représentations distinctes pour des inputs très similaires (Marr, 1971), par exemple deux fêtes d'anniversaire seront mémorisées spécifiquement (Figure 16). Il a été proposé que la formation de ces représentations temporelles et spatiales distinctes (contextes, lieux, épisodes) soit une étape essentielle et nécessaire dans le traitement de l'information dans l'objectif d'éviter la formation d'interférences entre différentes mémoires (pour revue, Yassa & Stark, 2011).

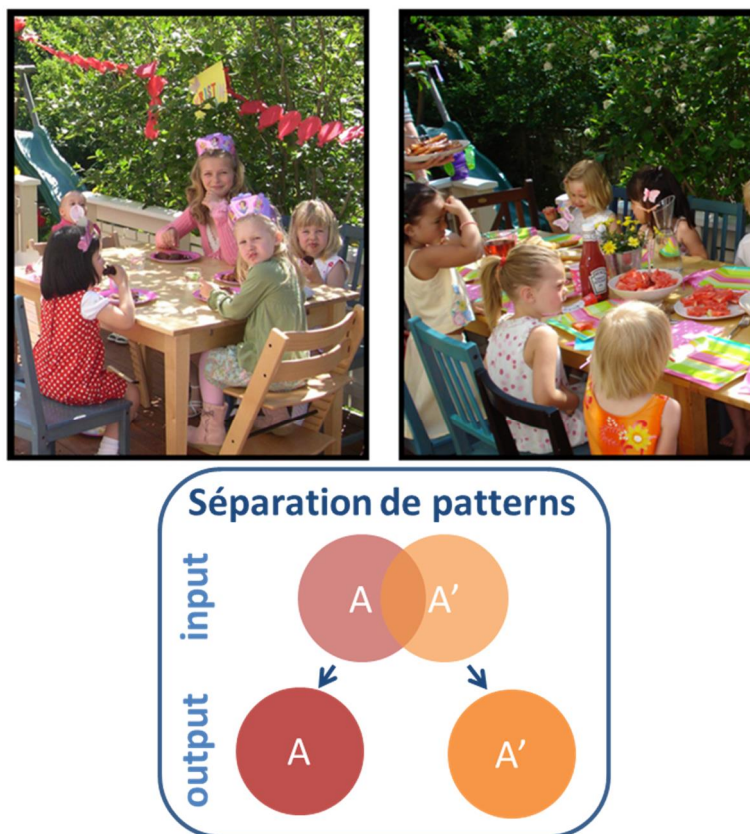


Figure 16 : La séparation de patterns permet de faire la distinction entre deux événements avec de nombreuses similitudes.

Un certain nombre d'expériences, comme deux fêtes d'anniversaire (événements A et A'), contiennent des éléments similaires : le même lieu, les mêmes expériences et les mêmes personnes. Le GD permettrait d'éviter le chevauchement des deux souvenirs en encodant les deux événements dans des réseaux partiellement distincts (output A et A'). D'après Leutgeb *et al.* 2007.

Depuis les travaux de lésions du GD par Gilbert *et al.* en 2001, on attribue un rôle du GD dans la fonction de séparation de patterns. Cette découverte a été validée par des études comportementales chez des souris et des rats, chez lesquels les lésions du GD altèrent la discrimination spatiale (Hunsaker & Kesner, 2008 ; McHugh *et al.* 2007 ; Morris *et al.* 2012). C'est donc logiquement que la question de l'implication de la neurogenèse hippocampique adulte dans ce type de fonction s'est posée.

La première étude ayant permis de montrer l'implication de la neurogenèse adulte dans la fonction de séparation de patterns est celle de Clelland *et al.* en 2009. Dans cette étude, les chercheurs ont aboli la neurogenèse chez des souris adultes et ont testé leurs performances en séparation de patterns spatiale dans une tâche de non appariement retardé (DNMP) dans un labyrinthe radial à 8 bras (Figure 17A). Deux configurations spatiales du labyrinthe sont présentées à l'animal, soit une configuration difficile (séparation 2 ; Figure 17B) où l'animal doit, pour récupérer une récompense, choisir entre deux bras du labyrinthe très proches spatialement, soit deux configurations plus faciles (séparation 3 et 4 ; Figure 17B) où le choix se fait entre deux bras du labyrinthe plus éloignés spatialement. Les performances des souris irradiées sont identiques à celles des souris contrôles non irradiées dans la configuration la plus simple du protocole. Toutefois les performances sont significativement altérées chez les souris irradiées dans la configuration la plus difficile, mettant en évidence un rôle des nouveaux neurones dans cette fonction (Figure 17C). Ce résultat a été confirmé dans une 2^e tâche spatiale où la souris doit discriminer, sur un écran, des images plus ou moins espacées dans l'espace.

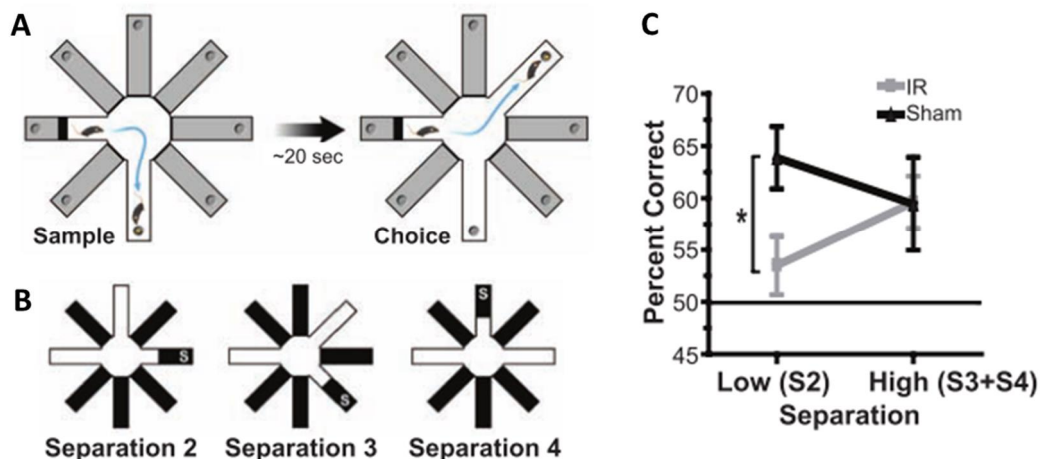


Figure 17 : Test de séparation de patterns en labyrinthe radial de Clelland *et al.* (2009).

(A) Chaque essai consiste en la réalisation d'une « sample phase » (à gauche) et d'une « choice phase » (droite). Durant la phase de choix, la souris ne doit pas retourner dans le bras précédemment visité durant la première étape. (B) La séparation de patterns a été testée en utilisant un protocole de DNMP en labyrinthe radial en variant la distance entre le premier bras présenté et le bras choisi dans un deuxième temps. S = bras de départ. (C) Pourcentage de réussite au cours de l'apprentissage. Les souris irradiées (IR) présentent des déficits dans la configuration S2 mais pas dans les configurations S3 et S4. La barre horizontale représente la chance (50%). Les barres représentent les erreurs standards à la moyenne. * $p < 0.05$. D'après Clelland *et al.* 2009.

Dans leur étude, Nakashiba *et al.* (2012) précisent que seules les jeunes cellules granulaires de 3 à 4 semaines sont nécessaires et suffisantes à la réalisation d'une tâche de séparation de patterns grâce à l'utilisation d'une souris triple transgénique DG-TeTX où les cellules granulaires matures peuvent être bloquées par la toxine tétanique (TeTX). Cependant, bien que l'implication des nouveaux neurones dans l'apprentissage ait été mise en évidence, il semblerait que ces derniers ne soient pas nécessaires lors du rappel. En effet, lors du rappel d'une tâche de séparation de patterns, il a été observé que ce dernier réactive préférentiellement la population neuronale du CA1 mais pas celle du GD, suggérant que le rappel ne réactiverait pas toutes les voies qui ont été activées durant l'apprentissage (Deng *et al.* 2013). D'autre part, une étude a également montré que la diminution spécifique de la prolifération cellulaire grâce à un modèle transgénique rat GFAP-TK, n'entraîne aucun déficit de séparation de patterns en labyrinthe radial ou dans une tâche de conditionnement de peur (Groves *et al.* 2013).

D'autre part, des expériences d'augmentation de la neurogenèse adulte ont également été réalisées : une autre étude sur des souris transgéniques dont la survie des nouveaux neurones est augmentée a montré une amélioration des performances mnésiques des animaux dans une tâche de discrimination contextuelle associée à un conditionnement de peur (Sahay *et al.* 2011), une tâche précédemment démontrée comme nécessitant la fonction de séparation de patterns (McHugh *et al.* 2007). Dans ce type de tâche, l'animal doit apprendre à discriminer deux contextes qui se ressemblent très fortement mais dont un seul des deux est associé à un renforcement négatif, le choc électrique. Tout comme pour la tâche de DNMP, l'implication des nouveaux neurones dans cette tâche a été mise en évidence, puisqu'une corrélation positive entre le taux de neurogenèse et les performances est observée (Sahay *et al.* 2011). De même, l'augmentation du taux de neurogenèse adulte via l'exercice physique volontaire en roue d'activité, entraîne une amélioration des performances des animaux en séparation de patterns en version spatiale chez des jeunes souris âgés de 3 mois mais, cependant, pas chez des souris plus âgées (22 mois, Creer *et al.* 2010).

En conclusion, bien qu'il existe quelques divergences, plusieurs d'études indiquent que la neurogenèse hippocampique adulte est fortement impliquée dans la réalisation de tâches nécessitant de fortes capacités de séparation de patterns. Ainsi, il est possible que l'une des principales fonctions des nouveaux neurones soit de coder et de séparer des événements spatiaux les uns des autres en garantissant une réduction des interférences spatiales susceptibles de perturber le codage d'événements différents (Wiscott *et al.* 2006).

e. Neurogenèse adulte et oubli

Le rôle de la neurogenèse adulte dans les processus mnésiques est désormais clairement reconnu. Cependant, contre toute attente, l'hypothèse que l'ajout de nouveaux neurones dans les circuits existants pourrait également être à l'origine de l'oubli a émergé (Feng *et al.* 2001 ; Weisz &

Argibay, 2012). L'oubli se définit par l'incapacité à accéder à l'information qui a été encodée avec succès (Wixted, 2007). Comme cet ajout continu de nouveaux neurones modifie les circuits de l'hippocampe, il est possible que la neurogenèse post-natale et adulte entraîne une dégradation des souvenirs établis (Feng *et al.* 2001 ; Josselyn & Frankland, 2012).

Des études en piscine de Morris, de discrimination ou d'évitement passif ont mis en évidence que la neurogenèse est nécessaire pour la flexibilité cognitive. Par exemple, lors du test de flexibilité en piscine de Morris, « où est maintenant localisée la plate-forme ? » pourrait consister à « oublier » l'ancienne position. Conformément à l'hypothèse de « memory clearance », après consolidation dans le cortex, la présence de forts taux de neurogenèse dans le GD pourrait favoriser l'effacement des associations précédemment apprises grâce à la capacité des nouveaux neurones à inhiber les neurones matures, ce qui permettrait à l'hippocampe d'être continuellement disponible pour créer de nouvelles mémoires (Anacker & Hen, 2017 ; Figure 18).

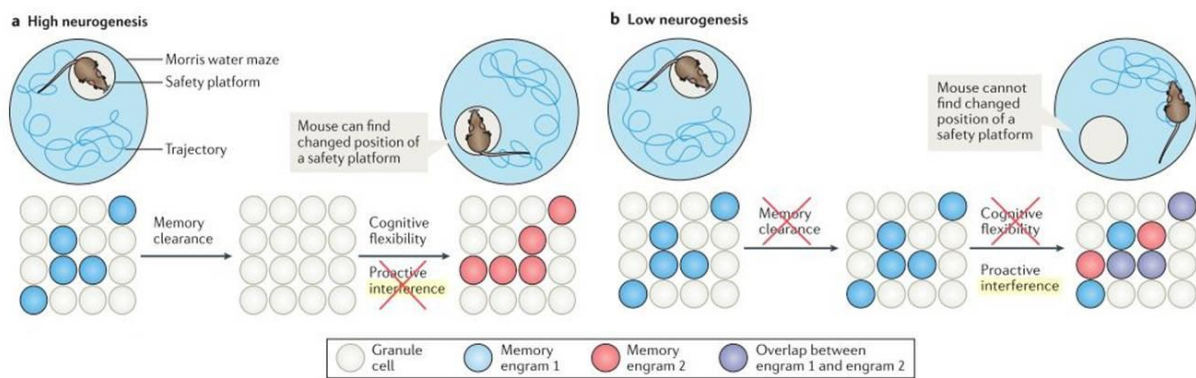


Figure 18 : Un fort taux de neurogenèse adulte facilite la flexibilité cognitive en facilitant la formation de nouvelles mémoires distinctes.

a) Avec un taux de neurogenèse élevé, la partie hippocampique des engrammes (traces biologiques de la mémoire) peut être éliminée plus rapidement, laissant le support de la trace à d'autres structures. Par exemple, un effacement de certaines mémoires permettrait de réduire les interférences proactives entre l'encodage du premier emplacement de la plate-forme et le deuxième. b) Avec un faible taux de neurogenèse, l'engramme correspondant au premier emplacement de la plate-forme ne va pas être suffisamment éliminé. En conséquence, l'engramme correspondant au deuxième emplacement de la plate-forme va être encodé par-dessus le premier et ne va ainsi pas être encodé par des ensembles neuronaux suffisamment distincts. Cela peut augmenter les interférences proactives, réduire la flexibilité cognitive et nuire à la capacité de trouver le nouvel emplacement de la plate-forme. D'après Anacker & Hen, 2017.

D'autres auteurs se sont intéressés à l'amnésie infantile, phénomène d'oubli chez les jeunes enfants jusqu'à l'âge d'environ trois ans (Josselyn & Frankland, 2012). A ce jour, il semble que l'amnésie infantile concerne principalement la mémoire épisodique (Alberini & Travaglia, 2017). C'est durant les premières années de notre vie que la neurogenèse est la plus active suggérant que l'ajout important de nouveaux neurones, modifiant sans cesse les réseaux de l'hippocampe, ne permettrait pas la mise en mémoire efficace des souvenirs. Akers *et al.* (2014) ont testé cette hypothèse : des souris adulte (2 mois) et des souriceaux (17 jours) ont été exposés à un

test de peur conditionnée en version contextuelle. Lors du test de rappel, alors que les souris adultes ont conservé une bonne mémoire tout au long de la durée expérimentale (jusqu'à 6 semaines), les souriceaux n'ont conservé ce souvenir qu'une semaine. Les chercheurs ont par la suite réalisé un 2^e test : ils ont augmenté la neurogenèse des souris adultes en leur faisant pratiquer une activité physique, et diminué la neurogenèse des souriceaux en administrant un inhibiteur pharmacologique. Ainsi, de manière remarquable, l'augmentation de la neurogenèse après l'apprentissage a accéléré l'oubli chez les souris adultes, alors que la réduction de la neurogenèse après l'apprentissage a permis aux souriceaux d'améliorer leur mémoire. Enfin, pour déterminer si la corrélation entre la neurogenèse et l'oubli peut être généralisée, les auteurs ont testé la rétention de la mémoire chez les cobayes et les dègues du Chili, deux espèces ayant des périodes de gestation prolongées et des niveaux inférieurs de neurogenèse post-natale par rapport aux souris. Ils ont constaté que les juvéniles de ces deux espèces présentent de très bons niveaux de rétention. En revanche, si les taux de neurogenèse sont augmentés par injections de mémantine ou bien par l'exercice physique, les performances mnésiques des petits deviennent alors très mauvaises, montrant que l'augmentation du nombre de nouveaux neurones est délétère pour l'intégration en mémoire des nouvelles informations. Dans l'ensemble, les résultats ont clairement démontré qu'il existe une corrélation substantielle entre la neurogenèse et l'oubli.

L'ensemble des études sur l'amnésie infantile soutient l'idée qu'un trop fort taux de neurogenèse ne favorise pas toujours la mémorisation à long terme car l'ajout de nouveaux neurones imposera toujours un coût pour la stabilité des réseaux. Ceci indique donc que le niveau de neurogenèse doit se trouver dans une fenêtre optimale à l'amélioration de la résolution d'un souvenir sans pour autant apporter de l'instabilité au système neuronal pouvant entraîner des interférences et perturber la mémoire. L'encodage de nouvelles informations nécessite juste la bonne quantité de neurogenèse dans le GD : ni trop peu ni trop.

Pour résumer, le rôle de la neurogenèse adulte dans les fonctions cognitives continue de se préciser mais reste parfois sujet à controverses, tout comme les mécanismes moléculaires qui permettent à ces nouveaux neurones de participer à la mise en mémoire d'une information. L'ensemble de ces données montre tout de même que la neurogenèse hippocampique adulte a un rôle reconnu dans la mise en mémoire d'informations dépendantes de l'hippocampe. Même si le lien entre le rôle de la neurogenèse dans la mémoire et celui dans la séparation de patterns n'est pas encore complètement élucidé, il semble évident que la formation, la sélection et le recrutement des nouveaux neurones hippocampiques durant leur période critique de maturation sont impliqués dans l'encodage et la consolidation d'informations impliquant l'hippocampe.

D'autre part, de nombreux modèles animaux de maladies neuropsychiatriques telles que la dépression, la maladie d'Alzheimer ou encore la DI mettent désormais en avant des altérations de cette neurogenèse hippocampique adulte. Ces potentielles altérations pourraient contribuer aux déficits cognitifs observés dans ces pathologies.

III. Modèles murins d'étude de la DI

Ce chapitre est consacré à la présentation des trois pathologies étudiées au cours de mon projet de thèse et des gènes impliqués. Pour chacune d'entre elles, un point bibliographique concernant la structure, l'expression et la fonction des 3 protéines sera effectué. Les premiers résultats obtenus sur la caractérisation des modèles murins correspondants seront également présentés.

3.1. Le syndrome de Coffin-Lowry

Le syndrome de Coffin-Lowry (CLS) a été rapporté initialement et indépendamment par Coffin *et al.* en 1966 et Lowry *et al.* en 1971. C'est une pathologie rare avec une incidence de 1/50000 à 1/100000 patients (Document ORPHANET 2011 ORPHA:192).

Le CLS se caractérise par des malformations physiques et des problèmes neurologiques (Hanauer & Young, 2002). Une dysmorphie faciale commune aux patients (hypertélorisme, un front proéminent et des lèvres épaisses) et des anomalies squelettiques (formation tardive d'os, scoliose/cyphose...) sont les principales caractéristiques morphologiques du CLS (Pereira *et al.* 2010). Des anomalies plus rares comme des malformations du cœur peuvent également être observées (Pereira *et al.* 2010). Dès les premières années, un retard de croissance est observé chez les patients (Pereira *et al.* 2010). L'âge moyen auquel les enfants touchés font leurs premiers pas est généralement étendu à trois ans (Zenjou *et al.* 2004). Ce syndrome entraîne également une DI de gravité variable, les QI rapportés allant de 15 à 60. Cependant, la majorité des patients masculins a une DI profonde (Pereira *et al.* 2010) alors que les filles ne sont que légèrement atteintes. Les troubles cognitifs et du langage sont importants mais de gravité variable. D'autres manifestations plus rares incluent des crises d'épilepsie et une surdité neurosensorielle qui peut être profonde (30%). Chez quelques rares cas de patientes, certains problèmes tels que la dépression, un comportement psychotique et la schizophrénie ont été rapportés (Pereira *et al.* 2010).

Le pronostic vital du CLS est mauvais et dépend de la sévérité de la maladie (Document ORPHANET 2011 ORPHA:192). A ce jour il n'existe pas de traitement spécifique pour ce syndrome, seuls des suivis cardiologiques et des traitements symptomatiques ciblant certains signes cliniques sont mis en place afin d'améliorer le quotidien des personnes atteintes (kinésithérapie, psychomotricité ou encore orthophonie pour travailler la motricité de la bouche et de la langue).

Depuis 1996, il est connu que cette pathologie rare est due à des mutations du gène *rsk2* (ou *RPS6KA3*) localisé sur le chromosome X en position Xp22.2-p22.1 et codant la protéine RSK2, une

sérine/thréonine kinase (Trivier *et al.* 1996). Actuellement, plus de 140 mutations distinctes du gène *rsk2* ont été mises en évidence dans le CLS (Abidi *et al.* 1999 ; Pereira *et al.* 2010). Parmi ces mutations, 68% sont des mutations *de novo* (Jacquot *et al.* 1998). Ces mutations sont d'une très grande hétérogénéité : faux sens (30%), non-sens (15%), erreurs d'épissage (20%), courtes délétions/insertions (30%) et grandes délétions/insertions (3 cas) (Delaunoy *et al.* 2006), et entraînent une réduction ou une perte de l'activité de la kinase RSK2 (Pereira *et al.* 2010). Aucune corrélation entre les signes cliniques observés et l'expression d'une mutation particulière n'a pu être mise en évidence (Zeniou *et al.* 2002).

a. Structure des protéines RSK

La famille des protéines RSKs comprend 4 isoformes : RSK 1, 2, 3, 4. Les protéines RSKs sont à 75-80% identiques entre elles et diffèrent surtout au niveau de leurs parties N-terminale et C-terminale. Elles sont composées d'environ 800 acides aminés et sont caractérisées par la présence de deux domaines fonctionnels kinases distincts (Jones *et al.* 1988) : le domaine C-terminal (CTKD) et le domaine N-terminal (NTKD) liés ensemble grâce à une région régulatrice « linker » (Figure 19). La présence de ces deux domaines kinases au sein de la même protéine est peu courante et confère aux protéines RSKs des caractéristiques de deux familles de protéines kinases distinctes : la famille des CAMK (calcium/calmodulin-dependent kinase) pour le CTKD et la famille des AGC (cAMP-dependent-protein kinase/protein kinase G/protein kinase C) pour le NTKD. En plus de ces deux domaines, les protéines possèdent également un domaine D permettant de lier ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinase1 and 2 ; Fisher & Blenis, 1996 ; Figure 19).



Figure 19 : Schéma représentant la structure générale des protéines RSKs.

Les protéines RSKs sont caractérisées par la présence de deux domaines fonctionnels, le domaine kinase N-terminal (NTKD) et le domaine kinase C-terminal (CTKD), qui sont connectés par une région linker. La région C-terminale contient un domaine de liaison à ERK1/2 appelé le domaine D (en vert). Les RSKs présentent six sites de phosphorylation (en orange) permettant l'activation de la protéine. D'après Anjum & Blenis, 2008.

Au niveau cellulaire, RSK2 appartient à la voie de signalisation des Ras/MAP Kinases (Figure 19) où elle est directement activée par ERK1/2 en réponse à des facteurs de croissance, plusieurs hormones, des neuromédiateurs, des chemokines et autres stimuli (Chen *et al.* 1992 ; Frödin & Gammeltoft, 1999). Plus précisément, ERK1/2 va se lier sur le domaine D et va par la suite phosphoryler la thréonine 573 de la région CTKD, ainsi que les sites de phosphorylation (sérine et

thréonine) situées dans la région linker (Figure 19). La kinase PDK1 (sérine/thréonine kinase 3-Phosphoinositide-Dependant protein Kinase 1) va alors se fixer sur un des sites phosphorylés de la région linker, et activer la région NTKD par phosphorylation, entraînant ainsi l'activation de la protéine RSK2 (Jensen *et al.* 1999 ; Frödin *et al.* 2000 ; pour revue, Romeo *et al.* 2012).

Une fois activée, RSK2 phosphoryle de nombreuses cibles cytosoliques telles que GSK3 β (Glycogen Synthase Kinase 3 Beta), CBP, ou BAD (BCL2-Associated Death promoter). Une grande proportion de RSK2 activée va également être transloquée dans le noyau (pour revue, Romeo *et al.* 2012) où elle va phosphoryler de nombreuses cibles nucléaires telles qu'ATF4 (Activating transcription factor 4), CREB, p53, PLD1 et l'histone H3. Sa translocation entraîne également l'induction de l'expression de gènes immédiats précoces tels que *zif268* et *c-fos* (Zeniou-Meyer *et al.* 2008 ; pour revue, Romeo *et al.* 2012, Morice *et al.* 2013 ; Figure 20).

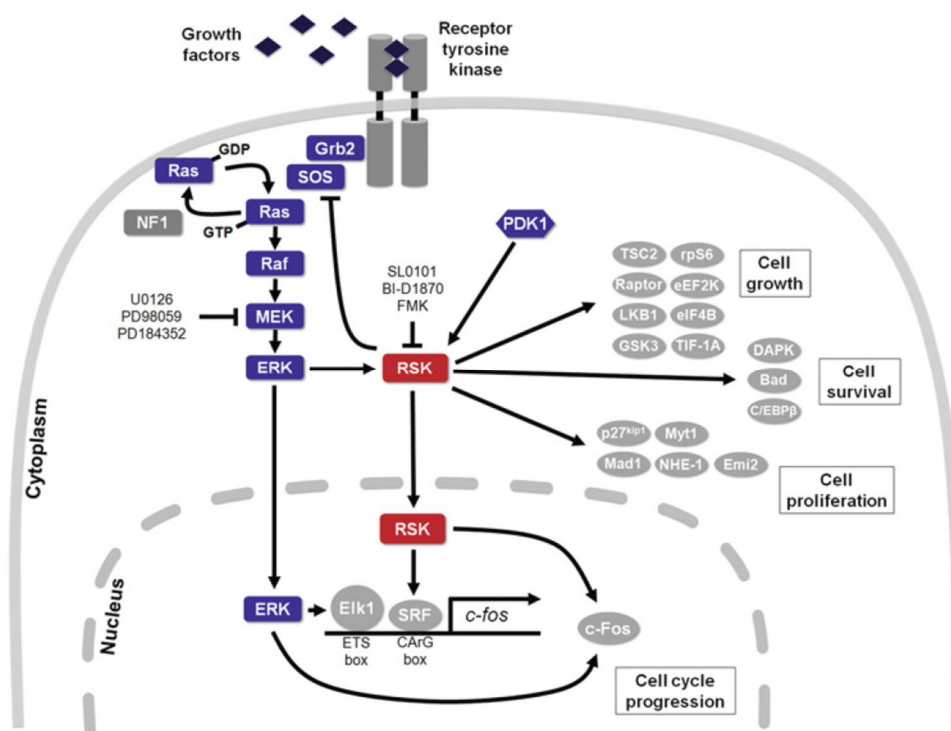


Figure 20 : Exemple de cibles cytotogiques et nucléaires des protéines RSKs.
Pour revue, Romeo *et al.* 2012

b. Expression tissulaire

Au cours du développement humain, l'ARNm de RSK2 est détecté majoritairement entre 9 et 13 semaines. Son expression est notamment observée dans le télencéphale antérieur et postérieur (à l'origine de l'hippocampe ; Guimiot *et al.* 2004). A l'âge adulte, son expression est retrouvée dans les muscles squelettiques, le cœur, le pancréas et le cerveau, notamment fortement dans l'hippocampe, le cervelet mais aussi dans le lobe occipital et le lobe frontal (Zeniou *et al.* 2002 ; Kohn *et al.* 2003).

Au stade embryonnaire murin, l'expression de la protéine RSK2 a été observée dans le cortex (Dugani *et al.* 2010 ; Ammar *et al.* 2013), le cervelet et l'hippocampe (Zeniou *et al.* 2002). Chez la souris adulte, l'ARNm de RSK2 est plus faiblement exprimé qu'au stade embryonnaire mais son expression demeure tout de même plus élevée dans l'hippocampe, le néocortex, le cortex piriforme et le cervelet et reste faible dans les autres structures cérébrales (Zeniou *et al.* 2002). L'expression de RSK2 a également été observée dans l'habenula (Darcq *et al.* 2011).

c. Rôle de la protéine RSK2

L'étude de la protéine RSK2 *in vitro* et *in vivo* a permis de mettre en avant une implication importante de la protéine dans de nombreuses fonctions.

Tout d'abord, plusieurs études ont montré un rôle direct des RSKs et en particulier de RSK2 dans le cycle cellulaire et la prolifération cellulaire en régulant, notamment, des médiateurs du cycle cellulaire (pour revue, voir Romeo *et al.* 2012). Par exemple, des études *in vitro* montrent l'implication de RSK2 dans la progression de la phase G1 du cycle cellulaire, via le contrôle de CDK2 (Fujita *et al.* 2003) ou bien, dans la transition de la phase G2-M via la Myt1 kinase (Palmer *et al.* 1998). RSK2 régule également l'avancement du cycle de par son action sur des substrats tels que l'histone H3 (Sassone-Corsi *et al.* 1999 ; Cho *et al.* 2005) et la cycline dépendante kinase cdc25C (Wang *et al.* 2010). Récemment, un rôle de RSK2 durant la mitose a été observé *in vitro*. En effet, l'absence de RSK2 affecte le nombre de microtubules et la distribution des fuseaux mitotiques ce qui entraîne un retard dans la progression de la mitose (Park *et al.* 2016). Enfin, des traitements avec des inhibiteurs de RSK2 sont capables d'arrêter la prolifération cellulaire de cellules humaines tumorales en culture (Tan *et al.* 1999). Toutefois, RSK2 peut également stopper la prolifération cellulaire en inhibant la protéine GSK3 β qui compte parmi ses fonctions la phosphorylation de facteurs de transcription impliqués dans la prolifération (Sutherland *et al.* 1993 ; Jacobs *et al.* 2012).

D'autres études ont mis en évidence que la protéine RSK2 est impliquée dans les mécanismes de survie cellulaire. En effet, RSK2 inhibe l'action de ses cibles pro-apoptotiques, telle que BAD (Tan *et al.* 1999 ; Bonni *et al.* 1999) et DAPK (Death Associated Protein Kinase), en les phosphorylant (Anjum *et al.* 2005). L'absence de RSK2 conduit à une diminution de l'expression du produit du gène *c-fos* et du facteur de transcription CREB, tous deux impliqués dans les processus de survie cellulaire, dans les fibroblastes des patients CLS ou dans les ostéoblastes (De Cesare *et al.* 1998 ; David *et al.* 2005). De plus, la phosphorylation du facteur de transcription p53 par RSK2 permet le déclenchement de la réparation de l'ADN ou l'apoptose en cas de stress cellulaire (Cho *et al.* 2005). Toutefois, malgré ses cibles pro-apoptotiques, Fischer *et al.* (2009) ont montré que RSK2 n'a aucune influence sur la survie des motoneurones.

La protéine RSK2 est également impliquée dans la différenciation cellulaire. Par exemple, RSK2 active ATF4, un facteur de transcription impliqué dans la différenciation et la fonction des ostéoblastes, probablement à l'origine des problèmes osseux observés chez les patients atteints du CLS (Yang *et al.* 2004). De même, au cours de la neurogenèse embryonnaire, Dugani *et al.* (2010) ont mis en évidence le rôle de RSK2 dans la différenciation des précurseurs corticaux en neurones.

Il a également été mis en évidence une implication de RSK2 dans la croissance neuritique des cellules PC12, des neurones corticaux embryonnaires, ainsi que dans la croissance axonale des motoneurones (Wong *et al.* 1996 ; Fischer *et al.* 2009 ; Ammar *et al.* 2013).

Enfin, parmi toutes ses cibles, RSK2 s'associe également à des facteurs de transcription indispensables pour la plasticité synaptique et la formation de la mémoire, tels que CBP, un coactivateur de transcription possédant une activité histone acétylase. Grâce à cette association, le complexe CBP-RSK2 peut ainsi réguler l'expression de gènes (tel que *c-fos*) en remodelant la structure de la chromatine (Merienne *et al.* 2001) et en phosphorylant des facteurs de transcription tels que CREB (De Cesare *et al.* 1998).

d. Modèle murin *Rsk2*-KO

Afin d'étudier le rôle de la protéine RSK2, deux modèles souris *Rsk2*-KO, de construction génétique différente, correspondant à l'absence de la protéine RSK2, ont été générés. Le premier modèle, créé en 2001 par Dufresne *et al.* présente d'importants problèmes de coordination motrice mais le second, créé en 2004 par Yang *et al.* ne présente pas de telles altérations. C'est le deuxième modèle de souris généré qui a été utilisé au cours de ma thèse.

Ce modèle murin *Rsk2*-KO présente une diminution du poids, de la taille et de la masse osseuse (Yang *et al.* 2004). Cependant, ces souris ne présentent pas de déficit moteur, ni de déficit de locomotion et d'exploration en open-field mais elles demeurent néanmoins plus actives dans le test d'émergence (Poirier *et al.* 2007). Concernant les tests d'anxiété, ces souris ne montrent aucun trouble dans les tâches des labyrinthes en croix ou en O surélevés (Poirier *et al.* 2007). En conditions différentes, lorsque les souris *Rsk2*-KO sont placées dans les cages d'hébergement IntelliCages™, un travail récent a permis de révéler qu'elles ne présentent pas de comportement dépressif et une anxiété réduite (Fischer *et al.* 2017). Concernant les tests d'apprentissage et de mémoire, plusieurs tests ont été réalisés. Leur mémoire associative (tâche d'aversion gustative) et leur mémoire de reconnaissance sont intactes. Un léger déficit en mémoire spatiale de travail en labyrinthe radial a été observé (Poirier *et al.* 2007). Toutefois, aucun déficit de mémoire de travail spatial n'a été observé lors de l'étude de Fischer *et al.* (2017) où les souris étaient placées en IntelliCages™. Leur déficit le plus important a été révélé dans le test spatial en piscine de Morris où elles présentent un retard d'acquisition en mémoire de référence spatiale durant les 7 premiers jours d'apprentissage.

Toutefois, ce retard est compensé au bout de 11 jours quand les performances des souris KO rejoignent celles des souris WT. Aucun déficit de mémoire n'est observé 24h plus tard, en revanche les souris montrent un déficit de mémoire 9 jours après la fin de l'apprentissage (Poirier *et al.* 2007). Lors de la réalisation d'un « reversal », aucun déficit de flexibilité n'est observé (Poirier *et al.* 2007). La réalisation d'autres tâches cognitives a permis de compléter la caractérisation comportementale des souris *Rsk2*-KO. Par exemple, chez un modèle de souris dépourvue de la protéine RSK2 dans l'habenula, une autre structure impliquée dans la cognition (pour revue, Baker *et al.* 2016), des déficits dans une tâche de conditionnement au contexte ont été soulignés (Darcq *et al.* 2011).

Deux autres études réalisées au laboratoire ont également montré que la présence de RSK2 n'est pas nécessaire pour la consolidation dans certaines tâches, mais l'est pour la reconsolidation. En effet, dans une tâche de reconnaissance d'objets en version spatiale, les souris *Rsk2*-KO présentent un déficit de mémoire après la phase de réexposition par rapport aux souris WT (Davis *et al.* 2010). Des résultats similaires ont été observés dans une tâche de conditionnement de peur au contexte avec une phase de réactivation (Morice *et al.* 2013). Cette même étude rapporte également un déficit de mémoire dans une tâche de conditionnement de peur avec un protocole de trace qui implique particulièrement l'hippocampe. Enfin, récemment, il a été montré chez ces mêmes souris, un déficit de séparation de patterns testée en labyrinthe radial (Thèse S. Lunion 2014).

Compte tenu des déficits comportementaux observés dans différentes tâches dépendantes de l'hippocampe, notre équipe s'est intéressée plus précisément au fonctionnement de l'hippocampe. Des études électrophysiologiques ont été réalisées *in vivo* sur la souris *Rsk2*-KO. Les résultats *in vivo* indiquent une transmission synaptique altérée, une diminution de l'excitabilité du réseau mais une PLT normale dans le GD (Morice *et al.* 2013). Au niveau synaptique, il a également été observé *in vitro* une réduction de la conductance des récepteurs AMPA et NMDA (N-méthyl-d-aspartate) avec une surexpression du récepteur GluR2 (Glutamate receptor 2 ; Mehmood *et al.* 2011, 2013). Au niveau morphologique, une analyse en microscopie électronique a montré que les épines dendritiques des souris *Rsk2*-KO présentent un élargissement du cou des épines et une augmentation de la taille des densités post-synaptiques ce qui pourrait contribuer à l'altération de la transmission synaptique observée (Morice *et al.* 2013). Etant donné que CREB et *zif268* sont des cibles de RSK2, l'équipe s'est également intéressée aux conséquences de l'absence de RSK2 en condition basale ou après induction de la PLT. Ainsi, chez le modèle de souris *Rsk2*-KO, après induction de la PLT, une réduction de la phosphorylation de CREB et par conséquent de l'expression du facteur de transcription *Zif268* ont été révélés ce qui pourrait contribuer aux déficits cognitifs observés (Morice *et al.* 2013 ; Mehmood *et al.* 2011, 2013).

3.2. La déficience intellectuelle non syndromique liée à PAK3

Comme mentionné précédemment, la mise en place de la cartographie des gènes durant les années 1990 a permis la découverte de nombreux gènes liés à l’X impliqués dans les DI. Parmi ces gènes, *pak3*, a été mis en évidence par une étude clinique menée sur une famille dont 4 de ces membres étaient atteints de DI non syndromique (Allen *et al.* 1998). Ce gène, situé sur le chromosome X en position Xq23, code la sérine/thréonine kinase PAK3. En 2000, Bienvenu *et al.* confirment l’implication de *pak3* dans une forme de DI modérée à sévère sans autre signe clinique en mettant en évidence une nouvelle mutation : la mutation R67C. **Mon étude porte précisément sur cette mutation R67C du gène *pak3*.**

Les années suivantes, plusieurs autres mutations de *pak3* ont été signalées chez des patients souffrant de DI. Dans certains cas, ces mutations sont associées à des phénotypes plus complexes comme des anomalies du développement du cerveau (agénésie du corps calleux, hypoplasie du cervelet ; Peippo *et al.* 2007 ; Rejeb *et al.* 2008 ; Magini *et al.* 2014), des épilepsies (Tzschach *et al.* 2015), des déficits cognitifs et moteurs (faible développement de la marche et du langage) et des anomalies dermatologiques (ichtyose ; Magini *et al.* 2014). Récemment, deux nouvelles mutations du gène *pak3* (dont une mutation *de novo*) ont été associées à une forme de paralysie cérébrale (McMichael *et al.* 2015) et une macrocéphalie (Hertecant *et al.* 2017). Les signes cliniques associés aux différentes mutations de PAK3 ont été synthétisés dans le tableau 1.

Mutations	Phénotype associé	Référence
R419X	- DI légère à modérée - 1 cas de microcéphalie	Allen <i>et al.</i> 1998
R67C	- DI modérée à sévère	Bienvenu <i>et al.</i> 2000
A365E	- DI légère	Gedeon <i>et al.</i> 2003
W446S	- DI légère à modérée, -microcéphalie -défauts d'apprentissage et d'élocution -quelques désordres psychiatriques (défauts de l'attention, agitation, anxiété, agressivité)	Peippo <i>et al.</i> 2007
G92V fsX35	- DI modérée -des défauts d'élocution, -quelques signes physiques (une petite tête ou microcéphalie, un petit nez, une grande bouche avec des lèvres étalées) -désordres psychiatriques	Rejeb <i>et al.</i> 2008
K389N	- DI sévère -anomalies structurales du cerveau (agénésie du corps calleux, hypoplasie du cervelet) -déficits cognitifs et moteurs (faible développement de la marche et du langage) -anomalies dermatologiques (ichtyose) - une mortalité précoce (6-8 ans)	Magini <i>et al.</i> 2014
R493C	- paralysie cérébrale	McMichael <i>et al.</i> 2015
S527G	-DI légère - épilepsie	Tzschach <i>et al.</i> 2015
Y427H (<i>de novo</i>)	- DI - macrocéphalie	Hertecant <i>et al.</i> 2017

Tableau 1 : Signes cliniques observés chez l'Homme selon les différentes mutations du gène *pak3* connues.

a. Structure de la protéine PAK3

La protéine PAK3, avec deux autres protéines PAK1 et PAK2, appartient à la famille des p21-activated kinases (PAK) du groupe 1, mais seule la protéine PAK3 est codée par un gène localisé sur le chromosome X et a été associée à la DI. Au niveau structural, ces protéines sont formées d'environ 500 acides aminés. Elles sont caractérisées par la présence d'un domaine kinase en position C-terminale et d'une région régulatrice en N-terminale. Une caractéristique du groupe 1 des protéines PAK est de contenir dans sa région régulatrice N-terminale, un domaine auto-inhibiteur (AID) qui se chevauche partiellement avec un domaine de liaison aux GTPases (PBD) et qui peut inhiber le domaine kinase situé à l'extrémité C-terminale (Figure 21).

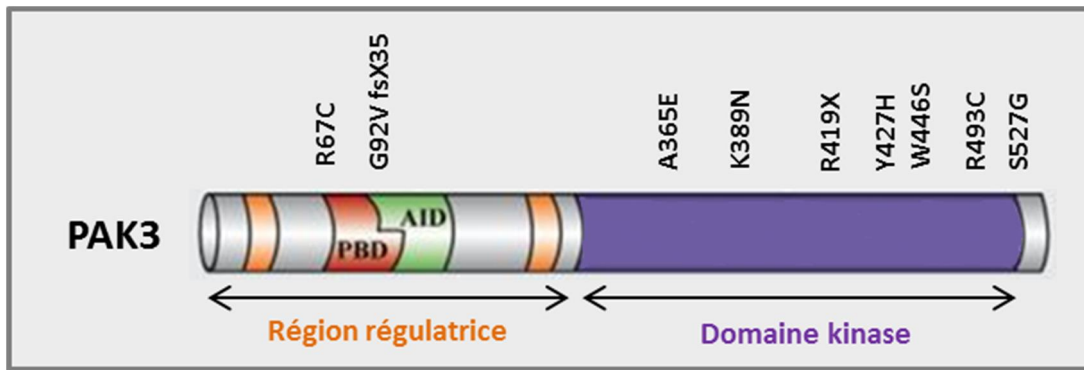


Figure 21 : Schéma de la structure de la protéine PAK3 et localisation des mutations identifiées actuellement et conduisant à une DI.

PBD: p21-binding domain ; AID: auto-inhibitory domain. D'après Kreis & Barnier, 2009.

Comme mentionné précédemment, 9 mutations de *pak3* ont été identifiées comme étant impliquées dans des DI (Tableau 1 ; Figure 21). Chaque mutation, localisée à différents endroits du gène, affecte en conséquence des domaines différents de la protéine. Au niveau fonctionnel, la liaison des Rho-GTPases (liées au GTP) au domaine PBD va permettre l'activation des kinases PAK. La kinase PAK3 est particulièrement activée par la Rho-GTPase Cdc42 (Kreis *et al.* 2007).

Notre mutation d'intérêt, la mutation R67C, située dans la région régulatrice, correspond à une substitution de la cystéine par l'arginine en position 67 (Bienvenu *et al.* 2000). Cette mutation faux-sens est localisée juste en amont du domaine de liaison aux Rho-GTPases (PBD, Figure 21). La kinase présente alors une activité kinase fonctionnelle mais toutefois une diminution de l'interaction de PAK3 avec Cdc42 est observée, entraînant une diminution de l'activation de PAK3 par cette GTPase (Kreis *et al.* 2007).

b. Expression tissulaire de PAK3

L'expression tissulaire de PAK3 a été étudiée uniquement chez les rongeurs. Ces études ont mis en évidence que la protéine PAK3 est observée essentiellement dans le cerveau (Manser *et al.* 1995 ; Rousseau *et al.* 2003) où elle est exprimée dès le développement embryonnaire (Kreis *et al.* 2007). Chez l'adulte, PAK3 est exprimée dans plusieurs structures cérébrales telles que le GD de l'hippocampe, le cortex, les bulbes olfactifs et l'amygdale (Manser *et al.* 1995 ; Allen *et al.* 1998, Mcphie *et al.* 2003 ; Boda *et al.* 2006). Dans le reste de l'organisme, PAK3 est exprimée en plus faible quantité dans le cœur, les reins, le foie, les poumons, la rate, les testicules et le thymus (Teo *et al.* 1995).

Au niveau cellulaire, PAK3 est majoritairement exprimée dans les neurones et notamment dans les neurones post-mitotiques du GD de l'hippocampe et de certaines couches corticales (II/III et IV ; Kreis *et al.* 2008). Dans les neurones, PAK3 est localisée au niveau des corps cellulaires, des dendrites et en particulier dans les épines dendritiques (Hayashi *et al.* 2004 ; Ong *et al.* 2002 ; Boda

et al. 2004). L'expression de PAK3 est quasiment nulle dans des astrocytes (Kreis *et al.* 2008). Cependant, une étude récente a montré une très forte expression de PAK3 dans les précurseurs des oligodendrocytes. Cette expression diminue par la suite dans les oligodendrocytes matures, en accord avec les études précédentes (Maglorius Renkilaraj *et al.* 2017). A ce jour, aucune étude n'a montré l'expression de PAK3 dans la microglie.

c. Rôle de la protéine PAK3

Les protéines PAK sont connues pour activer plusieurs voies de transduction, incluant la voie de la LIMK (LIM kinase) et la voie des MAPK régulant respectivement le cytosquelette d'actine et l'expression des gènes (Beeser & Chernoff, 2005 ; Pavlowsky *et al.* 2012 ; Figure 22).

Comme mentionné précédemment, les kinases PAKs sont les principaux effecteurs des Rho-GTPases, éléments importants contrôlant, entre autres, la polymérisation / dépolymérisation du cytosquelette d'actine. En effet, l'un des principaux effecteurs des kinases PAKs est la LIM kinase 1 (LIMK1) impliquée dans le remodelage du cytosquelette. Une fois activée, LIMK1 peut alors inhiber la cofiline en la phosphorylant (Yang *et al.* 1998), ce qui empêche la dépolymérisation des filaments d'actine (Arber *et al.* 1998 ; Edwards *et al.* 1999). Ainsi, la voie de signalisation Rho-GTPases/PAK participe à la formation et à la stabilisation du cytosquelette d'actine au sein de structures comme les lamellipodes ou les filopodes.

Ce rôle de régulateur au niveau du cytosquelette intervient également lors de la migration cellulaire, notamment au cours du développement, ainsi que dans le trafic membranaire (pour revue, Bokoch, 2003). En effet, *in vitro*, il a été mis en évidence que l'inhibition de PAK3 au cours de la migration inhibe la croissance de l'axone et des dendrites et favorise alors la migration tangentielle des interneurons immatures (Cobos *et al.* 2007).

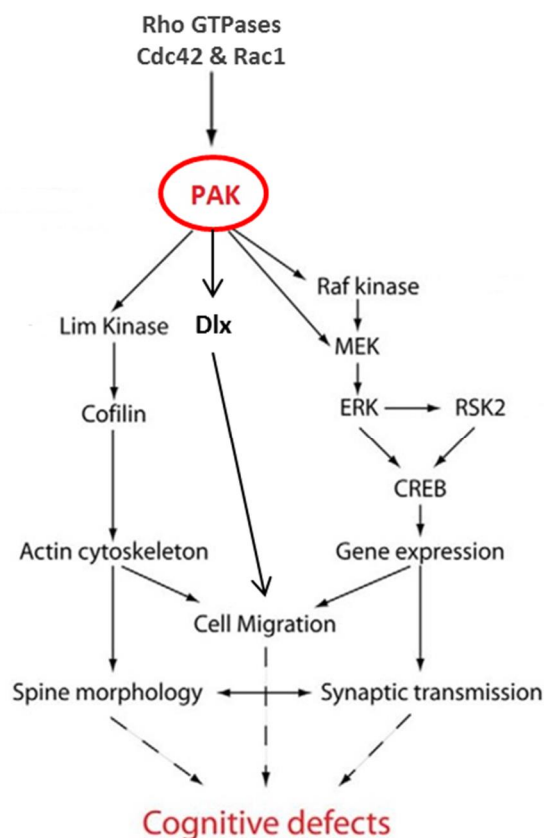


Figure 22 : Voies de signalisation des protéines PAK impliquées dans la plasticité synaptique et les déficits cognitifs.

Les protéines PAKs régulent le cytosquelette d'actine et l'expression des gènes en agissant sur des substrats directs ou indirects tels que les Lim Kinase, Raf Kinase ou MEK (lignes grises). D'après la revue, Kreis & Barnier, 2009.

Une étude *in vitro* à partir d'embryons de xénope, a montré que PAK3 joue un rôle crucial dans le contrôle de la sortie du cycle cellulaire. En effet, sa surexpression entraîne un arrêt prématuré du cycle cellulaire, tandis que son absence entraîne une augmentation de la prolifération (Souopgui *et al.* 2002). PAK3 serait également impliquée dans la différenciation. En effet, au cours du développement, l'absence de PAK3 entraîne une inhibition de la différenciation neuronale dans des embryons de xénope (Souopgui *et al.* 2002). Enfin, une étude a également mis en évidence un rôle de PAK3 dans la différenciation des précurseurs des oligodendrocytes en oligodendrocytes matures (Maglotius-Renkilaraj *et al.* 2017).

Enfin, depuis 2007, il est désormais connu que PAK3 joue un rôle dans la régulation de la morphologie des épines dendritiques et des synapses, deux éléments connus pour être altérés dans la DI (pour revue, Kreis & Barnier, 2009). En effet, *in vitro*, la répression de l'expression de PAK3 via l'expression des formes mutées de PAK3 (dont la mutation R67C) ou son inhibition en culture cellulaire de neurones hippocampiques, entraîne une diminution de la densité des épines dendritiques, des épines des neurones pyramidaux et des interneurons inhibiteurs de l'hippocampe en culture (Boda *et al.* 2004 ; Kreis *et al.* 2007 ; Dubos *et al.* 2012 ; Dai *et al.* 2014).

d. Modèles murins *Pak3-KO* et *Pak3-R67C*

Deux modèles murins ont été créés afin de mieux comprendre le rôle de la protéine PAK3 *in vivo*. Le modèle *Pak3-KO* a été le premier modèle produit : il résulte en une perte totale de la protéine (Meng *et al.* 2005), tandis que le modèle *Pak3-R67C*, créé dans notre laboratoire par le groupe de JV Barnier, présente la mutation R67C qui entraîne, *in vitro*, une perte d'activation de PAK3 par Cdc42 (Kreis *et al.* 2007). Ce dernier modèle est celui utilisé dans mon étude.

Les souris *Pak3-KO* sont morphologiquement identiques aux souris WT (poids, taille) mais présentent néanmoins une microcéphalie (C. Vaillend, données non publiées). Les premières données comportementales ont été obtenues en 2005 par l'équipe de Meng *et al.* Aucun déficit d'apprentissage et de mémoire spatiale en piscine de Morris n'a été observé. De même, lors de la réalisation d'un apprentissage en « reversal », c'est à dire quand la plate-forme est déplacée au cours de l'apprentissage, aucun déficit de flexibilité comportementale n'est observé. Elles présentent seulement une accélération de l'extinction dans une tâche de conditionnement aversif gustatif (Meng *et al.* 2005). Enfin, des études plus récentes menées par C. Vaillend ont montré que ces souris ne présentent pas de déficit dans un test de conditionnement de peur en version indicée mais par contre une diminution de la mémoire à long terme en version contextuelle est observée, suggérant un déficit de consolidation mnésique impliquant l'hippocampe (Farley *et al.* en préparation).

Au niveau de la structure des neurones et des synapses, les souris *Pak3-KO* ne présentent pas d'anomalies (densité post-synaptique, morphologie, densité et taille des épines dendritiques identiques entre les souris WT et KO ; Meng *et al.* 2005). Au niveau du fonctionnement de la synapse, une diminution de l'activité synaptique spontanée, ainsi qu'une PLT diminuée ont été observées *in vitro* (Boda *et al.* 2004). Chez le modèle murin, en absence de PAK3, la PLT est normalement induite et seule la phase tardive de la PLT (L-PLT) n'est pas maintenue dans le temps (Meng *et al.* 2005). Les auteurs se sont ensuite intéressés à la phosphorylation de la protéine CREB, un facteur de transcription constitutivement exprimé qui va être phosphorylé durant les phases tardives de la PLT et permettre de réguler l'expression génique. Une forte réduction de la forme active phosphorylée de CREB a été observée dans l'hippocampe et le cortex des souris *Pak3-KO*, suggérant un rôle de PAK3 dans la régulation de CREB (Meng *et al.* 2005).

La caractérisation du phénotype comportemental des souris *Pak3-R67C* a démarré dans notre équipe en 2012 et a été menée par C. Vaillend. Ces souris *Pak3-R67C* ont une morphologie globalement identique aux souris WT (taille et poids) mais présentent cependant aussi une microcéphalie, comme les souris *Pak3-KO* (C. Vaillend, données non publiées).

L'activité locomotrice en open-field est normale mais une diminution du comportement exploratoire dans le test de la planche à trou a été observée (stage M2, D. Le Verger 2014). Cette

diminution n'a cependant pas été observée dans l'exploration en open-field ou durant le test de reconnaissance d'objets.

Au niveau de l'émotivité, leur résignation est normale (test de suspension par la queue, test de la nage forcée), leur émotivité en open-field et dans le labyrinthe en croix surélevé est identique aux souris WT, seule une légère anxiété est observée dans le test des boîtes claires/obscurées (résultats C. Vaillend). D'autre part, les souris *Pak3-R67C* ne présentent aucun déficit d'apprentissage et de mémoire (testée après 48h et 1 semaine) dans le test de la piscine de Morris (protocole en version distribuée). Elles n'ont également pas montré de déficit de mémoire de reconnaissance spatiale d'objets en open-field (stage M2 D. Le Verger 2014). Enfin, au niveau du conditionnement de peur, les souris *Pak3-R67C* présentent une réponse de peur moins importante que celle des WT durant l'acquisition en version contextuelle et indicée, associés à un déficit de rétention en version contextuelle uniquement.

3.3. La Dystrophie musculaire de Duchenne

La dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) a été décrite pour la première fois en 1858 par Guillaume Duchenne. Elle touche environ 1 garçon sur 3600 (Mah *et al.* 2014).

Il s'agit d'une maladie neuromusculaire caractérisée par une faiblesse musculaire progressive due à une dégénérescence des muscles squelettiques, lisses et cardiaques (Document ORPHANET ORPHA:98896). Outre la dégénérescence musculaire, certains patients DMD présentent également des désordres cognitifs (Hinton *et al.* 2000) et, dans une étude datant de 2001, il a été estimé que 34,8% des patients DMD examinés présentent une DI plus ou moins sévère (Cotton *et al.* 2001).

Une prise en charge du patient permet de ralentir l'apparition des symptômes musculaires et osseux, de soulager la douleur et d'améliorer les conditions de vie du patient. Cependant, il n'existe, à ce jour, aucun traitement pour soigner cette maladie et l'espérance de vie des patients DMD est significativement réduite avec un décès pouvant survenir tôt à l'âge adulte.

En 1988, des études génétiques ont permis de montrer que le gène *dmd* est responsable de la DMD. Ce gène est situé sur le chromosome X en position Xp21.2 et correspond au plus grand gène connu puisqu'il s'étend sur 2,4 Mb et totalise 79 exons. La DMD est due à des mutations de ce gène dont 23% sont des mutations *de novo* (Barbujani *et al.* 1990). Ces mutations entraînent une perte totale du produit du gène *dmd* : la dystrophine de forme longue, aussi appelée Dp427 (427 kDa ; 3685 acides aminés ; Koenig *et al.* 1988).

a. Structure du gène *dmd* et des dystrophines

La présence de plusieurs promoteurs indépendants internes au gène *dmd* entraîne l'expression de dystrophines de longueurs variables qui s'expriment dans des organes ou des types cellulaires différents (Figure 23A). Ainsi, on connaît 3 formes longues (c'est-à-dire correspondant à la séquence complète) : la Dp427 musculaire, la Dp427 cérébrale et la Dp427 spécifique aux neurones de Purkinje. Ces diverses formes se différencient par trois promoteurs indépendants et par une séquence N-terminale propre à chacune. Il existe également 5 formes courtes : la Dp260 rétinienne, la Dp140 dans le cerveau fœtal, la Dp116 dans les cellules de Schwann des nerfs périphériques, et la Dp71 produite majoritairement dans le cerveau et exprimée dans les neurones et la glie (pour revue, Perronnet & Vaillend, 2010). La Dp40, une dystrophine issue d'un épissage de la Dp71, a été mise en évidence plus récemment. Elle est également exprimée dans le cerveau (Tozawa *et al.* 2012) et préférentiellement dans les neurones (Fujimoto *et al.* 2014).

Compte tenu de la structure du gène et de ses multiples sites d'épissage, une mutation perturbant le cadre de lecture (codon STOP, délétion) qui serait située avant l'intron 29 entraînera la perte de la forme longue de la dystrophine, sans entraîner la perte des autres formes, plus courtes, puisque leur transcription est initiée au niveau de promoteurs qui sont en aval de cet intron. Au

contraire, des mutations localisées en aval de l'intron 62 affectent l'ensemble des dystrophines (Figure 23A).

Structurellement, la Dp427 est constituée de quatre domaines : le domaine amino-terminal (NT) qui interagit avec les filaments d'actine du cytosquelette, un domaine central riche en spectrine qui donne à la protéine une forme flexible et allongée, un domaine riche en cystéine (CR) qui fixe le Ca^{2+} et renforce l'interaction avec le β -dystroglycane, puis le domaine carboxy-terminal qui permet de se lier aux protéines cytoplasmiques telles que les dystrobrevines et les syntrophines (CT, Figure 23). En se liant à ces protéines, les dystrophines participent à l'architecture de la cellule. Elles jouent un rôle dans la formation des complexes protéiques liés à la membrane (Dystrophin Associated Glycoprotein Complex, DAGC) qui permet de faire un lien physique entre la matrice extracellulaire et le cytosquelette (Figure 23B). Le DAGC joue également un rôle très important dans l'ancrage et l'agrégation à la membrane de récepteurs (GABA_A) et de canaux (potassiques, aquaporines ; Fritschy *et al.* 2003 ; Figure 23B en jaune).

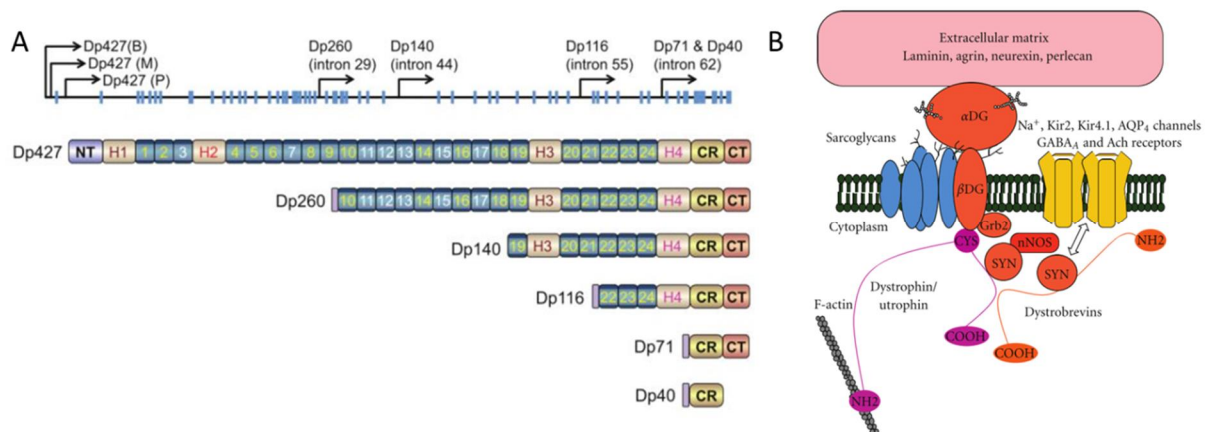


Figure 23 : Organisation du gène de la dystrophine et des produits issus de ce gène.

(A) En haut : l'organisation du gène *dmd* montre les exons spécifiques (bleu), les régions introniques (ligne noire) et les sites de début de transcription des différents promoteurs internes (flèches noires). (B : brain, M : muscle, P : cellules de Purkinje).

En dessous : les dystrophines Dp427 à Dp40 se composent de différents domaines : amino-terminal (NT), central (domaine spectrine), riche en cystéine (CR) et terminal (CT). McGreevy *et al.* 2015

(B) La dystrophine (en violet) se lie au cytosquelette d'actine par sa partie N-terminale (NH₂), le domaine riche en cystéine (CYS) se lie au sous-complexe transmembranaire des dystroglycanes (en orange). La partie C-terminale (COOH) interagit avec les protéines cytosoliques comme la syntrophine et la dystrobrevine (en orange). D'après la revue, Perronnet & Vaillend, 2010.

b. Déficience intellectuelle dans la DMD

Comme mentionné précédemment, environ un tiers des patients DMD souffrent de DI plus ou moins sévères (Cotton *et al.* 2001). Les déficits cognitifs des patients concernent à la fois les capacités de langage (compréhension, expression) et un retard d'apprentissage de la lecture en partie attribué à une forme de dyslexie. De plus, ces patients présentent des déficits de mémoire à court et long

terme, des troubles de l'attention et des altérations des habilités visuo-spatiales (Hinton *et al.* 2000). Les patients DMD montrent également une forte prévalence pour les troubles neuropsychiatriques tels que l'hyperactivité avec déficit attentionnel et autisme (Hendriksen & Vles, 2008).

L'étiologie de la DI dans la DMD est très complexe (pour revue, Perronnet & Vaillend, 2010). Plusieurs études des relations génotypes-phénotypes ont révélé une corrélation entre des mutations du gène affectant la Dp71 et la sévérité de la DI (Desguerre *et al.* 2009 ; Daoud *et al.* 2009a). Ainsi, une mutation située avant le promoteur de la Dp71 affecte les formes longues de la dystrophine et conduit à des déficits cognitifs modérés. Par contre, une mutation située après le promoteur de la Dp71 conduit à une DI sévère (QI inférieur à 50 ; Daoud *et al.* 2009a ; Figure 24). Le déficit en Dp71 est donc considéré comme un facteur aggravant majeur conduisant à une DI modérée à sévère dans la DMD. De plus, une étude clinique sur une famille de patients présentant des DI légères à modérées, a rapporté le cas d'un patient présentant une mutation affectant préférentiellement la Dp71 et associée à une DI sans aucun trouble musculaire (de Brouwer *et al.* 2014).

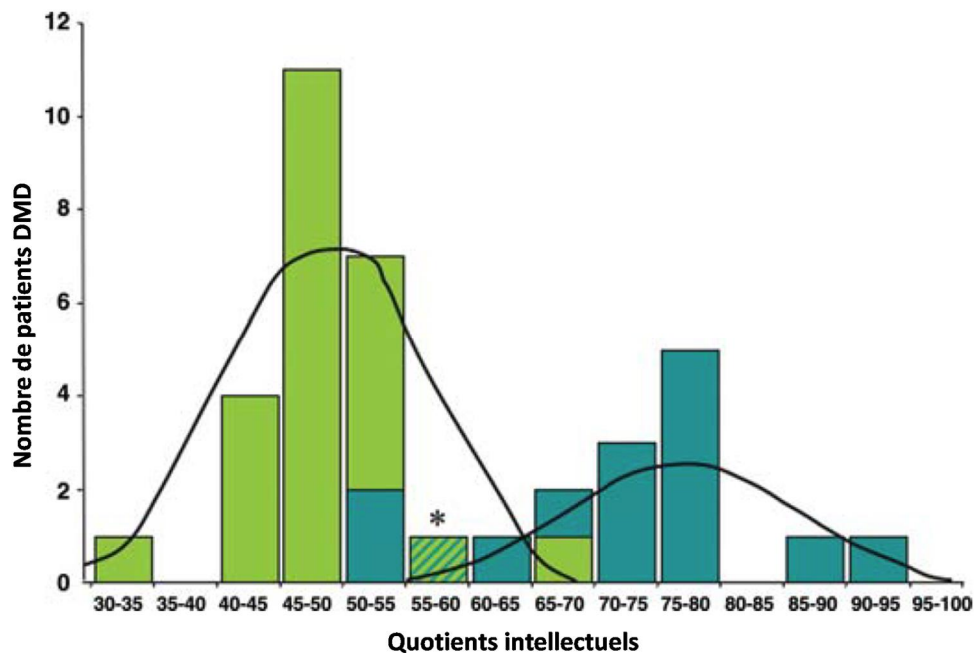


Figure 24 : Répartition des patients DMD en fonction de leurs quotients intellectuels.

En vert : patients ayant une mutation affectant une ou plusieurs formes de la dystrophine dont la Dp71.

En bleu : patients ayant une mutation affectant une ou plusieurs formes de la dystrophine excepté la Dp71. Daoud *et al.* 2009a.

Compte tenu du lien évident existant entre la Dp71 et l'apparition d'une DI sévère, mon projet s'est focalisé uniquement sur la forme courte de la dystrophine, la Dp71.

c. Expression tissulaire de la Dp71

L'étude de l'activité du promoteur de la Dp71 a montré que celui-ci était actif durant le développement embryonnaire. La Dp71 s'exprime dans des cellules souches embryonnaires pluripotentes et est notamment fortement détectée au niveau du cerveau antérieur embryonnaire, qui donne par la suite naissance à l'hippocampe (Rapaport *et al.* 1992 ; Sarig *et al.* 1999). De plus, à la naissance, un pic d'expression de la Dp71 est observé dans le cerveau (Sarig *et al.* 1999).

A l'âge adulte, on retrouve la Dp71 dans le muscle cardiaque, le cerveau, la rétine, le rein, le foie, les poumons et les testicules (Tokarz *et al.* 1998 ; pour revue, Perronnet & Vaillend, 2010). Dans le cerveau, son ARNm est fortement exprimé dans le GD de l'hippocampe et le bulbe olfactif, et dans une moindre mesure dans d'autres structures telles que le cortex et la corne d'Ammon de l'hippocampe (Górecki & Barnard, 1995 ; Daoud *et al.* 2009b). Au niveau cellulaire, la Dp71 est exprimée dans les cellules neuronales (pour revue, Perronnet & Vaillend, 2010 ; Tayadoni *et al.* 2012) notamment au niveau des synapses excitatrices glutamatergiques, où elle colocalise avec les récepteurs NMDA et AMPA (Daoud *et al.* 2009b). Elle est également localisée dans les cellules gliales, notamment dans les pieds astrocytaires où elle pourrait jouer un rôle dans la barrière hémato-encéphalique (Nico *et al.* 2004).

d. Rôle de la protéine Dp71

Les données expérimentales obtenues à partir de modèles cellulaires ont clairement démontré la participation de la Dp71 dans plusieurs processus cellulaires tels que la signalisation cellulaire, le cycle cellulaire et l'architecture cellulaire. Au niveau structural, la Dp71 est composée d'environ 600 acides aminés. Elle ne possède pas de domaine spectrine, mais conserve les trois autres domaines (NT, CR et CT ; Figure 23A). En C-terminal elle ne se lie pas aux mêmes protéines que la Dp427 (Blake *et al.* 1999).

Au niveau cellulaire, les données actuelles suggèrent que cette protéine a des fonctions ambivalentes à la fois dans les cellules gliales et neuronales (Tadayoni *et al.* 2012). À l'interface glio-vasculaire, la Dp71 est nécessaire pour le regroupement normal d'un sous-ensemble d'aquaporines (AQP4) et de canaux potassiques (Kir4.1), prenant ainsi part à la fonction de la barrière hémato-encéphalique (Nicchia *et al.* 2008 ; Tadayoni *et al.* 2012).

La Dp71 participe également au cycle de division cellulaire et à la prolifération cellulaire (Herrera-Salazar *et al.* 2016). Ainsi, dans une étude *in vitro* sur des cellules PC12 dépourvues de Dp71, un retard dans le cycle cellulaire a été observé (transition de phase retardée G0 / G1 à S). De plus, en absence de Dp71, un ralentissement du cycle cellulaire a été mis en évidence, notamment durant la phase de mitose. En effet, la Dp71 est normalement associée à la lamine B1, localisée au niveau du fuseau mitotique, une protéine indispensable à la cytokinèse. En absence de la Dp71, le

taux de lamine B1 est diminué, ce qui nuit au déroulement correct de la cytokinèse (Villarreal-Silva *et al.* 2010). La perte de Dp71 pourrait donc nuire à la croissance cellulaire et à la prolifération cellulaire en rendant la mitose instable.

D'autres études ont révélé un rôle de la Dp71 dans la différenciation cellulaire. Les niveaux d'ARNm de Dp71 sont notamment augmentés suite à la différenciation des astrocytes induite par l'AMPC comparés aux taux d'ARNm de la Dp427 et d'utrophine, suggérant un rôle spécifique du complexe Dp71-dystroglycane dans la différenciation (Imamura *et al.* 1998). Une autre étude a également rapporté ce résultat durant la différenciation induite par le NGF dans les cellules PC12 (Cisneros *et al.* 1996). Sur ce même type cellulaire, en absence de Dp71, l'activation de ERK1/2 est normale, mais cependant l'expression de MAP2, un marqueur qui intervient tard dans le processus de différenciation, est perturbée (Acosta *et al.* 2004). Enfin, une autre étude basée sur des cellules PC12 a également permis de mettre en évidence le rôle de la Dp71 dans la croissance neuritique qui est perturbée en son absence (Acosta *et al.* 2004).

A ma connaissance, toutes ces fonctions de la Dp71 n'ont jamais été confirmées *in vivo*.

e. Modèle murin Dp71-KI

Afin d'étudier le rôle de la protéine Dp71 et les mécanismes sous-jacents à la DI liée à cette protéine, nous disposons dans l'équipe d'un modèle de souris transgénique spécifiquement déficiente en Dp71, la souris *Dp71-KI*, qui a été produite par le Weizmann Institute en Israël (Sarig *et al.* 1999). La souris *Dp71-KI* a été créée par transgénèse en insérant le gène de la β -Galactosidase dans le premier exon unique de la Dp71 (Sarig *et al.* 1999). Comme la Dp71 n'est pas exprimée dans le muscle, l'absence de cette protéine dans ce modèle de souris n'entraîne pas de myopathie.

L'étude du phénotype comportemental des souris *Dp71-KI* menée par C. Vaillend a débuté en 2005. Ces souris présentent une locomotion normale (open-field, labyrinthe en croix) et se comportent de manière identique aux souris WT dans des tests moteurs (test de la grille inversée et test de suspension), mettant en évidence que les fonctions motrices ne sont pas affectées (Daoud *et al.* 2009b). L'étude de l'anxiété, réalisée grâce au test du labyrinthe en croix surélevé n'avait initialement pas montré de différence entre les souris KI et WT. Cependant, des données récentes obtenues au laboratoire ont montré que ces souris sont plus anxieuses que les souris WT dans divers tests d'anxiété (open-field, test du clair/obscur et labyrinthe en croix surélevé ; M2 D. Le Verger 2014). Au niveau cognitif, ces souris mutantes ne présentent pas de déficit d'acquisition et de rétention dans la tâche de reconnaissance d'objets à court et long terme, bien qu'elles présentent cependant une exploration des objets amoindrie par rapport aux souris WT, qui selon les auteurs, pourrait s'expliquer par une altération de la motivation ou du comportement de recherche de la nouveauté (Daoud *et al.* 2009b). Aucune altération de la mémoire de peur conditionnée, en version

contextuelle, indicée et avec le protocole de trace, n'a été observée. En termes de mémoire spatiale, les souris *Dp71-KI* présentent un retard d'apprentissage spatial en piscine de Morris, ainsi que des déficits de mémoire de reconnaissance spatiale à 6h et 24h dans une tâche d'alternance et un déficit de mémoire spatiale de travail en labyrinthe radial (Daoud *et al.* 2009b ; Chausseot *et al.* en préparation). Ces souris présentent également une altération de la flexibilité comportementale dans deux apprentissages impliquant la mémoire de référence spatiale (piscine de Morris et labyrinthe radial ; Chausseot *et al.* en préparation).

Compte tenu des diverses altérations comportementales observées chez ce modèle, il semblerait que la *Dp71* soit nécessaire à la réalisation de tâches dépendantes d'un circuit incluant l'hippocampe, notamment lors de la réalisation de tâches spatiales. Dans l'hippocampe, l'organisation cellulaire apparaît normale chez les souris *KI*. Cependant, la transmission glutamatergique est augmentée, ce qui déséquilibre la balance excitation/inhibition en faveur de l'excitation. Dans le CA1 de l'hippocampe, la PLT est diminuée mais la DLT est normale. De plus, les souris *Dp71-KI* présentent une altération de la densité des synapses et de leur morphologie dans le cerveau adulte. Le nombre de synapses glutamatergiques est légèrement diminué mais la taille des densités post-synaptiques est quant à elle augmentée (Daoud *et al.* 2009b) et des altérations ultrastructurales sont également observées au niveau présynaptique (Miranda *et al.* 2011). Ces altérations de la structure et de la plasticité des synapses pourraient contribuer aux déficits cognitifs observés.

Objectifs de la thèse

Depuis quelques années, le nombre de diagnostics de patients DI d'origine génétique ne cesse d'augmenter entraînant avec eux la découverte de nouvelles protéines impliquées. Comme mentionné en première partie de mon introduction, les causes neurobiologiques de la DI sont multiples et bien que certains mécanismes cellulaires et moléculaires sous-jacents à cette pathologie aient été mis en évidence, la plupart restent encore méconnus, le champ de recherche reste donc immense. Parmi ces mécanismes, des troubles de la neurogenèse embryonnaire ou de migration neuronale au cours du développement à l'origine de malformations cérébrales ont été mis en évidence. D'autre part, de récentes recherches tendent à s'accorder sur l'existence de défauts de plasticité dans plusieurs régions clés du cerveau impliquées dans la cognition. L'idée que des altérations de la neurogenèse adulte puissent contribuer aux symptômes de la DI est relativement récente et représente un domaine prometteur pour le développement de nouvelles approches thérapeutiques. Cependant, compte tenu de la multitude de gènes conduisant à la DI, les altérations des fonctions cognitives et de la neurogenèse hippocampique adulte, rapportées dans quelques modèles étudiés, sont également diverses (Pons-Espinal *et al.* 2013). Par exemple, l'étude des fonctions cognitives chez le modèle *Fmr1-KO* du syndrome de l'X fragile a permis de mettre en évidence des déficits mnésiques dans de nombreux types de tâches faisant intervenir, entre autres, la mémoire spatiale et la séparation de patterns (Zhao *et al.* 2005 ; Guo *et al.* 2011 ; Eadie *et al.* 2012) suggérant une altération de la fonction de l'hippocampe et plus particulièrement du GD. Dans cette structure, des études *in vitro* et *in vivo* de la neurogenèse adulte ou des analyses sur cellules souches neurales ont mis en évidence des altérations telles que la diminution de la survie cellulaire (Luo *et al.* 2010), la diminution de la différenciation neuronale (Guo *et al.* 2011 ; Lazarov *et al.* 2012) mais aussi l'augmentation de la différenciation gliale (Luo *et al.* 2010). Cependant, certains des résultats liés à la prolifération des cellules progénitrices restent parfois contradictoires (Patzlaff *et al.* 2017). Dans le modèle du syndrome de Rett (modèle murin *Mecp2-KO*), certains des déficits cognitifs suggèrent également une atteinte hippocampique (Pelka *et al.* 2006 ; Moretti *et al.* 2006). D'ailleurs, l'étude de la neurogenèse hippocampique adulte montre une diminution de la taille des neurones et de la complexité de l'arborisation dendritique des neurones hippocampiques (Kishi & Macklis, 2004). Aucun déficit de prolifération, de survie ou de différenciation cellulaire dans le GD n'a été observé *in vivo* (Smrt *et al.* 2007). Toutefois, l'étude de neurones embryonnaires issus de l'hippocampe de souris *Mecp2-KO* a montré une implication du gène dans la survie neuronale (Young *et al.* 2004). D'autre part, dans environ 10% des cas du syndrome de Rett, des mutations du gène *Foxg1* ont été mises en évidence (Ariani *et al.* 2008 ; Mencarelli *et al.* 2010). Dans la neurogenèse adulte, le produit

de ce gène semble être important pour maintenir la balance entre la prolifération et la différenciation (Tian *et al.* 2012) et est nécessaire pour la survie et la différenciation neuronale (Shen *et al.* 2006).

C'est dans ce contexte que s'inscrivent mes travaux de thèse qui se sont centrés sur l'étude des gènes *pak3*, *rsk2* et *dmd* dont les mutations conduisent, chez l'Homme, à des déficits cognitifs sévères représentatifs d'une large proportion de DI liées à l'X. **L'objectif de mon projet était d'entreprendre une analyse comparative de la neurogenèse hippocampique adulte (prolifération, survie, maturation, et intégration fonctionnelle des nouveaux neurones) et des fonctions cognitives associées (mémoire spatiale, séparation de patterns) chez trois modèles murins impliquant ces trois gènes (souris *Pak3-R67C*, *Rsk2-KO* et *Dp71-KI*).** Plusieurs arguments nous ont amené à faire l'hypothèse que les trois protéines issues de ces gènes puissent être impliquées dans la neurogenèse adulte. Dans un premier temps, des études antérieures réalisées au laboratoire sur ces modèles murins, ont permis de mettre en évidence un ensemble d'altérations que j'ai résumé en tableau 2 (pour les détails, voir la partie III de l'introduction). Brièvement, l'établissement de la caractérisation comportementale de ces trois modèles murins a montré qu'ils présentaient tous trois certains déficits cognitifs dans des tâches dépendantes de l'hippocampe (Poirier *et al.* 2007 ; Morice *et al.* 2013 ; Daoud *et al.* 2009b ; Farley *et al.* en préparation ; Tableau 2). D'autre part, une microcéphalie a été mise en évidence pour le modèle *Pak3-R67C* mais n'existe pas pour les modèles *Rsk2-KO* et *Dp71-KI*. Alors que de nombreuses études restent à effectuer chez le modèle *Pak3-R67C* récemment généré, les études menées sur les modèles *Rsk2-KO* et *Dp71-KI* mettent en évidence des défauts de plasticité synaptique. Enfin, des études, essentiellement *in vitro* (ou au cours du développement), suggèrent un rôle de ces protéines dans des aspects du cycle cellulaire, de la différenciation ou de la maturation neuronale qui laissent penser que ces trois protéines puissent également influencer la neurogenèse hippocampique adulte. Concernant la *Dp71*, une étude *in vivo* sur un modèle murin correspondant à l'absence de la forme longue de la dystrophine (souris *mdx*) a montré également une altération de certaines étapes de la neurogenèse adulte (Deng B *et al.* 2009), ce qui constitue un argument supplémentaire quant à l'implication de la dystrophine dans la neurogenèse adulte.

L'ensemble des données obtenues grâce aux modèles murins que nous possédons, laisse donc suggérer la présence d'une altération de l'hippocampe et apportent donc des pistes permettant de suspecter une potentielles altérations de la neurogenèse adulte.

	Rsk2-KO	Pak3-R67C	Dp71-KI
Développement cérébral	absence d'altérations majeures	Microcéphalie	=
Plasticité synaptique	Transmission glutamatergique altérée ↳ excitabilité du réseau	?	Transmission glutamatergique altérée
	PLT =	?	PLT ↗ DLT normale
Morphologie des synapses	↳ conductance des récepteurs AMPA et NMDA ↗ expression du récepteur GluR2 ↗ taille des densités post-synaptiques	?	↳ densité des synapses ↗ taille des densités post-synaptiques
Morphologie des épines dendritiques	↗ taille du cou des épines dendritiques	?	?
Exploration/Locomotion	= Légère hyperactivité	=/↳ (planche à trou) =	Amoindrie =
Anxiété	=/↳	Légère anxiété (boîtes claires/obscurées)	Un peu plus anxieuses
Mémoire de travail	Léger déficit en spatial / = (Intellicages©)	?	Déficit
Reconnaissance d'objet	=	=	=
Apprentissage spatial piscine de Morris distribué	Retard acquisition + déficit mémoire spatiale à 9 jours mais pas à 24h	= Léger défaut de trajectoire	Retard acquisition
Mémoire contextuelle de peur conditionnée	=	Retard d'acquisition Léger déficit de rétention	=
Flexibilité	=	?	Altérée
Séparation de patterns	Déficit	?	?

Tableau 2 : Comparaison des différentes données connues avant le début du doctorat, chez les trois modèles murins de DI.

Compte tenu de l'historique de recherche sur ces trois modèles au sein du laboratoire, nous n'avons pas exactement axé nos recherches sur les mêmes tâches/expériences, mais pour mener à bien cette étude comparative, nous avons suivi la même ligne directrice.

- Nous avons caractérisé la dynamique de la neurogenèse adulte (prolifération, maturation et survie des nouveaux neurones) à l'état basal chez les trois modèles de souris.
- En parallèle, nous avons réalisé des études comportementales susceptibles de moduler et/ou d'impliquer la neurogenèse adulte. Pour ce faire, nous avons utilisé de nouveaux protocoles comportementaux afin de tester la fonction de séparation de patterns, ainsi qu'une tâche spatiale de non appariement retardé avec essais successifs pour mettre en

évidence la sensibilité des souris aux interférences lors d'un apprentissage en labyrinthe radial.

- Par la suite, nous avons également étudié l'intégration fonctionnelle des nouveaux neurones dans l'hippocampe des souris mutantes, en relation avec des processus mnésiques impliquant spécifiquement ces nouveaux neurones afin de mettre évidence de potentielles altérations du recrutement des jeunes neurones par l'apprentissage.

Ainsi, la première partie des résultats sera consacrée à ceux obtenus chez le modèle murin *Rsk2*-KO qui ont donné lieu à la publication d'un article dans le journal « *Neurobiology of disease* », puis par la présentation des résultats obtenus pour le modèle *Pak3*-R67C qui a donné lieu à la préparation d'un deuxième article qui sera soumis prochainement. Enfin je présenterai les premières données obtenues sur l'étude du modèle *Dp71*-KI.

Matériels et Méthodes

I. Animaux

Les différentes expériences réalisées au cours de cette thèse ont été menées sur des souris C57BL/6 mâles adulte âgées de 3 mois : sauvages (Wild Type, WT) et 3 lignées mutantes : une souris déficiente pour le gène *Rsk2* (*Rsk2*-KO), une souris mutée dans le gène *Pak3* (*Pak3*-R67C) et une souris mutée dans le gène *dmd* entraînant l'absence de la dystrophine de 71 kD (*Dp71*-KI). Ces trois gènes sont localisés sur le chromosome X. Les souris sont issues du croisement d'une souris mâle WT et d'une souris femelle hétérozygote pour le gène muté. Pour l'expérience d'irradiation, un groupe supplémentaire de souris irradiées C57BL/6 âgées de 8 semaines (IR, n = 10) et un groupe de souris non irradiées (NIR, n = 8) ont été utilisés.

Les souris ont été placées par fratrie de 2 à 6, WT et mutants d'une même lignée confondus, dans des cages standards. Elles sont logées dans l'animalerie du laboratoire dont la température est contrôlée, avec un cycle lumière/obscurité de 12 heures, et ont accès à l'eau et à la nourriture *ad libitum* (exceptées les souris soumises à un test comportemental dans le labyrinthe radial). Au début des expérimentations, les souris sont âgées de 3-4 mois. Toutes les expériences comportementales ont été réalisées entre 9h et 19h et à l'aveugle concernant le génotype.

Les souris sont générées au sein de l'unité de production de l'animalerie transgénique du laboratoire. Les procédures expérimentales ont été menées conformément aux directives établies par la Directive du Conseil des Communautés Européennes (2010/63/ Décret de la Directive du Conseil de l'UE) et le Comité d'Expérimentation Animale (CEEA N° 59, Projet éthique 2014-8). Tous les efforts ont été faits pour réduire le nombre de souris utilisées et minimiser leur souffrance. La procédure d'irradiation a été faite à l'Institut de Radioprotection et de Sécurité Nucléaire par Philippe Lestavel et Christelle Durand (Laboratoire de radiotoxicologie et de radiobiologie expérimentale).

II. Procédures comportementales

Trois jours avant le début des expérimentations, les souris sont manipulées environ 2 minutes par jour par l'expérimentateur. Lors de chaque tâche comportementale, une caméra reliée à un système de vidéotracking (ANY-maze™, Stoelting) est placée au-dessus des dispositifs afin d'enregistrer toutes les séquences de tests.

2.1. Tâche d'apprentissage et de mémoire spatiale en labyrinthe aquatique :

Le dispositif est constitué d'un bac circulaire (150 cm de diamètre x 37 cm de hauteur) rempli d'eau ($20^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$) jusqu'à environ 15 cm du bord supérieur, rendu opaque par l'ajout d'un colorant blanc non toxique (Acusol OP301 Opacifier; Rohm and Haas). Tout autour de la piscine sont disposés des rideaux blancs où sont accrochés de larges indices visuels colorés (Figure 25A). La piscine est virtuellement séparée en quatre quadrants possédant un point de départ défini. Chacun de ces quadrants contient un disque virtuel de 48 cm de diamètre avec au centre de ce disque un possible emplacement de la plate-forme (11,5 cm de diamètre). Celle-ci est placée au milieu d'un des quadrants, qui est alors appelé quadrant cible. Elle demeure ainsi placée tout au long de l'expérience. Les trois autres quadrants servent de points de départ, désignés de manière aléatoire et variant à chaque essai (Figure 25B).

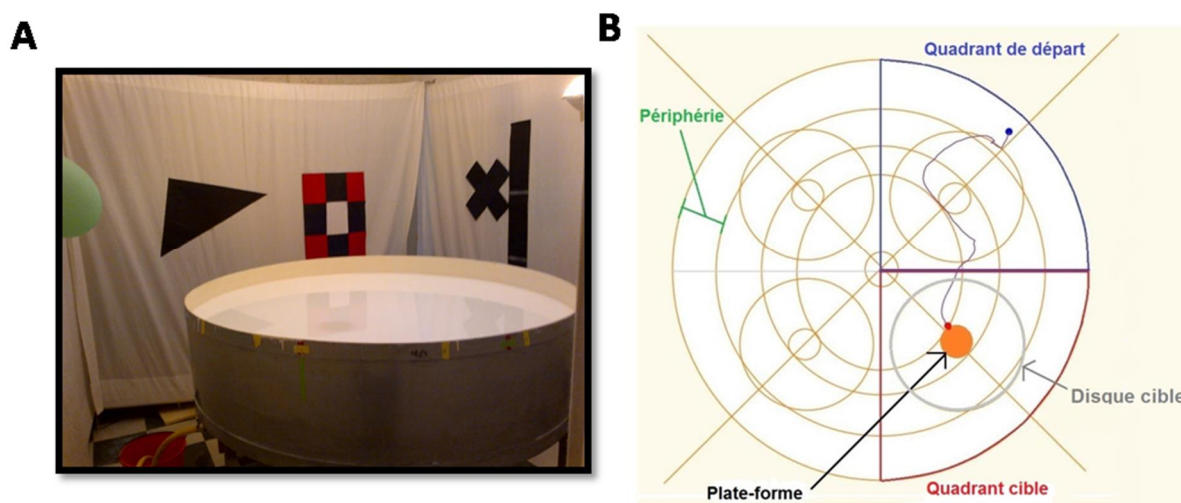


Figure 25 : Dispositif expérimental du labyrinthe aquatique.

A : Salle d'expérience présentant de nombreux indices visuels à distance. B : Exemple de tracé du trajet (en bleu) suivi par une souris pendant un essai obtenu grâce au logiciel de vidéotracking ANY-Maze Stoelting®.

Par l'intermédiaire de la caméra placée au-dessus de la piscine et du logiciel de vidéotracking, différents paramètres sont enregistrés : la distance parcourue, la latence d'atteinte de la plateforme, la vitesse de nage, le temps de nage effectué dans les différents quadrants et disques, la thigmotaxie (temps de nage (ou distance parcourue) effectué en périphérie de la piscine, dans un corridor circulaire virtuel de 20 cm de large ; Figure 25B)

a. Version massée

Ce protocole adapté de Jones *et al.* (2001) a été utilisé pour tester les souris de la lignée *Pak3-R67C* (WT n=7 et *Pak3-R67C* n=6). Le jour précédant le début de l'apprentissage, une étape d'habituation est réalisée : La plate-forme est placée dans le quadrant cible à 0,5 cm au-dessus de la surface de l'eau (visible). Un essai commence en introduisant la souris dans la piscine, face à la paroi, à un des trois points de départ désignés, de manière aléatoire. Le temps maximal autorisé pour chaque essai est de 60s. Si la souris ne réussit pas à trouver la plate-forme, l'expérimentateur la guide vers celle-ci. Elle peut alors y rester pendant 60s avant d'être replacée dans l'eau depuis un autre point de départ pour un nouvel essai. Trois essais sont réalisés au cours de l'habituation, chacun à partir d'un des trois points de départ.

Le jour suivant, les souris sont entraînées à localiser la plate-forme qui est cette fois située 0,7-0,9 cm en dessous de la surface de l'eau (non-visible). L'apprentissage massé est constitué de trois sessions d'entraînement séparées de 2 heures, chacune composées de trois blocs à 25 minutes d'intervalle, chaque bloc étant composé de 3 essais consécutifs (27 essais au total). A chaque essai, la souris est placée dans la piscine à différents points de départ et est autorisée à nager librement jusqu'à ce qu'elle atteigne la plate-forme avec un temps maximum de 60s. Comme lors de l'habituation, si la souris ne réussit pas à trouver la plate-forme après 60s, l'expérimentateur la guide vers celle-ci et elle doit y rester pendant 60s.

Un test de mémoire est réalisé 10 jours après la dernière session d'entraînement : 2 essais consécutifs séparés de 3 minutes durant lesquels la plate-forme est retirée de l'eau. La souris doit chercher la plate-forme pendant 60s. La mémoire spatiale est évaluée durant le 1^{er} essai en comparant le temps passé dans le quadrant qui possédait auparavant la plate-forme (quadrant cible), au niveau de chance (25%) et au nombre de passage sur l'emplacement de la plate-forme.

b. Version distribuée

Ce protocole, adapté de Poirier *et al.* (2007), a été utilisé pour tester le modèle murin *Rsk2-KO* (WT n=11 et *Rsk2-KO* n=10). Le jour précédant le début de l'apprentissage, une étape d'habituation est réalisée : La plate-forme est placée au centre de la piscine toujours en dessous de la surface de l'eau (invisible). Elle comprend 9 essais. Au cours du premier essai la souris est déposée sur la plate-forme et doit y rester pendant 60s avant de réaliser l'essai suivant. Pour les essais 2-5, la souris est placée aux différents points de départ, face à la paroi, puis est guidée par l'expérimentateur jusqu'à la plate-forme sur laquelle elle devra rester 60s. Quatre heures plus tard, les essais 2-5 sont réitérés.

Le jour suivant, les souris débutent l'apprentissage qui durera 7 jours. Chaque jour d'entraînement est composé de 8 essais (2 blocs de 4 essais séparés de 4h soit 8 essais total par jour). Les souris sont entraînées à localiser la plate-forme qui est cette fois située dans le quadrant cible choisi. A chaque essai, la souris est placée dans la piscine à différents points de départ et

dispose de 90s pour chercher la plate-forme. Si la souris ne réussit pas à trouver la plate-forme après 90s, l'expérimentateur la guide vers celle-ci et elle doit y rester pendant 60s.

Deux tests de mémoire sont réalisés le lendemain du dernier jour d'apprentissage : 2 essais consécutifs séparés de 3 minutes durant lesquels la plate-forme est retirée de l'eau. La souris est autorisée à chercher la plate-forme pendant 90s. Tout comme pour le protocole utilisé dans la version massée, la mémoire spatiale est évaluée durant le 1^{er} essai en comparant le temps passé dans le quadrant cible au niveau de chance (25%), ainsi qu'en comparant le nombre de passages sur l'emplacement de la plate-forme.

2.2. Tâches comportementales en labyrinthe radial :

Trois tâches comportementales ont été réalisées en labyrinthe radial. Le dispositif (Ugo Basile, Italie) est composé d'une plate-forme centrale (diamètre : 16 cm) entourée de 8 bras (35 cm de long, 5,5 cm de large) aux extrémités desquels sont fixées des coupelles (diamètre : 1,5 cm) permettant d'y déposer une récompense (20 μ L de saccharine 0,1%) faisant office de renforcement positif (Figure 26). Des portes à l'entrée de chaque bras peuvent être individuellement actionnées à partir d'une interface manuelle. Les bras sont ouverts sur l'extérieur et permettent à la souris d'avoir une vision complète des indices visuels de la pièce d'expérimentation.



Figure 26 : Dispositif du labyrinthe radial.

Ces trois tâches nécessitent de placer les souris en restriction hydrique une semaine avant le début de l'expérience. Chaque souris est pesée et les biberons d'eau sont retirés des cages. À partir de ce jour, les souris n'auront accès à l'eau de boisson qu'une fois par jour pendant 10 minutes. Tout au long de cette expérimentation, l'évolution du poids des souris est suivie par pesée quotidienne (les souris ne doivent pas perdre plus de 10 à 15% de leur poids initial) et leur état général est contrôlé.

La veille du début de la tâche de discrimination, les souris sont habituées au dispositif. Le matin, elles sont déposées pendant 5 minutes par fratrie sur le labyrinthe radial où tous les bras sont

ouverts. Les bras sont tous renforcés et maintenus dans cet état au fur et à mesure du passage des souris dans les bras. L'après-midi, les souris sont déposées individuellement pendant 5 minutes chacune. Le labyrinthe est nettoyé à l'alcool absolu après chaque souris.

a. Mémoire de travail en labyrinthe radial :

Ce protocole a été utilisé uniquement sur le modèle *Pak3-R67C*. Dans cette tâche comportementale, les souris (WT n=10 et *Pak3-R67C* n=11) doivent aller successivement récupérer les récompenses situées au bout des 8 bras du labyrinthe radial, de manière successive, et sans jamais retourner dans un bras précédemment visité.

Durant la phase de test, les souris vont réaliser 1 essai par jour pendant 12 jours. Au début de l'essai, la souris est placée au centre du dispositif, entourée d'un cylindre transparent. Toutes les portes sont ouvertes. L'essai débute lorsque le cylindre est retiré. Un essai dure 5 minutes maximum. Si toutes les récompenses sont récupérées avant la fin des 5 minutes, la souris est retirée du dispositif. Trois types d'erreur peuvent être observés :

- Erreur de mémoire de travail : entrée dans un bras déjà visité au cours d'un même essai
- Erreur de type procédural : omettre de visiter un bras ou visite du bras sans prendre la récompense
- Choix avortés : Sortie sans atteindre la zone de but

Pour chaque souris, des enregistrements vidéos de tous les essais ont été effectués et le nombre d'erreurs de mémoire de travail comptabilisé.

b. Tâche de non-appariement retardé en labyrinthe radial

Ce protocole, utilisé pour les souris *Rsk2-KO* (WT n=11 et *Rsk2-KO* n=8) et *Pak3-R67C* (WT n=18 et *Pak3-R67C* n=17) est basé sur celui de Clelland *et al.* (2009). Dans cette tâche, les souris doivent distinguer deux configurations proches représentées par une différence variable entre deux bras du labyrinthe radial.

Les souris sont testées sur leur capacité à distinguer un bras familier d'un nouveau bras (delayed non-matching to sample, DNMP) dans un labyrinthe radial. Durant 10 jours, les souris ont réalisé 4 essais par jour (40 essais au total avec 20 essais de chaque configuration du labyrinthe), séparés d'une trentaine de minutes. Chaque essai comprend 2 phases séparées d'une vingtaine de secondes et un temps de 3 minutes est accordé pour chacune des phases :

- **Une phase imposée** : 2 bras sur 8 sont ouverts. La souris est placée à l'extrémité d'un bras appelé bras de départ. Elle doit aller chercher une récompense à l'extrémité du deuxième bras. Une fois récupérée, la souris est enlevée du labyrinthe, puis ce dernier est nettoyé à l'alcool (Figure 27).

- **Un test de choix** : vingt secondes plus tard, un troisième bras est ouvert. Seul, ce nouveau bras ouvert sera renforcé. La position de ce bras varie en fonction de l'angle qu'il forme avec le 2^e bras : Soit 90° (configuration proche), soit 180° (configuration éloignée ; Figure 27) :

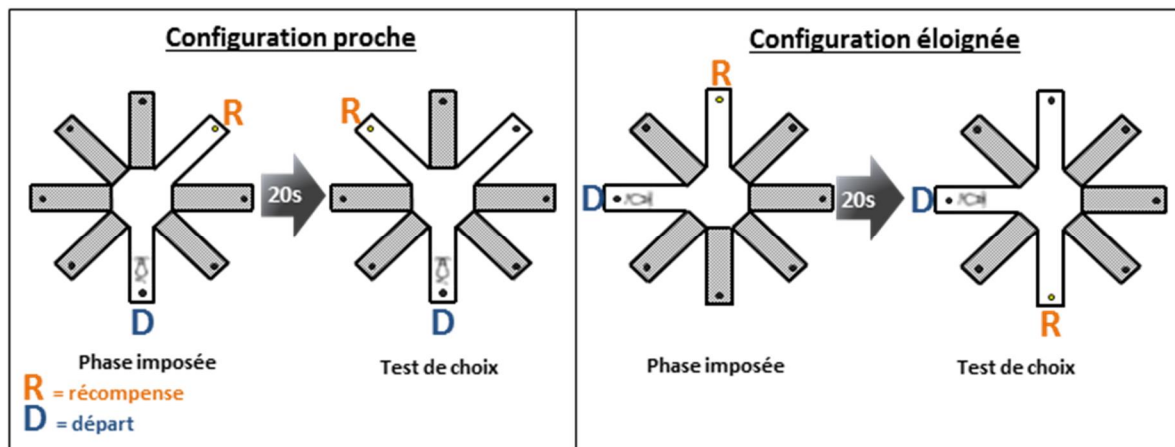


Figure 27 : Réalisation d'un essai dans la tâche de séparation de patterns en labyrinthe radial (Clelland *et al.* 2009).

Deux configurations du labyrinthe sont testées (proche / éloignée). Chaque essai est composé d'une phase imposée et d'un test de choix.

Si la souris va directement chercher la récompense dans le nouveau bras, l'essai est considéré comme réussi. Une erreur est comptabilisée si la souris retourne dans l'ancien bras qui n'est plus renforcé ou si elle n'a pas fait de choix au bout de 3 minutes. Au cours des 2 premiers jours de l'expérience, la souris a la possibilité de rectifier son erreur en allant récupérer la récompense dans le nouveau bras récompensé.

Chaque jour, les souris reçoivent deux essais en configuration proche et deux essais en configuration éloignée. A chaque essai les bras utilisés sont alternés de manière aléatoire. Pour chaque souris, des enregistrements vidéos de tous les essais ont été effectués et le temps mis pour aller chercher la récompense lors de l'essai imposé a également été comptabilisé, afin d'exclure la possibilité d'un manque de motivation.

24h après la fin de l'expérience, les souris ont réalisé 3 essais espacés de 3 minutes chacun, soit en configuration proche soit en configuration éloignée.

c. Tâche de non-appariement retardé avec essais successif en labyrinthe radial

Pour tester la flexibilité, l'organisation de la mémoire et la sensibilité aux interférences proactives, nous avons utilisé la tâche de modélisation de la mémoire déclarative des événements répétitifs du quotidien développée par Al Abed *et al.* (2016). Cette tâche nécessite la capacité de conserver en mémoire des endroits récemment visités. Au cours de cette tâche, on attribue, à chaque souris, 3 paires de bras adjacents du labyrinthe A, B et C (Figure 28A). Les souris vont devoir distinguer ces différentes paires de bras, et les deux bras qui les composent en s'aidant des indices de l'environnement. Cette tâche comportementale repose sur un comportement naturel de la souris

qui est l'alternance. A chaque essai, une paire de bras va être présentée à la souris, qui devra se souvenir lequel des deux bras de la paire elle a visité la fois d'avant pour pouvoir alterner son choix puis remettre à jour les nouvelles informations. La tâche nécessite donc la capacité d'organiser et de mettre à jour les événements stockés au fur et à mesure qu'ils sont utilisés, afin de surmonter les interférences proactives des visites précédentes et va tester à la fois la rétention et les composants organisationnels de la mémoire dépendante de l'hippocampe (Al Abed *et al.* 2016). Dans cette tâche, nous avons testé séparément 2 groupes de souris : un groupe de souris irradiées (IR, $n = 10$) et non irradiées (NIR $n = 8$) et le modèle murin *Pak3-R67C* ($n = 13$) et leurs contrôles WT ($n = 13$).

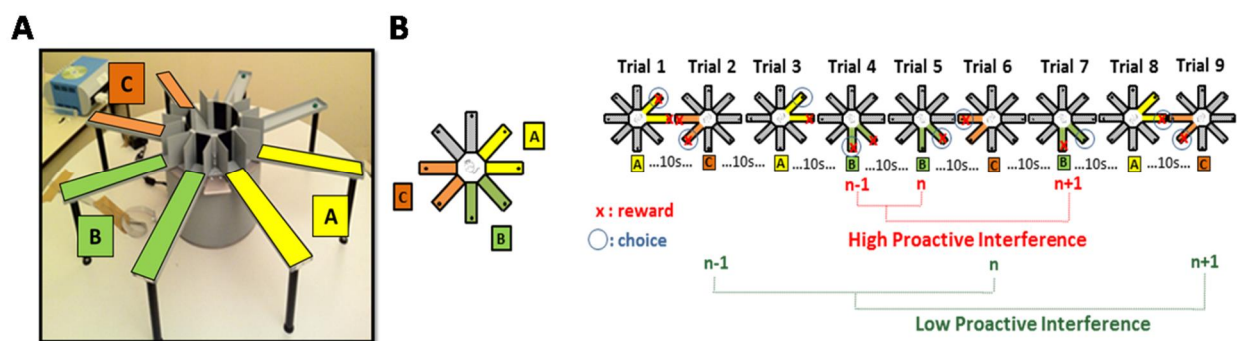


Figure 28 : Tâche de non-appariement retardé avec essais successifs en labyrinthe radial (Al Abed *et al.* 2016).

(A) Exemple de trois paires de bras (A-C) utilisées pour réaliser la tâche. (B) Exemple partiel d'une séquence d'essais avec illustration de présentations de paires successives et de choix de bras faits par la souris. Mise en évidence d'un essai soumis à haute interférence proactive (High Proactive Interference) et d'un essai soumis à faible interférence proactive (Low Proactive Interference).

Pour la réalisation de ce test, un deuxième jour d'habituation est réalisé avant la phase de test. Ainsi, le matin du 2^e jour d'habituation, les souris sont placées au centre du labyrinthe, portes fermées. Certaines portes sont alors ouvertes simultanément, de manière aléatoire, pendant que la souris se déplace sur le labyrinthe. Si la souris ne réussit pas à se déplacer normalement et rapidement sur le labyrinthe, à récupérer les récompenses ou bien à aller dans tous les bras du labyrinthe, une nouvelle session d'habituation est organisée durant l'après-midi du 2^e jour.

Durant la phase de test, les souris vont réaliser 23 essais par jour (configurations A, B et C de manière aléatoire). Les essais sont espacés de 10 secondes et l'expérience est réalisée pendant 15 jours. Durant un essai, la souris est placée au centre du dispositif. Toutes les portes permettant l'accès aux différents bras sont fermées. L'essai débute à l'ouverture d'une paire de deux bras adjacents du labyrinthe. La souris a alors le choix d'aller récupérer une récompense (20 μ L de saccharine 0,1%) dans un des deux bras du labyrinthe en s'aidant des indices de l'environnement.

- Au cours du premier essai de chaque paire, les deux bras de la paire sont appâtés, laissant le choix à la souris de débiter sa série de test par le bras désiré. Ces essais amorcent le démarrage de tous les autres essais.

- Au cours des essais suivants, la souris doit, ne plus retourner dans le bras de la paire précédemment visité, qui n'est alors plus appâté. Elle doit retenir le bras visité à l'essai n jusqu'à l'essai $n+1$ sans le confondre avec le bras visité à l'essai $n-1$. Elle doit ainsi mettre à jour l'information sur la position de la récompense, à chaque essai et pour chaque paire de bras.

- A la fin de l'essai, la souris retourne au centre du dispositif, 10 secondes sont alors décomptées avant l'ouverture d'une nouvelle paire de bras.

En cas d'échec à un essai (la souris choisit le même bras à l'essai $n-1$ et n), l'essai $n+1$ sera alors identique à n , jusqu'à ce que la souris parvienne à aller dans le bras appâté (Figure 28B).

Dans cette expérience, trois paramètres sont enregistrés :

- Le pourcentage d'essais réussis
- Le pourcentage d'essais réussis en fonction de l'intervalle de rétention (IT_n). L'intervalle de rétention correspond au nombre d'essais entre deux essais de la même paire de bras. L'intervalle est de 0 si deux essais successifs de la même paire se suivent. L'intervalle maximal est de 4. Il correspond à la présence de 4 essais interférents de paires différentes entre deux essais d'une même paire.
- Le pourcentage d'essais réussis en fonction de l'interférence proactive (PI). L'interférence proactive correspond à l'effet d'un essai précédent sur un nouveau qui présente certaines similitudes. Elle est déterminée en fonction de la proximité entre l'essai n et l'essai $n-1$ de la même paire qui interfère pro-activement. Plus l'intervalle de rétention entre les deux essais $n-1$ et n est petit, plus l'interférence générée à l'essai $n+1$ sera grande (= high interference, IT_n = 0/1). Au contraire, plus l'intervalle de rétention entre les deux essais $n-1$ et n est grand, plus l'interférence générée à l'essai $n+1$ sera faible (= low interference, IT_n = 2/3/4 ; Figure 28B)

Pour chaque souris, des enregistrements vidéos de tous les essais ont été effectués permettant de détecter et suivre le mouvement des animaux. Le temps mis pour aller chercher la récompense est comptabilisé, afin d'exclure la possibilité d'un manque de motivation. Au cours de cette expérience, on comptabilise également le pourcentage d'essais réussis, le pourcentage d'essais réussis en fonction de l'intervalle de rétention, ainsi que le pourcentage d'essais réussis en fonction de l'interférence proactive.

2.3. Séparation de pattern en reconnaissance d'objets:

Ce protocole, utilisé chez les souris *Rsk2*-KO (WT $n=10$ et *Rsk2*-KO $n=8$) et *Dp71*-KI (WT $n=17$ et *Dp71*-KI $n=14$), est basé sur celui de van Hagen *et al.* (2015). La boîte de test correspond à un open-field carré (50x50x50cm) avec des parois noires et un sol gris recouvert de sciure. Les

expériences sont menées sous une illumination homogène (inférieure à 50 lux). Le protocole commence par une période de 3 jours d'habituation au dispositif qui consiste en deux sessions de 4 minutes par jour espacées de 90 minutes. Durant chaque session, les souris sont individuellement placées dans la boîte de test. Au 4^e jour, deux objets identiques en plastique (petites boîtes rectangulaires en plastique) sont placés symétriquement sur une ligne horizontale dans l'arène, espacés de 16 cm. Les souris sont alors autorisées à les explorer pendant 5 minutes. La tâche de discrimination d'objets commence 24h après cette habituation et consiste en une seule session d'acquisition de 5 minutes avec deux nouveaux objets à explorer (2 petits tubes cylindriques en plastique ; Figure 29). Une heure après, l'acquisition est suivie d'un test de rétention d'une durée de 5 minutes dans lequel un des objets a été placé dans une nouvelle position. La nouvelle position est soit proche (6 cm) soit distante (12 cm) de la position précédente (Figure 29). Au cours des différentes étapes (habituation au dispositif, habituation aux objets, test), la distance parcourue, le temps passé au centre du dispositif, le nombre de redressements, le temps d'exploration et le nombre de contacts avec les objets ont été notés par l'expérimentateur en utilisant le système de vidéotracking. La performance durant la rétention a été exprimée en pourcentage de temps passé à explorer l'objet déplacé sur le temps total passé à explorer les deux objets.

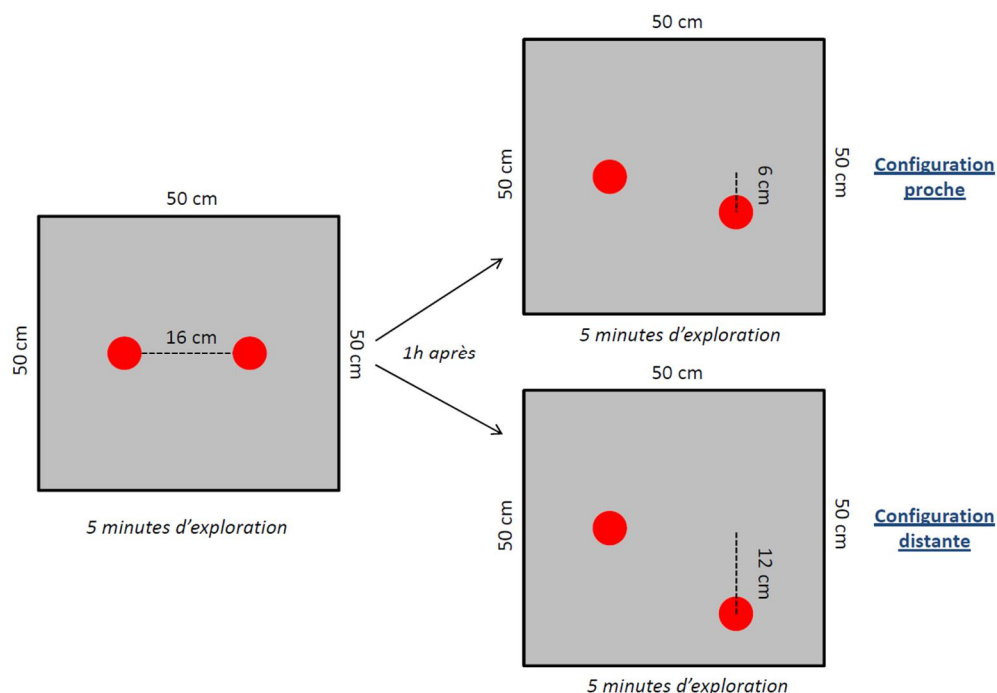


Figure 29 : Tâche de séparation de patterns selon un protocole de reconnaissance d'objets.

Les souris sont placées dans l'open-field et disposent de 5 minutes pour explorer leur environnement avec deux objets à explorer (en rouge sur le schéma). Une heure après, cette phase d'exposition est suivie d'un test de rétention d'une durée de 5 minutes dans lequel un des objets est déplacé dans une nouvelle position, soit proche (6 cm) soit distante (12 cm) de la position initiale.

III. Etude de la neurogenèse

3.1. Administration de la BrdU

Nous avons utilisé la méthode d'intégration de la 5-Bromo-2-deoxyUridine (BrdU), un analogue de la thymidine qui va s'intégrer à l'ADN durant la phase S du cycle cellulaire des cellules en division. La BrdU (Sigma B9285-1G) est diluée dans une solution de NaCl (10mg/mL) et NaOH (0,07N). Une fois intégrée à l'ADN, la BrdU pourra être détectée via des techniques d'immunohistochimie qui permettront de mettre en évidence les cellules néoformées au moment de l'injection. Afin d'étudier la neurogenèse hippocampique adulte et ses différentes phases, différents protocoles d'injections de BrdU, ainsi que différents délais ont été réalisés en fonction des modèles et de la question posée. Ces protocoles seront détaillés dans les différentes parties.

3.2. Perfusion intracardiaque et préparation des tissus

Les souris sont profondément anesthésiées avec une injection intra-péritonéale de pentobarbital (0,1%) puis perfusées en intracardiaque avec une solution contenant 4% de paraformaldehyde froid (PFA) dans 0,2 M phosphate buffer (PB). Les cerveaux sont disséqués et fixés toute la nuit dans cette solution de PFA à 4°C, puis transférés dans trois bains successifs de concentration croissante en sucrose (10%, 20%, 30%). Ils sont ensuite congelés à l'aide du 2-méthylbutane refroidi à -25 °C puis stockés à -20°C. Des sections coronales (40 µm) sont coupées au cryostat et conservées dans une solution cryoprotectante (AMARAL). L'étude de la neurogenèse hippocampique adulte a par la suite été réalisée sur coupes flottantes.

3.3. Immunohistochimie

La révélation des cellules BrdU⁺, ki67⁺ (marqueur endogène exprimé durant les phases G1, S1 G2 et M du cycle cellulaire), P-H3⁺ (Phospho Histone H3 ; marqueur des cellules prolifératives présentes dans la phase tardive de G2 et la phase M), Zif268⁺ (pour marquer les cellules activées) et NeuN⁺ (marqueur des neurones matures) a été réalisée. Afin de pouvoir observer le pic d'expression du gène immédiat précoce *zif268*, les souris ont été sacrifiées 90 minutes après la fin de la tâche comportementale.

Après plusieurs rinçages dans le PBS (phosphate buffer solution) et dans le PBS Triton X-100, les coupes sont immergées dans une solution de méthanol (10%) et H₂O₂ (10%) pour inactiver les peroxydases endogènes. Pour la révélation des cellules BrdU⁺, deux étapes supplémentaires sont réalisées : les coupes sont placées dans une solution d'Acide Chlorhydrique (HCl) 2N (30 minutes à 37°C) pour dénaturer les brins d'ADN et permettre aux sites antigéniques de devenir accessibles aux

anticorps, puis le pH des coupes est rendu neutre avec un bain d'acide borique (0,1M, 15 minutes, pH 8,5). Après avoir bloqué les sites antigéniques avec du sérum de chèvre (5%) les sections sont incubées toute la nuit à 4°C dans une solution d'anticorps primaire de rat anti-BrdU (1:400; OBT0030, AbD Serotec), ou de lapin anti-Ki67 (1/400, ab16667 (SP6), Abcam), ou de lapin anti-P-H3 (1/200, 9701, Cell Signalling), ou de lapin anti-Zif268 (1/100, (C-19):sc-189, Santa Cruz Biotechnology, inc) ou de souris anti-NeuN (1/100, (C-19):sc-189, Santa Cruz Biotechnology, inc). Le lendemain, les coupes sont ensuite incubées dans une solution d'anticorps secondaire (anti-rat biotinylé fait chez la chèvre (1/400; BA-9400, Eurobio), anti-lapin biotinylé fait chez la chèvre (1/400, BA-1000, Eurobio) ou de souris biotinylé fait chez la chèvre (1/400, BA-9200, Eurobio) pendant 1h30 à température ambiante. Après amplification grâce au VECTASTAIN® ABC kit (1/400; Elite Vector Labs) pendant 1h30, on effectue la révélation. Les coupes sont révélées dans une solution DAB (3,3- diaminobenzidine-tetrahydrochloride) pour obtenir un marquage noir des noyaux des cellules présentant de la BrdU, du ki67, du P-H3, du NeuN ou du Zif268. Les coupes sont ensuite montées sur lame et une fois sèches contre-colorées avec une solution de NuclearFastRed (vector) pour permettre de mettre en évidence la couche granulaire du GD de l'hippocampe. Les coupes sont ensuite déshydratées avec des bains successifs d'alcool de concentration croissante (70%, 90%, 100%) suivis de deux bains de Xylène. Pour finir, les lames sont montées sous lamelles avec le milieu de montage (Eukitt).

3.4. Immunofluorescence

Pour le double et triple marquage avec la BrdU, les coupes sont traitées comme mentionné ci-dessus (à l'exception de l'étape d'inactivation de la peroxydase) et incubées toute la nuit à 4°C dans une solution d'anticorps primaire. Plusieurs combinaisons d'anticorps ont été effectuées afin de réaliser ces doubles/triples marquages : rat anti-BrdU (1:400; OBT0030, AbD Serotec), guinea-pig anti-doublecortin (anti-DCX, 1/1000, AB2253, Millipore), souris anti-NeuN (1/600, MAB377, Millipore) lapin anti-Ki67 (1/400, ab16667 (SP6), Abcam), lapin anti-GFAP (1:1000; DAKO), lapin anti-Zif268 (1/100, (C-19):sc-189, Santa Cruz Biotechnology, inc), lapin anti-glutamate receptor 1 (GluR1; 1:200; Millipore), lapin anti-KCC2b (1:100; StressMarq Biosciences), souris anti-NKCC1 (1:1000; T4-c; DSHB). Les coupes sont ensuite incubées 1h30 à température ambiante dans une solution d'anticorps secondaire : anti-guinea pig alexaFluor®488 (1/400, A11073, Invitrogen), anti-souris alexaFluor®647 ou 488 (1/300, A21236, Invitrogen ; 1/300, Ab150117, Invitrogen), anti-lapin alexaFluor®488 (1/400, A11034, Invitrogen). Si besoin, les marquages BrdU et Zif268 ont été amplifiés en utilisant un anti-rat biotinylé fait chez la chèvre (1/400; BA-9400, Eurobio) et l'anti-lapin biotinylé fait chez la chèvre (1/400, BA-1000, Eurobio) respectivement. Puis une incubation de 1h30 dans une solution de streptavidin alexaFluor®488 ou alexaFluor®568 (1/1,000, D11223 et S11226 Invitrogen) a été réalisée. Pour finir, les lames sont montées sous lamelles avec le milieu de montage.

3.5. Quantification des cellules BrdU⁺ / Zif268⁺ / ki67⁺ et des cellules DCX⁺

Tous les comptages ont été réalisés par un seul expérimentateur, en aveugle. Les cellules marquées ont été comptées avec un microscope Olympus (BX60) couplé au logiciel d'analyse d'images (MercatorPro; ExploraNova®).

Les noyaux marqués par la BrdU, les cellules marquées par Zif268 ou par ki67, ainsi que les cellules DCX⁺ ont été comptées uniquement dans le DG dorsal de l'hippocampe (bregma -1,15mm à -3,30mm). Le comptage des noyaux marqués à la BrdU a été réalisé sur 6 coupes espacées de 240µm par animal et trois coupes par animal espacées de 480µm, pour le ki67⁺, Zif268⁺ et les cellules DCX⁺. À l'aide du logiciel, les contours du GD et des couches granulaires ont été tracés à l'objectif X10 afin de mesurer automatiquement les surfaces. Les volumes du GD et des couches granulaires sont estimés en multipliant la somme des surfaces délimitées par 240 ou 480. Les cellules marquées présentes dans la couche granulaire du GD sont comptabilisées de manière exhaustive à l'objectif X40 et multiplié par 6 ou 12. On obtient ainsi une densité de cellules marquées en divisant le nombre total de cellules comptées par le volume de la couche granulaire du GD (mm³).

3.6. Analyse et quantification des doubles et triples marquages :

Les sections ont été analysées en utilisant le système de Confocal Zeiss (LSM700).

a. Analyse des cellules BrdU⁺

Afin d'établir le pourcentage de cellules BrdU doublement marquées avec GFAP ou triplement marquées avec DCX / Ki67 / Zif268 / GluR1 / NKCC1 / KCC2b et le NeuN, quatre à six sections (espacées de 240µm) de toutes les souris ont été analysées. Les colocalisations ont été évaluées sur 100-125 cellules BrdU⁺ par groupe de souris en réalisant des stacks d'images et des reconstructions 3D afin de vérifier les doubles et triples marquages.

b. Analyse des cellules triplement marquées DCX⁺ Zif268⁺ NeuN⁺

Pour établir le pourcentage de cellules DCX positives triplement marquées avec Zif268 et NeuN huit stacks de 10µm sur 2 sections par souris ont été analysés au X40 (deux stacks par GD, les 2 sections sont espacées de 480µm). Le nombre de cellules DCX⁺/Zif268⁺/NeuN⁺ dans chaque stack a été compté manuellement. Au total, les colocalisations ont été évaluées sur 300-400 cellules DCX⁺ par groupe de souris.

c. Quantification des cellules NeuN⁺ et des cellules doublement marquées Zi268⁺/NeuN⁺

Sur les mêmes coupes, le pourcentage de cellules Zi268⁺/NeuN⁺ a été comptabilisé en réalisant 12 stacks de 6µm sur 2 sections par souris au X40 (six stacks sur un des deux GD, les 2 sections sont espacées de 480µm). Le nombre de cellules Zi268⁺, NeuN⁺ et Zi268⁺/NeuN⁺ dans chaque stack a été compté manuellement en utilisant le logiciel Image J (cells counters login) et moyenné par animal. Au total, les colocalisations ont été évaluées sur 3500 cellules NeuN⁺ par groupe de souris.

d. Analyses phénotypiques des cellules ki67⁺ BrdU⁺ âgés de 3 jours et DCX⁺:

Au moins 30 cellules (60 pour les cellules DCX⁺) ont été analysées par animal. Trois à six souris par génotype ont été analysées.

IV. Mesure des dendrites

La mesure des longueurs des dendrites a été réalisée chez les souris *Rsk2*-KO (WT n=5 et *Rsk2*-KO n=4), *Pak3*-R67C (WT n=4 et *Pak3*-R67C n=5), et *Dp71*-KI (WT n=4 et *Dp71*-KI n=4), à l'aide du logiciel Mercator. L'analyse a été effectuée à partir des neurones marqués à la DCX afin de visualiser les dendrites. Les neurones ont été mesurés à l'objectif X40 à partir de quatre rectangles de 250µm x 100µm (deux sur la couche supra et deux sur la couche infra) sur un gyrus denté d'un hippocampe par souris. Au total, 260 neurones ont été mesurés chez les souris *Rsk2*-KO, 240 chez les souris *Dp71*-KI et 170 chez les souris *Pak3*-R67C. Les tailles et le nombre d'intersections ont été additionnés pour chaque souris afin d'obtenir une somme pour chaque catégorie.

V. Analyses statistiques

Les tests statistiques sont effectués avec le logiciel STATVIEW (version 5.0). Pour analyser les données comportementales, des ANOVA (Analysis of variance) factorielles et des ANOVA à mesures répétées ont été effectuées. Des tests *t* de Student ont également permis d'analyser les données comportementales pour tester les performances en fonction de la chance. Pour l'analyse des données de comptage cellulaire, les valeurs obtenues ont été comparées à l'aide d'ANOVA factorielles. Pour toutes ces analyses, le seuil de significativité a été fixé à 0,05.

Résultats

I. Etude de la neurogenèse adulte et des fonctions cognitives associées, chez le modèle murin *Rsk2-KO*

Comme mentionné dans l'introduction, le syndrome de Coffin Lowry (CLS) est une forme rare de DI causée par des mutations du gène *rsk2* (ou *RPS6KA3*) qui code la protéine kinase RSK2, localisée dans la voie de signalisation MAPK/ERK (cf. Introduction III.3.1). Au niveau cellulaire, RSK2 contribue notamment au fonctionnement du cycle cellulaire, à l'apoptose, à la différenciation cellulaire et est impliquée dans la morphologie des épines dendritiques (pour revues, Romeo *et al.* 2012 ; Houles & Roux, 2017). Un rôle de RSK2 a également été mis en évidence dans la maturation cellulaire au cours du développement cérébral du cortex (Dugani *et al.* 2010 ; Ammar *et al.* 2013). Néanmoins, malgré une meilleure compréhension des mécanismes de signalisation cellulaire dans lesquels la kinase RSK2 pourrait être impliquée, encore peu de choses sont connues sur le rôle de RSK2 dans les fonctions neuronales *in vivo* et sur les mécanismes neuronaux sous-jacents au dysfonctionnement cognitif dans le CLS.

Des études antérieures menées en partie au laboratoire et basées sur le modèle murin *Rsk2-KO* ont rapporté des déficits d'apprentissage et de mémoire spatiale en piscine de Morris, ainsi que dans la consolidation et la reconsolidation de la mémoire de peur dépendante de l'hippocampe (Poirier *et al.* 2007 ; Davis *et al.* 2010 ; Morice *et al.* 2013). Compte tenu du rôle clé de la neurogenèse dans les fonctions mnésiques, nous avons alors suspecté de potentielles altérations de cet important mécanisme de plasticité du cerveau adulte.

Dans cette étude (article publié ci-joint), dont une partie a été amorcée durant la thèse de S. Lunion (2014), nous avons testé si l'absence de la protéine RSK2 affecte l'une des étapes clés de la neurogenèse basale en étudiant la dynamique de la neurogenèse : prolifération, différenciation, maturation et survie des nouveaux neurones dans l'hippocampe adulte des souris *Rsk2-KO in vivo*. Nous avons par la suite analysé l'impact de l'apprentissage spatial sur la neurogenèse adulte en absence de RSK2 depuis la prolifération des cellules progénitrices jusqu'au recrutement des nouvelles cellules par l'apprentissage. Enfin, nous avons également testé les performances des souris *Rsk2-KO* dans des tâches de séparation de patterns.

1.1. L'absence de RSK2 entraîne un retard de maturation des neurones immatures chez la souris *Rsk2*-KO sans affecter la prolifération et la survie neuronale

La première série d'expériences visait à évaluer l'impact de l'absence de la protéine RSK2 sur la prolifération et la survie des cellules nouvellement générées au sein du GD de l'hippocampe de souris adultes WT et *Rsk2*-KO à l'état basal. Aucune altération de la prolifération cellulaire n'a été observée grâce à l'étude des marqueurs Ki67 (marqueur des cellules prolifératives en phase G1, S, G2 et M du cycle cellulaire ; Figure 1A) et P-H3 (exprimé pendant les phases G2/M ; Figure supplémentaire 2B). Ce résultat est confirmé par l'étude de cellules BrdU⁺ âgées de 2h qui montre des densités similaires entre les souris WT et *Rsk2*-KO (Figure supplémentaire 2A). De même, l'étude de la survie cellulaire, par injections de la BrdU, n'a pas montré d'altération de cette étape à 2, 4 et 6 semaines post injections chez les souris *Rsk2*-KO (Figure 1H). Par la suite, compte tenu de deux études récentes qui montrent qu'au cours du développement, les neurones corticaux en culture de souris *Rsk2*-KO présentent un retard de croissance cellulaire (Ammar *et al.* 2013) et que les précurseurs neuronaux corticaux sont maintenus davantage au stade précurseur radial (Dugani *et al.* 2010), nous avons étudié plus précisément et spécifiquement la vitesse de maturation des nouveaux neurones chez les souris *Rsk2*-KO *in vivo*. En utilisant la co-expression de marqueurs spécifiques pour chaque stade, nous avons étudié le phénotype des cellules Ki67⁺ en utilisant le marqueur DCX qui s'exprime dans les cellules progénitrices intermédiaires tardives (type 2b et 3), ainsi que dans les neurones immatures (Figure 1B). Par rapport aux souris WT, les souris *Rsk2*-KO possèdent une proportion plus importante de cellules Ki67⁺ qui n'expriment pas la DCX (cellules de type 1 / type-2a) et par conséquent, beaucoup moins de cellules de type 2b et de type 3 (Figure 1B), ce qui suggère une maturation retardée dans les premiers stades de la prolifération chez les souris *Rsk2*-KO. Ce retard de maturation a été confirmé de plusieurs façons. L'étude du phénotype d'une population de cellules BrdU⁺ âgées de 3 jours montre que la proportion de cellules BrdU⁺ / Ki67⁺ / DCX⁻, est significativement plus importante chez les souris *Rsk2*-KO par rapport aux souris WT, signifiant que chez le modèle mutant, une proportion significative de nouvelles cellules a quitté le cycle cellulaire mais n'expriment pas encore la DCX (Figure 1C). D'autre part, en se focalisant uniquement sur les cellules neuronales immatures DCX⁺, nous montrons que la densité de cellules DCX⁺ dans le GD est plus importante chez les souris *Rsk2*-KO que chez les WT (Figure 1D). De plus, l'analyse du phénotype de ces cellules DCX⁺, montre que chez les souris *Rsk2*-KO une population significativement plus large de cellules DCX⁺ est sortie du cycle (Ki67⁺) mais n'exprime pas encore NeuN (Figure 1G), suggérant qu'en l'absence de RSK2, les nouveaux neurones sont maintenus plus longtemps dans un stade immature. Enfin, l'étude de la maturation neuronale, analysée grâce aux marqueurs DCX et NeuN, a montré que davantage de cellule BrdU⁺ âgées de 14 jours expriment le marqueur DCX chez les souris *Rsk2*-KO par rapport aux souris WT. De plus, bien qu'aucune différence significative ne soit observée entre les souris WT et *Rsk2*-KO, quelques cellules BrdU⁺ âgés de 42 jours expriment encore le

marqueur DCX chez les souris *Rsk2*-KO contrairement à celles des souris WT qui ne l'expriment plus (Figure 11). L'ensemble de ces résultats confirme la présence d'un retard de maturation dans les premiers stades de la neurogenèse adulte chez les souris mutantes *Rsk2*-KO sans affecter leur phénotype neuronal.

1.2. L'absence de RSK2 affecte l'effet de l'apprentissage spatial sur la régulation de la neurogenèse adulte dans le GD et altère le recrutement par l'apprentissage des neurones immatures et matures

Comme présenté dans l'introduction, des apprentissages dépendants de hippocampe sont souvent associés au recrutement de nouveaux neurones qui se trouvent dans leur période critique de maturation au moment de l'apprentissage (3-8 semaines) et permet leur survie à long terme (Kee *et al.* 2007 ; Trouche *et al.* 2009). Afin d'évaluer l'effet de l'apprentissage sur la neurogenèse adulte en l'absence de RSK2, nous avons soumis les souris à un apprentissage spatial en piscine de Morris. Les souris ont été préalablement injectées à la BrdU afin de cibler une population de cellules BrdU⁺ âgées d'environ 5 semaines au moment de l'apprentissage pour pouvoir analyser le recrutement de ces nouveaux neurones. Nous avons quantifié la prolifération et la survie des nouveaux neurones en analysant la densité de cellules Ki67⁺, DCX⁺ et des cellules BrdU⁺ âgés de 48-53 jours chez les souris WT et *Rsk2*-KO après le test de mémoire (WT-LEARN et KO-LEARN ; Figure 2A).

Comme montré précédemment (Poirier *et al.* 2007), les souris *Rsk2*-KO présentent un retard d'apprentissage spatial en piscine de Morris associé à un déficit de mémoire spatiale à long terme (24h ; Figures 2B-C-D). Au niveau cellulaire, l'apprentissage spatial selon nos conditions n'a eu aucun effet sur la prolifération des nouvelles cellules (cellules Ki67⁺ et DCX⁺) chez les souris WT-LEARN (Figures 2F-G). En revanche, chez les souris KO-LEARN, les densités de cellules Ki67⁺ et DCX⁺ sont significativement réduites en comparaison avec leurs contrôles sans comportement (Figures 2F-G). Bien que ces diminutions suite à l'apprentissage puisse être dues au stress connu pour avoir un effet négatif sur la neurogenèse hippocampique adulte (pour revue, Mirescu & Gould, 2006), il n'y a pour autant pas d'évidence que les souris *Rsk2*-KO présentent une plus haute sensibilité au stress que les souris WT (Poirier *et al.* 2007 ; Fisher *et al.* 2017). D'autre part, quelques études ont mis en évidence que l'apprentissage est un facteur pouvant entraîner l'apoptose de neurones les plus immatures (Döbrössy *et al.* 2003 ; Dupret *et al.* 2007). Compte tenu du retard de maturation observé chez les souris mutantes, davantage de jeunes cellules pourraient être dans une période de sensibilité plus précoce, ce qui expliquerait les diminutions observées.

Concernant la survie des cellules BrdU⁺ âgées de 48-53 jours, une augmentation de leur nombre a été mise en évidence chez les souris WT après l'apprentissage, en accord avec de nombreuses études (pour revues, Aasebø *et al.* 2011 ; Shors *et al.* 2012 ; Figure 2H). Cependant aucun effet positif de l'apprentissage n'a été observé chez les souris mutantes. Selon la littérature,

pendant les premières semaines après leur naissance, les nouvelles cellules présentent une excitabilité accrue et une plasticité élevée et leur survie dépend, au moins en partie, de leur recrutement pendant l'apprentissage (Schmidt-Hieber *et al.* 2004, Ge *et al.* 2007, Marín-Burgin *et al.* 2012). La plupart des données appuyant ce scénario ont suggéré que les nouveaux neurones recrutés par l'apprentissage seraient fonctionnellement intégrés dans les réseaux cortico-hippocampiques préexistants et sélectionnés de manière compétitive pour survivre (Kee *et al.* 2007, Snyder *et al.* 2009, Trouche *et al.* 2009 ; Veyrac *et al.* 2013). Nous avons donc fait l'hypothèse que l'absence d'effet pro-survie de l'apprentissage chez les souris *Rsk2*-KO pourrait être due à une altération du recrutement des nouveaux neurones. Pour tester cette hypothèse nous avons cartographié l'expression du gène immédiat précoce *Zif268* connu pour contrôler activement le recrutement et promouvoir la survie des nouveaux neurones durant leur période critique de maturation (Veyrac *et al.* 2013). L'analyse a été effectuée 90 minutes après le rappel mnésique dans trois types de cellules : les jeunes nouveaux neurones qui expriment DCX et NeuN, les neurones BrdU⁺ âgés de 48-53 jours et les neurones matures exprimant NeuN uniquement. Nos résultats montrent que chez les souris WT, *Zif268* est exprimé davantage par les cellules BrdU⁺ de 48-53 jours (7,4%), mais il est également exprimé par des neurones matures DCX⁻ / NeuN⁺ (3,7%) et par des jeunes neurones DCX⁺ / NeuN⁺ (1,4% ; Figure 3C-D-E). Pour les souris *Rsk2*-KO, la distribution est totalement différente. Premièrement, il n'y a pratiquement aucun jeune neurone qui exprime *Zif268* (*Zif268*⁺ / DCX⁺ / NeuN⁺) chez les souris *Rsk2*-KO alors qu'il y a tout de même une petite population qui est activée chez les souris WT (Figure 3C). Ainsi, chez les souris *Rsk2*-KO, la présence d'une maturation retardée des nouveaux neurones pendant la période durant laquelle ils sont censés exprimer *Zif268* pourrait bien être un facteur important expliquant l'altération de leur recrutement. Deuxièmement, alors que la proportion de cellules BrdU⁺ activée est identique entre les souris WT et *Rsk2*-KO, de manière surprenante la proportion de neurones matures est augmentée chez les souris *Rsk2*-KO comparé aux souris WT (Figure 3D-E). Si on considère que les défauts de neurogenèse sont en partie à l'origine des déficits cognitifs, alors, cela suggère que l'activation accrue des cellules matures préexistantes ne serait pas suffisante pour compenser le manque d'activation des nouvelles cellules. Sur le plan des mécanismes, cette suractivation pourrait être dû à la surexpression d'ERK1/2 dans l'hippocampe en l'absence de RSK2 (Schneider *et al.* 2011), l'expression de *Zif268* pouvant être directement contrôlée par ERK1/2 via plusieurs kinases et régulateurs transcriptionnels (Davis *et al.* 2000).

1.3. La fonction de séparation de patterns est altérée chez les souris *Rsk2*-KO

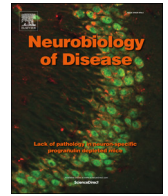
Compte tenu du rôle des nouveaux neurones dans la séparation de patterns, nous avons supposé que les altérations de la neurogenèse observées chez le modèle *Rsk2*-KO pourraient avoir des répercussions sur cette fonction et donc sur la capacité des souris *Rsk2*-KO à discriminer

finement des situations relativement proches. Nous avons testé cette fonction dans un paradigme expérimental s'inspirant de la tâche de reconnaissance d'objets (OPS task cf. Mat et Met II.2.3 ; van Hagen *et al.* 2015). Dans cette tâche, la nouvelle position de l'un des objets est plus ou moins éloignée de sa position initiale (configuration proche vs éloignée). Durant la phase de test, 1h après la première exposition, les souris WT passent significativement plus de temps à explorer l'objet déplacé dans les deux configurations, indiquant une bonne discrimination. En revanche, bien que les souris *Rsk2*-KO passent significativement plus de temps à explorer l'objet déplacé lorsqu'il est très éloigné de sa position initiale, elles n'explorent toutefois pas davantage l'objet déplacé en configuration proche. Cette altération de la discrimination spatiale a également été confirmée par des études menées précédemment au laboratoire dans une tâche de séparation de patterns en labyrinthe radial (thèse S. Lunion, 2014). Dans cette tâche, les performances des souris WT augmentent progressivement alors que celles des souris *Rsk2*-KO ne se différencient pas de la chance (50%), que ce soit dans la configuration simple ou dans la configuration difficile qui nécessite une discrimination fine. Ces résultats indiquent que les souris *Rsk2*-KO, dans cette tâche, présentent un déficit sévère de discrimination.

La réalisation de ces deux tâches comportementales confirme donc l'altération de la fonction de séparation de patterns chez les souris *Rsk2*-KO. Compte tenu de la contribution des nouveaux neurones à cette fonction, l'altération du recrutement des nouveaux neurones observée chez ces souris pourrait donc contribuer aux déficits de cette fonction. Cependant d'autres altérations physiologiques observées chez ce modèle, telles que la réduction de la transmission synaptique et de l'excitabilité, des conductances AMPA et NMDA et de la structure des synapses dans le GD pourraient également y contribuer (Morice *et al.* 2013).

En conclusion, cette étude révèle un rôle précédemment inconnu de la protéine RSK2 dans les premières étapes de la maturation neuronale au cours de la neurogenèse hippocampique adulte. En son absence, la dynamique de maturation, observée par l'expression de marqueurs neuronaux dans les nouvelles cellules, est retardée ce qui entraîne possiblement des répercussions pour le recrutement d'une population de nouveaux neurones lors de l'apprentissage et pourrait contribuer aux diverses altérations cognitives observées chez ce modèle. Ces altérations de la neurogenèse, associées à un déficit de discrimination fine des configurations spatiales relativement similaires, pourraient contribuer au dysfonctionnement cognitif observé dans le syndrome de Coffin-Lowry.

Article 1



Selective alteration of adult hippocampal neurogenesis and impaired spatial pattern separation performance in the RSK2-deficient mouse model of Coffin-Lowry syndrome

Charlotte Castillon^a, Steeve Lunion^a, Nathalie Desvignes^a, André Hanauer^b, Serge Laroche^a, Roseline Poirier^{a,*}

^a Paris-Saclay Neuroscience Institute, UMR 9197, CNRS, Univ. Paris-Sud, Univ. Paris-Saclay, F-91405 Orsay, France

^b Institute of Genetics and Molecular and Cellular Biology (IGBMC), CNRS/INSERM/University of Strasbourg, 67404 Illkirch, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Intellectual disability
Mental retardation
Coffin-Lowry
Adult neurogenesis
Pattern separation
Dentate gyrus
RSK2

ABSTRACT

Adult neurogenesis is involved in certain hippocampus-dependent cognitive functions and is linked to psychiatric diseases including intellectual disabilities. The Coffin-Lowry syndrome (CLS) is a developmental disorder caused by mutations in the *Rsk2* gene and characterized by intellectual disabilities associated with growth retardation. How RSK2-deficiency leads to cognitive dysfunctions in CLS is however poorly understood. Here, using *Rsk2* Knock-Out mice, we characterized the impact of RSK2 deficiency on adult hippocampal neurogenesis *in vivo*. We report that the absence of RSK2 does not affect basal proliferation, differentiation and survival of dentate gyrus adult-born neurons but alters the maturation progression of young immature newborn neurons. Moreover, when RSK2-deficient mice were submitted to spatial learning, in contrast to wild-type mice, proliferation of adult generated neurons was decreased and no pro-survival effect of learning was observed. Thus, learning failed to recruit a selective population of young newborn neurons in association with deficient long-term memory recall. Given the proposed role of the dentate gyrus and of adult-generated newborn neurons in hippocampal-dependent pattern separation function, we explored this function in a delayed non-matching to place task and in an object-place pattern separation task and report severe deficits in spatial pattern separation in *Rsk2*-KO mice. Together, this study reveals a previously unknown role for RSK2 in the early stages of maturation and learning-dependent involvement of adult-born dentate gyrus neurons. These alterations associated with a deficit in the ability of RSK2-deficient mice to finely discriminate relatively similar spatial configurations, may contribute to cognitive dysfunction in CLS.

1. Introduction

The Coffin-Lowry syndrome (CLS) is a rare X-linked genetic disorder in which patients suffer intellectual disability associated with facial and digit dysmorphisms and progressive skeletal malformations (Hanauer and Young, 2002; Pereira et al., 2010). Intellectual disabilities, though variable in severity, are prominent in male patients, with IQ scores ranging from moderate to profound (Pereira et al., 2010). As yet, there is no cure for this pathology. CLS is caused by mutations of the *RPS6KA3* gene, also called *Rsk2* (Trivier et al., 1996) that encodes the serine/threonine kinase RSK2 (p90 ribosomal S6 kinase 2). In neurons,

RSK2 acts at the distal end of the mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase (MAPK/ERK) cell-signalling pathway. In response to growth factors, polypeptide hormones, neurotransmitters, chemokines and other stimuli, ERK1/2 is activated and directly phosphorylates RSK2. Activated RSK2 can in turn phosphorylate several cytosolic and nuclear substrates, including ATF4, CREB, CBP, BAD, p53, histone H3, suggesting a potential role of RSK2 in various cellular processes such as cell-cycle progression, neuronal differentiation, cell survival and apoptosis (for a review, see Romeo et al., 2012).

Despite intensive research on RSK, the relationship between loss-of-

Abbreviations: AMPA, amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid; ATF4, activating transcription factor 4; BAD, Bcl-2-associated death promoter; CBP, CREB-binding protein; CLS, Coffin-Lowry syndrome; CREB, cAMP-response element binding protein; DG, dentate gyrus; DGC, dentate granule cell; ERK, extracellular signal-regulated kinase; GluR, glutamate receptor; IEG, immediate early gene; IGF1, insulin like growth factor 1; IQ, intellectual quotient; ID, intellectual disability; ITI, inter-trial interval; LTP, long-term potentiation; MRI, magnetic resonance imaging; NMDA, N-methyl-D-aspartate; OPS, object pattern separation task; Rsk2, 90-kDa ribosomal S6 kinase 2; WT, wild-type

* Correspondence to: R. Poirier, Paris Saclay Neuroscience Institute, UMR9197, CNRS, University Paris-Sud, Bât. 446, F-91405 Orsay, France.

E-mail address: roseline.poirier@u-psud.fr (R. Poirier).

<https://doi.org/10.1016/j.nbd.2018.04.007>

Received 31 October 2017; Received in revised form 7 March 2018; Accepted 4 April 2018

Available online 06 April 2018

0969-9961/ © 2018 Elsevier Inc. All rights reserved.

function mutations in the *Rsk2* gene and cognitive deficits in CLS patients remains poorly understood. In some CLS patients, morphometric brain magnetic resonance imaging (MRI) showed a reduced total brain volume, and in particular reduced cerebellar and hippocampal volumes in three clinical cases (Kesler et al., 2007). CLS mouse model (*Rsk2* Knock-Out, *Rsk2*-KO) show no gross anatomical or histological brain abnormalities, however, *Rsk2*-KO mice display cognitive deficits, in particular spatial learning and memory deficits (Poirier et al., 2007; Davis et al., 2010; Darcq et al., 2011) and in the consolidation and reconsolidation of hippocampal-dependent fear memories (Morice et al., 2013), a profile of behavioural deficits indicative of hippocampal dysfunction, a brain structure within which RSK2 is expressed (Zeniou et al., 2002). Consistent with this, we previously identified several functional and structural neuronal alterations in the hippocampus of *Rsk2*-KO mice, including impaired synaptic transmission despite normal *in vivo* LTP, decreased excitability, reduced AMPA and NMDA conductances in the dentate gyrus (DG), and altered excitatory synapse morphology (Morice et al., 2013). Furthermore, Mehmood et al. (2011) showed that the expression of several genes encoding proteins implicated in cell differentiation, cell death or gene expression was altered in the hippocampus of *Rsk2*-KO mice. Interestingly, they also found an increased expression of GluA2 and a 25% reduction in basal AMPAR-mediated transmission in the hippocampus of *Rsk2*-KO mice. Taken together, these alterations in hippocampal neuronal functions may be one causal mechanism underlying some of the cognitive deficits in CLS.

Among neuronal plasticity mechanisms potentially underlying cognitive deficiencies, increasing evidence from several models of intellectual disabilities suggests an important involvement of adult hippocampal neurogenesis (for reviews, see Pons-Espinal et al., 2013; Bowers and Jessberger, 2016), a form of plasticity that plays a key role in hippocampal-dependent cognitive functions. Whether this is also the case for CLS is not known. However, a few studies have shown that RSK2 knockdown in isolated murine embryonic cortical precursors *in vitro* decreases differentiation of cortical radial precursors into neurons (Dugani et al., 2010) and that RSK2 seemed to be essential for neurite outgrowth in cultured cortical neurons (Ammar et al., 2013). Moreover, RSK2 depletion was recently found to affect the stability and distribution of mitotic spindles and delay mitotic progression in HeLa cells (Park et al., 2016). These data raise the issue as to whether hippocampal-dependent memory deficits in *Rsk2*-KO mice may in part be because of altered adult hippocampal neurogenesis, but the potential role of RSK2 in hippocampal neurogenesis in the adult *in vivo* has not as yet been examined.

In hippocampus, new neurons are continuously generated in the subgranular zone of the dentate gyrus, giving rise to new dentate gyrus granule cells (DGs) throughout life. Several extrinsic and intrinsic cell-signalling factors can regulate adult neurogenesis and influence the destiny of newborn cells, promoting either their death (for the majority) or their survival and integration into pre-existing cortico-hippocampal networks (for a review, Aimone et al., 2014). Some factors such as enriched environmental living conditions or voluntary physical exercise can enhance survival of adult born neurons, while stress is one known factor having a negative impact on hippocampal neurogenesis. To date, empirical evidence also shows that hippocampal-dependent learning can increase survival of newly born neurons, principally those that are during their critical period of maturation (\approx 3–8 weeks after their birth) at the time of learning (Aasebø et al., 2011; Kim et al., 2011; Epp et al., 2013; Veyrac et al., 2013).

At present, there is strong evidence indicating that adult newborn neurons in their critical maturation stage can be recruited by learning, integrated into existing networks and play an important role in hippocampal-dependent forms of memory (recently reviewed in Aimone et al., 2014; Gonçalves et al., 2016; Anacker and Hen, 2017). Numerous studies show that ablation or reduction of adult neurogenesis leads to deficits in hippocampal-dependent learning and memory tasks and that, in the adult, there is a positive correlation between higher levels of

adult neurogenesis and memory performance (for reviews, Castilla-Ortega et al., 2011; Marín-Burgin and Schinder, 2012). In addition, adult neurogenesis has been established as a critical contributor of hippocampal pattern separation, a function that serves the separate encoding and fine discriminability of relatively similar or related events (Rolls, 2013) and which involves the dentate gyrus (McHugh et al., 2007; Berron et al., 2016). For instance, mice with ablated neurogenesis show spatial memory deficits in a delayed non-matching to place task in the radial maze when arms to be discriminated are close to each other (Clelland et al., 2009), whereas mice with increased adult hippocampal neurogenesis perform more efficiently in contextual fear-discrimination learning (Sahay et al., 2011) and in a spatial pattern separation tasks (Creer et al., 2010). Further, using a transgenic mouse in which the output of old newborn neurons were specifically inhibited while those of younger ones were intact, Nakashiba et al. (2012) demonstrated that pattern separation requires mainly young newborn neurons (up to 3–4 weeks old).

Here, we therefore set out to determine whether alterations in adult hippocampal neurogenesis contribute to the learning and memory deficits caused by RSK2 loss-of-function. We first examined whether RSK2 loss-of-function affects any of the key steps of basal adult hippocampal neurogenesis by assessing progenitor cell proliferation, differentiation, neuronal maturation, and survival of adult hippocampal newborn neurons in the *Rsk2*-KO mouse model of CLS. We then explored neurogenesis in relation to spatial learning and memory by analysing the effect of RSK2 loss on the proliferation, neuronal survival and recruitment of newborn hippocampal neurons by learning. Finally, guided by our results showing selective alterations in adult neurogenesis in *Rsk2*-KO mice, we examined their performance in spatial pattern separation tasks known to engage adult hippocampal neurogenesis.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Rsk2 knockout mice (C57BL/6 background) were generated and genotyped as previously described (Yang et al., 2004). Wild Type (WT) and *Rsk2*-KO mice used in this study were from the same littermates. All experiments were performed using only males that were 3–5-month-old. After weaning, mice were housed two to five per cage, kept on a 12 h light/dark schedule ($21 \pm 1^\circ\text{C}$ and $25 \pm 5\%$ humidity) with food and water available *ad libitum*, except during the delayed non-matching to place experiment. Five days before experimental procedures, all mice were handled 1–2 min each day. All experiments were performed at $21 \pm 1^\circ\text{C}$, $25 \pm 5\%$ humidity, between 9:00 a.m. and 6:00 p.m. Experimental procedures were conducted in accordance with the guidelines established by the European Communities Council Directive (2010/63/EU Council Directive Decree) and the ethical committee Paris-Sud and Centre (CEEA N°59). All efforts were made to reduce the number of mice used and to minimize their suffering.

2.2. Experimental procedures

2.2.1. Experiment 1

In this first experiment, we analysed basal proliferation, several steps of neuronal maturation and survival of adult newborn neurons in *Rsk2*-KO mice. To label proliferating cells and their first steps of development, WT and *Rsk2*-KO mice received a single injection of 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU, 150 mg/kg, i.p., Sigma) dissolved in 0.9% NaCl (10 mg/ml), following the protocol from Mandyam et al. (2007). Two hours (4 WT and 5 *Rsk2*-KO), and three days (5 WT and 6 *Rsk2*-KO) after the injection, mice were perfused and their brains collected. To study basal cell survival, each mouse received two injections per day of BrdU (50 mg/kg, i.p., Sigma) dissolved in 0.9% NaCl (10 mg/ml) for three days (total six injections). *Rsk2*-KO and WT mice were perfused 14, 28 or 42 days later (5 WT and 5 *Rsk2*-KO mice per time

point).

2.2.2. Experiment 2

In this experiment, we studied the effects of spatial learning on proliferation and survival of adult born neurons, using a water maze (WM) task, a paradigm for which we have previously shown delayed spatial learning and deficient spatial memory in *Rsk2*-KO mice (Poirier et al., 2007). In the present study, we specifically evaluated the effect of learning on the different stages of neurogenesis and on the recruitment of adult newborn neurons following recall of spatial memory. WT ($n = 19$) and *Rsk2*-KO ($n = 17$) mice received two injections per day of BrdU (100 mg/kg) for five days. Forty days after the last injection, 11 WT and 9 *Rsk2*-KO mice were submitted to spatial learning in a water maze for 8 days. All animals were sacrificed 90 min after two successive probe tests, 3 min apart, 24 h after training. One group of control mice with no training but transported to the WM room each day (CTL-T: transport-control mice; 8 WT and 8 *Rsk2*-KO) was perfused the same day as trained mice. We used expression of the immediate early gene (IEG), *Zif268*, to examine activation of newborn immature and mature neurons following the spatial memory test.

2.2.3. Experiment 3

In this experiment, we investigated performance of WT and *Rsk2*-KO mice in behavioural tasks involving pattern separation function. One group of mice (11 WT and 8 *Rsk2*-KO) was trained in a delayed non-matching to place task. A second group of mice (10 WT and 8 *Rsk2*-KO) was trained in an object location recognition task.

2.3. Behavioural procedures

2.3.1. Spatial memory

Water maze training was conducted as in Poirier et al. (2007). The maze consisted of a circular tank (150 cm in diameter) filled with opaque water (22 °C) to 15 cm below the top of the sidewall. An invisible circular platform (10 cm in diameter) was placed 0.5 cm below the water surface. The maze was placed in a room (380 lx) containing several different cues on the walls. A video camera above the maze was connected to a computer to record swim paths. The day before training, mice were given 2 habituation sessions (4 trials each). At the beginning, the mouse had to stay on the platform placed in the centre of the tank during 60 s. Then, the mouse was introduced into the maze, at one of the four starting points and it was guided by hand to the platform and remained on it for 60 s before the next trial. During the training phase, mice were given two blocks, 4 h apart, of four trials a day for 7 days. For the training session, the platform was placed in the centre of a quadrant (35 cm from the walls). At each trial, the mouse was introduced into the maze, facing the wall at a starting point and allowed to swim freely until it reached the platform with a maximum time of 90 s. The mouse remained 60 s on the platform before the next trial. If the mouse failed to find the platform, it was guided to it. 24 h after the last learning trial, mice were given probe tests. The platform was removed and mice were allowed to swim for 90 s. All trials were recorded with an image tracking system (ANY-maze™, Stoelting). Latencies and swim paths lengths to find the platform, swimming speed, percentage of time spent in periphery and in each quadrant of the water maze were analysed. Probe test performance was evaluated by calculating the percentage of time spent in the target quadrant.

2.3.2. Spatial pattern separation

To explore the capacity for spatial pattern separation, we used two different behavioural tasks. First, we used a delayed non-matching to place task in a radial maze, adapting the protocol described by Clelland et al. (2009). The apparatus consisted of eight arms (35 cm long, 5.5 cm wide, black plastic) with no sidewalls, extending from an octagonal central platform (diameter 16 cm). The maze was placed on a round table in a dimly lit room (80 lx) rich in extra-maze cues positioned on

the walls. Small plastic cups (diameter 1 cm, 0.5 cm deep) at the end of each arm allowed the mice to obtain a reward. We used 40 µl of diluted concentrated milk as reward. One week prior to testing and during the task, mice were placed on a water-restriction regime with access to water for 15 min/day. Mice were habituated to the maze two days before testing (two 5-min sessions, all arms baited). The testing procedure consisted in 4 trials per day during 10 days. Each trial included a sample phase followed by a choice phase (Fig. 4A). During sample phase, two arms were opened: the start arm and the arm that contained a reward. The mouse was placed at the extremity of the start arm and allowed to search the bait for a maximum of 180 s. As soon as the reward was consumed, the mouse was replaced in its home cage for 20–30 s and the maze was cleaned with absolute ethanol. The choice phase occurred immediately after cleaning. For this phase, a supplementary arm was opened and the reward was placed at the extremity of this new arm. The previously baited arm remained opened. The mouse was introduced into the maze at the extremity of the same start arm, and had to choose between the previously baited location and the new baited location. The previously baited and newly baited arms were separated either by only one arm (close arms configuration/angle of 90°) or separated by three arms (distant arms configuration/angle of 180°). Each day, mice were submitted, at random, to 2 trials in close arms configuration, and 2 trials in distant arms configuration. The start arm was changed at each trial. We considered a correct choice when mice visited directly the baited arm. Mice that made incorrect choices were allowed to self-correct only the first two days of the task. Each day, for both genotypes, we analysed the percent correct choice in close and distant arms configurations.

In a second task, we adapted the object pattern separation (OPS) task described in van Hagen et al. (2015). The test box, equipped with a video camera, consisted of a square open-field (50 × 50 × 50 cm) with black walls and a grey floor covered with sawdust. Experiments were undertaken under homogeneous dim illumination (< 50 lx). The testing procedure started with a 3-day period of habituation consisting of two daily sessions of 4 min separated by a 90-min delay. On each session, mice were individually exposed to the open-field and allowed to move freely for 4 min. On day 4, two identical plastic objects (small plastic rectangular boxes) were placed symmetrically, 16 cm apart on a virtual horizontal line in the arena. Mice were allowed to explore for 5 min. The object discrimination task started 24 h after this habituation and consisted of a single acquisition session of 5 min with 2 novel objects to explore (2 small cylindrical plastic tubes 3.5 cm diameter - 7 cm high), followed by a 5-min retention test 1 h later in which one of the 2 identical objects was moved to a novel position (Fig. 4B). The novel position was either close (6 cm) or distant (12 cm) from the previous position. Two days later, using a different set of objects (2 yellow Lego® pieces 3 cm diameter - 6 cm high), the mice were submitted to a second session of acquisition followed by a retention test. The novel position of the object during the test phase was counterbalanced among individuals and genotypes, and each mouse was successively tested on each novel position of the object (close versus distant position). The exploration time of each object was scored by the experimenter using an image tracking system (ANY-maze™, Stoelting). Retention performance was expressed as the percent time spent exploring the displaced object over the total time spent exploring the two objects.

2.4. Tissue preparation

In experiments 1 and 2, mice were deeply anesthetized with pentobarbital and perfused intracardially with cold phosphate-buffered saline (PBS) followed by cold 4% paraformaldehyde (PFA). Brains were dissected and post-fixed in 4% PFA for 24 h and cryoprotected in 30% sucrose solution. Serial coronal sections (40 µm) were cut through the rostrocaudal extent of the hippocampus using a cryostat and stored in tissue cryoprotectant solution at -20 °C before immunohistochemistry or immunofluorescence.

2.5. Immunohistochemistry/immunofluorescence

Cell proliferation, maturation, survival and activated cells were identified based on their expression of specific markers. For proliferation, in addition to BrdU labelling, we used Ki67, an endogenous marker expressed during G1, S, G2 and M cell-cycle phases and phospho-H3 (P-H3) labelling to discriminate proliferating cells in either the late G2 or M phases. For neuronal maturation, we used DCX which is expressed in type-2b/type-3 progenitor cells and young immature neurons, and NeuN expressed in mature neurons. The activation of the cells was analysed using co-expression of the IEG, Zif268.

For immunohistochemistry, after several rinses in PBS, free floating sections were quenched in 0.3% H₂O₂ in 0.1 M PBS/CH₃OH (1:1) for 15 min at room temperature. Sections were then washed and blocked in 5% normal goat serum in 0.1 M PBS with 0.5% Triton X-100 for 1 h at room temperature. Incubation in the primary antibody was performed at room temperature overnight. The primary antibodies were: rabbit anti-Ki67 (1/400, ab16667 (SP6), Abcam), rabbit anti-P-H3 (1/200, 9701, Cell signalling) and guinea pig anti-DCX antibody (1/1000, AB2253, Millipore). For BrdU immunohistochemistry, sections were previously treated with 2 N HCl at 37 °C for 30 min followed by 15 min in boric acid. We used a rat anti-BrdU antibody overnight (1/400, OBT0030, AbD Serotec). The next day, sections were washed and incubated for 90 min at room temperature with the corresponding secondary antibody: biotinylated goat anti-rat antibody (1/400, BA-9400, Eurobio), biotinylated goat anti-rabbit antibody (1/400, BA-1000, Eurobio) or biotinylated goat anti-guinea pig antibody (1/400, 16-17-06, Eurobio). After rinses, sections were treated with avidin-biotin peroxidase complex (ABC Elite Vector Labs) followed by a 3,3' diaminobenzidine as a substrate for staining (Sigma). Finally, slides were counterstained using Nuclear Fast Red.

The phenotype of cycling proliferative cells (Ki67⁺ cells) or immature neurons (DCX⁺ cells) or BrdU⁺ cells were performed by immunofluorescence co-labelling. The activation of DCX⁺ or BrdU⁺ cells was determined by DCX/Zif268 and BrdU/Zif268 co-labelling. In general, after several washes with PBS and PBS-T, the sections were incubated overnight in the appropriate primary antibodies and, after several washes, sections were incubated for 90 min in the secondary antibodies. The primary antibodies used were rabbit anti-Ki67 (1/400, ab16667 (SP6), Abcam), guinea pig anti-DCX antibody (1/1000, AB2253, Millipore), rat anti-BrdU (1/400, OBT0030, AbD Serotec), rabbit anti-Zif268 (1/100, (C-19):sc-189, Santa Cruz Biotechnology, Inc.) and mouse anti-NeuN antibody (1/600, MAB377, Millipore) antibodies. The secondary antibodies were the anti-rabbit alexaFluor[®] 488 (1/400, A11034, Invitrogen), anti-guinea pig alexaFluor[®] 488 (1/400, A11073, Invitrogen), anti-guinea pig alexaFluor[®] 568 (1/400, A11075, Invitrogen), anti-mouse alexaFluor[®] 647 (1/300, A21236, Invitrogen). If necessary, BrdU and Zif268 labelling were amplified using goat biotinylated anti-rat (1/400, BA-9400, Eurobio) or goat biotinylated anti-rabbit (1/400, BA-1000, Eurobio) and then streptavidin alexaFluor[®] 568 (1/1000; S11226, Invitrogen) or streptavidin alexaFluor[®] 488 (1/1000; S11223, Invitrogen). Sections were mounted in Vectashield medium (Vector labs).

2.6. Quantification and image analyses

For all experiments, the investigator was blind to the genotype. For total BrdU⁺, Ki67⁺, P-H3⁺ or DCX⁺ cell counts, we used a BX60 Olympus microscope at ×400 magnification. Every sixth (for BrdU⁺ cells) or twelfth (for Ki67⁺, P-H3⁺ or DCX⁺ cells) sections throughout the dorsal hippocampus (stereotaxic coordinates: −1.20 to −2.30 relative to bregma according to Paxinos' brain atlas) were analysed. The surface area of the dorsal hippocampus, dentate gyrus and the granular cell layer were traced in mapping software (Mercator Pro, Explora Nova), objective ×10. The volume was determined by multiplying the surface area by the distance between sections (240 μm or 480 μm).

Densities of BrdU⁺, Ki67⁺, P-H3⁺, DCX⁺ cells were estimated by multiplying the total number of labelled cells by 6 or by 12. Four to seven mice per group were used for these analyses.

2.7. Phenotypic analyses

All co-localizations were analysed using confocal microscopy (LSM 700, Zeiss) with a ×40 objective, by performing z-stack acquisitions and 3D reconstructions to univocally verify double/triple labelling. All acquisitions were carried out in sequential scanning mode to prevent cross-bleeding between channels. For Ki67⁺ cells, 3 day-old BrdU⁺ cells and DCX⁺ cells phenotypes, at least 30 cells (60 cells for DCX⁺ cells) were analysed per animal. Four to six mice per genotype were used. For neuronal maturation study, we calculated the percentage of BrdU⁺ cells co-labelled with DCX and/or NeuN on 4–6 sections (240-μm spacing). Co-localizations were analysed in 100–125 BrdU⁺ cells per group of mice.

To analyse neuronal activation post-recall, we established the percentage of DCX⁺ cells triple-labelled with Zif268 and NeuN in eight 10 μm stacks in 2 serial sections per mouse (two from each DG, 480-μm spacing) collected at ×40 magnification. The number of DCX⁺/NeuN⁺/Zif268⁺ cells in each stack was counted manually. In total, co-localizations were evaluated on 300–400 DCX⁺ cells per group of mice. Second, we estimated the percentage of BrdU⁺ cells expressing Zif268 in 100–125 BrdU⁺ cells per group of mice (4–6 sections, 240-μm spacing). Third, for quantification of granule cell number in the dentate gyrus (NeuN⁺ cells) and the percentage of activated NeuN⁺ cells (NeuN⁺/Zif268⁺ cells), twelve different square areas of 960 μm² (160 μm × 6 μm) were traced on two sections (480-μm spacing). The number of NeuN⁺ and NeuN⁺/Zif268⁺ cells in each square area was counted manually using Image J software (cells counters login) and summed per animal.

2.8. Statistical analyses

Data were expressed as means ± S.E.M. They were analysed by one-way or repeated measures ANOVA and one sample *t*-tests using StatView 5.0 software. Significance level was set at 0.05 for all analyses.

3. Results

Our morphological analyses showed that the volume of the hippocampus, of the dentate gyrus and the volume of the granule cell layer were comparable in WT and *Rsk2*-KO mice (Supplementary data: Fig. 1). The mean number of mature neurons (NeuN⁺ cells) in selected zones of the DG was also similar (WT: 1872.5 ± 29.93 NeuN⁺ cells; *Rsk2*-KO: 1814.75 ± 41.37 NeuN⁺ cells, factorial ANOVA, *F*(1,6) = 1.279; NS).

3.1. Normal proliferation and survival rates of DG newborn neurons, but altered maturation dynamics in the early stages of neurogenesis in *Rsk2*-KO mice

To investigate whether RSK2 has a role in adult hippocampal neurogenesis, we examined the developmental stages of adult-generated DG newborn neurons in WT and *Rsk2*-KO mice. First, to assess progenitor cell proliferation, we used immunolabelling for Ki67, a marker of proliferating cells expressed during the G1, S and G2 phases. We found similar densities of proliferating Ki67⁺ cells in WT and *Rsk2*-KO mice (Fig. 1A; factorial ANOVA, *F*(1,7) = 0.764; NS), suggesting no alteration in the rate of cell proliferation in DG from adult *Rsk2*-KO mice. This was confirmed in another group of mice from both genotypes injected with BrdU and perfused 2 h later. *Rsk2*-KO mice showed similar densities of BrdU⁺ cells compared to WT mice (Supplementary data: Fig. 2A; factorial ANOVA, *F*(1,7) = 0.058; NS). Finally, as RSK2 was

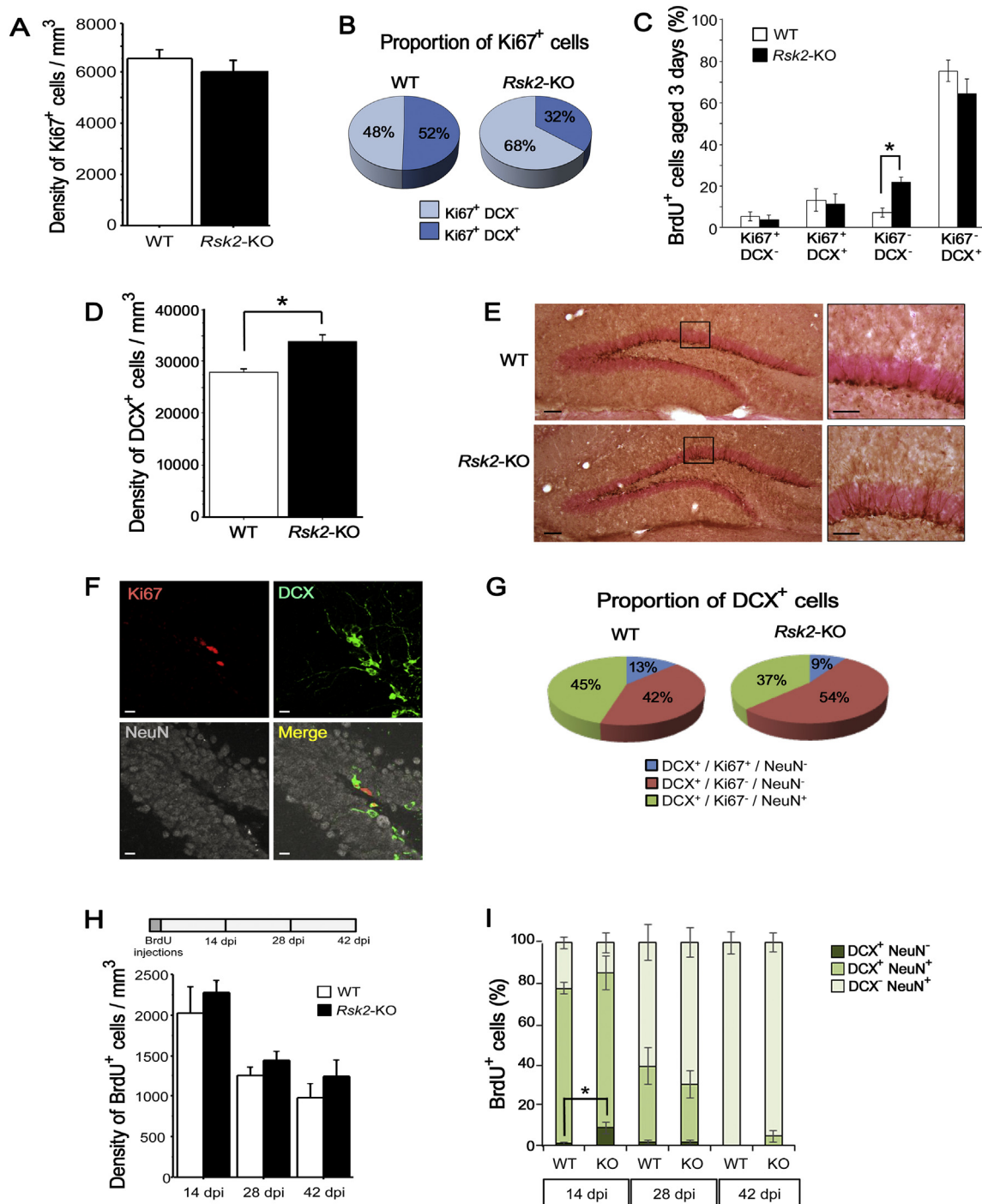


Fig. 1. Effect of RSK2-deficiency on proliferation, survival and neuronal maturation of adult-generated cells in the DG. (A) Density of Ki67⁺ cells in DG from WT and *Rsk2*-KO mice. (B) Proportion of Ki67⁺ cells expressing DCX or not in WT and *Rsk2*-KO mice. (C) Proportion of BrdU⁺ cells aged 3 days expressing Ki67 and/or DCX in WT and *Rsk2*-KO mice. (D) Densities of DCX⁺ cells in granule cell layers from adult dorsal dentate gyrus in WT and *Rsk2*-KO mice. (E) Representative microphotographs illustrating DCX labelling in the DG of WT (top) and *Rsk2*-KO mice (bottom, scale bar = 100 μm). Enlarged images corresponding to the box are shown on the right (scale bar = 50 μm). (F) Representative confocal images of neurons expressing Ki67, DCX and NeuN in the DG (scale bar = 10 μm). (G) Proportion of DCX⁺ cells expressing Ki67 and/or NeuN in WT and *Rsk2*-KO mice. (H) Schematic time-line for the study of adult newborn cells survival (top) and densities of BrdU⁺ cells 14, 28 and 42 days after BrdU injections (dpi) in WT and *Rsk2*-KO mice (bottom). (I) Percent of BrdU⁺ cells expressing DCX and/or NeuN at 14, 28 and 42 dpi in WT and *Rsk2*-KO mice. Error bars represent ± S.E.M. * indicates significant differences.

reported to phosphorylate histone H3 (Sassone-Corsi et al., 1999; Cho et al., 2005), we analysed immunolabelling for P-H3, a marker of proliferating cells in G2 or M phases of the cell cycle, and also observed similar densities of P-H3 labelled cells *in vivo* (Supplementary data: Fig. 2B; factorial ANOVA, $F(1,7) = 0.021$; NS). Together, these results show that, in basal conditions, loss of RSK2 does not affect the rate of

production of proliferative cells in the adult DG *in vivo*.

As a role for RSK2 has been reported in differentiation of cortical radial precursors into neurons during development (Dugani et al., 2010), we examined several developmental stages of adult newborn cells using the co-expression of stage-specific markers (for review, see Kempermann et al., 2015). Briefly, the adult DG contains a quiescent

pool of neural stem cells (NSCs or type-1 cells) which, once activated, enter the cell cycle and give rise to three identifiable intermediate progenitor cells (type-2a, 2b and 3) associated with high proliferative activity. Once adult newborn cells become restricted to a neuronal lineage, they express doublecortin (DCX), migrate into the granule cell layer and differentiate into mature DGCs. Using Ki67 to detect dividing NSCs and progenitor cells, and DCX expressed in late intermediate progenitor cells (type-2b and 3) and immature neurons, we determined the proportion of active proliferative Ki67⁺ cells that expressed or not DCX (Fig. 1B). In *Rsk2*-KO mice, we found significantly more Ki67⁺ cells that do not express DCX (type-1/type-2a cells) compared to WT mice (Fig. 1B; WT: $47.74 \pm 3.69\%$; *Rsk2*-KO: $67.54 \pm 4.23\%$; factorial ANOVA, $F(1,6) = 12.40$; $p = 0.012$) and, consequently, significantly less type-2b and type-3 cells. These results suggest a delayed maturation among the population of proliferative cells in *Rsk2*-KO mice. To confirm this point, we injected WT and *Rsk2*-KO mice with BrdU (integrated during S phase) and analysed the phenotype of BrdU⁺ cells aged 3 days using both Ki67 to determine the proportion of these cells still in the active cell cycle and DCX to determine the percentage of 3-day-old BrdU⁺ cells committed towards a neuronal phenotype. Our results showed that, at 3 days of age, the proportion of adult newborn BrdU⁺ cells still expressing Ki67, with or without DCX, was small and similar in both genotypes (Fig. 1C; factorial ANOVA, $Ki67^+/DCX^-$: $F(1,9) = 0.228$; NS; $Ki67^+/DCX^+$: $F(1,9) = 0.062$; NS), suggesting that the majority of 3-day-old cells have exited the cell-cycle without apparent delay in absence of RSK2. Once out of the cycle, the number of 3-day-old BrdU⁺ cells expressing DCX was not significantly different between genotypes (Fig. 1C; factorial ANOVA, $Ki67^-/DCX^+$: $F(1,9) = 1.461$; NS). However, in *Rsk2*-KO mice, a significant proportion of 3-day-old DG newborn cells had exited the cell cycle but do not express DCX (BrdU⁺/ $Ki67^-/DCX^-$ cells) compared to WT mice (Fig. 1C; factorial ANOVA, $F(1,9) = 17.416$; $p = 0.0024$). This population of cells aged of 3 days may have returned to a quiescent state and contribute to the delay in time of neuronal maturation, suggesting that the absence of RSK2 perturbs the differentiation of precursors towards a neuronal lineage, as shown during embryonic cortical neurogenesis (Dugani et al., 2010). Next, we analysed the maturation trajectory at older, yet still immature, stages in DCX-expressing newborn neurons. DCX is transiently expressed by adult newborn cells from the type-2b stage up to several weeks of age. Surprisingly, in the adult DG of *Rsk2*-KO mice, the density of the overall population of DCX⁺ cells was significantly higher than in WT mice (Fig. 1D and E; factorial ANOVA, $F(1,6) = 16.821$; $p = 0.006$), suggesting that in addition to a delay in expressing DCX in the absence of RSK2, a proportion of newborn cells also remains in an immature stage for a longer time-period. We therefore analysed the phenotype of these DCX⁺ cells (Fig. 1F and G). The proportion of DCX⁺ cells that expressed Ki67⁺ was similar in both genotypes (factorial ANOVA, $F(1,10) = 0.972$; NS), however, in *Rsk2*-KO mice, a significantly larger proportion expressed DCX alone with no co-expression of either Ki67 or NeuN (Fig. 1F and G; $DCX^+/Ki67^-/NeuN^-$ cells: factorial ANOVA, $F(1,10) = 8.054$; $p = 0.017$). There was also a trend towards a smaller proportion of DCX⁺ cells expressing NeuN ($DCX^+/Ki67^-/NeuN^+$ cells, $37.3 \pm 3.3\%$ in *Rsk2*-KO mice against $45.4 \pm 2.7\%$ in WT mice) although this did not reach the significance threshold (factorial ANOVA, $F(1,10) = 3.565$; $p = 0.08$). These findings confirm an abnormal maturation time-course in the absence of RSK2 with a proportion of newborn neurons maintained in an immature stage for a longer time-period. Finally, we evaluated whether this retarded maturation of newborn DGCs has any consequence for their survival rate and final neuronal phenotype by investigating newborn DGCs aged 14, 28 and 42 days, birth-dated by BrdU injections. We observed a similar rate of decrease in the number of surviving BrdU-labelled cells in both genotypes over the 6 weeks (Fig. 1H; factorial ANOVA, time effect: $F(2,24) = 16.619$; $p < 0.0001$; genotype effect: $F(1,24) = 2.301$; NS; time \times genotype interaction: $F(2,24) = 0.021$; NS), that was most prominent between 2 and 4 weeks

($F(1,16) = 17.627$; $p < 0.001$), with no significant differences between genotypes (genotype effect: $F(1,16) = 1.329$; NS; time \times genotype interaction: $F(1,16) = 0.025$; NS). This suggests that the delayed neuronal maturation is transient and does not impact the overall population of more mature newborn DGCs. The phenotype of these BrdU⁺ cells at the different time-points was analysed by co-labelling with DCX and NeuN (Fig. 1I). At 14 days post-injection (dpi), the percentage of 14-day-old BrdU⁺ cells that expressed the immature neuronal marker DCX but not the mature neuronal marker NeuN was significantly higher in *Rsk2*-KO mice than in WT mice (factorial ANOVA, $F(1,6) = 6.897$; $p = 0.039$, Fig. 1I), while the proportions of BrdU⁺ cells expressing DCX and NeuN, or NeuN alone, were similar between genotypes ($F(1,6) = 0.018$, NS; $F(1,6) = 1.819$, NS). At the longer time-points of 28 and 42 dpi, no significant differences were found between WT and *Rsk2*-KO mice (28 dpi: genotype effect: $F(1,8) = 0.831$; NS; type \times genotype interaction: $F(2,16) = 0.660$; NS; 42 dpi: genotype effect: $F(1,7) = 0.958$; NS type \times genotype interaction: $F(2,14) = 0.516$; NS), even if at 42 dpi a small percentage of BrdU⁺ cells still expressed DCX in *Rsk2*-KO mice. Together, these results confirm a retarded maturation of hippocampal newborn cells in the first few weeks of their birth in *Rsk2* mutant mice, a delay that does not affect the overall pool of surviving newborn neurons and their neuronal phenotype at longer times.

3.2. Altered activity-dependent regulation of DG neurogenesis upon learning in *Rsk2*-KO mice

To date there is evidence to suggest that hippocampal-dependent learning can recruit certain newborn DGCs that are at the time of learning within their critical period of maturation, between 3 and 8 weeks of age in mice, and promote their integration and long-term survival (Kee et al., 2007; Snyder et al., 2009; Trouche et al., 2009; Aasebø et al., 2011; Veyrac et al., 2013). To investigate the functional impact of RSK2 loss for neurogenesis in relation to hippocampal-dependent learning, we trained mice in a spatial learning and memory task that we have previously shown to be affected in *Rsk2*-KO mice (Poirier et al., 2007) and quantified proliferation and survival after learning and recall (Fig. 2A, see Materials and methods) by analysing the density of Ki67⁺ and DCX⁺ cells and that of mature neurons aged 48–53 days birth-dated by BrdU injections before learning (Fig. 2A). Home cage mice of both genotypes, transported in the experimentation room (CTL-T) and perfused the same day, were used as controls.

As previously reported (Poirier et al., 2007), all mice learned to find the hidden platform during training (Fig. 2B; repeated measures ANOVA, time effect: $F(6,108) = 23.239$; $p < 0.0001$; time \times genotype interaction: $F(6,108) = 2.144$; $p = 0.0541$), despite learning was delayed in *Rsk2*-KO mice compared to WT mice (genotype effect: $F(1,18) = 11.378$; $p = 0.0034$). During the probe test 24 h after training, WT mice spent significantly more time in the target quadrant (Student t -test, $t(10) = 4.834$; $p = 0.0007$), whereas *Rsk2*-KO mice spent 25% of the time in each of the quadrants (Student t -test, $t(8) = 1.43$; NS), thus showing impaired spatial memory (Fig. 2C and E; factorial ANOVA, percent time in target quadrant: $F(1,18) = 5565$; $p = 0.0298$). Moreover, the mean number of crossings over the place where the platform was located during training differed significantly between WT and *Rsk2*-KO mice (Fig. 2D; $F(1,18) = 15.477$; $p = 0.001$). These results replicate our previous report (Poirier et al., 2007) of slightly delayed spatial learning and profound spatial memory deficit in *Rsk2*-KO mice.

Mice were killed 90 min after the retention test to quantify the density of newborn DGCs at different stages of maturation (Fig. 2F–H). As reported above in naïve mice, similar densities of Ki67⁺ cells and a significantly elevated density of DCX⁺ cells was found in CTL-T *Rsk2*-KO mice compared to CTL-T WT mice (Ki67⁺ cells: $F(1,10) = 0.148$; NS; DCX⁺ cells: $F(1,14) = 8.57$; $p = 0.01$). In the mice submitted to learning, the densities of Ki67⁺ and DCX⁺ cells were both significantly decreased in *Rsk2*-KO learners compared to *Rsk2*-KO CTL-T mice

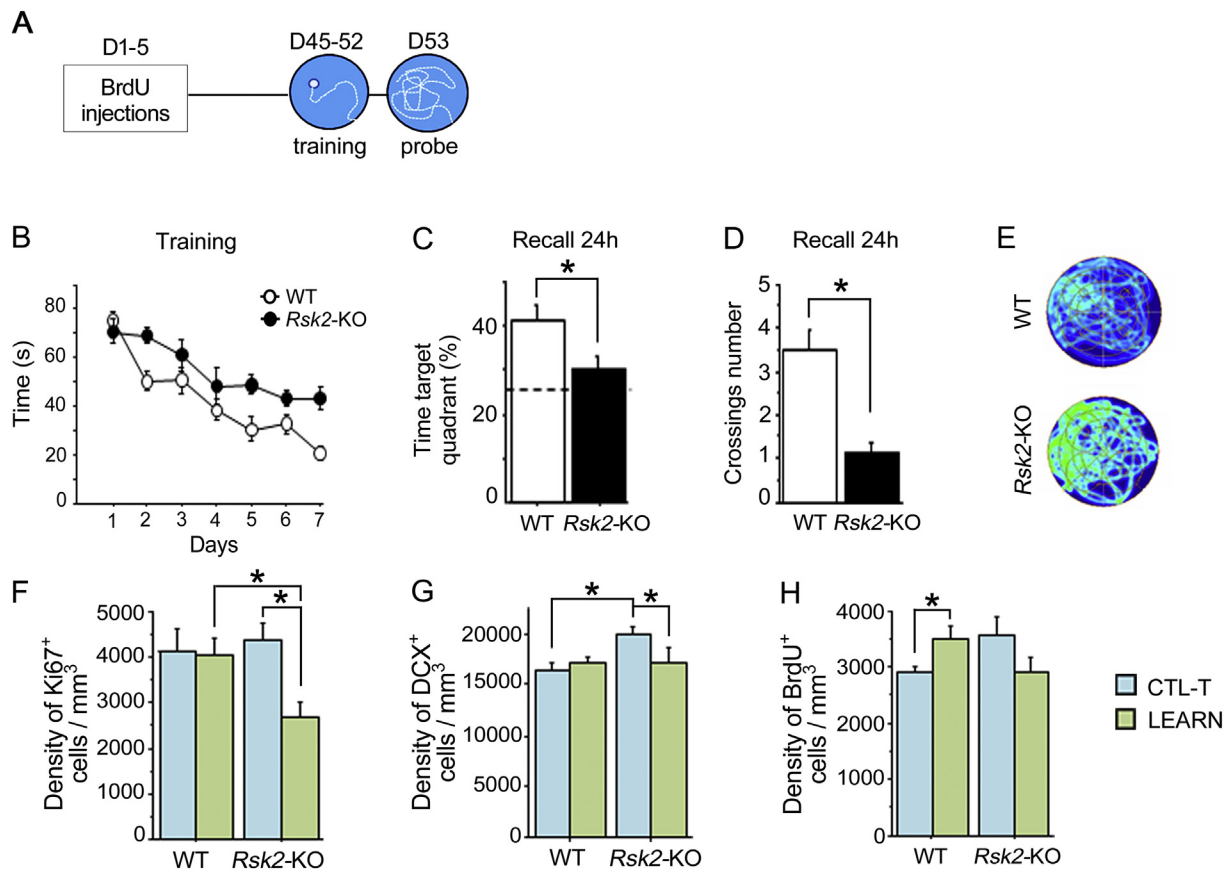


Fig. 2. Effect of spatial learning and recall on adult neurogenesis in *Rsk2*-KO mice. (A) Experimental design. WT and *Rsk2*-KO mice received five injections of BrdU. Mice were submitted to spatial training in a water maze 40 days after BrdU injections and to a retention test on day 53. Controls mice were not submitted to a behavioural task but were transported to the experimental room on every session. All mice were perfused on day 53, 90 min following the retention test. (B) Time to reach the hidden platform during training. (C) Percent time spent in the target quadrant during the probe test. (D) Mean number of crossings during the probe test. (E) Examples of trajectories during a probe trial. (F–H) Density of Ki67⁺ cells (F), DCX⁺ cells (G) and BrdU⁺ cells (H) in control (CTL-T) and trained (LEARN) mice of both genotypes.

(Ki67⁺ cells: $F(1,10) = 10.351$; $p = 0.0092$; DCX⁺ cells: $F(1,11) = 8.792$; $p = 0.0129$), reaching a level significantly lower than in WT learner mice for Ki67⁺ cells ($F(1,10) = 7.573$; $p = 0.02$) and decreasing back to WT levels for DCX⁺ cells ($F(1,8) = 1.418$; NS). These results suggest a negative impact of water maze training on the number of proliferative cells and immature newborn neurons in *Rsk2*-KO mice. All 48–53-day-old cells labelled with BrdU expressed NeuN and were considered mature neurons. For these cells, in control mice there was no significant difference between genotypes (CTL-T: $F(1,8) = 3.609$; NS) as reported above in naïve mice. However, in mice submitted to learning, the number of BrdU⁺ cells in WT mice was significantly increased after learning compared to WT CTL-T mice (Fig. 2H; $F(1,8) = 5.551$; $p = 0.046$), indicating learning in our conditions promoted the survival of this population of newborn DG cells. No such post-learning increased survival was observed in *Rsk2*-KO mice (Fig. 2H; $F(1,8) = 2.481$; NS), the number of BrdU⁺ labelled neurons was even slightly decreased compared to *Rsk2*-KO CTL-T mice. Thus, in the absence of RSK2, learning in our conditions affected the population of proliferative cells and of immature newborn neurons and failed to promote survival of older newly born DG neurons in contrast to WT mice.

3.3. Dysregulation in the recruitment of immature and mature DG cells by learning in *Rsk2*-KO mice

To examine whether loss of RSK2 affects learning-associated recruitment of DG newborn neurons, we mapped expression of the IEG

Zif268 in three types of cells: young DCX⁺/NeuN⁺ neurons (Fig. 3A), 48–53-day-old BrdU⁺/NeuN⁺ adult-born neurons (Fig. 3B) and mature (NeuN⁺/DCX⁻) neurons, 90 min after memory recall. In WT mice, a small proportion of cells of all three categories expressed Zif268, with a larger proportion of 48–53-day-old BrdU⁺ (7.4%) compared to that of young DCX⁺/NeuN⁺ (1.4%) or mature neurons (3.7%). A completely different pattern of result was found in *Rsk2*-KO mice. In these mice, there was a near complete lack of Zif268 activation in young DCX⁺/NeuN⁺ neurons compared to WT learner mice (Fig. 3C; $F(1,10) = 8.048$; $p = 0.0176$). The proportion of 48–53-day-old BrdU⁺/NeuN⁺ cells expressing Zif268 was unchanged (Fig. 3D; $F(1,6) = 0.238$; NS) but, surprisingly, the proportion of activated mature NeuN⁺/DCX⁻/Zif268⁺ neurons was higher in *Rsk2*-KO mice compared to WT mice (Fig. 3E; $F(1,8) = 7.699$; $p = 0.0241$). These results suggest that spatial memory recall in *Rsk2*-KO mice leads to diametrically opposite effects on cell activation in DG compared to WT mice, failing to activate young DCX⁺/NeuN⁺ neurons and conversely increasing the proportion of activated mature NeuN⁺/DCX⁻ neurons.

3.4. Impaired spatial pattern separation function in *Rsk2*-KO mice

In previous (Poirier et al., 2007; Morice et al., 2013) and current studies, we found that *Rsk2*-KO mice display cognitive alterations primarily affecting spatial memory, in relation to hippocampal dysfunction. Given the involvement of the DG and of adult-generated neurons in pattern separation (McHugh et al., 2007; Clelland et al., 2009; Nakashiba et al., 2012; Tronel et al., 2012; Berron et al., 2016) and the

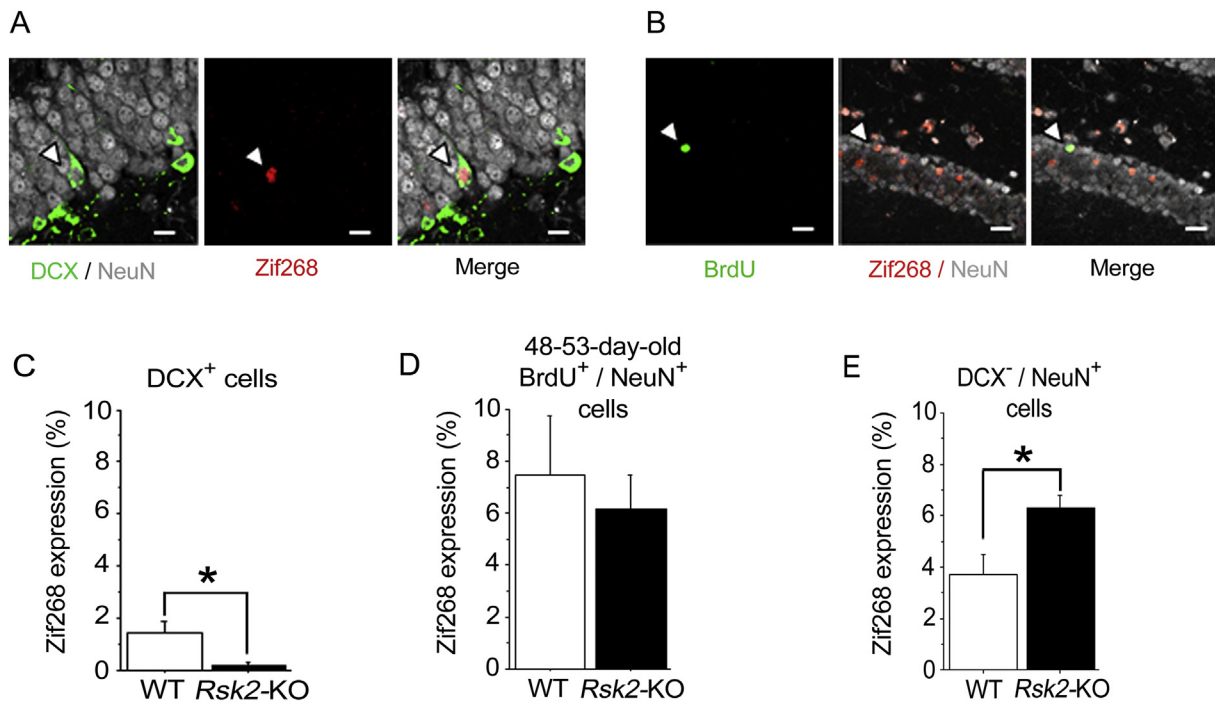


Fig. 3. Recruitment of immature and mature DG cells in relation to learning and memory recall. (A, B) Representative confocal images of DCX⁺/NeuN⁺/Zif268⁺ co-labelling (A, arrowheads; scale bar = 10 μ m) and of BrdU⁺/NeuN⁺/Zif268⁺ co-labelling (B, arrowheads; scale bar = 30 μ m) in the DG. (C–D) Percent of Zif268-expressing cells in the DCX⁺ cell population (C), the 48–53-day-old BrdU⁺ cell population (D) and in the NeuN⁺ cell population (E) in trained mice of both genotypes. Error bars represent \pm S.E.M. * represents significant differences.

alterations in neurogenesis observed here, we hypothesised that *Rsk2*-KO mice could be impaired in tasks placing a high demand on spatial discrimination and behavioural pattern separation function. We therefore assessed performance of *Rsk2*-KO mice in a spatial delayed non-matching to place task in a radial maze in which the target arm location can be either close in space, or highly separated from, the previously experienced, sample arm (Fig. 4A). Performance of WT mice increased progressively above chance for both types of separation, reaching 75.75% and 77.27% correct choices in the close and distant configurations, respectively (*t*-tests vs chance (50%), $t(10) = 3.96$, $p = 0.0027$; $t(10) = 5.87$, $p = 0.0002$). In contrast, performance of *Rsk2*-KO remained at chance level in both configurations (close arms: 50% correct, $t(7) = 0$, NS; distant arms: 56.25% correct, $t(7) = 1.42$, NS) with a significant main effect of genotype in both configurations in the last trials (Fig. 4B; D8–10, factorial ANOVA, close arms: $F(1,17) = 8.27$; $p = 0.0105$; distant arms: $F(1,17) = 10.08$; $p = 0.0055$). On the last day (day 10), the mean number of correct trials in the close arms configuration was $77.2 \pm 7.8\%$ in WT mice against $50 \pm 9.4\%$ in *Rsk2*-KO mice, and in the distant configuration, $77.2 \pm 10.3\%$ in WT mice against $43.75 \pm 6.2\%$ in *Rsk2*-KO mice. These data on the last day indicate no improvement of performance of *Rsk2*-KO mice in their ability to discriminate between the previously baited arm and the novel one, whatever the configuration (distant or close). Although we cannot exclude the possibility that the mice would improve their performance with significantly more training days, these results nevertheless suggest a severe deficit in spatial discrimination ability in *Rsk2*-KO mice.

To confirm this in a different type of task, we assessed performance in the spatial object pattern separation task (OPS task, van Hagen et al., 2015), a task derived from the object-place recognition task. These tasks are based on the innate propensity of rodents to explore novelty in which mice previously exposed to objects demonstrate they remember the position of the objects after a delay by showing preferential exploration of a displaced object. In a previous study (Poirier et al., 2007), we found no apparent deficit in *Rsk2*-KO mice, using three different

objects during the sample phase and displacing one of the objects by 15 cm in the test phase. During the first exposure to the objects in the sample phase, *Rsk2*-KO mice spent more time exploring the objects than WT mice but this difference was not maintained at later times of exploration. At test, 24 h after the exposure phase, no deficit in long-term object-place recognition memory was found in *Rsk2*-KO mice (Poirier et al., 2007). Here, in the specific OPS task, to increase the similarity between the exposure and test phases, we used two identical objects and at test, one of the objects was moved either a short distance (6 cm, close configuration), or a longer distance (12 cm, distant configuration) away from its initial position (Fig. 4C). When mice were allowed to explore objects for the first time, the number of contacts made with the objects was significantly more important in *Rsk2*-KO mice (WT: 14 ± 1.9 ; KO: 21.62 ± 1.6 ; factorial ANOVA, $F(1,16) = 8.544$; $p = 0.01$), as observed previously (Poirier et al., 2007). However, here the percentage of time spent exploring the objects during the habituation phase was similar (WT: $11.53 \pm 1.3\%$; *Rsk2*-KO: $12.06 \pm 0.8\%$; $F(1,16) = 0.106$; NS), indicating different strategies of object exploration but intact novelty-seeking behaviour in mutant mice. During the following phases of exposition to the objects (first and second acquisition-retention tests), mice from both genotypes showed comparable numbers of contacts with the objects and exploration times (factorial ANOVA, genotype effect, acquisition-1: contact number: $F(1,16) = 0.01$; NS; exploration time: $F(1,16) = 0.028$; NS; retention-1: contact number: $F(1,16) = 0.108$; NS; exploration time: $F(1,16) = 0.152$; NS; acquisition-2: contact number: $F(1,16) = 1.67$; NS; exploration time: $F(1,16) = 0.471$; NS; retention-2: contact number: $F(1,16) = 0.42$; NS; exploration time: $F(1,16) = 0.222$; NS), indicating that all mice had the same curiosity and motivation for exploring objects. In the test phase 1 h after the sample phase, analysis of the percent time exploring the displaced objects in the close and distant configurations revealed significant differences between genotypes (repeated measures ANOVA, genotype effect: $F(1,32) = 4.509$; $p = 0.0415$; genotype \times object position interaction: $F(1,32) = 5.597$; $p = 0.0242$). WT mice spent significantly more time exploring the displaced objects in

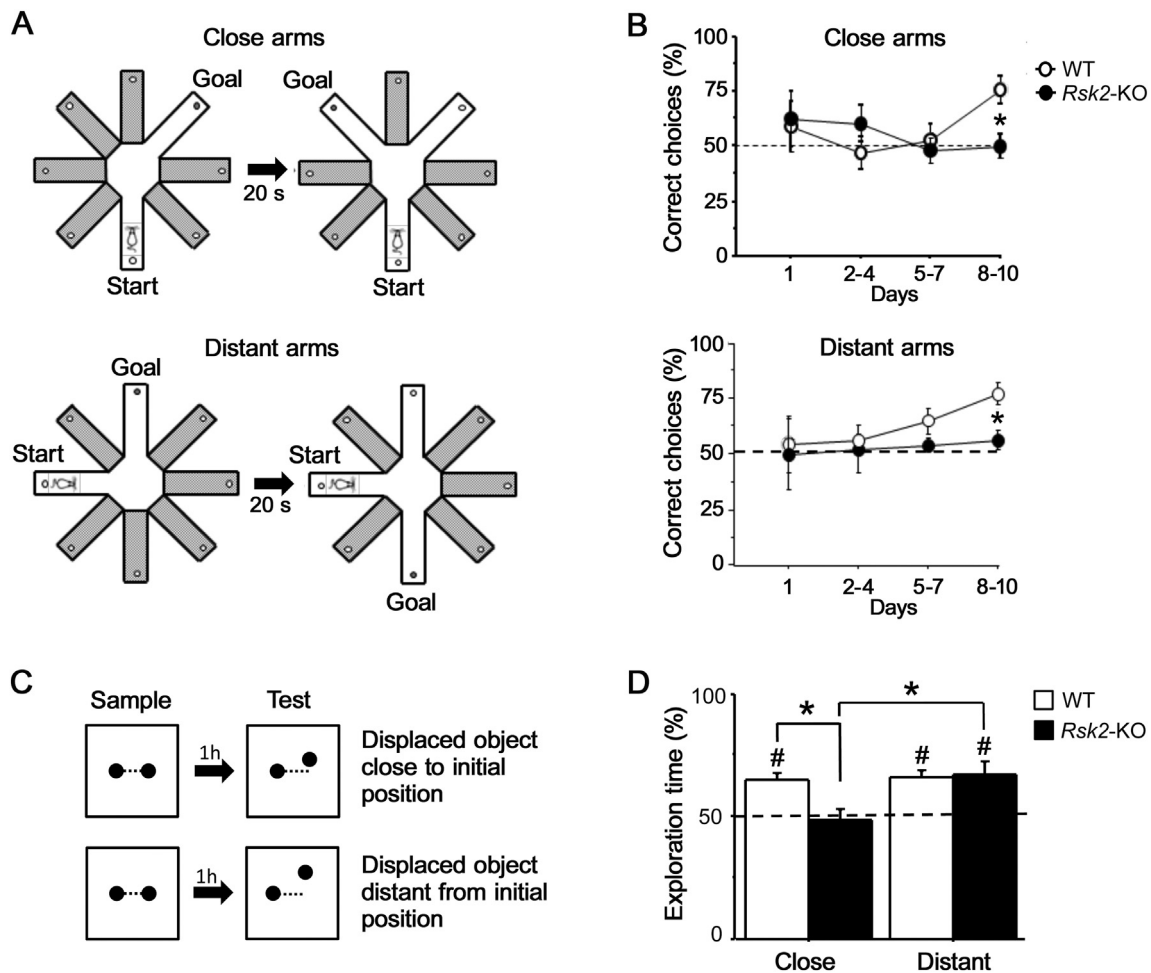


Fig. 4. Impaired spatial pattern separation in *Rsk2*-KO mice. (A) Experimental design to study pattern separation function in a delayed non-matching to place paradigm in a radial maze (adapted from Clelland et al., 2009). During the sample phase, the mouse is allowed to visit the baited arm (Goal). During the choice phase, 20s later, an additional arm is opened and rewarded (Goal) while the previously baited arm is opened but not rewarded. The previously baited and newly baited arms were separated either by only one arm (top, close arms configuration) or by three arms (bottom, distant arms configuration). (B) Mean percentage of correct choices \pm S.E.M. in the close (top) and distant arms (bottom) configurations in WT and *Rsk2*-KO mice. * indicates significant difference between genotypes. (C) Schematic representation of the object pattern separation task (adapted from van Hagen et al., 2015). During the sample phase, mice were exposed to a spatial configuration of two similar objects. At test 1 h later, one of the objects was displaced to a novel spatial position, close to (top) or distant from (bottom) the initial position. (D) Percent exploration time of the displaced object in the close or distant configurations in WT and *Rsk2*-KO mice. Error bars represent \pm SEM. * indicates significant differences between groups. # indicates significant difference compared to chance (50%).

both the close and distant configurations (recognition index compared to chance: one sample *t*-test, $p < 0.05$ for each object position; Fig. 4D), indicating similar discrimination ability in place recognition. *Rsk2*-KO mice spent significantly more time exploring the displaced object when its position was relatively far away from its initial position (recognition index compared to chance: one sample *t*-test, distant position: $t(7) = 3.29$, $p < 0.05$; Fig. 4D), in agreement with previous data (Poirier et al., 2007). However, *Rsk2*-KO mice were not able to do so when the displaced object remained relatively close to its initial position (recognition index compared to chance: one sample *t*-test, distant position: $t(7) = 3.29$, $p < 0.05$; close position: $t(7) = -0.33$, NS; Fig. 4D). Together, these results show that *Rsk2*-KO mice are deficient in their ability to distinguish two relatively similar spatial configurations, indicating that hippocampal pattern separation function in the mutant mice is altered.

4. Discussion

The Coffin-Lowry syndrome is an inheritable disorder caused by mutations of the *Rsk2* gene and characterized by several clinical symptoms including moderate to severe intellectual disability. Despite

increasing insights into the cell-signalling mechanisms in which the RSK2 kinase may be involved in, little is known about the role of RSK2 in neuronal functions *in vivo* and on the neural mechanisms underlying cognitive dysfunction in CLS. Previous *in vivo* studies have reported defects in glutamatergic transmission, synapse structure and activity-dependent plasticity-related gene expression in hippocampus (Morice et al., 2013; Mehmood et al., 2011) associated with hippocampal-dependent memory deficits (Poirier et al., 2007; Davis et al., 2010; Darq et al., 2011) and reduced emotional reactivity (Fischer et al., 2017). In the present study, we report that adult hippocampal neurogenesis, a mechanism of plasticity which plays an important role in hippocampal-dependent memories, is altered at multiple, specific levels in *Rsk2* mutant mice in association with impaired spatial discrimination abilities and behavioural pattern separation, representing a novel mechanism which may contribute to cognitive impairments in CLS.

4.1. Adult hippocampal neurogenesis in *Rsk2* mutant mice

Several studies have reported a role for RSKs in the regulation of diverse cellular processes including cell growth, cell cycle progression, cell proliferation and survival, including cancer-cell proliferation

(reviewed in Romeo et al., 2012). For example, RSK2 was reported to bind to and/or phosphorylate diverse substrates that regulate the cell cycle such as histone H3 (Sassone-Corsi et al., 1999; Cho et al., 2005) and the cyclin-dependent kinase cdc25C (R. Wang et al., 2010), and can also affect neuronal survival via inactivation of BAD (Bonni et al., 1999) or phosphorylation of CREB (Xing et al., 1996, 1998; De Cesare et al., 1998). During cortical development *in vivo*, RSK2 knockdown was also shown to perturb the differentiation of cortical radial precursors into neurons (Dugani et al., 2010). However, other results have been reported, showing no specific effect of RSK2 deficiency on survival of embryonic cortical neurons *in vitro* (Dugani et al., 2010) or survival of isolated motoneurons (Fischer et al., 2009). In the hippocampal neurogenic area of the adult brain, our results show that the rate of cell proliferation is not altered in *Rsk2*-KO mice. Likewise, analysis of the fate of DG newborn cells and their survival over several weeks in basal conditions revealed no specific alteration of differentiation or survival rates in the absence of RSK2. Analysing neuronal maturation over time using stage-specific markers, however, we found the absence of RSK2 results in a retarded maturation of young adult-born DG neurons. Specifically, in the early stages of proliferation we found a significantly higher proportion of Ki67⁺ progenitor cells that do not yet express DCX (type-1/type-2a cells) and significantly less type-2b and type-3 cells in *Rsk2*-KO mice. This delayed maturation was confirmed in several ways. First, for cells of 3 days of age, a significant proportion of cells had exited the cell cycle but do not express DCX compared to WT mice, indicating more cells had returned to a quiescent stage in *Rsk2*-KO mice. Second, there was a higher density of immature DCX-expressing neurons in *Rsk2*-KO mice and, within this cell population, more cells did not yet express the mature neuronal marker NeuN. Third, at 2 weeks of age, we found a significantly higher proportion of BrdU⁺ neurons that did not yet express NeuN, and by 6 weeks of age a small proportion of newborn neurons still expressed DCX in *Rsk2*-KO mice, in contrast to WT mice. Together these results highlight a delayed maturation of adult-generated DG neurons in the early stages of adult hippocampal neurogenesis in *Rsk2* mutant mice. This contribution of RSK2 to neuronal maturation in the adult DG parallels its reported contribution during cortical embryogenesis, showing delayed cell growth of cultured cortical neurons from *Rsk2*-KO mice (Ammar et al., 2013) and an increased maintenance of cortical embryonic cells in a cycling radial precursor stage (Dugani et al., 2010). In the adult DG *in vivo*, however, this delayed maturation of newly-born cells is transient, as it does not affect the overall number of surviving neurons remaining after several weeks in the mutant mice.

Although this may have important functional consequences in relation to hippocampal functions, the underlying mechanisms remain as yet unknown. Several candidate mechanisms could be envisaged. First, RSK2 was found to be required for osteoblast differentiation via phosphorylation of ATF4, and this finding has notably been linked to delayed skeletal development observed in CLS patients (Yang et al., 2004). To our knowledge, no study has as yet examined the potential role of ATF4 in adult hippocampal neurogenesis. However, ATF4 is highly expressed in neural progenitors during embryonic neurogenesis and a precise control of ATF4 levels is required during embryonic neurogenesis, otherwise progenitor cells accumulate in the early G1 phase of the cell cycle and fail to differentiate (Frank et al., 2010). Thus, lack of RSK2 may contribute to slowing down the early phases of neurogenesis via reduced ATF4 phosphorylation. Alternatively, or in addition, phospholipase D1 (PLD1), another major downstream target of RSK2 (Ammar et al., 2013), regulates neurite outgrowth in neural stem cells by promoting neuronal differentiation (Yoon et al., 2005) and the absence of PLD1 was shown to result in a delay in the development of cultured cortical neurons with impaired neurite outgrowth, similarly to what is found in *Rsk2*-KO mice (Ammar et al., 2013). Interestingly, in PLD1-deficient mice, brain development is delayed during the first post-natal month despite the fact that total brain volume catches up to WT levels by P33 (Burkhardt et al., 2014). Further mechanistic studies

would be required to explore the potential role of RSK2-dependent activation of ATF4 and/or PLD1 in brain development and in adult hippocampal neurogenesis. Finally, several studies have shown a role of growth factors in the regulation of adult hippocampal neurogenesis and an increase in the expression of the insulin like growth factor 1 (IGF1) gene has been reported in hippocampus from *Rsk2*-KO mice (Mehmood et al., 2011). IGF1 is known to participate in the modulation of different steps of adult neurogenesis, including in the differentiation of immature neurons (Llorens-Martín et al., 2010). Future studies will determine whether the increase of IGF1 in *Rsk2*-KO mice is a prime mechanism involved in the delayed maturation of hippocampal adult-born neurons.

4.2. Responsiveness of adult-born DGCs in *Rsk2* mutant mice in relation to learning and memory

Numerous studies support the idea that different factors such as stressful events, enriched living conditions, exercise or behavioural experience influence proliferation and/or survival and integration of adult-born DGCs. In our experimental conditions, spatial training had no effect on proliferation of newborn cells but promoted survival of adult-born mature neurons in WT mice, in line with several reports (for a review, see Epp et al., 2013). In contrast, in *Rsk2*-KO mice, learning had a negative effect on proliferation of newborn cells and, consequently, on the density of young immature adult-born neurons. Whether the decrease in the population of young immature cells in *Rsk2* mutant mice following learning could be due to stress, known to have a negative impact on adult hippocampal neurogenesis (for a review, see Mirescu and Gould, 2006) is uncertain but seems unlikely as no evidence for a higher sensitivity to stress was demonstrated in *Rsk2*-KO mice (Poirier et al., 2007; Fischer et al., 2017). Another possibility refers to the fact that spatial learning in the water maze can increase death of a selective population of very young immature newborn DGCs (Döbrössy et al., 2003; Dupret et al., 2007). Because of the delayed maturation of newborn DGCs in *Rsk2*-KO mice reported above, this could have endowed this population of cells with an enlarged time-window of sensitivity to this adverse effect of learning.

Second, and also in contrast to WT mice, spatial training failed to enhance survival of mature neurons in *Rsk2*-KO mice. There is evidence to suggest that enhanced survival of newborn DGCs after learning is related to the recruitment during learning of a pool of young newborn neurons while in the first few weeks of their birth, when they display increased intrinsic excitability and a high capacity for plasticity (Schmidt-Hieber et al., 2004; Ge et al., 2007; Marín-Burgin and Schinder, 2012). Most of the evidence supporting this scenario comes from studies investigating the activation of IEGs in young newborn neurons upon learning or recall (Kee et al., 2007; Tashiro et al., 2007; Snyder et al., 2009; Trouche et al., 2009; Snyder et al., 2012; Veyrac et al., 2013). These recruited neurons would be functionally integrated into pre-existing cortico-hippocampal networks and competitively selected to survive in an experience-dependent manner, a condition for their contribution to memory. We therefore speculated that the absence of pro-survival effect of learning in *Rsk2*-KO mice may be due to altered activity-dependent recruitment of young newborn DGCs and tested this hypothesis by mapping the expression of the IEG, Zif268 in DG newborn neurons and older DGCs following memory recall.

We found that learning in our conditions led to an inverse pattern of activation of newborn and old DGCs between WT and *Rsk2*-KO mice. Specifically, there were significantly and in fact virtually no activated young DCX⁺ newborn neurons in *Rsk2* mutant mice following recall compared to WT mice. In contrast, while there was no difference between WT and *Rsk2* mutant mice in the activation of 48–53-day-old DGCs that did not appear to be specifically activated by learning, the pool of old, pre-existing neurons expressing Zif268 upon recall was larger in *Rsk2* mutant mice than in WT mice. This inverse effect of learning characterized by a decrease in experience-dependent activation of young newborn neurons and an increase in the activation of old

neurons is reminiscent of the potential impact that newborn DGCs may have on modulating inhibitory tone in the DG (Gu et al., 2012; Restivo et al., 2015; Toni et al., 2008). However, in terms of relationship with behavioural performance, this suggests that the increased activation of pre-existing DGCs would not be able, or be sufficient to compensate for the lack of activation of newborn cells. Mechanistically, this effect could well be due to ERK1/2 overexpression in hippocampus previously reported in the absence of RSK2 (Schneider et al., 2011), as Zif268 expression can be directly controlled by ERK1/2 via several parallel downstream kinases and transcriptional regulators (Davis et al., 2000). Finally, we have previously shown that learning-induced Zif268 expression in newborn DGCs during their critical period of maturation actively controls the recruitment of these newborn neurons by learning and their subsequent functional integration into memory networks and survival (Veyrac et al., 2013). Thus, during the early phases of the critical period, when immature neurons express Zif268 upon the occurrence of learning and are prone to be selected to serve memory function, the retarded maturation of these DGCs in *Rsk2* mutant mice could well be one determinant of their unsuccessful recruitment, as suggested by the failure of spatial learning to promote their survival and lack of activation upon memory recall.

4.3. Impaired spatial pattern separation function in *Rsk2*-KO mice

Our previous studies in *Rsk2*-KO mice have shown that they display severe memory deficits in hippocampal-dependent behavioural tasks such as spatial learning and memory in the water-maze, as replicated here, or trace fear conditioning (Poirier et al., 2007; Davis et al., 2010; Morice et al., 2013). Adult-generated newborn hippocampal neurons are deemed to contribute to these forms of learning and memory, and therefore the lack of recruitment of newborn DGCs in *Rsk2* mutant mice may contribute to the spatial learning and memory deficits observed in these mice. A series of studies in the last few years provided evidence for a critical role of adult hippocampal neurogenesis in hippocampal pattern separation, a function that allows the distinct encoding of relatively similar or overlapping events, resulting in a better behavioural ability to finely discriminate related events (Clelland et al., 2009; Creer et al., 2010; Sahay et al., 2011; Tronel et al., 2012; Nakashiba et al., 2012). This led us to hypothesise that *Rsk2* mutant mice might have prominent difficulties in their ability to finely discriminate related features in the spatial domain. We tested this in two different tasks taxing spatial pattern separation function, a delayed non-matching to place task (Clelland et al., 2009) and an object-place task (van Hagen et al., 2015), both placing varying demands on spatial discrimination ability, and found *Rsk2* mutant mice have severe deficits in both tasks. These findings provide the first evidence suggesting altered hippocampal pattern separation function in this mouse model of CLS. The abnormalities in adult DG neurogenesis reported here in *Rsk2* mutant mice may well contribute to these deficits. However, we and others have also shown RSK2-deficiency is associated with other physiological abnormalities in the dentate gyrus, including reduced synaptic transmission and excitability, reduction of AMPA and NMDA conductances and altered synapse structure (Morice et al., 2013), as well as in other hippocampal subfields (Mehmood et al., 2011). Thus, all these changes in hippocampal physiology could contribute to the altered spatial pattern separation function found in *Rsk2* mutant mice.

4.4. Adult neurogenesis and intellectual disabilities

The advancement of knowledge about the contribution of adult neurogenesis to different forms of hippocampal-dependent cognitive functions has led to explore the potential role this form of plasticity may have in a number of neuropsychiatric diseases. Although the past decade has witnessed remarkable acceleration in our understanding of genetic factors underlying inherited ID (Vissers et al., 2016), leading to the identification of several ID-associated genes and related molecular

and cellular mechanisms, unresolved issues remain about the relationship between ID-related mutations and cognitive impairments (Humeau et al., 2009; Pavlowsky et al., 2012; Vaillend et al., 2008). The neurobiological causes of ID syndromes are presumably multifactorial. For example, several ID genes, including *Rsk2*, are involved in brain development, neurogenesis and neuronal migration, leading to defects in functional and structural plasticity in key brain regions involved in cognition (Vaillend et al., 2008). The idea that altered adult neurogenesis can be involved in ID syndromes is relatively recent and represents a promising field for the development of novel therapeutic approaches. Fragile X Syndrome (FXS), Rett syndrome, Down syndrome, Rubinstein-Taybi syndrome, Angelman syndrome and some rare X-linked diseases are neurodevelopmental disorders associated with ID that have all been shown in animal models to be associated with alterations of several steps of adult hippocampal neurogenesis (for reviews, see Pons-Espinal et al., 2013; Bowers and Jessberger, 2016; Mardirossian et al., 2009; J. Wang et al., 2010; Allegra et al., 2017; Patzlaff et al., 2017). However, in line with the variety of genes leading to ID, the reported alterations in adult hippocampal neurogenesis in these different models are notably diverse (Pons-Espinal et al., 2013), affecting either proliferation of adult-born cells, their differentiation, neuronal maturation processes and dynamics and/or their survival. Despite these differences, altered adult hippocampal neurogenesis might thus be one common phenotype in several neurodevelopmental disorders that persist throughout adulthood. In parallel, these animal models display impaired hippocampal-dependent learning and memory and defects in pattern separation function have been reported in mouse models of Fragile X and Rubinstein Taybi syndromes (Guo et al., 2011; Eadie et al., 2012; Lopez-Atalaya et al., 2011). Unfortunately, most research has focused on analysing key steps of adult neurogenesis in basal conditions, but no study to our knowledge has as yet tested the activation/recruitment of adult-born dentate gyrus neurons in a behavioural context. Concerning Coffin-Lowry Syndrome, although few studies have already shown a role of RSK2 in embryonic neurogenesis or in neurite outgrowth *in vitro* (Dugani et al., 2010; Ammar et al., 2013), the present study is the first to describe adult hippocampal neurogenesis *in vivo* and we notably highlighted in the mutant mice an alteration of the early stages of neuronal maturation and of experience-dependent involvement of adult neurogenesis, and a deficit in the ability to discriminate relatively similar spatial configurations, a deficit in spatial pattern separation which may contribute to their more general spatial memory deficits. A better understanding of the molecular mechanisms involved in the regulation of experience-dependent adult neurogenesis and of the selective contribution of hippocampal neurogenesis to the cognitive deficits associated with ID remains a challenge for future research.

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2018.04.007>.

Acknowledgements

This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS, France); the University Paris-Sud (France); the Fondation Jérôme Lejeune (Grants #066732 and #1495 to SLa and RP) and The Fondation pour la Recherche sur le Cerveau (FRC 2013 to SLa). CC and SLu were supported by doctoral fellowships from the French Ministry of Higher Education and Research. The authors wish to thank C. Vaillend for providing access to radial maze and the zootechnic platform in Orsay for animal breeding, care and genotyping.

Authors contributions

RP, SLa and AH designed the study. SLa and RP wrote the manuscript. CC, SLu, ND and RP performed and analysed the experiments. All authors revised and approved its final version.

Conflict of interest

None.

References

- Aasebø, I.E.J., Blankvoort, S., Tashiro, A., 2011. Critical maturational period of new neurons in adult dentate gyrus for their involvement in memory formation. *Eur. J. Neurosci.* 33, 1094–1100.
- Aimone, J.B., Li, Y., Lee, S.W., Clemenson, G.D., Deng, W., Gage, F.H., 2014. Regulation and function of adult neurogenesis: from genes to cognition. *Physiol. Rev.* 94, 991–1026 (Review).
- Allegra, M., Spalletti, C., Vignoli, B., Azzimondi, S., Busti, I., Billuart, P., Canossa, M., Caleo, M., 2017. Pharmacological rescue of adult hippocampal neurogenesis in a mouse model of X-linked intellectual disability. *Neurobiol. Dis.* 100, 75–86.
- Ammar, M.R., Humeau, Y., Hanauer, A., Nieswandt, B., Bader, M.F., Vitale, N., 2013. The Coffin-Lowry syndrome-associated protein RSK2 regulates neurite outgrowth through phosphorylation of phospholipase D1 (PLD1) and synthesis of phosphatidic acid. *J. Neurosci.* 33, 19470–19479.
- Anacker, C., Hen, R., 2017. Adult hippocampal neurogenesis and cognitive flexibility - linking memory and mood. *Nat. Rev. Neurosci.* 18, 335–346 (Review).
- Berron, D., Schütze, H., Maass, A., Cardenas-Blanco, A., Kuijf, H.J., Kumaran, D., Düzel, E., 2016. Strong evidence for pattern separation in human dentate gyrus. *J. Neurosci.* 36, 7569–7579.
- Bonni, A., Brunet, A., West, A.E., Datta, S.R., Takasu, M.A., Greenberg, M.E., 1999. Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription-dependent and -independent mechanisms. *Science* 286, 1358–1362.
- Bowers, M., Jessberger, S., 2016. Linking adult hippocampal neurogenesis with human physiology and disease. *Dev. Dyn.* 245, 702–709 (Review).
- Burkhardt, U., Stegner, D., Hattinger, E., Beyer, S., Nieswandt, B., Klein, J., 2014. Impaired brain development and reduced cognitive function in phospholipase D-deficient mice. *Neurosci. Lett.* 572, 48–52.
- Castilla-Ortega, E., Pedraza, C., Estivill-Torrús, G., Santín, L.J., 2011. When is adult hippocampal neurogenesis necessary for learning? Evidence from animal research. *Rev. Neurosci.* 22, 267–283 (Review).
- Cho, Y.Y., He, Z., Zhang, Y., Choi, H.S., Zhu, F., Choi, B.Y., Kang, B.S., Ma, W.Y., Bode, A.M., Dong, Z., 2005. The p53 protein is a novel substrate of ribosomal S6 kinase 2 and a critical intermediary for ribosomal S6 kinase 2 and histone H3 interaction. *Cancer Res.* 65, 3596–3603.
- Clelland, C.D., Choi, M., Romberg, C., Clemenson, G.D., Fragniere, A., Tyers, P., Jessberger, S., Saksida, L.M., Barker, R.A., Gage, F.H., Bussey, T.J., 2009. A functional role for adult hippocampal neurogenesis in spatial pattern separation. *Science* 325, 210–213.
- Creer, D.J., Romberg, C., Saksida, L.M., van Praag, H., Bussey, T.J., 2010. Running enhances spatial pattern separation in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 2367–2372.
- Darcq, E., Koebel, P., Del Boca, C., Pannetier, S., Kirstetter, A.S., Garnier, J.M., Hanauer, A., Befort, K., Kieffer, B.L., 2011. RSK2 signaling in brain habenula contributes to place aversion learning. *Learn. Mem.* 18, 574–578.
- Davis, S., Vanhoutte, P., Pages, C., Caboche, J., Laroche, S., 2000. The MAPK/ERK cascade targets both elk-1 and cAMP response element-binding protein to control long-term potentiation-dependent gene expression in the dentate gyrus in vivo. *J. Neurosci.* 20, 4563–4572.
- Davis, S., Renaudineau, S., Poirier, R., Poucet, B., Save, E., Laroche, S., 2010. The formation and stability of recognition memory: what happens upon recall? *Front. Behav. Neurosci.* 4, 1–11.
- De Cesare, D., Jacquot, S., Hanauer, A., Sassone-Corsi, P., 1998. Rsk-2 activity is necessary for epidermal growth factor-induced phosphorylation of CREB protein and transcription of c-fos gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 12202–12207.
- Döbrössy, M.D., Drapeau, E., Aourasseau, C., Le Moal, M., Piazza, P.V., Abrous, D.N., 2003. Differential effects of learning on neurogenesis: learning increases or decreases the number of newly born cells depending on their birth date. *Mol. Psychiatry* 8, 974–982.
- Dugani, C.B., Paquin, A., Kaplan, D.R., Miller, F.D., 2010. Coffin-Lowry syndrome: a role for RSK2 in mammalian neurogenesis. *Dev. Biol.* 347, 358–359.
- Dupret, D., Fabre, A., Döbrössy, M.D., Panatier, A., Rodríguez, J.J., Lamarque, S., Lemaire, V., Olié, S.H., Piazza, P.V., Abrous, D.N., 2007. Spatial learning depends on both the addition and removal of new hippocampal neurons. *PLoS Biol.* 5, e214.
- Eadie, B.D., Cushman, J., Kannangara, T.S., Fanselow, M.S., Christie, B.R., 2012. NMDA receptor hypofunction in the dentate gyrus and impaired context discrimination in adult Fmr1 knockout mice. *Hippocampus* 22, 241–254.
- Epp, J.R., Chow, C., Galea, L.A., 2013. Hippocampus-dependent learning influences hippocampal neurogenesis. *Front. Neurosci.* 7, 57.
- Fischer, M., Pereira, P.M., Holtmann, B., Simon, C.M., Hanauer, A., Heisenberg, M., Sendtner, M., 2009. P90 ribosomal s6 kinase 2 negatively regulates axon growth in motoneurons. *Mol. Cell. Neurosci.* 42, 134–141.
- Fischer, M., Cabello, V., Popp, S., Krackow, S., Hommers, L., Deckert, J., Lesch, K.P., Schmitt-Böhrer, A.G., 2017. Rsk2 knockout affects emotional behavior in the IntelliCage. *Behav. Genet.* 47, 434–448.
- Frank, C.L., Ge, X., Xie, Z., Zhou, Y., Tsai, L.H., 2010. Control of activating transcription factor 4 (ATF4) persistence by multisite phosphorylation impacts cell cycle progression and neurogenesis. *J. Biol. Chem.* 285, 33324–33337.
- 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.
- Gonçalves, J.T., Schafer, S.T., Gage, F.H., 2016. Adult neurogenesis in the hippocampus: from stem cells to behavior. *Cell* 167, 897–914 (Review).
- Gu, Y., Arruda-Carvalho, M., Wang, J., Janoschka, S.R., Josselyn, S.A., Frankland, P.W., Ge, S., 2012. Optical controlling reveals time-dependent roles for adult-born dentate granule cells. *Nat. Neurosci.* 15, 1700–1706.
- Guo, W., Allan, A.M., Zong, R., Zhang, L., Johnson, E.B., Schaller, E.G., Murthy, A.C., Goggin, S.L., Eisch, A.J., Oostra, B.A., Nelson, D.L., Jin, P., Zhao, X., 2011. Ablation of Fmrp in adult neural stem cells disrupts hippocampus-dependent learning. *Nat. Med.* 17, 559–565.
- Hanauer, A., Young, I.D., 2002. Coffin-Lowry syndrome: clinical and molecular features. *J. Med. Genet.* 39, 705–713.
- Humeau, Y., Gambino, F., Chelly, J., Vitale, N., 2009. X-linked mental retardation: focus on synaptic function and plasticity. *J. Neurochem.* 109, 1–14.
- Kee, N., Teixeira, C.M., Wang, A.H., Frankland, P.W., 2007. Preferential incorporation of adult-generated granule cells into spatial memory networks in the dentate gyrus. *Nat. Neurosci.* 10, 355–362.
- Kempermann, G., Song, H., Gage, F.H., 2015. Neurogenesis in the adult hippocampus. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 7 (9), a018812.
- Kesler, S.R., Simonsen, R.J., Voeller, K., Abidi, F., Stevenson, R.E., Schwartz, C.E., Reiss, A.L., 2007. Altered neurodevelopment associated with mutations of RSK2: a morphometric MRI study of Coffin-Lowry. *Neurogenetics* 8, 143–147.
- Kim, W.R., Christian, K., Ming, G.L., Song, H., 2011. Time-dependent involvement of adult-born dentate granule cells in behavior. *Behav. Brain Res.* 227, 470–479.
- Llorens-Martín, M., Torres-Alemán, I., Trejo, J.L., 2010. Exercise modulates insulin-like growth factor 1-dependent and -independent effects on adult hippocampal neurogenesis and behaviour. *Mol. Cell. Neurosci.* 44, 109–117.
- Lopez-Atalaya, J.P., Ciccarelli, A., Viosca, J., Valor, L.M., Jimenez-Minchan, M., Canals, S., Giustetto, M., Barco, A., 2011. CBP is required for environmental enrichment-induced neurogenesis and cognitive enhancement. *EMBO J.* 30, 4287–4298.
- Mandyam, C.D., Harburg, G.C., Eisch, A.J., 2007. Determination of key aspects of precursor cell proliferation, cell cycle length and kinetics in the adult mouse subgranular zone. *Neuroscience* 146, 108–122.
- Mardirossian, S., Rampon, C., Salvter, D., Fort, P., Sarda, N., 2009. Impaired hippocampal plasticity and altered neurogenesis in adult Ube3a maternal deficient mouse model for Angelman syndrome. *Exp. Neurol.* 220, 341–348.
- Marín-Burgin, A., Schinder, A.F., 2012. Requirement of adult-born neurons for hippocampus-dependent learning. *Behav. Brain Res.* 227, 391–399 (Review).
- McHugh, T.J., Jones, M.W., Quinn, J.J., Balthasar, N., Coppari, R., Elmquist, J.K., Lowell, B.B., Fanselow, M.S., Wilson, M.A., Tonegawa, S., 2007. Dentate gyrus NMDA receptors mediate rapid pattern separation in the hippocampal network. *Science* 317, 94–99.
- Mehmod, T., Schneider, A., Sibille, J., Marques Pereira, P., Pannetier, S., Ammar, M.R., Debole, D., Thibault-Carpentier, C., Rouach, N., Hanauer, A., 2011. Transcriptome profile reveals AMPA receptor dysfunction in the hippocampus of the Rsk2-knockout mice, an animal model of Coffin-Lowry syndrome. *Hum. Genet.* 129, 255–269.
- Mirescu, C., Gould, E., 2006. Stress and adult neurogenesis. *Hippocampus* 16, 233–238.
- Moricie, E., Farley, S., Poirier, R., Dallerac, G., Chagneau, C., Pannetier, S., Hanauer, A., Davis, S., Vaillend, C., Laroche, S., 2013. Defective synaptic transmission and structure in the dentate gyrus and selective fear memory impairment in the Rsk2 mutant mouse model of Coffin-Lowry syndrome. *Neurobiol. Dis.* 58, 156–168.
- Nakashiba, T., Cushman, J.D., Pelkey, K.A., Renaudineau, S., Buhl, D.L., McHugh, T.J., Rodriguez Barrera, V., Chittajallu, R., Iwamoto, K.S., McBain, C.J., Fanselow, M.S., Tonegawa, S., 2012. Young dentate granule cells mediate pattern separation, whereas old granule cells facilitate pattern completion. *Cell* 149, 188–201.
- Park, Y.Y., Nam, H.J., Do, M., Lee, J.H., 2016. The p90 ribosomal S6 kinase 2 specifically affects mitotic progression by regulating the basal level, distribution and stability of mitotic spindles. *Exp. Mol. Med.* 48, e250.
- Patzlaff, N.E., Nemeč, K.M., Malone, S.G., Li, Y., Zhao, X., 2017. Fragile X related protein 1 (FXR1P) regulates proliferation of adult neural stem cells. *Hum. Mol. Genet.* 26, 1340–1352.
- Pavlovsky, A., Chelly, J., Billuart, P., 2012. Emerging major synaptic signaling pathways involved in intellectual disability. *Mol. Psychiatry* 17, 682–693.
- Pereira, P.M., Schneider, A., Pannetier, S., Heron, D., Hanauer, A., 2010. Coffin-Lowry syndrome. *Eur. J. Hum. Genet.* 18, 627–633 (Review).
- Poirier, R., Jacquot, S., Vaillend, C., Southphong, A.A., Libbey, M., Davis, S., Laroche, S., Hanauer, A., Welzl, H., Lipp, H.P., Wolfer, D.P., 2007. Deletion of the Coffin-Lowry syndrome gene Rsk2 in mice is associated with impaired spatial learning and reduced control of exploratory behavior. *Behav. Genet.* 37, 31–50.
- Pons-Espinal, M., De Lagran, M.M., Dierssen, M., 2013. Functional implications of hippocampal adult neurogenesis in intellectual disabilities. *Amino Acids* 45, 113–131.
- Restivo, L., Niibori, Y., Mercaldo, V., Josselyn, S.A., Frankland, P.W., 2015. Development of adult-generated cell connectivity with excitatory and inhibitory cell populations in the hippocampus. *J. Neurosci.* 35, 10600–10612.
- Rolls, E.T., 2013. The mechanisms for pattern completion and pattern separation in the hippocampus. *Front. Syst. Neurosci.* 7, 74 (Review).
- Romeo, Y., Zhang, X., Roux, P.P., 2012. Regulation and function of the RSK family of protein kinases. *Biochem. J.* 441, 553–569.
- Sahay, A., Scobie, K.N., Hill, A.S., O'Carroll, C.M., Kheirbek, M.A., Burghardt, N.S., Fenton, A.A., Dranovsky, A., Hen, R., 2011. Increasing adult hippocampal neurogenesis is sufficient to improve pattern separation. *Nature* 472, 466–470.
- Sassone-Corsi, P., Mizzen, C.A., Cheung, P., Crosio, C., Monaco, L., Jacquot, S., Hanauer, A., Allis, C.D., 1999. Requirement of Rsk-2 for epidermal growth factor-activated phosphorylation of histone H3. *Science* 285, 886–891.
- Schmidt-Hieber, C., Jonas, P., Bischofberger, J., 2004. Enhanced synaptic plasticity in newly generated granule cells of the adult hippocampus. *Nature* 429, 184–187.

- Schneider, A., Mehmood, T., Pannetier, S., Hanauer, A., 2011. Altered ERK/MAPK signaling in the hippocampus of the *mrsk2* KO mouse model of Coffin-Lowry syndrome. *J. Neurochem.* 119, 447–459.
- Snyder, J.S., Choe, J.S., Clifford, M.A., Jeurling, S.I., Hurley, P., Brown, A., Kamhi, J.F., Cameron, H.A., 2009. Adult-born hippocampal neurons are more numerous, faster maturing, and more involved in behavior in rats than in mice. *J. Neurosci.* 29, 14484–14495.
- Snyder, J.S., Clifford, M.A., Jeurling, S.I., Cameron, H.A., 2012. Complementary activation of hippocampal-cortical subregions and immature neurons following chronic training in single and multiple context versions of the water maze. *Behav. Brain Res.* 227, 330–339.
- Tashiro, A., Makino, H., Gage, F.H., 2007. Experience-specific functional modification of the dentate gyrus through adult neurogenesis: a critical period during an immature stage. *J. Neurosci.* 27, 3252–3259.
- Toni, N., Laplagne, D.A., Zhao, C., Lombardi, G., Ribak, C.E., Gage, F.H., Schinder, A.F., 2008. Neurons born in the adult dentate gyrus form functional synapses with target cells. *Nat. Neurosci.* 11, 901–907.
- Trivier, E., De Cesare, D., Jacquot, S., Pannetier, S., Zackai, E., Young, I., Mandel, J.L., Sassone-Corsi, P., Hanauer, A., 1996. Mutations in the kinase *Rsk-2* associated with Coffin-Lowry syndrome. *Nature* 384, 567–570.
- Tronel, S., Belnoue, L., Grosjean, N., Revest, J.M., Piazza, P.V., Koehl, M., Abrous, D.N., 2012. Adult-born neurons are necessary for extended contextual discrimination. *Hippocampus* 22, 292–298.
- Trouche, S., Bontempi, B., Rouillet, P., Rampon, C., 2009. Recruitment of adult-generated neurons into functional hippocampal networks contributes to updating and strengthening of spatial memory. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 5919–5924.
- Vaillend, C., Poirier, R., Laroche, S., 2008. Genes, plasticity and mental retardation. *Behav. Brain Res.* 192, 88–105 (Review).
- van Hagen, B.T., van Goethem, N.P., Lagatta, D.C., Prickaerts, J., 2015. The object pattern separation (OPS) task: a behavioral paradigm derived from the object recognition task. *Behav. Brain Res.* 285, 44–52.
- Veyrac, A., Gros, A., Bruel-jungerman, E., Rochefort, C., Kleine Borgmann, F.B., Jessberger, S., Laroche, S., 2013. *Zif268/egr1* gene controls the selection, maturation and functional integration of adult hippocampal newborn neurons by learning. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 7062–7067.
- Vissers, L.E., Gilissen, C., Veltman, J.A., 2016. Genetic studies in intellectual disability and related disorders. *Nat. Rev. Genet.* 17, 9–18 (Review).
- Wang, R., Jung, S.Y., Wu, C.F., Qin, J., Kobayashi, R., Gallick, G.E., Kuang, J., 2010a. Direct roles of the signaling kinase RSK2 in *Cdc25C* activation during *Xenopus* oocyte maturation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 19885–19890.
- Wang, J., Weaver, I.C., Gauthier-Fisher, A., Wang, H., He, L., Yeomans, J., Wondisford, F., Kaplan, D.R., Miller, F.D., 2010b. CBP histone acetyltransferase activity regulates embryonic neural differentiation in the normal and Rubinstein-Taybi syndrome brain. *Dev. Cell* 18, 114–125.
- Xing, J., Ginty, D.D., Greenberg, M.E., 1996. Coupling of the RAS-MAPK pathway to gene activation by RSK2, a growth factor-regulated CREB kinase. *Science* 273, 959–963.
- Xing, J., Kornhauser, J.M., Xia, Z., Thiele, E.A., Greenberg, M.E., 1998. Nerve growth factor activates extracellular signal-regulated kinase and p38 mitogen-activated protein kinase pathways to stimulate CREB serine 133 phosphorylation. *Mol. Cell. Biol.* 18, 1946–1955.
- Yang, X., Matsuda, K., Bialek, P., Jacquot, S., Masuoka, H.C., Schinke, T., Li, L., Brancorsini, S., Sassone-Corsi, P., Townes, T.M., Hanauer, A., Karsenty, G., 2004. ATP4 is a substrate of RSK2 and an essential regulator of osteoblast biology; implication for Coffin-Lowry Syndrome. *Cell* 117, 387–398.
- Yoon, M.S., Yon, C., Park, S.Y., Oh, D.Y., Han, A.H., Kim, D.S., Han, J.S., 2005. Role of phospholipase D1 in neurite outgrowth of neural stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 329, 804–811.
- Zeniou, M., Ding, T., Trivier, E., Hanauer, A., 2002. Expression analysis of RSK gene family members: the RSK2 gene, mutated in Coffin-Lowry syndrome, is prominently expressed in brain structures essential for cognitive function and learning. *Hum. Mol. Genet.* 11, 2929–2940.

II. Etude de la neurogenèse adulte et des fonctions cognitives associées chez le modèle murin *Pak3-R67C*

Parmi l'ensemble des gènes de DI découverts depuis les années 1990, *pak3* a été mis en évidence par une étude clinique menée sur une famille dont 4 garçons étaient atteints de DI non syndromique (Allen *et al.* 1998). En 2000, Bienvenu *et al.* confirment l'implication de *pak3* dans une forme de DI modérée à sévère sans autre signe clinique en mettant en évidence une nouvelle mutation : la mutation R67C.

A ce jour, encore peu d'informations sont connues sur le rôle de la kinase PAK3 dans les fonctions neuronales *in vivo* et dans les mécanismes neuronaux sous-jacents aux dysfonctionnements cognitifs dans la DI associée à ce gène. Seule une étude de Meng *et al.* (2005) a étudié le phénotype comportemental de souris *Pak3-KO* : aucun déficit d'apprentissage et de mémoire spatiale en piscine de Morris et aucun déficit de flexibilité comportementale n'ont été mis en évidence, seule une accélération de l'extinction dans une tâche de conditionnement aversif gustatif a été observée. Cette étude a par ailleurs mis en évidence *in vitro* un défaut de plasticité à long terme dans le CA1 de l'hippocampe en absence de PAK3 (Meng *et al.* 2005). Au niveau cellulaire, l'implication de PAK3 dans la régulation du cytosquelette d'actine, la migration cellulaire, ainsi que dans le trafic membranaire a plusieurs fois été mise en évidence via la LIMK1 (pour revue, Bokoch, 2003). D'autre part, PAK3 est également connu pour son rôle dans la régulation de la morphologie des épines dendritiques et des synapses, deux éléments connus pour être altérés dans de nombreux cas de DI (pour revue, Kreis & Barnier, 2009). Enfin, il semble que PAK3 active la voie des MAPK et est impliquée dans le trafic des récepteurs AMPA (Magini *et al.* 2014 ; Hussain *et al.* 2015), un mécanisme clé impliqué dans la plasticité synaptique, l'apprentissage et la mémoire (Penn *et al.* 2017).

Dans le cadre de ma thèse, nous nous sommes concentrés sur la mutation spécifique R67C du gène *Pak3*. Pour cela, le groupe du Dr J.V. Barnier a généré un nouveau modèle murin de DI porteur de la mutation R67C du gène *Pak3*. Il s'agit d'une mutation faux-sens localisée dans la partie régulatrice de la protéine, qui entraîne une diminution de son interaction avec la GTPase Cdc42, sans affecter son activité kinase. Il en résulte que son activation générale par Cdc42 est diminuée (Kreis *et al.* 2007). Dans un premier temps, le phénotype comportemental de la souris mutante a été caractérisé dans diverses tâches « classiques » de comportement par le Dr C. Vaillend. En parallèle, je me suis en particulier focalisée sur l'analyse des performances dans des tâches dépendantes de la

neurogenèse hippocampique adulte (mémoire spatiale, fonction de séparation de patterns et gestion des interférences). J'ai également examiné si la mutation R67C pourrait affecter certaines des étapes clés de la neurogenèse hippocampique basale et, en parallèle, j'ai étudié la régulation de la neurogenèse adulte en relation avec l'apprentissage en analysant la survie et l'activation des nouveaux neurones suite à un apprentissage spatial. L'ensemble de ces résultats fait l'objet d'un article en cours de préparation (ci-joint) et résumé ci-dessous. Les figures référencées sont situées aux pages 159-167.

2.1. Caractérisation comportementale de la souris *Pak3-R67C*.

Les souris *Pak3-R67C* sont viables, fertiles et en bonne santé générale. Leur poids, leur taille et leur morphologie sont identiques à ceux des souris WT.

La première caractérisation comportementale des souris mutantes en open-field indique qu'elles présentent une locomotion, une exploration et une anxiété comparable à celles des souris WT (Figure supplémentaire 1A-C). Au niveau mnésique, des études menées dans l'équipe montrent qu'elles ne présentent pas de déficit d'apprentissage spatial en labyrinthe aquatique en version distribuée, ni de déficit de mémoire 48h ou 1 semaine après la fin de l'acquisition (Figure 2A-B-C). Ces résultats sont comparables à ceux observés chez la souris *Pak3-KO* (Meng *et al.* 2005). En parallèle de cette étude comportementale et compte tenu de nos hypothèses sur un rôle potentiel de PAK3 dans la neurogenèse hippocampique adulte, nous nous sommes focalisés sur des tâches comportementales dépendantes de la neurogenèse. Nous avons choisi de soumettre les souris *Pak3-R67C* à un protocole plus difficile d'apprentissage spatial massé en labyrinthe aquatique et testé leur mémoire spatiale 10 jours plus tard (Jones *et al.* 2001 ; Veyrac *et al.* 2013 ; Figure 2D). Veyrac *et al.* (2013) ont montré au laboratoire l'implication des neurones nouvellement générés dans cette tâche spatiale. Nos résultats montrent que, au cours de l'acquisition, le temps pour atteindre la plate-forme diminue de manière significative au cours des essais et de manière identique entre les souris WT et *Pak3-R67C*, suggérant que les souris mutantes sont capables d'apprendre correctement l'emplacement de la plate-forme dans ces conditions expérimentales (Figure 2D). Toutefois, dix jours plus tard, lors du test de rappel, nos résultats indiquent que les souris *Pak3-R67C* passent autant de temps dans le quadrant où se trouvait auparavant la plate-forme que dans les autres quadrants (Figure 2E). De même, le nombre de passage sur l'emplacement de la plate-forme est significativement inférieur à celui des souris WT (Figure 2F). Ainsi, malgré un apprentissage spatial correctement réalisé, les souris *Pak3-R67C* présentent dans cette situation, un déficit de mémoire spatiale à long-terme. Nous avons poursuivi notre étude en testant la conséquence de la mutation R67C du gène *Pak3* sur les performances des souris dans des tâches de séparation de patterns faisant appel à la capacité de discrimination fine dans le domaine spatial. Nous avons utilisé la tâche de non appariement retardé en labyrinthe radial de Clelland *et al.* (2009) (cf. Mat et Met II.2.2.b, Figure 27)

pour laquelle l'implication des nouveaux neurones hippocampiques adultes a été clairement démontrée (Clelland *et al.* 2009). Afin de réaliser cette tâche dans de bonnes conditions, nous avons tout d'abord vérifié que les souris ne présentent pas de déficit de mémoire de travail en labyrinthe radial ce qui aurait pu rendre difficile l'interprétation des performances dans cette tâche (Figure supplémentaire 1D). Dans la tâche de séparation de patterns, les souris doivent apprendre à discriminer deux bras du labyrinthe, très proches spatialement (configuration difficile) ou plus éloignés (configuration facile), à l'aide des indices de l'environnement (Figure 3A). A chaque essai, les souris sont testées dans une configuration différente impliquant des bras différents. Chaque jour, les souris réalisent 4 essais (deux dans chaque configuration) séparés d'environ 30 minutes. Pour les deux génotypes, le pourcentage d'essais corrects dans les deux configurations (« proche » et « éloignée ») augmente régulièrement avec l'apprentissage et se différencie significativement de la chance en fin d'entraînement (Figure 3B). Vingt-quatre heures après la fin de l'apprentissage, nous avons réalisé un test de mémoire avec trois essais successifs dans la même configuration. Les résultats indiquent que les souris WT ont de bonnes performances dans les deux configurations. En revanche, les souris *Pak3-R67C* ne parviennent à réaliser la tâche que dans la configuration où les 2 bras sont éloignés, le pourcentage de choix corrects dans la configuration proche ne se différenciant pas du niveau de la chance (Figure 3C). Ces résultats indiquent que la succession des trois essais rapprochés a entraîné une baisse importante de performance chez les souris *Pak3-R67C* dans la configuration proche, suggérant une sensibilité accrue aux interférences générées par le test.

Par la suite, pour tester cette potentielle sensibilité des souris *Pak3-R67C* aux interférences, nous avons analysé les performances d'un nouveau groupe de souris dans une tâche spatiale de non appariement retardé avec essais successifs en labyrinthe radial (cf. Mat et Met II.2.2.c ; Al Abed *et al.* 2016). Cette tâche est caractérisée par une haute demande organisationnelle testée grâce à des variations de délais séparant la répétition d'événements similaires. Dans cette tâche, on attribue trois paires de bras adjacents du labyrinthe à chaque souris, qui seront présentées successivement et dans un ordre aléatoire (Figures 3D-E). A la présentation de chaque paire, les souris doivent choisir le bras qui contient la récompense, mais la position du renforcement alterne entre chaque essai correct. Durant les 15 jours d'apprentissage, les souris ont réalisé 23 essais par jour. Comme montré par la figure 3F, durant l'apprentissage, le pourcentage d'essais corrects augmente significativement chez les souris WT mais les performances des souris *Pak3-R67C* restent au niveau de la chance. Pour aller plus loin dans l'analyse comportementale, nous avons étudié plus précisément les essais du dernier bloc de 3 jours en fonction du nombre d'essais interférents (IT_n, nombre d'essais entre 2 essais d'une même paire ; cf. Mat et Met II.2.2.c; Figure 3G) et montré que les performances des souris *Pak3-R67C* diminuent significativement quand l'IT_n augmente. Alors que les résultats des souris WT diminuent progressivement de 87% à 65%, en fonction de l'augmentation de l'IT_n, les performances du groupe *Pak3-R67C* étaient déjà plus faibles pour l'IT_n minimum et ne se différencient pas de la chance pour l'IT_n maximal (Figure 3G). De même, l'analyse du dernier bloc

d'essais en fonction de l'interférence proactive (PI) a montré qu'à l'inverse des performances des souris WT, les souris *Pak3-R67C* présentent de bonnes performances uniquement en cas de faibles interférences proactives (low PI) mais une haute sensibilité aux fortes interférences (high PI ; Figure 3H).

La réalisation de cette tâche est associée à une activation du GD révélée par une augmentation de l'expression du gène immédiat précoce *c-fos* (Al Abed *et al.* 2016). De plus, quelques études montrent une implication de la neurogenèse adulte dans la gestion des interférences (Winocur *et al.* 2012 ; Epp *et al.* 2016). Guidés par ces indications, nous avons donc vérifié si cette tâche dépendait, au moins en partie, de la neurogenèse adulte en analysant les performances de souris chez lesquelles la neurogenèse adulte a été abolie par irradiation focale de l'hippocampe (collaboration IRSN, Fontenay-aux-Roses). Pour cela, nous avons tout d'abord validé les effets de l'irradiation focale dans le GD des souris irradiées (IR) en réalisant des analyses immunohistochimiques avec les marqueurs DCX et BrdU, et nous avons confirmé l'absence presque totale de nouveaux neurones 10 semaines après irradiation (Figure supplémentaire 2B-C). Au niveau comportemental, nos résultats indiquent que les performances des souris non irradiées (NIR) s'améliorent au cours du temps alors que celles des souris IR restent au niveau de la chance (Figure supplémentaire 2D). Comme pour les souris *Pak3-R67C*, nous avons analysé plus précisément le bloc final correspondant aux trois derniers jours en fonction de l'ITn (Figure supplémentaire 2E) et avons montré que les performances des souris IR diminuent significativement lorsque l'ITn augmente. Nous avons également analysé les performances en fonction des interférences proactives et montré que les souris irradiées présentent un déficit en conditions de faibles et fortes interférences (low et high PI ; Figure supplémentaire 2F). Ces résultats montrent que les nouveaux neurones dans le GD dorsal sont nécessaires pour la réalisation de cette tâche comportementale qui nécessite une bonne gestion des interférences proactives, ce qui n'avait encore jamais été démontré.

Dans l'ensemble, ces résultats montrent, premièrement, que les nouveaux neurones du GD dorsal jouent un rôle important dans la capacité à organiser les événements au sein de la mémoire de façon à surmonter les interférences, et deuxièmement que la mutation R67C du gène *Pak3* conduit à des déficits similaires à ceux observés en absence de nouveaux neurones dans la gestion des interférences et dans l'organisation des événements en mémoire. D'autre part, à notre connaissance, aucune d'étude n'a testé la sensibilité aux interférences chez des modèles murins de DI bien que la gestion des interférences soit altérée chez les patients DI (Bexkens *et al.* 2014a-2014b). Ceci est probablement lié au fait que ces patients présentent souvent des problèmes d'attention (Iarocci & Burack, 1998). Néanmoins, malgré la similitude des déficits observés chez les souris irradiées et chez les souris *Pak3-R67C* dans cette tâche, on ne peut pas, à ce stade de l'étude, conclure que les déficits mnésiques observés chez ces souris dépendent uniquement d'un déficit de neurogenèse adulte.

2.2. La mutation R67C du gène *Pak3* entraîne une mort accélérée transitoire des nouveaux neurones durant leur période critique de maturation

Durant la neurogenèse embryonnaire chez le xénope, Souopgui *et al.* (2002) ont montré que PAK3 est impliquée dans le contrôle de la sortie du cycle cellulaire, ainsi que dans la différenciation des précurseurs neuronaux, confortant notre hypothèse quant à son implication potentielle dans la neurogenèse adulte. Notre seconde série d'expériences a donc consisté à étudier les différentes étapes de la neurogenèse adulte dans le GD des souris WT et *Pak3*-R67C. Tout d'abord, nous avons étudié, au niveau cérébral, les volumes des hippocampes dorsaux, des GD et des couches granulaires et montré que ces volumes chez les souris *Pak3*-R67C sont comparables à ceux des souris WT (Figure supplémentaire 3). Notre étude basée sur différents marqueurs n'a montré aucune altération de la prolifération, de la différenciation ou de la maturation neuronale (Figure 4C-4E-F). Par la suite, nous avons étudié l'implication de PAK3 dans la survie des nouvelles cellules générées 18, 28 et 38 jours après incorporation de la BrdU. La quantification stéréologique des noyaux ayant incorporé la BrdU montre une mort accélérée des nouveaux neurones entre 18 et 28 jours après leur naissance chez les souris *Pak3*-R67C. Cependant, la densité de cellules qui a survécu 38 jours après injections de la BrdU est similaire entre les deux groupes de souris, montrant que la mort des nouvelles cellules est plus précoce chez les souris *Pak3*-R67C, sans conséquence ultérieure pour le pool final de nouveaux neurones qui survivent à plus long terme (Figure 4D). Plusieurs études de modèles murins de DI ont mis en évidence des déficits de survie des nouveaux neurones (Shen *et al.* 2006 ; Contestabile *et al.* 2007 ; Luo *et al.* 2010 ; Tian *et al.* 2012). Toutefois, à notre connaissance, très peu d'études sur des modèles de DI ont réalisé une analyse de la dynamique de la neurogenèse comme nous l'avons fait ici, mettant en évidence ce phénomène spécifique de mort accélérée durant la période critique. La mutation R67C du gène *Pak3* influence donc la survie des nouveaux neurones durant la période critique de maturation où ils sont sélectionnés pour mourir ou survivre afin de s'intégrer dans les réseaux de l'hippocampe. Etant donné que les jeunes nouveaux neurones sont impliqués dans certains processus mnésiques dépendant de l'hippocampe, il est possible que cette mort accélérée des nouveaux neurones contribue aux déficits cognitifs observés. Cependant, il est également envisageable que ces effets soient médiés par des anomalies physiologiques dans le GD. En effet, il a été montré *in vitro*, un déficit de PLT dans le CA1 en absence de la protéine PAK3, associé à une forte diminution de la forme active de la protéine CREB (Meng *et al.* 2005). De plus, en présence de la mutation R67C précisément, Kreis *et al.* (2007) ont observé une diminution de la densité des épines dendritiques, sans modification de la structure des épines sur des neurones pyramidaux de CA1.

2.3. Le gène *Pak3* contrôle le recrutement des nouveaux neurones dans les réseaux impliqués dans les processus mnésiques

Guidés par plusieurs études montrant que l'apprentissage spatial peut recruter certains jeunes nouveaux neurones pendant leur période critique de maturation (1-3 semaines) et moduler leur survie (Kee *et al.* 2007 ; Veyrac *et al.* 2013), nous avons examiné si l'apprentissage spatial pouvait compenser la mort neuronale observée et activer des nouveaux neurones du GD. Nous avons donc injecté des souris *Pak3-R67C* avec de la BrdU, puis soumis ces souris à un apprentissage spatial précisément au moment de la période critique des nouvelles cellules marquées (18 jours post injections) afin d'analyser l'influence de l'apprentissage sur leur survie (Figure 4A). Les résultats ont été analysés après un test de rétention 10 jours plus tard (les cellules BrdU sont alors âgées de 28 jours) afin d'étudier l'activation / le recrutement des nouveaux neurones par la tâche comportementale en labyrinthe aquatique. Les résultats chez les souris WT et *Pak3-R67C* montrent que la tâche comportementale n'a pas eu d'incidence sur la survie des nouveaux neurones âgés de 18 jours au moment de l'apprentissage (Figure 4A). Dans notre étude, l'apprentissage spatial n'a donc pas favorisé la survie des nouvelles cellules. La littérature reste toujours très controversée à ce sujet, certaines études montrent un effet positif de l'apprentissage sur la survie neuronale, d'autres un effet négatif, et enfin, comme dans notre étude, certains auteurs ont également mis en évidence une absence d'effets (Snyder *et al.* 2005; Mohapel *et al.* 2006 ; Epp *et al.* 2007 ; pour revue, voir Ehninger & Kempermann, 2006 ; Veyrac *et al.* 2013).

Afin d'étudier l'impact fonctionnel de cette mort accélérée (observée même en conditions basales) et de rechercher de possibles mécanismes sous tendant les déficits mnésiques, nous avons étudié l'activation / le recrutement des nouveaux neurones par la tâche comportementale. Guidés par des études montrant que les nouveaux neurones âgés de 3 à 6 semaines sont activés lors de la réalisation de certains apprentissages dépendants de l'hippocampe (Aasebø *et al.* 2011 ; Veyrac *et al.* 2013), nous avons ciblé une population de cellules BrdU âgées de 4 semaines et étudié leur recrutement en utilisant le marqueur d'activation Zif268, après un test de mémoire spatiale 10 jours après l'apprentissage. Nous avons étudié précisément l'activation après le test de rétention des neurones immatures ($DCX^+/NeuN^+$), des neurones de 28 jours ($BrdU^+/NeuN^+$) et des neurones matures ($DCX^-/NeuN^+$) dans les quatre groupes de souris. Chez les souris contrôles sans apprentissage, aucun neurone immature $DCX^+/NeuN^-$ n'est activé et une proportion identique de neurones âgés de 28 jours activés et de neurones matures activés ($BrdU^+/NeuN^+/Zif268^+$ et $NeuN^+/Zif268^+$) est observée (Figure 4C-D). Après la réalisation de la tâche comportementale et le test de rétention, une proportion plus élevée des neurones matures activés est observée dans les deux groupes de souris (Figure 4D). L'activation des neurones de 28 jours est similaire entre les deux groupes de souris, mais on constate l'absence complète de recrutement de neurones immatures chez les souris *Pak3-R67C*, par rapport aux souris WT dont une petite proportion est activée (Figure

4B). Ces résultats suggèrent qu'il n'y a pas d'activation des neurones immatures chez les souris *Pak3-R67C*. Selon la littérature, il est désormais connu que les nouveaux neurones du DG présentent, au moment de leur période critique de maturation (1-3 semaines), des propriétés électrophysiologiques particulières d'hyperactivité et d'hyperexcitabilité qui pourraient faciliter leur recrutement au cours de l'apprentissage afin de contribuer aux fonctions mnésiques de l'hippocampe (Snyder *et al.* 2009). En conséquence, l'absence de recrutement de ces neurones encore immatures que nous avons observée, pourrait donc contribuer aux déficits cognitifs associés à la mutation R67C du gène *Pak3*.

De ce fait, pour comprendre pourquoi les nouveaux neurones immatures ne sont pas activés suite au test de mémoire spatiale, nous avons émis l'hypothèse que chez les souris *Pak3-R67C* les nouveaux neurones pourraient ne pas être totalement matures fonctionnellement pour pouvoir être activés. Pour tester cette hypothèse, nous avons alors étudié l'expression des co-transporteurs du Cl⁻, NKCC1 et KCC2b, impliqués dans le « switch » GABA, indicateur de la maturation fonctionnelle des nouveaux neurones. Comme je l'ai détaillé au cours de l'introduction, l'ensemble des changements morphologiques et synaptiques qui ont lieu dans cette période critique sont essentiels pour le recrutement et la survie de nouveaux neurones (Aasebø *et al.* 2011). Chez les souris *Pak3-R67C*, nos résultats indiquent un déséquilibre dans l'expression des deux cotransporteurs au Cl⁻ pour les nouveaux neurones âgés de 18 jours, c'est-à-dire au moment de la réalisation de la tâche comportementale. En effet, par rapport aux souris WT, ces nouvelles cellules expriment davantage le co-transporteur dépolarisant NKCC1 et moins le co-transporteur hyperpolarisant KCC2b (Figure 5A-B). Ces résultats indiquent que PAK3 est nécessaire à la mise en place des fonctions GABAergiques pendant la période critique de maturation des nouveaux neurones. Ainsi, la mutation R67C du gène *Pak3* entraîne un retard de maturation fonctionnelle. En conséquence, à 18 jours, on peut faire l'hypothèse que certains nouveaux neurones du DG des souris *Pak3-R67C* n'ont pas encore acquis les capacités fonctionnelles nécessaires pour être correctement activés et recrutés par une tâche comportementale, ce qui entraînerait leur mort précoce et contribuerait aux déficits cognitifs observés en mémoire spatiale, ainsi que dans la fonction de séparation de patterns. Pour appuyer cette hypothèse, il a récemment été montré au laboratoire que les souris *Zif268-KO* présentent de la même façon que les souris *Pak3-R67C*, un déficit de mémoire à long terme (25 jours) suite à un apprentissage massé en piscine de Morris, ainsi qu'un retard de maturation fonctionnelle des nouveaux neurones et une mort accélérée pendant la période critique. De plus, l'expression de *Zif268* par les nouveaux neurones durant leur période critique de maturation contrôle activement leur recrutement lors de l'apprentissage et promeut leur survie (Veyrac *et al.* 2013). Ainsi, chez les souris *Pak3-R67C*, le défaut de maturation fonctionnelle des nouveaux neurones pendant la période durant laquelle *Zif268* peut être exprimé pourrait être un facteur important expliquant l'altération de leur recrutement.

En conclusion, la mutation R67C du gène *Pak3* entraîne un retard de maturation fonctionnelle des nouveaux neurones pendant leur période critique d'intégration au sein des réseaux neuronaux de l'hippocampe. Lors de la réalisation d'une tâche comportementale dépendante de l'hippocampe, une proportion de nouveaux neurones des souris *Pak3*-R67C n'a donc pas encore acquis les capacités fonctionnelles nécessaires pour être activée et recrutée par cette tâche, ce qui peut expliquer à la fois la mort précoce de ces neurones et contribuer aux déficits cognitifs observés. A ce jour, nous ne savons pas encore si l'absence de PAK3 aurait les mêmes effets que ceux observés chez notre mutant *Pak3*-R67C. Les données apportées dans cette étude permettent donc d'ajouter un argument supplémentaire quant à la contribution de la neurogenèse hippocampique adulte aux déficits cognitifs associés à la DI.

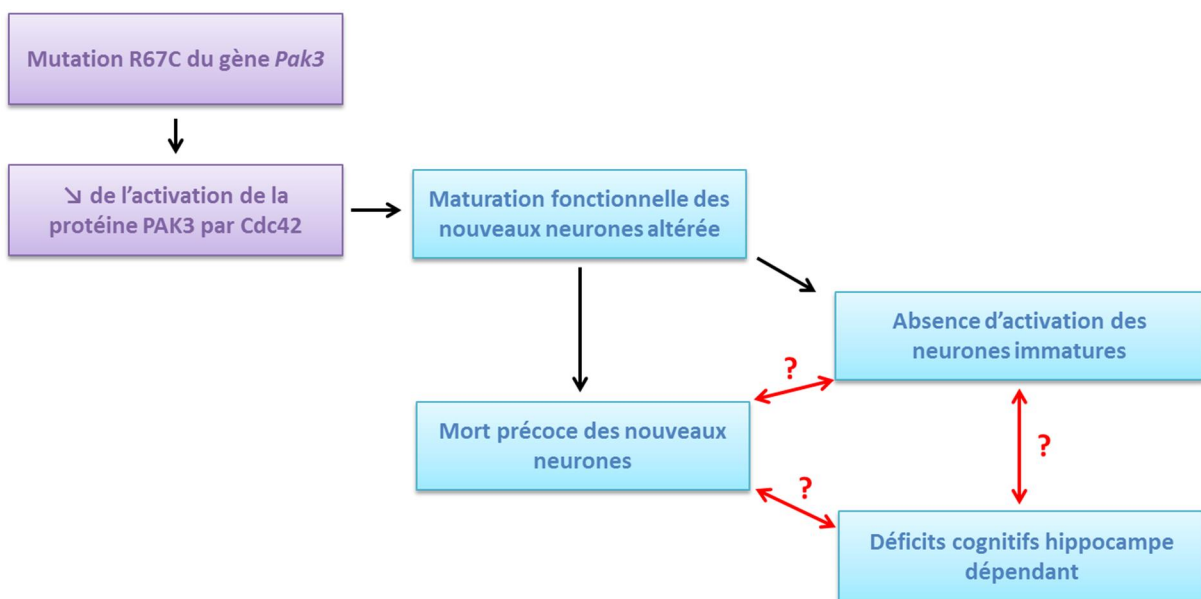


Figure 30 : Schéma récapitulatif des résultats obtenus chez la souris mutante *Pak3*-R67C

Article 2

ARTICLE EN PREPARATION

**The intellectual disability PAK3 R67C mutation impacts cognitive functions
and adult hippocampal neurogenesis**

¹Castillon C, ¹Dominichini F, ¹Guyon S, ¹Da Silva K, ²Durand C, ²Lestaevel P,
¹Vaillend C, ¹Laroche S, ¹Barnier JV, ¹Poirier R

¹ Paris-Saclay Neuroscience Institute, UMR 9197, CNRS, Univ. Paris-Sud, Univ. Paris-Saclay, F-91405 Orsay, France.

² Institute for Radiological Protection and Nuclear Safety (IRSN), Research department on the Biological and Health Effects of Ionizing Radiation (SESANE), Laboratory of experimental Radiotoxicology and Radiobiology (LRTOX), Fontenay aux roses, France.

Introduction

Intellectual disability (ID) is characterized by impaired cognitive functions and adaptive behaviors (DSMV, 2013). Although the causes of ID are highly heterogeneous, genetic factors take a large part in the etiology of ID and numerous cases are caused by mutations in single genes located on the X chromosome and autosomic genes (Vissers et al., 2015). The proteins encoded by ID genes regulate cellular processes including synaptic function, neurogenesis, neuronal migration, and regulation of transcription and translation (Vaillend et al., 2008, van Bokhoven, 2011). While abnormalities in synaptic plasticity and dendritic spine morphogenesis have been reported to contribute to cognitive deficiencies in models of ID, alterations in different steps of adult hippocampal neurogenesis have more recently been linked to cognitive deficits in several models of syndromic ID (Pons-Espinal et al., 2013). To further address this issue, we chose as a case study the X-linked p21-activated kinase-3 (PAK3) gene because this gene is involved in signaling pathways that control synaptic plasticity and neurogenesis and mutations of the gene were reported to cause ID (Allen et al., 1998).

Pak3 is evolutionary conserved among vertebrates and highly expressed in brain, in particular in cortex and hippocampus (Kreis and Barnier, 2009). PAK3 protein belongs to group-I PAK family of serine/threonine kinases that are downstream effectors of RhoGTPases Rac1 and Cdc42 (Bokoch et al., 2003). At the cellular level, PAK3 has been implicated in LIM kinases activation that control actin cytoskeleton dynamics, in MAP Kinase activation and in AMPA receptor trafficking, mechanisms that play major roles in synaptic plasticity and learning and memory (Boda et al., 2004; Hussain et al., 2015, Kreis and Barnier, 2009, Penn et al., 2017). Currently, however, little is known about the *in vivo* function of Pak3. A Pak3 Knock-out mouse was generated which showed normal spatial learning and memory despite abnormality in hippocampal synaptic plasticity, and altered extinction of taste-aversion learning (Meng et al., 2005). However, how single mutations of Pak3 may cause ID is unknown. Because PAK3 was also identified as an important component in the control of cell cycle exit and in the differentiation of neuronal precursors in *Xenopus* embryos (Souopgui et al., 2002), in the time course of interneuron migration during cortical ontogenesis (Cobos et al., 2007) and in oligodendrocyte precursor differentiation (Maglorius Renkilaraj et al., 2017), we hypothesize that mutations leading to PAK3 dysfunction may also alter adult hippocampal neurogenesis and neurogenesis-dependent cognitive functions. To date, over 10 mutations of PAK3 gene have been reported causing mild to severe ID (Tzschach et al., 2015; Hertecant et al., 2017). Here, we focused on the R67C missense mutation known to cause a severe form of non-syndromic ID in patients (Bienvenu et al., 2000). This mutation, which falls within the regulatory domain of the protein, does not affect kinase activity, but modifies its interaction with GTPases, leading to reduced PAK3 activation by the Cdc42 GTPase (Kreis et al., 2007). We generated the first model for PAK3-dependent ID by knock-in the R67C mutation, strictly identical to the human mutation described in Bienvenu et al. (2000). We characterized the behavioural phenotype of this novel ID model and focused on adult neurogenesis-dependent tasks, assessing spatial memory and pattern separation function. We examined whether the R67C mutation affects any of the key steps of basal adult hippocampal neurogenesis by assessing

progenitor cell proliferation, differentiation, neuronal and functional maturation, and survival of adult-born neurons. Finally, we explored adult hippocampal neurogenesis in relation to spatial learning by analyzing the effect of the mutation on neuronal survival and the recruitment of newborn neurons by learning.

Materials and Methods

Generation of Pak3-R67C knock-in mice

The 8.6 kb genomic fragment (corresponding to the 143.704.924 to 143.713.589 nucleotides from the X chromosome in the genome assembly reference sequence GRCm38.p4) containing the coding exon 2 of the C57Bl/6N mouse Pak3 gene was subcloned from a BAC plasmid into the backbone vector pHL931. The modified arm containing the coding exon 2 of Pak3 (0.8 kb) and the floxed neomycin selection cassette were inserted between the 5 ϕ homology arm (4.4 kb) and the 3 ϕ arm (3.5 kb) by PCR. Directed mutagenesis of the g>143709671 C>T was done by PCR and DpnI digestion and verified by sequencing. The linearized vector was electroporated into an ES cell line (MCI-C57BL/6N). 361 neomycin-resistant clones were screened for homologous recombination by PCR and 5 positive clones were further confirmed by Southern blotting after DNA genomic digestion with AseI, NdeI to validate 5 ϕ arm insertion and SexAI and XcmI to validate 3 ϕ arm insertion. Two selected clones were injected in blastocysts and embryo transfer to pseudopregnant females was performed by standard procedures. Offspring (F1) with the coat color characteristic for the ES background were tested for germ line transmission by PCR and further confirmed by Southern blot analysis. In order to remove the positive selection marker, 8-week old positive F1 mice were then bred with recombinase expressing C57BL/6 mice (Birling et al., 2012). Segregation of the targeted gene and Cre-recombinase alleles were also monitored by Southern blot analysis. As the missense mutation suppresses a HhaI site, the corresponding genomic region of a PAK3-R67C male was PCR-amplified from genomic DNA with high-fidelity Taq polymerase and the two primers 5 ϕ -GCTTTCTTATGCAGTGTATGCAAGCCA and 5 ϕ -GGAGGAAAAGTTTCCATCTTCAGACTGAC, and the amplified PCR fragment was cloned and several clones were sequenced. The genotype of mutated mice was routinely determined by PCR analysis using primers encompassing the lox sequences (forward primer 5-GTGGGTTTTGATGCAGTCACCGG and reverse primer CAAATTTTGCAGAGACTTTGGCACTG), yielding 465 and 552 bp fragments in the presence of the wild-type and mutant allele, respectively. The mice were maintained as hemizygous breeders on a C57Bl/6J background. Hemizygous mice are generated at Mendelian ratio, and homozygous mice are fertile with no apparent phenotype.

Analysis of PAK3 mRNA expression by quantitative real-time PCR

Total RNA was isolated from adult brain using the TRIzol Reagent (Life Technologies) according to the manufacturer's protocol. cDNA was generated from 0.5 µg of mRNAs using the iScript Reverse Transcription Supermix (Biorad). Using the SsoAdvanced Universal SYBRGreen Supermix (Biorad), real-time PCR was performed on the CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Biorad). The Pak3 primer set was obtained from Qiagen (QuantiTect Primer Assay: Mm_Pak3-1-SG; QT00119560) and used following the manufacturer's instructions. Samples were amplified in triplicates and relative copy number was determined using the comparative Ct method, with PGK1 (Pgk1 primers: 5'-CTGACTTTGGACAAGCTGGACG and 5'-GCAGCCTTGATCCTTTGGTTG) and 2-microgloblin (B2m primers: 5'-CCGCCTCACATTGAAATCCA and 5'-TCGATCCCAGTAGACGGTCTTG) as normalization genes, and expressed compared to a human embryonic brain mRNA sample as exogenous reference (Clinisciences).

Western blotting et immunoprecipitation

For immunoprecipitation from brain tissue, two-month-old adult forebrains were rapidly dissected, cut in small pieces with scalpel and homogenized with Dounce (10 pushes) in 10 volumes/weight (i.e. 10 ml/1 gr) of lysis buffer (Tris 10 mM, pH 8.0, 0.5 mM DTT, supplemented with a cocktail of protease and phosphatase inhibitors as previously described (Combeau et al., 2012)). The lysate was centrifuged at 100,000g 30 min at 4°C and the amount of proteins in the supernatant S1 corresponding to the cytosol fraction was measured by Folin or Bradford methods. The membrane pellet was resuspended with the same buffer added with 2% SDS, sonicated and then centrifuged (100000g, 30 min, 4°C). Protein quantification of the SDS-soluble fraction S2 was done by the method of Lowry. We did not observe any difference in PAK1 or PAK3 purification in the cytosolic and membrane fractions in knock-in brains compared to WT brains (data not shown). For immunoprecipitation from cell cultures, 35 mm dishes cultured cells were washed twice with ice-cold phosphate-buffered saline and lysed in 50 µl of cold lysis buffer containing 50 mM Tris-HCl, 1% Triton X-100, 100 mM NaCl, 50 mM NaF, 10 mM Na₄P₂O₇, 5 mM EDTA, 1% aprotinin, 1 mM 4-(2-aminoethyl)-benzenesulfonyl fluoride (Pefabloc SC, Interchim), pH 7.5, and then clarified by centrifugation (13,000 g, 10 min). For PAK3 expression, PAK3 protein was immunoprecipitated after with a Goat-anti PAK3 antibody (SC N19) and then revealed with a rabbit PAK3 specific antibody (AbCam).

Generation of the Pak3-tm1b mice and analysis of PAK3 expression

The C57BL/6N-Pak3-tm1a(EUCOMM)Hmgu mice were generated at the ICS facility by injecting embryonic stem (ES) cell clones carrying the PAK3 targeted allele (HEPD0663_5) obtained from the Knockout Mouse Project (KOMP) Repository into C57BL/6 blastocysts (Skarnes et al., 2011). Generation of Pak3-tm1b-lacZ reporter mice that express β-galactosidase under the control of endogenous PAK3 promoter was obtained by crossing tm1a mice with a global Cre deleter mouse expressing Cre recombinase ubiquitously under the control of a mouse Pgk1 promoter (Lallemand et al., 1998). This resulted in deletion of both the neomycin cassette and critical exon 2, leading to the

generation of tm1b-lacZ reporter mice that express β -galactosidase in cells where PAK3 would ordinarily be expressed. Genotyping was performed by 3 primers-PCR with the following primers for PAK3-tm1a: 5 ϕ -GTGGGACTCTGACATCAATG-3, 5 ϕ -GCAGATAGGTACACACCAGC-3 and 5 ϕ -R 5 ϕ -CAACCTGACCTTGGGCAAGAAC, and for Pak3-Tm1b: 985-MP3-E4-F 5 ϕ -CCCATGGATACATAGCAGCAC, 5 ϕ -CTTATCATGTCCGGATCCGG, and 5 ϕ -CACTTTGAAGACCAGACTGGTC. Analysis of PAK3 expression was done by β -galactosidase staining on tm1b brain slices. Briefly, brains were dissected as described below and free-floating brain sections (40 μ m) were permeabilized for 10 min at room temperature in phosphate buffer containing 0.01% sodium-deoxycholate (w/v) and 0.02% Nonidet P-40 (v/v). Then, sections were stained with X-Gal reaction buffer (phosphate buffer containing 5 mM K₃[Fe(CN)₆], 5 mM K₄[Fe(CN)₆], 2 mM MgCl₂) containing 0.8 mg/ml of X-Gal to visualize β -Gal activity. The reaction was performed overnight at 37°C in darkness. Subsequent to X-Gal staining, sections were washed in 0.1 M phosphate buffer for 10 min twice. Sections were mounted using Fluoromount medium.

X-Irradiation

Adult mice were exposed to X-ray ionizing radiation using the Small Animal Radiation Research Platform (SARRP) of IRSN. The dorsal dentate gyrus was specifically irradiated with the protocol described by Dos Santos et al (submitted, 2018). Briefly, mice were anesthetized by ip injection of ketamine (100 mg/Kg) / xylazine (10 mg/Kg) solution. A fractioned protocol was performed to deposit a total dose of 15 Gy in three days (3 x 5 Gy) spaced by one day, using the 1 mm irradiation field and 3 isocenters. Throughout the duration of the study, there were no noticeable side effects of irradiation in terms of weight loss or hair loss. Non-irradiated sham control mice (NIR) were transported to the irradiation facility, anaesthetized, and subjected to scanner imaging, but were not irradiated.

Animal breeding for behavioral experiments

All the mice were housed in a temperature and light-controlled colony room (12-h light/dark cycle) in groups of 2-6 per cage with food and water ad libitum (except for mice submitted to behavioural testing in the radial maze). Experiments were conducted during the light phase and were performed blind to the genotype. Experimental procedures were conducted in accordance with the guidelines established by the European Communities Council Directive (2010/63/EU Council Directive Decree) and the Animal Experimentation Ethical Committee (CEEA N°59, project N°1408). All efforts were made to reduce the number of mice used and to minimize their suffering.

Behavioural procedures

Adult (3-month old) male Pak3 hemizygous knock-in mice (Pak3-R67C) and Wild-Type (WT) littermate mice were used in behavioural studies. A supplementary group of 8-week old C57BL/6 irradiated (IR, n=10) and non-irradiated mice (NIR, n=8) was used. Before the start of behavioural experiments, mice were handled 2 minutes per day for 3 days by the experimenter. For

each behavioural task, a camera connected to a videotracking system (ANY-maze[®], Stoelting) was placed above the devices to record behavioural sequences.

Open field

One group of male Pak3-R67C (n=15) and littermate control mice (n=12) aged 4 months was submitted to an open-field exploration test. The test box was a square open-field (50 x 50 x 50 cm) with black walls and white floor under homogeneous illumination (100 lx in centre area). Each mouse was released near the wall and allowed to move freely in the area during 40 min. Recorded x-y positions were used to generate tracking plots of exploration paths and to calculate the distance travelled, time spent, average speed, and maximal speed (bouts of acceleration) in distinct zones of the box (whole apparatus, in a 10-cm width virtual corridor along the walls and the remaining centre area). Latency of the first entry, number of entries, percent distance travelled in centre area and along walls were calculated as relative measures of anxiety. Videos were analyzed offline using event-recorder keys in ANY-maze[®] to quantify vertical activity (number of rearings/leanings).

Water maze set-up and training procedures

The water maze consisted of a circular tank (150 cm in diameter, 37 cm high) filled with water (21°C ± 0.5°C) to 7 cm below the top of the sidewall, made opaque by adding a white, non-toxic paint (Acusol OP301 Opacifier; Rohm and Haas). The maze was placed in a room containing several different cues on the walls. The pool was divided into four virtual quadrants. A circular escape platform (11.5 cm in diameter placed at 40 cm from the wall), submerged 0.5-cm below the water surface, was located in the centre of one quadrant (target quadrant) and remained at a fixed location for each mouse during training. The three other quadrants served as starting points, assigned pseudo-randomly and varied on each trial. The maze was placed in a well-lit room (380 lx) containing several extra-maze cues. Data recorded by video-tracking (ANY-maze[®]) were used to reconstruct swim paths and to calculate averaged swim speed, swim path lengths and time spent in various virtual areas of the maze: the four quadrants, the four platform annuli (48-cm in diameter beyond that of the platform position) and a virtual corridor (19 cm in width) set along the wall to quantify thigmotaxis. Path efficiency was defined as an index of the efficiency of the path taken by the animal to get from its start position to the platform, with a score of 1 indicating perfect efficiency (straight line trajectory). Memory retention was evaluated during a probe test by comparing the time spent in the quadrant which previously contained the platform to chance (25%) and the number of crossings over the platform site in the quadrant that contained the platform during training.

Distributed protocol

One month after the open-field exploration test, a group of Pak3-R67C (n=15) and littermate WT mice (n=12) was submitted to a distributed spatial learning task in the water maze. One day before training, the mice underwent four trials of habituation during which they were trained to find and stay on the escape platform, placed in the centre of the tank, for 60 s. Following habituation, the training phase lasted 11 days and consisted of 4 successive trials during which the platform was always located

in the same quadrant for a given mouse. The position of the hidden platform was assigned for each mouse in one of the four virtual quadrants of the maze, such that the four positions were equally used in both groups of mice. Mice were introduced into the water maze from three different starting points in the quadrants that did not contained the platform and were allowed to swim freely until reaching the platform. The sequence of starting points was chosen in a pseudorandom order and counterbalanced among individuals. Mice failing to find the platform after 90 s were gently guided to it by hand and a maximum escape latency of 90 s was recorded. Mice remained 60 s on the platform before the start of the next trial. After this training phase, probe tests were performed 48h and one week after the last training session and consisted of a single trial during which the platform was removed.

Massed protocol

Another group of male mice WT (n=7) and Pak3-R67C mice (n=6) aged 3.5 months was used. For habituation, 1d before training, the mice were submitted to a single habituation block of three trials, with the platform protruding 0.5 cm above the water surface. A trial started by introducing the mouse into the maze facing the wall at one of the three designated starting points and allowed to swim freely until it reached the platform with a maximum time of 60 s. The mouse remained 60 s on the platform before being replaced at another starting point for the next trial. The next day, mice were trained to locate the hidden platform. The massed-training procedure (Veyrac et al., 2013) consisted in three training sessions separated by 2h, each composed of three blocks, 25-min apart, of three consecutive trials (27 trials total). At each trial, a mouse was introduced into the maze from any of the three different starting points and allowed to swim freely until it reached the platform. If a mouse failed to find the platform after 60 s, it was gently guided to it and allowed to stay on it for 60 s before the start of the next trial. Ten days after learning, the platform was removed from the pool and 2 successive probe tests, 3 min apart, are carried out.

Radial-arm maze set-up and training procedures

Three behavioural tasks were performed in a radial maze. The device (Ugo Basile, Italy) consists of an octagonal central platform (diameter 16 cm) surrounded by 8 arms (35 cm long, 5.5 cm wide) at the ends of which small plastic cups (diameter 1 cm, 0.5 cm deep) are fixed to deposit a reward (20 μ L of saccharin 0.1%) as a positive reinforcement. Doors at the entrance of each arm can be individually operated from a manual interface. The arms are open on the outside and allow the mouse to have a complete vision of extra-maze cues positioned on the walls of the testing room. One week prior to testing and during the training phase, mice were placed on a water-restriction regime with access to water for 10 min/day. During habituation, 1d before training, the animals were habituated to the apparatus during two sessions. On the first session, a group of littermate mice was allowed to move freely in the maze and collect rewards during 5 min. On the second session, mice were individually placed in the maze for 5 min to retrieve rewards from the baited arm wells. The maze is cleaned with absolute alcohol between each mouse.

Working memory

In this behavioral task, mice (WT n=10, Pak3-R67C n=11) have to recover rewards located at the end of the 8 arms of the radial maze without returning to a previously visited arm. Mice were submitted to 1 trial per day for 12 days. At the beginning of a trial, the mouse is placed in the center of the device surrounded by a transparent cylinder. All doors are open. The trial begins when the cylinder is removed. The maximum time for a trial is 5 min. If all rewards are recovered before the end of 5 minutes, the mouse is removed from the device. The number of working memory errors, consisting in entries into an already visited arm during a given trial, was counted.

Delayed non-matching to place paradigm in the radial-arm maze

The delayed non-matching to place (DNMP) paradigm was based on Clelland et al. (2009). During this task, WT (n=18) and Pak3-R67C (n=17) mice, aged 3.5 months, were tested for their ability to distinguish two spatial configurations represented by a variable difference between two arms positions of the radial-arm maze. During training for 10 consecutive days, mice were submitted to 4 trials/day separated by 20 minutes. Each trial included two phases: a sample phase followed by a choice phase 20s later. In the sample phase, only the start arm and one baited arm were opened. Once the reward was recovered, the mouse was removed from the maze, the maze was cleaned with alcohol and the choice phase started during which one additional arm was opened and was the only arm rewarded. This third arm varied in distance from the sample arm previously rewarded by either one arm (close configuration) or three arms (distant configuration) (Fig. 3). The trial was considered successful if the mouse directly went to the novel rewarded arm. An error was counted if the mouse chose the sample arm as before. During the first two days of the experiment, mice had the opportunity to correct their errors by going to the rewarded arm. Every day, the mice were randomly submitted to two trials in close configurations and two trials in distant configurations. Each arm used (start, sample and test arms) during the trial alternate randomly. On day 11, 24h after the end of training, mice were submitted to three spaced trials of 3 minutes each, either in the close configuration (WT n=9, Pak3-R67C n=9) or in the distant configuration (WT n=9, Pak3-R67C n=8). The percentage of corrects choices was analysed during training and test.

Successive spatial delayed non-matching to sample task in a radial-arm maze

To test memory flexibility and organisation, and susceptibility to proactive interference, we used the task modelling declarative memory of repetitive everyday events developed by Al Abed et al. (2016). This hippocampal-dependent task in the radial-arm maze requires the ability to retain recently visited places, i.e. which arm was the more recently visited within each of three repeatedly used pairs of arms, over varying intervals and intervening arm pairs. The task also requires the ability to organize and update the stored events as they are used, to overcome proactive interference from previous arm visits, and taxes both the retention and organizational components of hippocampus-dependent memory (Al Abed et al., 2016). We separately tested 2 cohorts of mice in this task: a group of irradiated (IR, n=10) and non-irradiated (NIR n=8) mice and a group of WT (n=13) and Pak3-R67C (n=13) mice. They were water restricted and maintained at 85-90% body weight for the duration of testing.

Two days before training, the animals were habituated to the apparatus during four sessions. The first day, the habituation protocol was similar to that of the previous behavioural task in the radial maze. The second day, mice were habituated to the opening / closing of the doors. For this, each mouse was placed individually in the central platform with all arms closed. All arms were baited. After thirty seconds, two or three arms were opened simultaneously and the mouse was allowed to get rewards, during five minutes. Behavioural training started the following day during 15 days. Each mouse was attributed a set of 3 pairs of adjacent arms (pairs A, B, and C; Fig. 4A) that were repeatedly and successively used until the end of training. At each training session, the mouse was submitted to successive presentations of the same 3 pairs, in a pseudo-random order, and required to choose the baited arm in each pair presentation. The position of the reward within each pair followed an alternation rule, a natural mouse behaviour. Thus, the reward was always positioned in the arm which was not visited by the mouse during the previous trial with the same pair (Fig. 4B).

At the beginning of each daily session, the mouse was placed in the central platform with all closed arms. In the first trial with each pair, at the beginning of a training session, both arms contained a food pellet. Thus, this trial was just a "sampling" trial, not a "testing" trial, but then, the alternation rule applied and each trial becomes both a "testing" trial and a "sampling" trial. After 10s, the mouse was given access to one of the 3 pairs of arms (A, B or C), and ask to choose to visit one of the two arms. The door of the non-chosen arm was closed as soon as the mouse reached the end of the chosen arm. As the mouse came back in the centre, the door of the chosen arm was closed. After a fixed inter-trial interval of 10s spent in the centre, another trial began with two opened arms (same pair, or any of the other two pairs) and so on. Each daily session consisted of 23 trials with a 10s inter-trial interval (ITI). Performance was measured as the percentage of correct trials over training and during the testing phase on day 11, as a function of the number of interfering trials (ITn) between 2 presentations of the same pair. Thus, the ITn corresponds to the number of interfering trials with different pairs between two trials of the same pair. ITn can therefore vary from 0 (two consecutive trials with the same pair) to 4 (4 interfering trials with different pairs between two trials from the same pair). The percentage of correct trials as a function of proactive interference (PI) was also calculated. PI was dependent on the number of interfering trials between trial n and trial n-1 of the same pair. If the ITn between n-1 and n is small, the interference generated for the trial n+1 is more important and vice versa. Two categories of PI were analysed, "low PI" for an ITn of 2 to 4 between trials n-1 and trial n, and "high PI" when the ITn is between 0 and 1.

BrdU administration

To study adult newborn cell survival in basal conditions, WT and Pak3-R67C mice were given three BrdU injections (100 mg/kg, i.p.) at 4h intervals on a single day and were perfused 18 (WT n=5, Pak3-R67C n=5), 28 (WT n=6, Pak3-R67C, n=7) and 38 (WT n=4, Pak3-R67C n=5) days later. To analyse cell survival after the spatial learning and memory task, a group of Pak3-R67C mice (n=6) and their littermate controls (n=7) received three i.p. injections of BrdU (100 mg/kg) at 4h intervals. The mice were then trained 18 days later and perfused 10 days after training (28 days after BrdU injections). To

quantify co-labelling with the immediate early gene *zif268*, all mice were sacrificed 90 min after the end of the behavioural task. Additional naive control groups (WT n=6, Pak3-R67C n=7) consisted of undisturbed mice remaining in their home cages and killed 28 days after BrdU injections. Irradiated mice (n=10) and their non-irradiated controls (n=8) received two BrdU injections per day (100 mg/kg, i.p.) at 8h intervals for 3 days and were trained 21 days later and perfused 15 days after the beginning of training (35 days after BrdU injections).

Tissue Preparation and Immunohistochemistry

Mice were deeply anesthetized with and i.p injection of pentobarbital (0.1%) and then perfused transcardially with a solution containing 4% cold paraformaldehyde (PFA) in 0.1M phosphate buffer (PB). Brains were dissected out and fixed overnight in PFA at 4°C, then transferred in PB 0.1M containing sucrose (10%, 20%, 30%), frozen in 2-methylbutane (-25°C) and preserved at -20°C. Coronal sections (40 µm) were cut with a cryostat and preserved in cryoprotectant solution.

Revelations of BrdU⁺ and Ki67⁺ cells were performed on floating sections. After several rinses in PBS (phosphate buffer solution) and PBS Triton X-100, the sections were immersed in a methanol solution (10%) and H₂O₂ (10%) to inactivate endogenous peroxidase. For BrdU revelation, two supplementary steps were made: the sections were placed in a solution of 2N HCl (30 minutes at 37°C) to denature the DNA strands and allow the antigenic sites to become accessible to the antibody and the pH was reduced to a neutral value with a boric acid bath (0.1M, 15 min, pH 8.5). After blocking antigenic sites with goat serum (5%) the sections were incubated overnight at 4°C in a rat anti-BrdU primary antibody (1/400, OBT0030, AbD Serotec), or a rabbit anti Ki67 (1/400, ab16667 (SP6), Abcam), or a mouse anti-NeuN (1/600, MAB377, Millipore). Sections were then incubated in a goat biotinylated anti-rat (1/400, BA-9400, Eurobio) or a goat biotinylated anti-rabbit (1/400, BA-1000, Eurobio) secondary antibody for 1h30 at room temperature. Sections were then processed with avidin-biotin-peroxydase complex (1/400, ABC Elite Vector Labs) for 1h30, followed by three rinses of 5 min in PBS. The sections were then revealed in a DAB solution (3,3-diaminobenzidine-tetrahydrochloride (Sigma-Aldrich) to obtain black immunolabelling. Sections were then mounted on slides and stained-against Nuclear Fast Red in order to visualize the granule cell layer (GCL) of the DG. After dehydration, the slides were mounted with the mounting medium (Eukitt).

Immunofluorescence

For BrdU double- and triple-labelling, sections treated as above were incubated overnight at room temperature in rat anti-BrdU (1/400, OBT0030, AbD Serotec) antibodies, together with the following antibodies: guinea-pig anti-doublecortin (anti-DCX) (1/1000, AB2253, Millipore) and/or mouse anti-NeuN (1/600, MAB377, Millipore), rabbit anti-GFAP (1:1000; DAKO), rabbit anti-Zif268 (1/100, (C-19):sc-189, Santa Cruz Biotechnology, inc), rabbit anti-glutamate receptor 1 (GluA1; 1:200; Millipore), rabbit anti-KCC2b (1:100; StressMarq Biosciences), mouse anti-NKCC1 (1:1000; T4-c; DSHB). Sections were then incubated for 1h30 at room temperature in goat biotinylated anti-rat (1/400, BA-9400, Eurobio) or a goat biotinylated anti-rabbit (1/400, BA-1000, Eurobio) antibodies

followed by streptavidin alexaFluor®568 (1/1000; S11226, Invitrogen) or streptavidin alexaFluor®488 (1/1000; S11223, Invitrogen), or with anti-rabbit alexaFluor®488 (1/400, A11034, Invitrogen), anti-guinea pig alexaFluor®488 (1/400, A11073, Invitrogen), anti-mouse alexaFluor® 647 (1/300, A21236, Invitrogen) and mounted in vectashield medium with DAPI (Vector Laboratories).

BrdU⁺ / Ki67⁺ and DCX⁺ cells quantification

All cell counts were conducted by an experimenter blind to the genotype and experimental conditions. Labelled profiles were counted with an Olympus microscope (BX60) coupled with mapping software (MercatorPro; ExploraNova). The surface areas of the hippocampus, dentate gyrus and granule cell layer were traced in mapping software (Mercator Pro, Explora Nova), objective X10. Counting of BrdU⁺ nuclei, Ki67⁺ cells or DCX⁺ cells was done only in DG of the dorsal hippocampus (bregma 1.15 mm to 3.30 mm). For BrdU quantification, six sections per animal spaced by 240 μ m were used. For Ki67⁺ and DCX⁺ cells, three sections per animal spaced by 480 μ m were used. The volume was determined by multiplying the surface area by the distance between sections (240 μ m or 480 μ m). Densities of BrdU⁺, Ki67⁺, and DCX⁺ cells were estimated by multiplying the total number of labelled cells by 6 or by 12.

Double- and triple-labelling analysis and quantification

Sections were analysed using the Zeiss confocal system (LSM700).

BrdU⁺ cells: To establish the percentage of BrdU cells double-labelled with GFAP, or triple-labelled with NeuN and one of the following antibodies: DCX / Zif268 / GluA1 / NKCC1 / KCC2b, 4-6 serial sections (240- μ m spacing) from all mice were examined throughout the dorsal DG. Co-localisations were evaluated on 100-125 BrdU⁺ cells per group of mice by performing z-stack acquisitions and 3D reconstructions to univocally verify double or triple labelling. All acquisitions were carried out in sequential scanning mode to prevent cross-bleeding between channels.

DCX⁺ cells: To establish the percentage of DCX cells triple-labelled with Zif268 and NeuN, eight 10 μ m stacks in 2 DG serial sections per mouse (two of each DG, 480- μ m spacing) were collected at 40 \times . The number of DCX⁺/Zif268⁺/NeuN⁺ cells in each stack was counted manually. In total, co-localisations were evaluated on 300-400 DCX⁺ cells per group of mice.

NeuN⁺ cells and Zif268⁺ cells quantification: To quantify the total number of cells in the GCL (NeuN⁺ cells) and the percentage of Zif268⁺ cells double-labelled with NeuN, twelve 6 μ m stacks in 2 DG serial sections per mouse (six on each DG, 480- μ m spacing) were collected at 40 \times . The number of NeuN⁺ cells and Zif268⁺/NeuN⁺ cells in each stack was counted manually using Image J software (cells counters login) and summed per animal. In total, co-localisations were evaluated on 3800 NeuN⁺ cells per group of mice.

Statistical Analysis

All data were averaged across animals within each experimental group and are presented as means \pm SEM. Statistical comparisons were conducted by one-way or repeated measures ANOVA. One-sample

t-tests relative to 25% (spatial memory tests) or 50% (successive spatial delayed non-matching to sample task) were used to analyse performance against chance. Statistical tests were carried out using StatView 5.0 software. Significance level was set at $P < 0.05$.

Results

Generation of the Pak3-R67C mouse model and brain general anatomy

To provide insights into the effects of the Pak3 R67C mutation, we generated a mouse model expressing the mutated PAK3 gene encoding the PAK3-R67C protein. The generation of the Pak3-R67C mice was done by mutagenesis of the CGC>TGC mutation in the sequence of the second coding exon in the recombination vector (Fig. 1A). We verified that the HhaI site suppressed by this mutation (Bienvenu et al., 2000) was absent from the genomic fragment of the transgenic males (Fig. 1B). The genomic mutated sequence of exon 2 was verified after cloning (Data not shown). The mutated allele segregates with Mendelian ratio and mutated hemizygotic males and homozygotic females are viable and fertile, with normal life span. Body weights of adult males Pak3-R67C mice ($28.44\text{g} \pm 0.475$, $n=9$) were similar to those of their WT littermate ($28.11\text{g} \pm 0.633$, $n=9$). PAK3 mRNAs were transcribed at a similar level in transgenic adult male brain than in WT brain as quantified by quantitative RT-PCR (Data not shown). Pak3-R67C protein was normally expressed in adult male brain, as shown by immunoprecipitation (Fig. 1C).

General behavioural characterisation of Pak3-R67C mice

Pak3-R67C mice showed no overtly abnormal behaviour. In the open-field task, both genotypes showed a progressive and significant reduction of the distance travelled over the 40-min testing period (Supplementary Fig. 1A; time effect : $F(7,175)=26.79$, $p<0.001$; genotype effect : $F(1,25)=0.09$, $p=0.76$; interaction : $F(7,175)=0.41$, $p=0.89$), with no genotype difference in running speed ($F(1,25)=0.09$, $p=0.76$), maximal speed ($F(1,25)=0.11$, $p=0.73$) and vertical activity (Supplementary Fig. 1B; $F(1,25)=0.22$, $p=0.64$), thus ruling out the presence of major motor deficits or hyperactivity phenotype. Behavioural activity displayed in the center area of the open-field, which may typically reflect anxiety-related responses, was also unaltered in Pak3-R67C mice, as reflected by a lack of genotype difference in the latency to enter this area; $F(1,25)=0.58$, $p=0.45$), the number of entries in the center area ($F(1,25)=0.11$, $p=0.73$) and the percent time spent (Supplementary Fig. 1C; $F(1,25)=1.83$, $p=0.18$) and distance travelled in center ($F(1,25)=1$, $p=0.32$).

Impaired long-term spatial memory in Pak3-R67C mice in massed but not in distributed protocols

We analysed spatial learning and memory performance in the water maze following two training protocols. When training was distributed over 11 days (4 successive trials per day), mice of both genotypes showed comparable learning curves (Fig. 2A), as reflected by the time-dependent decrease in escape latency (repeated measures ANOVA, trials : $F(10,1141)=27.6$, $p<0.001$; genotype:

$F(1,25)=0.09$, $p=0.76$; interaction : $F(10,1141)=0.57$, $p=0.83$) and distance swum to find the platform (repeated measures ANOVA, trials : $F(10,1141)=15.9$, $p<0.001$; genotype: $F(1,25)=2.09$, $p=0.16$; interaction : $F(10,1141)=0.53$, $p=0.86$). The average swimming speed was slightly higher as training progressed in Pak3-R67C mice ($F(1,25)=8.99$, $p<0.01$) and thigmotaxis, which decreased significantly over training in both genotypes (time: $F(10,1141)=35.89$, $p=0.000$), was slightly less in Pak3-R67C mice during the first three training days (global interaction over 11 days: $F(10,1141)=2.68$, $p<0.01$). Pak3-R67C mice also displayed a reduced path efficiency during the last three days of training ($F(1,25)=5.93$, $p<0.05$). This suggested that Pak3-R67C mice expressed a slightly altered navigation and/or search strategy during learning, yet this did not prevent them to reach comparable learning performance to that of the controls. During the probe test performed 48h after the last training session, mice of both genotypes showed a preference for the target quadrant (Fig. 2B; repeated measures ANOVA, Quadrant: $F(3,175)=8.94$, $p<0.001$; genotype: $F(1,25)=0.86$, $p=0.36$; interaction : $F(3,175)=2.34$, $p=0.08$), with a larger percent time spent in the target quadrant (univariate t-test comparison to chance: $p<0.05$). However, during this probe test, again, Pak3-R67C displayed reduced path efficiency ($p=0.03$) and slightly longer distance swum before crossing the target platform position ($p<0.01$), suggesting mild retention deficit and/or altered navigation strategy. In a second probe test, one week post-training, mice of both genotypes displayed comparable performance and significant preference for the target quadrant (Fig. 2C), while genotype differences in path efficiency and distance swum before reaching target zone were not statistically significant. In all, the results suggest unimpaired spatial learning and memory performance, yet Pak3-R67C might have used slightly less efficient navigation strategies.

We then submitted another cohort of WT and Pak3-R67C mice to a more stringent spatial learning task using a massed protocol in the water maze (Jones et al., 2001; Veyrac et al., 2013) and analysed long-term memory performance 10 days after training. The time and swim path lengths to reach the platform decreased significantly during training in both genotypes (Fig. 2D; repeated measures ANOVA, time to find the platform: genotype: $F(1,11)=0.126$, $p=0.7298$; time: $F(8,88)=4.567$, $p=0.0001$; interaction $F(8,88)=0.884$, $p=0.5334$; distance : genotype effect: $F(1,11)=0.002$, $p=0.9623$; distance: $F(8,88)=7.686$, $p<0.0001$; interaction $F(8,88)=0.918$, $p=0.5061$). Swim speed and the percent time spent in the virtual corridor along the wall (thigmotaxis) were also similar between genotypes (repeated measures ANOVA, speed: genotype: $F(1,11)=0.407$, $p=0.5368$; speed: $F(8,88)=4.236$, $p=0.0002$; interaction $F(8,88)=0.447$, $p=0.8894$; thigmotaxis: genotype: $F(1,11)=0.193$, $p=0.8894$; thigmotaxis: $F(8,88)=27.450$, $p<0.0001$; interaction $F(8,88)=0.572$, $p=0.7985$). These results show that mice from both genotypes learned the task as efficiently. Spatial long-term memory was tested 10 days later by removing the platform. In contrast to WT mice who spent significantly more time in the target quadrant, Pak3-R67C mice spent as much time in the target quadrant as in the other quadrants (Fig. 2E; factorial ANOVA, target quadrant: $F(1,11)=7.364$, $p=0.0202$; one sample analysis, target quadrant: WT $t(6)=4.708$, $p=0.0033$; Pak3-R67C $t(5)=0.418$, $p=0.6934$). The mean number of crossings on the platform site was significantly smaller in Pak3-R67C than in WT mice (Fig. 2F; factorial ANOVA, $F(1,11)=5.242$, $p=0.0428$). During the test, swim speeds were similar between

genotypes (factorial ANOVA, $F(1,11)=2.674$, $p=0.1302$). These data show that, despite normal spatial learning in both protocols, Pak3-R67C mice displayed long-term spatial memory deficits in the more difficult experimental condition of the massed training protocol.

Hippocampal pattern separation function deficit and high sensitivity to interference in Pak3-R67C mice.

We next examined performance of the mice in three behavioural tasks in a radial-maze to examine working memory and their ability to finely discriminate spatial configurations. During the working memory paradigm, both genotypes showed an identical progressive increase of the number of correct trials (repeated measures ANOVA genotype: $F(1,16)=1.444$, $p=0.2470$; time: $F(1,10)=4.750$, $p<0.0001$; interaction: $F(1,10)=0.738$, $p=0.6878$) suggesting that Pak3-R67C mice do not display working memory deficit in this task (Supplementary Fig. 1D). Then, to analyse spatial pattern separation function, we tested WT and Pak3-R67C mice in a delayed non-matching to place paradigm in the radial-maze (Clelland et al., 2009). Mice had to learn to discriminate between two arms of the maze, either close to each other in space (close configuration) or more physically separated (distant configuration) (see methods ; Fig. 3A). For both genotypes, the percentage of correct trials in both the close and distant configurations increased regularly with training (Fig. 3B), reaching statistical significance in the distant configuration (repeated measures ANOVA, distant WT: $F(4,68)=4.010$, $p=0.0056$; Pak3-R67C: $F(4,64)=4.510$, $p=0.0028$) and a trend towards significance in WT mice in the close configuration (repeated measures ANOVA, close WT: $F(4,68)=2.201$, $p=0.0780$; Pak3-R67C: $F(4,64)=1.785$, $p=0.1485$). In both cases, the genotype effect and the percent correct trial x genotype interaction were non-significant (close: $F(1,33)=0.077$, $p=0.7829$ and $F(4,132)=1.650$, $p=0.1654$; distant: $F(1,33)=2.382$, $p=0.1323$ and $F(4,132)=1.168$, $p=0.3277$, respectively). By the end of training, however, performance in both configurations and for both genotypes differed significantly from chance (Fig. 3B; one sample analysis, J9-J10: close: WT: $t(17)=5.236$, $p<0.0001$; Pak3-R67C: $t(16)=3.887$, $p=0.0013$; distant: WT: $t(17)=3.828$, $p=0.0013$; Pak3-R67C: $t(16)=2.393$, $p=0.0293$). These results suggest no specific deficit for Pak3-R67C mice during the training phase in this task, whatever the configuration (close or distant). However, when on day 11 sub-groups of each genotype were submitted to a probe test with 3 successive trials in a same configuration (close or distant for each sub-group), WT mice performed well in both configurations (Fig 3C; one-sample analysis: close configuration $t(8)=4.359$, $p=0.0024$, distant configuration $t(8)=2.887$, $p=0.0203$), but, in contrast, Pak3-R67C mice remained at chance level in the close configuration despite their good performance in the distant configuration (Fig 3C; percent correct trials: close: Factorial ANOVA: $F(1,16)=7.143$, $p=0.0167$; one sample analysis: Pak3-R67C $t(8)=-0.164$, $p=0.8735$; distant: Factorial ANOVA: $F(1,15)=0.176$, $p=0.6804$; one sample analysis: Pak3-R67C $t(7)=3.742$, $p=0.0072$). This result is suggestive of a hippocampal pattern separation deficit in Pak3-R67C mice in conditions of higher interference due to the close succession of three consecutive trials.

To test this hypothesis more specifically, we used another cohort of mice and examined their performance in the hippocampal-dependent successive spatial delayed non-matching to sample task developed by Al Abed et al. (2016). This task in a radial-maze is characterized by high organizational demand due to the varying delay separating repetitions of similar events (see methods). During behavioural testing, each mouse was attributed a set of 3 pairs of adjacent arms presented in a pseudo-random order (Fig. 3D). For each arm pair, the position of the reward was alternated between one trial of that pair and the next (Fig. 3E). During the 15 days of training, mice were submitted to 23 successive trials with a 10s ITI. During training, the percentage of correct choices increased significantly in WT mice, whereas performance of Pak3-R67C mice remained at chance level (Fig 3F; % correct choices: genotype: $F(1,24)=11.97$, $p=0.0020$; % time: $F(4,96)=16.388$, $p<0.0001$; interaction % time x genotype $F(4,96)=3.551$, $p=0.0095$). Analysis of performance in the final block of 3 days (block 5) as a function of the number of interfering trials (ITn) between two presentations of the same pair showed that performance of WT mice decreased slightly (from 87% to 65% correct) as the ITn increased, though still remaining significantly above chance even for the ITn 3-4 (Fig. 3G). In contrast, performance of Pak3-R67C was significantly lower than that of WT mice, even when there was no interfering trials (ITn 0), and the mice were at chance level for the ITn 3-4 (Fig. 3G; Factorial ANOVA: genotype: ITn 0: $F(1,24)=5.577$, $p=0.0267$; one sample analysis WT: $t(12)=11.677$, $p<0.0001$; Pak3-R67C: $t(12)=7.580$, $p<0.0001$; ITn 1-2: $F(1,24)=11.234$, $p=0.0027$; one sample analysis WT: $t(12)=8.768$, $p<0.0001$; Pak3-R67C: $t(12)=2.683$, $p=0.0199$; ITn 3-4: $F(1,24)=13.047$, $p=0.0014$; one sample analysis WT: $t(12)=4.754$, $p=0.0005$; Pak3-R67C: $t(12)=0.770$, $p=0.04563$). Analysis of proactive interference (PI) revealed that unlike WT mice, Pak3-R67C mice displayed a strong proactive interference effect at high but not low PI (High PI: Factorial ANOVA: $F(1,24)=5.023$, $p=0.0345$; one sample analysis WT: $t(12)=4.415$, $p=0.0008$; Pak3-R67C: $t(12)=1.516$, $p=0.1554$; low PI: Factorial ANOVA: $F(1,24)=2.949$, $p=0.0988$; one sample analysis WT: $t(12)=6.470$, $p<0.0001$; Pak3-R67C: $t(12)=3.448$, $p=0.0048$; Fig. 3H). The deficits observed in Pak3-R67C mice in this task indicate the mice exhibit a higher sensitivity to high proactive interference.

Hippocampal pattern separation function deficit and high sensitivity to interference in irradiated mice.

Using c-Fos labelling, Al Abed et al. (2016) showed that realization of the task relies heavily on DG activity and pattern separation function, suggesting the possible involvement of DG newborn neurons. To investigate this, in a separate experiment we tested whether this task depends, at least in part, on adult DG neurogenesis by analysing performance of mice submitted to focal irradiation of the dorsal hippocampus. First, using DCX and BrdU markers 2 months after irradiation, we confirmed the near complete blockade of dorsal DG neurogenesis in irradiated (IR) mice (Supplementary Fig. 2A-C ; Factorial ANOVA BrdU : $F(1,5)=0.587.283$, $p<0.0001$; Factorial ANOVA DCX : $F(1,5)=0.126.586$, $p<0.001$). Performance in the behavioural task carried out 2 months after irradiation showed that similarly to the above results the percentage of correct choices increased significantly during training in non-irradiated (NIR) mice whereas performance of IR mice remained at chance level

(Supplementary Fig. 2D ; % correct choices: genotype: $F(1,16)=7.815$, $p=0.0130$; % time: $F(4,64)=13.748$, $p<0.0001$; interaction $F(4,64)=4.703$, $p=0.0022$). During the final block of trials (block 5), analysis of ITn showed that only for IR mice performance decreased significantly when the ITn increased. While performance of NIR mice became slightly lower (from 80% to 72% correct) as the ITn increased, though remaining above chance even for the ITn 3-4, that of IR mice decreased from 72% to 55% and was significantly different from WT mice both for an ITn of 1-2 and an ITn of 3-4 (Supplementary Fig. 2E ; Factorial ANOVA: ITn0: $F(1,16)=2.264$, $p=0.1519$; one sample analysis NIR: $t(7)=9.756$, $p<0.0001$; IR: $t(9)=6.845$, $p<0.0001$; ITn1-2: $F(1,16)=7.979$, $p=0.0122$; one sample analysis NIR: $t(7)=9.888$, $p<0.0001$; IR: $t(9)=2.490$, $p=0.0344$; ITn3-4: $F(1,16)=11.228$, $p=0.0041$; one sample analysis NIR: $t(7)=5.173$, $p=0.0013$; IR: $t(9)=2.262$, $p=0.05$). Analysis of the PI effect showed a strong proactive interference effect in IR mice, both in the Low PI and High PI conditions (Supplementary Fig. 2F; Factorial ANOVA: Low PI $F(1,16)=8.459$, $p=0.0103$; one sample analysis NIR: $t(7)=8.412$, $p<0.0001$; IR: $t(9)=1.112$, $p=0.2948$; High PI $F(1,16)=5.659$, $p=0.0302$; one sample analysis NIR: $t(7)=3.906$, $p=0.0059$; IR: $t(9)=2.255$, $p=0.0506$).

All together, these results show, first, that adult-born neurons in the dorsal DG play an important role in the ability to organize events in memory as they are used and to overcome interference and second, that the R67C mutation of the Pak3 gene leads to similar impairments in the management of interference and the organisation of events in memory.

Selective alterations of adult DG neurogenesis in Pak3-R67C mice

Basal neuronal architecture of the hippocampal anatomy appeared normal (Supplementary Fig. 3A). The volume of the hippocampus, of the DG and the volume of the granule cell layer (GCL) were comparable in WT and Pak3-R67C mice (Supplementary Fig. 3B-D). The mean number of mature neurons (NeuN⁺ cells) in selected zones of the DG were also similar (WT: 1445 ± 98.718 ; Pak3-R67C: 1357 ± 59.943 NeuN⁺ cells; Factorial ANOVA; $F(1,6)=0.581$; $p=0.4750$).

PAK3 expression was initially broadly described in hippocampus (Allen et al., 1998). To define more precisely its expression and to overcome the absence of specific anti-Pak3 antibodies suitable for immunofluorescence, we analyzed the expression of β -galactosidase as a reporter of activity of the PAK3 promoter using Pak3-tmlb mice (Skarnes et al., 2011). Free floating sections of transgenic male brain were stained and we focused on hippocampal expression pattern of PAK3. We observed a clear staining of the hippocampus, in CA1 and DG cell layers (Fig. 4A). To specify the identity of the cells expressing PAK3, we performed immunofluorescence labelling on lacZ-stained sections. As shown on the figure 4B, most of the PAK3 positive cells are localized in the subgranular zone. They are NeuN⁺ and some of them are also DCX⁺, showing that in DG, PAK3 is expressed mainly in mature neurons, but also in some immature neurons.

We first examined proliferation, differentiation and survival of adult-generated cells in the DG of Pak3-R67C mice in basal conditions. Using the proliferation marker Ki67, we found similar densities

of Ki67⁺ cells in both genotypes (Fig. 4C; Factorial ANOVA F(1,6)=0.005, p=0.9472), suggesting that proliferation of newborn cells in adult DG was not affected by the R67C mutation of Pak3. Studying newborn cell survival at different times after BrdU injections (18, 28 and 38 days post injections, dpi; Fig. 4D), as expected, a high rate of newborn cells was eliminated both in WT and Pak3-R67C mice within the first few weeks of their birth, however, whereas WT mice showed a progressive loss of BrdU⁺ cells between 18 and 38 dpi, an accelerated death was observed in Pak3-R67C mice with a salient loss between 18 and 28 dpi (Factorial ANOVA: 18 dpi: F(1,7)=1.078, p=0.3336; 28 dpi: F(1,7)=9.049, p=0.0197; 38 dpi: F(1,7)=0.270, p=0.6192). This accelerated death does not, however, affect the whole population of newborn neurons as the number of surviving DGCs several weeks later (38 dpi) appears equivalent to that of WT mice (Fig. 4D). We then verified whether this accelerated death has any consequence for the population of immature DCX⁺ neurons. Similar densities of immature DCX⁺ neurons in the DG of WT and Pak3-R67C mice was observed (Fig. 4E; Factorial ANOVA F(1,7)=2.205, p=0.1811). Similarly, triple labelling of BrdU⁺ cells with markers of immature (DCX) and mature (NeuN) neurons at the different dpi revealed no significant difference between genotypes (Fig. 4F-G; Factorial ANOVA: 18 dpi: BrdU⁺/DCX⁺/NeuN⁺ cells: F(1,5)=1.531, p=0.2710; BrdU⁺/DCX⁻/NeuN⁺ cells: F(1,5)=0.089, p=0.7771; 28 dpi: BrdU⁺/DCX⁺/NeuN⁺ cells: F(1,6)=0.728, p=0.4262; BrdU⁺/DCX⁻/NeuN⁺ cells: F(1,6)=0.628, p=0.4583; 38 dpi: BrdU⁺/DCX⁻/NeuN⁺ cells: F(1,7)=5.420, p=0.0528). Moreover, double labelling of 18-day-old BrdU⁺ cells with the glial marker Glial fibrillary acidic protein (GFAP) also revealed no difference between genotypes (data not shown; Factorial ANOVA: 18 dpi BrdU⁺/GFAP⁺ cells: F(1,5)=0.139, p=0.7248). Thus, overall, these results indicate normal proliferation, fate determination, differentiation rate and neuronal phenotypic maturation over time among the surviving neurons in Pak3-R67C mice, however, the R67C mutation of the Pak3 gene is associated with a selective, albeit transient, deficit in the survival of a population of adult newborn DGCs that are within the critical time-window during which they are selected to die or survive for long-term functional integration into pre-existing cortico-hippocampal networks.

Delayed functional maturation and deficient long-term recruitment of newborn DGCs into spatial memory networks

Guided by the evidence that adult-born DGCs can be recruited upon hippocampal-dependent spatial learning (Kee et al., 2007; Veyrac et al., 2013; Danielson et al., 2016), we studied the activation of newborn DG neurons following spatial memory recall using the activation marker Zif268. For this, we selected the water maze task under a massed training regimen as above, as Pak3-R67C mice can learn the task as well as WT mice but show severe memory deficit 10 days later (Fig. 2E-G). WT and Pak3-R67C mice were submitted to spatial learning 18 days after BrdU injections and newborn cells survival and Zif268 expression were analysed after the probe test 10 days after training (Fig. 5A). BrdU⁺ cells counting after the retention test in our training condition did not impact survival of newborn DGCs aged 18d at the time of learning, neither in WT nor in Pak3-R67C mice compared to home cage controls mice (Fig. 5B; Factorial ANOVA: WT: F(1,10)=0.039, p=0.8471; Pak3-R67C:

$F(1,10)=0.039$, $p=0.8473$). The number of newborn 28-day-old DGCs in Pak3-R67C mice was significantly lower than in WT mice, replicating the above results in basal conditions.

We then examined whether mutation of the Pak3 gene affects activity-dependent recruitment of DG neurons by mapping Zif268 expression in newborn immature neurons (DCX^+), in 28-day-old neurons ($BrdU^+/NeuN^+$) and in older mature neurons ($NeuN^+$) after memory recall. In control home cage WT and Pak3-R67C mice, there was virtually no activation of immature DCX^+ neurons and only a small proportion of 28-day-old DGCs ($BrdU^+/NeuN^+/Zif268^+$) and mature neurons ($Zif268^+/NeuN^+$) expressed Zif268, with no significant difference between genotypes (Fig. 5C-E; Factorial ANOVA: $BrdU^+/NeuN^+/Zif268^+$: $F(1,6)=0.224$, $p=0.6528$; $Zif268^+/NeuN^+$: $F(1,6)=0.805$, $p=0.4040$). After memory recall, a higher proportion of mature neurons expressed Zif268 in both genotypes (Fig. 5E; Factorial ANOVA: genotype effect $F(1,14)=1.029$, $p=0.3277$; learning effect $F(1,14)=6.186$, $p=0.0261$; genotype x learning $F(1,14)=0.092$, $p=0.7660$). For 28-day-old neurons, the proportion expressing Zif268 was similar between genotypes and not different from controls (Fig. 5D; Factorial ANOVA: genotype effect $F(1,13)=0.055$, $p=0.8180$; learning effect $F(1,13)=0.041$, $p=0.8430$; genotype x learning $F(1,13)=0.146$, $p=0.7085$), suggesting this population of neurons is not specifically activated upon recall. However, while in WT mice a significant proportion of younger, DCX^+ newborn DGCs expressed Zif268 after recall, suggesting recruitment of these neurons, we found no neurons within this population activated upon recall in Pak3-R67C mice (Fig. 5C; Factorial ANOVA: genotype effect $F(1,12)=1086.270$, $p<0.0001$; learning effect $F(1,12)=1086.270$, $p<0.0001$; genotype x learning $F(1,12)=1086.270$, $p<0.0001$). Thus, memory recall in our training condition resulted in an activation of a proportion mature DGCs which was of a similar size in WT and Pak3-R67C mice, and a selective, learning-related activation of a population of young immature neurons in WT mice, a population of newborn neurons that failed to be activated in Pak3-R67C mice, indicating that the long-term memory deficit in these mice is associated with the absence of recruitment of this neuronal population.

This specific phenotype of Pak3-R67C mice has also been observed in another mutant mouse for which deletion of the gene Zif268 led to a similar accelerated death during the critical window of maturation of newborn DGCs and defect of recruitment during learning, effects that were attributed to delayed functional maturation of young newborn DGCs (Veyrac et al., 2013). Indeed, around 3 weeks of age, newborn DGCs undergo extensive functional synaptic changes that are essential for their functional maturation and survival (Aasebø et al., 2011), including in the expression of the glutamate receptor GluA1 (Hagihara et al., 2011) and the expression pattern of the Cl⁻ ionic cotransporters NKCC1 and KCC2 implicated in the conversion from GABA-induced depolarization to hyperpolarization, a mechanism crucial for synaptic integration of 3-week-old DGCs (Ge et al., 2006, Ming et al., 2011). We therefore analysed GluA1, NKCC1 and KCC2 expression in 18-day-old DGCs of Pak3-R67C and WT mice. We found that the proportion of BrdU-labelled 18-day-old newborn DGCs expressing GluA1 was similar between genotypes (data not shown; Factorial ANOVA: $F(1,6)=0.027$, $p=0.8757$), however, the expression pattern of NKCC1 and KCC2 revealed an imbalance in the expression of the two Cl⁻ cotransporters in BrdU-labelled 18-day-old DGCs of Pak3-R67C mice, with a larger proportion expressing NKCC1 associated with a lower proportion expressing

KCC2 compared to WT mice (Fig. 6; Factorial ANOVA, NKCC1: $F(1,6)=10.416$, $p=0.0180$; KCC2: $F(1,8)=6.083$, $p=0.0389$). This result suggests a delayed conversion of GABA-mediated depolarization to hyperpolarization in Pak3-R67C mice, indicative of a delayed functional maturation of young newborn DGCs during their critical window of maturation and selection, an effect which might be instrumental in their accelerated death during this time period and lack of recruitment in relation to learning and memory.

DISCUSSION

Since the late 1990s, several mutations of the Pak3 gene have been identified, which cause mild to severe X-linked ID. Among these, the R67C missense mutation in the second coding exon of Pak3 was shown to be responsible for a severe form of non-syndromic ID (Bienvenu et al., 2000). This mutation that changes the arginine 67 to a cysteine residue at the end of the PBD domain affects the regulatory domain of PAK3 protein and decreases its binding to Cdc42 while increasing its binding to Rac1 (Kreis et al., 2007). To better characterize the effect of the R67C mutation of Pak3 in cognitive functions and explore some of the potential underlying mechanisms, we generated a novel mouse model of ID bearing the missense mutation R67C of Pak3, in a manner strictly similar to the human mutation described in Bienvenu et al., (2000). This was done by generating this mutation by directed mutagenesis in the targeting vector, and then by homologous recombination in ES cells, allowing to introduce it in the genomic sequence of the endogenous Pak3 gene on the X chromosome. This mutation was transmitted in the germ line and hemizygotus males and heterozygotous females display normal live and are fertile. This mutation does not alter the expression of the mutated gene suggesting that the mouse phenotype is not due to a defect of Pak3 gene expression or PAK3 protein synthesis. We then carried out the first characterization of the behavioral phenotype of the mice in a variety of behavioural tasks. Our results indicate that Pak3-R67C mice display normal locomotion and exploration, no specific alteration of anxiety-like behaviours and no deficit in spatial working memory in a radial maze or spatial learning and memory in a distributed protocol in the water-maze. This is in agreement with behavioral data previously reported in a Pak3 knock-out mouse (Meng et al., 2005). However, using a more stringent spatial learning task based on a massed protocol in the water-maze, we found that despite normal spatial learning, Pak3-R67C mice have a profound deficit in spatial long-term memory. Moreover, using a delayed non-matching to place task placing varying demands on spatial discrimination ability (Clelland et al., 2009), we showed that Pak3-R67C mice display alterations in spatial pattern separation function and a high sensibility to interferences. This was confirmed in the hippocampal-dependent successive spatial delayed non-matching to sample task developed by Al Abed et al. (2016) which models declarative memory of repetitive everyday events. This task in a radial-maze is characterized by high organizational demand due to the varying delay separating repetitions of similar events and allows probing memory flexibility and organisation, and susceptibility to proactive interference (Al Abed et al., 2016). Our results showed that, despite normal spatial working memory, Pak3-R67C mice exhibit a high sensitivity to proactive interference, leading

to impairments in the organization of events in memory. Together, these results demonstrate for the first time a link between PAK3 dysfunction and alterations in cognitive functions that might be related to the impaired cognitive abilities observed in ID patients.

Numerous studies show that defects in adult hippocampal neurogenesis result in alterations of spatial memory and pattern separation function (Clelland et al., 2009; Tronel et al., 2012; Nakashiba et al., 2012). Reports also suggest the involvement of dentate gyrus adult-born neurons in behavioral tasks involving proper management of interferences (Winocur et al., 2012; Saxe et al. 2007). Here, we first confirmed this point in the successive spatial delayed non-matching to sample task by examining performance of normal mice subjected to focal X-ray irradiation of the dorsal hippocampus. Mice with near complete absence of new-born neurons in the dorsal hippocampus showed profound deficits in the task, characterized by a similar high sensitivity to proactive interference as that found in Pak3-R67C mice. Given the above phenotype of Pak3-R67C mice, we sought to explore whether the R67C mutation of Pak3 affects adult hippocampal neurogenesis. This was also prompted by reports showing that PAK3 is involved in the control of cell cycle exit and in the differentiation of neuronal precursors in *Xenopus* embryos (Souopgui et al., 2002), and in oligodendrocyte precursor differentiation (Maglorius Renkilaraj et al., 2017). Moreover, the RhoGTPase Cdc42 and Rac1, of which PAK3 acts as a downstream effector, have stage specific functions in adult neurogenesis (Vadodaria et al., 2013a, 2013b). PAK3 is expressed in hippocampus (Allen et al., 1998) and we confirmed here its expression in granular cells of the adult DG, including in immature DCX-expressing neurons. In basal conditions, the R67C mutation of Pak3 did not appear to affect cell proliferation and neuronal differentiation of adult-born DGCs; however, we found that young immature newborn neurons in Pak3-R67C mice undergo accelerated death during the critical period, around 3-4 weeks of their birth, associated with deficient functional maturation characterized by an increased NKCC1/KCC2b chloride co-transporter ratio. This alteration of neurogenesis in Pak3-R67C mice is unlikely to be a result of developmental anatomic modifications of the hippocampus, as neuronal architecture, DG and DGC layers volumes and DGCs number were not affected. With the R67C mutation, however, the accelerated death and altered functional maturation during the critical period did not affect the whole population of newborn neurons, as the number of surviving DGCs at a later time point of 38d after their birth appeared equivalent to that of WT mice.

To date, several extrinsic and intrinsic cell-signalling factors can regulate adult neurogenesis during their critical period of maturation (2-6 weeks after their birth) and influence the destiny of newborn cells, promoting either their death (for the majority) or their survival and integration into pre-existing cortico-hippocampal networks (for reviews, Aimone et al., 2014 ; Aasabø et al., 2011). Once integrated, these young adult neurons, even still immature, play an important role in hippocampal-dependent forms of memory (reviewed in Aimone et al., 2014; Gonçalves et al., 2016; Anacker and Hen, 2017). Thus, despite an overall normal population of mature newborn DGCs in Pak3-R67C mice, we hypothesized that the accelerated death of young neurons during the critical period may impact their eventual activation and recruitment when learning occurs. We thus investigated the recruitment of DG neurons by measuring Zif268 expression after recall of spatial learning in the massed paradigm

for which Pak3-R67C mice display normal learning but deficient long-term memory. We found memory recall resulted in normal activation of mature DG and BrdU⁺ cells in Pak3-R67C mice, but a complete failure of recruitment of a population of young DCX⁺ newborn neurons, indicating that the long-term spatial memory deficit in these mice is associated with the absence of recruitment of this population of young newborn neurons.

The current view about the potential contribution of newborn DG neurons to learning and memory suggests that when a specific hippocampal-dependent learning experience occurs, a number of young newborn DGCs, because of their high intrinsic excitability and high capacity for undergoing synaptic potentiation (Ge et al. 2007), would be activated by learning, promoting their recruitment and functional integration into memory networks, and hence their subsequent activation upon memory recall. In line with this scenario, we propose that in the behaving animal, the R67C mutation of Pak3 leads to a specific, transient loss of young, yet not fully mature DGCs during their critical period of maturation, potentially due at least in part to their altered GABAergic function. This in turn would impede the recruitment of a population of these young newborn neurons by training, preventing their contribution to long-term spatial memory. Whether this alteration in adult neurogenesis and deficient activation upon learning is also causative for the altered capacity of the mutant mice to cope with interferences and for their deficient ability to finely discriminate events in the spatial domain remains to be investigated. However, the documented contribution of adult hippocampal neurogenesis to spatial pattern separation function (Rolls, 2013) reinforces the hypothesis that altered adult neurogenesis in Pak3-R67C mice might be instrumental in the selective behavioral deficits displayed by the mice. Mechanistically, how the R67C mutation of the Pak3 gene leads to altered adult hippocampal neurogenesis is as yet unknown, and although we found that young DCX-positive neurons can express PAK3, we cannot discard a cell non-autonomous function of PAK3. Cell type-specific manipulation of mutated PAK3 using genetic approaches will be one step further for dissociating cell-autonomous and non cell-autonomous contribution of PAK3.

Acknowledgments

The authors wish to thank the zootechnic platform in Orsay for animal breeding care and genotyping (Bernadette Wiszniowski), and Morgane Dos Santos From Institute for Radiological Protection and Nuclear Safety (IRSN), Research department in Radiobiology and regenerative MEDicine (SERAMED), Laboratory of Radiobiology of Accidental exposures (LRAcc), Fontenay-aux-Roses, France for her help in the irradiation procedure. M.C. Birling and M. Jagla-Eberlin of the Mouse Clinical Institute (ICS, Illkirch) are acknowledged for technical support and discussions related to the generation of knock-in Pak3-R67C (IR2450) and Pak3-tm1a mice (IR5884), and Karine Maillard from the TAAM (CNRS, Orleans) for providing us with the Cre-deleter mice. This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS, France), the University Paris-Sud (France), the Fondation pour la Recherche sur le Cerveau (FRC 2013 to SL), the Fondation Jérôme Lejeune (Grant #1070 to JVB); PHENOMIN and ANR MRGENES to JVB and CV. CC and FD were supported by doctoral fellowships from the French Ministry of Research.

References

- Aasebø IEJ, Blankvoort S, Tashiro A (2011) Critical maturational period of new neurons in adult dentate gyrus for their involvement in memory formation. *Eur J Neurosci* 33:109461100.
- 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* 94:99161026.
- Al Abed AS, Sellami A, Brayda-Bruno L, Lamothe V, Noguès X, Potier M, Bennetau-Pelissero C, Marighetto A (2016) Estradiol enhances retention but not organization of hippocampus-dependent memory in intact male mice. *Psychoneuroendocrinology* 69:77-89.
- Allen KM, Gleeson JG, Bagrodia S, Partington MW, MacMillan JC, Cerione RA, Mulley JC, Walsh CA (1998) PAK3 mutation in nonsyndromic X-linked mental retardation. *Nat Genet* 20(1):25-30.
- Bienvenu T, Chelly J (2006) Molecular genetics of Rett syndrome: when DNA methylation goes unrecognized. *Nat Rev Genet* 7(6):415-26.
- Birling MC, Dierich A, Jacquot S, Hérault Y, Pavlovic G (2012) Highly-efficient, fluorescent, locus directed cre and FlpO deleter mice on a pure C57BL/6N genetic background. *Genesis* 50(6):482-9.
- Boda B, Alberi S, Nikonenko I, Node-Langlois R, Jourdain P, Moosmayer M, Parisi-Jourdain L, Muller D (2004) The mental retardation protein PAK3 contributes to synapse formation and plasticity in hippocampus. *The Journal of Neuroscience* 24 (48) 108166 10825.
- Bokoch GM (2003) Biology of the p21-activated kinases. *Annu Rev Biochem.* 72:743-81.
- Clelland CD, Choi M, Romberg C, Clemenson GD, Fagniere A, Tyers P, Jessberger S, Saksida LM, Barker RA, Gage F (2009) A functional role for adult hippocampal neurogenesis in spatial pattern separation. *Science* 325:210.
- Cobos I, Borello U, Rubenstein JL (2007) Dlx transcription factors promote migration through repression of axon and dendrite growth. *Neuron* 21;54(6):873-88.
- Combeau G, Kreis P, Domenichini F, Amar M, Fossier P, Rousseau V, Barnier JV (2012) The p21-activated kinase PAK3 forms heterodimers with PAK1 in brain implementing trans-regulation of PAK3 activity. *J Biol Chem* 31;287(36):30084-96.
- Danielson NB, Kaifosh P, Zaremba JD, Lovett-Barron M, Tsai J, Denny CA, Balough EM, Goldberg AR, Drew LJ, Hen R, Losonczy A, Kheirbek MA (2016) Distinct Contribution of Adult-Born Hippocampal Granule Cells to Context Encoding. *Neuron* 6;90(1):101-12.
- Dos Santos M, Kereselidze D, Gloaguen C, Benadjaoud M, Tack K, Lestaevél P, Durand C. Role of hippocampal dentate gyrus in radio-induced behavioral disorders: development of new experimental models in postnatal mouse. In preparation.
- Ge S, Goh ELK, Sailor K a, Kitabatake Y, Ming G, Song H (2006) GABA regulates synaptic integration of newly generated neurons in the adult brain. *Nature* 439:5896593.
- Ge S, Yang C, Hsu K, Guo-li M, Song H (2007) A critical period for enhanced synaptic plasticity in newly generated neurons of the adult brain. *Neuron* 54: 5596566.
- Gonçalves JT, Schafer ST, Gage FH (2016) Adult Neurogenesis in the Hippocampus: From Stem Cells to Behavior. *Cell* 3;167(4):897-914.
- Hagihara H, Ohira K, Toyama K, Miyakawa T (2011) Expression of the AMPA receptor subunits GluR1 and GluR2 is associated with granule cell maturation in the dentate gyrus. *Front Neurosci* 5, 100.
- Hertecant J, Komara M, Nagi A, Al-Zaabi O, Fathallah W, Cui H, Yang Y, Eng CM, Al Sorkhy M, Ghattas MA, Al-Gazali L, Ali BR (2017) A de novo mutation in the X-linked PAK3 gene is the underlying cause of intellectual disability and macrocephaly in monozygotic twins. *Eur J Med Genet* 60(4):212-216.
- Hussain NK, Thomas GM, Luo J, Haganir RL (2015) Regulation of AMPA receptor subunit GluA1 surface expression by PAK3phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci USA* 27;112(43):E5883-90.
- Jones MW, Errington ML, French PJ, Fine A, Bliss TV, Garel S, Charnay P, Bozon B, Laroche S, Davis S (2011) A requirement for the immediate early gene Zif268 in the expression of late LTP and long-term memories. *Nat Neurosci* 4(3):289-96.
- Kee N, Teixeira CM, Wang AH, Frankland PW (2007). Preferential incorporation of adult-generated granule cells into spatial memory networks in the dentate gyrus. *Nat Neurosci* 10:3556362.
- Kreis P, Thévenot E, Rousseau V, Boda B, Muller D, Barnier JV (2007) The p21-activated kinase 3 implicated in mental retardation regulates spine morphogenesis through a Cdc42-dependent pathway. *J Biol Chem* 20;282(29):21497-506.
- Kreis P, Barnier JV (2009) PAK signalling in neuronal physiology. *Cell Signal* 21(3):384-93.
- Lallemand Y, Luria V, Haffner-Krausz R, Lonai P (1998) Maternally expressed PGK-Cre transgene as a tool for early and uniform activation of the Cre site-specific recombinase. *Transgenic Res* 7(2):105-12.

- Maglorius Renkilaraj MRL, Baudouin L, Wells CM, Doulazmi M, Wehrle R, Cannaya V, Bachelin C, Barnier JV, Jia Z, Nait Oumesmar B, Dusart I, Bouslama-Oueghlani L (2017) The intellectual disability protein PAK3 regulates oligodendrocyte precursor cell differentiation. *Neurobiol Dis* 98:137-148.
- Meng J, Meng Y, Hanna A, Janus C, Jia Z (2005) Abnormal long-lasting synaptic plasticity and cognition in mice lacking the mental retardation gene Pak3. *J Neurosci* 13;25(28):6641-50.
- Ming GL, Song H (2011) Adult neurogenesis in the Mammalian brain: significant answers and significant questions. *Neuron* 70:6876702.
- Nakashiba T, Cushman JD, Pelkey KA, Renaudineau S, Buhl DL, McHugh TJ, Barrera VR, 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* 149:1886201.
- Penn AC, Zhang CL, Georges F, Royer L, Breillat C, Hosy E, Petersen JD, Humeau Y, Choquet D (2017) Hippocampal LTP and contextual learning require surface diffusion of AMPA receptors. *Nature* 21;549(7672):384-388.
- Pons-Espinal M, De Lagran MM, Dierssen M (2013) Functional implications of hippocampal adult neurogenesis in intellectual disabilities. *Amino acids* 45(1):113-31.
- Rolls ET (2013) The mechanisms for pattern completion and pattern separation in the hippocampus. *Front Syst Neurosci* 7:74.
- Saxe MD, Malleret G, Vronskaya S, Mendez I, Garcia AD, Sofroniew M V, Kandel ER, Hen R (2007) Paradoxical influence of hippocampal neurogenesis on working memory. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:464264646.
- Skarnes WC, Rosen B, West AP, Koutsourakis M, Bushell W, Iyer V, Mujica AO, Thomas M, Harrow J, Cox T, Jackson D, Severin J, Biggs P, Fu J, Nefedov M, de Jong PJ, Stewart AF, Bradley A (2011) A conditional knockout resource for the genome-wide study of mouse gene function. *Nature* 15;474(7351):337-42.
- Souopgui J, Sölter M, Pieler T (2002) XPak3 promotes cell cycle withdrawal during primary neurogenesis in *Xenopus laevis*. *EMBO J* Dec 2;21(23):6429-39.
- Tronel S, Belnoue L, Grosjean N, Revest JM, Piazza PV, Koehl M, Abrous DN (2012) Adult-born neurons are necessary for extended contextual discrimination. *Hippocampus*. 22:292-8.
- Tzschach A, Grasshoff U, Beck-Woedl S, Dufke C, Bauer C, Kehrer M, Evers C, Moog U, Oehl-Jaschkowitz B, Di Donato N, Maiwald R, Jung C, Kuechler A, Schulz S, Meinecke P, Spranger S, Kohlhasse J, Seidel J, Reif S, Rieger M, Riess A, Sturm M, Bickmann J, Schroeder C, Dufke A, Riess O, Bauer P (2015) Next-generation sequencing in X-linked intellectual disability *Eur J Hum Genet* 23(11): 151361518.
- van Bokhoven H (2011) Genetic and epigenetic networks in intellectual disabilities. *Annu Rev Genet* 45:81-104.
- Vaillend C, Poirier R, Laroche S (2008) Genes, plasticity and mental retardation. *Behavioural brain research*. 192(1):886105.
- Vadodaria KC, Jessberger S (2013a) Maturation and integration of adult born hippocampal neurons: signal convergence onto small Rho GTPases. *Front Synaptic Neurosci* 20;5:4.
- Vadodaria KC, Brakebusch C, Suter U, Jessberger S (2013b) Stage-specific functions of the small Rho GTPases Cdc42 and Rac1 for adult hippocampal neurogenesis. *J Neurosci* 16;33(3):1179-89.
- Veyrac A, Gros A, Bruel-jungerman E, Rochefort C, Borgmann FBK, Jessberger S, Laroche S (2013) Zif268/egr1 gene controls the selection, maturation and functional integration of adult hippocampal newborn neurons by learning. *Proc Natl Acad Sci* 110:706267067.
- Vissers LE, Gilissen C, Veltman JA (2015) Genetic studies in intellectual disability and related disorders. *Nat Rev Genet* 17(1):9-18.
- Winocur G, Becker S, Luu P, Rosenzweig S, Wojtowicz JM (2012) Adult hippocampal neurogenesis and memory interference. *Behav Brain Res* 14;227(2):464-9.

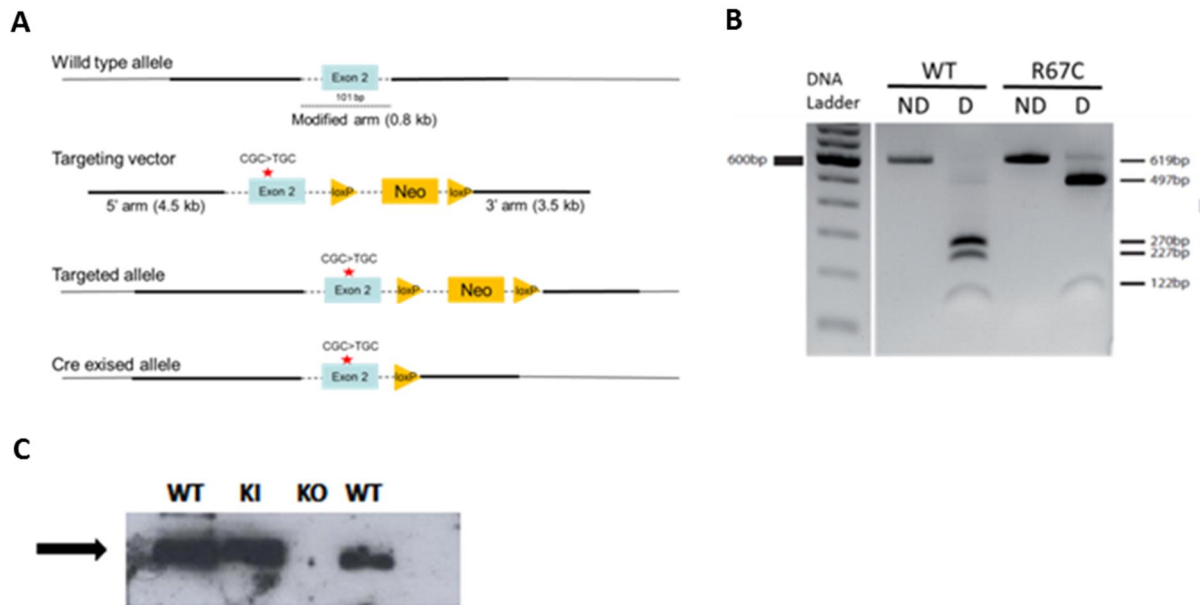


Figure 1: Generation of *Pak3*-R67C knock-in mice.

(A) Targeting strategy for the knock-in of the *Pak3*-R67C mutation. After recombination and Cre-mediated loxP excision, the targeted allele contained the single nucleotide variation encoding the R67C missense mutation. (B) The R67C mutation suppresses a genomic *HhaI* restriction site in transgenic animals. High fidelity PCR-amplified fragments surrounding the exon 2 were digested with *HhaI* restriction enzyme and then analyzed by agarose electrophoresis. ND: non digested, D: *HhaI* digested sample, WT and R67C for wild type and hemizygote males, respectively. (C) The knock-in mutation does not modify protein expression. PAK3 proteins were immunoprecipitated from WT and R67C male adult brains and analyzed by western-blot with PAK3 specific antibodies. Note that the signal level is similar for littermate WT and R67C males and that no signal was detected for the knock-out mice.

(Figure provisoire)

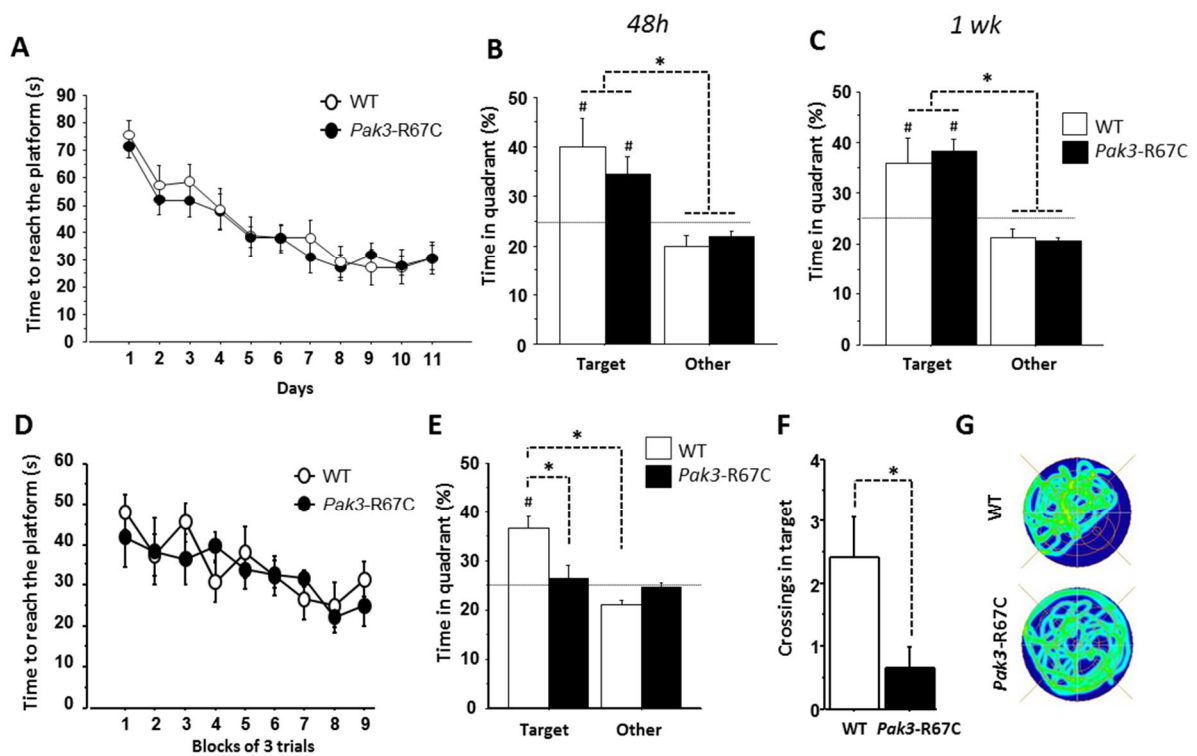


Figure 2 : Behavioral performance of *Pak3-R67C* mice in the distributed and massed spatial learning protocols in the water maze.

(A) During distributed training, the latency to find the hidden platform declined similarly in WT (n=15) and *Pak3-R67C* mice (n=12). (B) 48h or (C) 1 week after acquisition, WT and *Pak3-R67C* mice spent significantly more time searching in the target quadrant compared with other quadrants. (D) During massed training, the latency to find the hidden platform declined similarly in WT (n=7) and *Pak3-R67C* mice (n=6). (E) Ten days after acquisition, WT mice spent significantly more time searching in the target quadrant compared with other quadrants, but not *Pak3-R67C* mice. (F) Mean number of crossings over the target location was significantly higher in WT than in *Pak3-R67C* mice. (G) Examples of trajectories during a probe trial. Error bars indicate SEM. * indicates significant differences between groups. # indicates significant differences compared to chance (25 %).

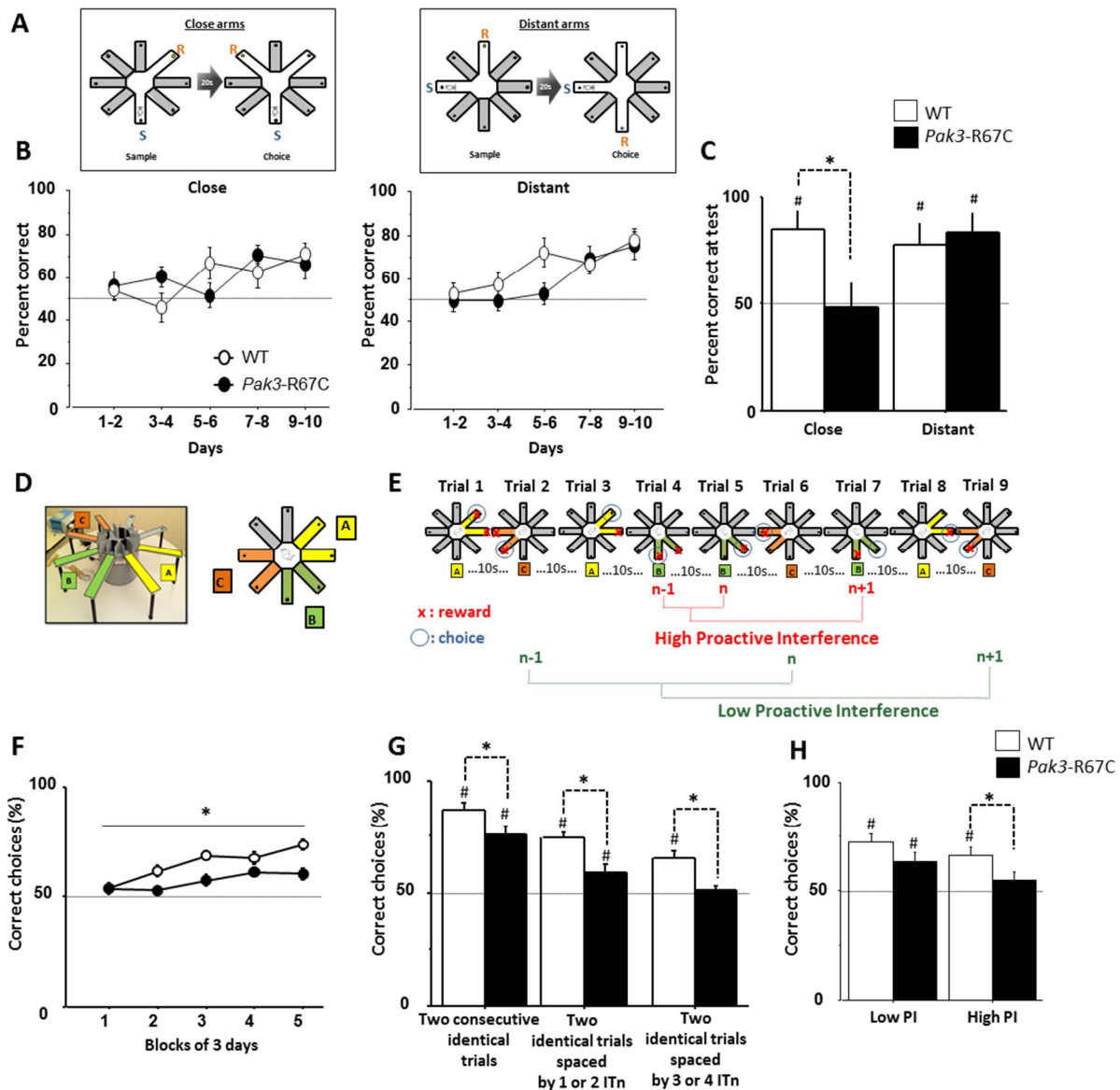


Figure 3 : Behavioral performance of *Pak3-R67C* mice in the pattern separation task and successive spatial DNMP task in the radial maze.

(A) Pattern separation was tested using a DNMP protocol in the radial-arm maze by varying the distance (close or distant configurations) between the sample and correct arms. S, start arm. Each trial consisted of a sample phase (left) and a choice phase (right). (B) Performance during 10 days of training was similar between WT (n=18) and *Pak3-R67C* (n=17) in both configurations. (C) On day 11, sub-groups of mice were submitted to three successive trials either in the close or distant configuration. *Pak3-R67C* mice were impaired in the close but not the distant configuration in the DNMP task. (D) An example of the set of 3 pairs (A, B, C) of arms repeatedly used for a given mouse throughout memory testing in the successive spatial DNMP task (Al Abed *et al.* 2016). (E) A selected example of a sequence of trials within a session illustrating successive arm-pair presentations and arm-choices made by a mouse. Below are examples of selected trials illustrating the design to evaluate low and high proactive interference (see methods for details). (F) The percent of correct choices increased progressively during training in WT (n=13) and *Pak3-R67C* mice (n=13), however performance of WT mice was significantly above that of *Pak3-R67C* mice. (G) Performance during the last 3 training sessions as a function of the proximity between two identical tests. ITn, interfering trials, (H) Performance during the last 3 sessions as a function of the level of proactive interference for a given trial (Low PI, High PI) for WT and *Pak3-R67C* mice. The horizontal black line represents chance. Error bars indicate SEM. * indicates significant differences between groups. # indicates significant differences compared to chance (50 %).

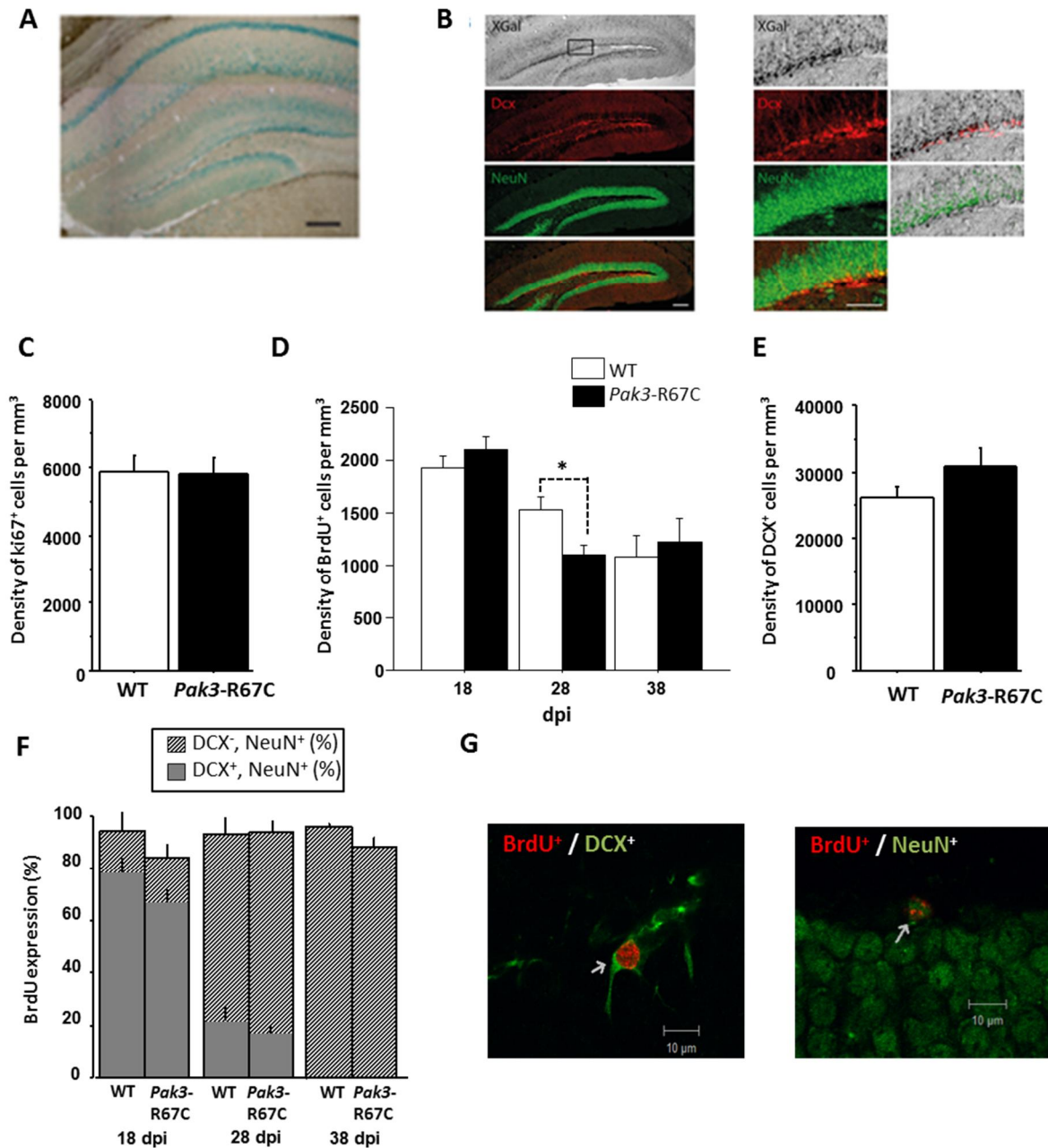


Figure 4 : β -galactosidase expression under the PAK3 endogenous promoter in hippocampal neurons and effect of R67C mutation of *Pak3* gene on basal adult hippocampal neurogenesis.

(A) Representative image of X-Gal deposit in hippocampal brain slices of Tm1B mice showing strong expression in mature neurons of CA1 layer and in the dentate gyrus. (B) *Pak3* promoter activity is stronger in the subgranular zone of the DG, in both mature and immature neurons. Scale bars = 200 μm for (A), 100 μm for (B) left panel and 50 μm for (B) right panel. (C) The density of $ki67^+$ cells was similar between genotypes. (D) Total number of $BrdU^+$ cells at different days post injections (dpi). *Pak3-R67C* mice showed significantly less $BrdU^+$ cells than WT mice at 28 dpi. (E) The density of DCX^+ cells was similar between genotypes. (F) The percentage of $BrdU^+$ cells expressing DCX and / or $NeuN$ was similar between genotypes at the 3 different dpi. (G) Confocal micrographs of 28-day-old $BrdU^+$ newborn cells expressing DCX or $NeuN$ in a WT mouse. Scale bars = 10 μm . Number of mice: 18 dpi: WT (n=5), *Pak3-R67C* (n=5); 18 dpi: WT (n=6), *Pak3-R67C* (n=7); 28 dpi: WT (n=4), *Pak3-R67C* (n=4). Data are means \pm SEM. * indicates significant differences between groups.

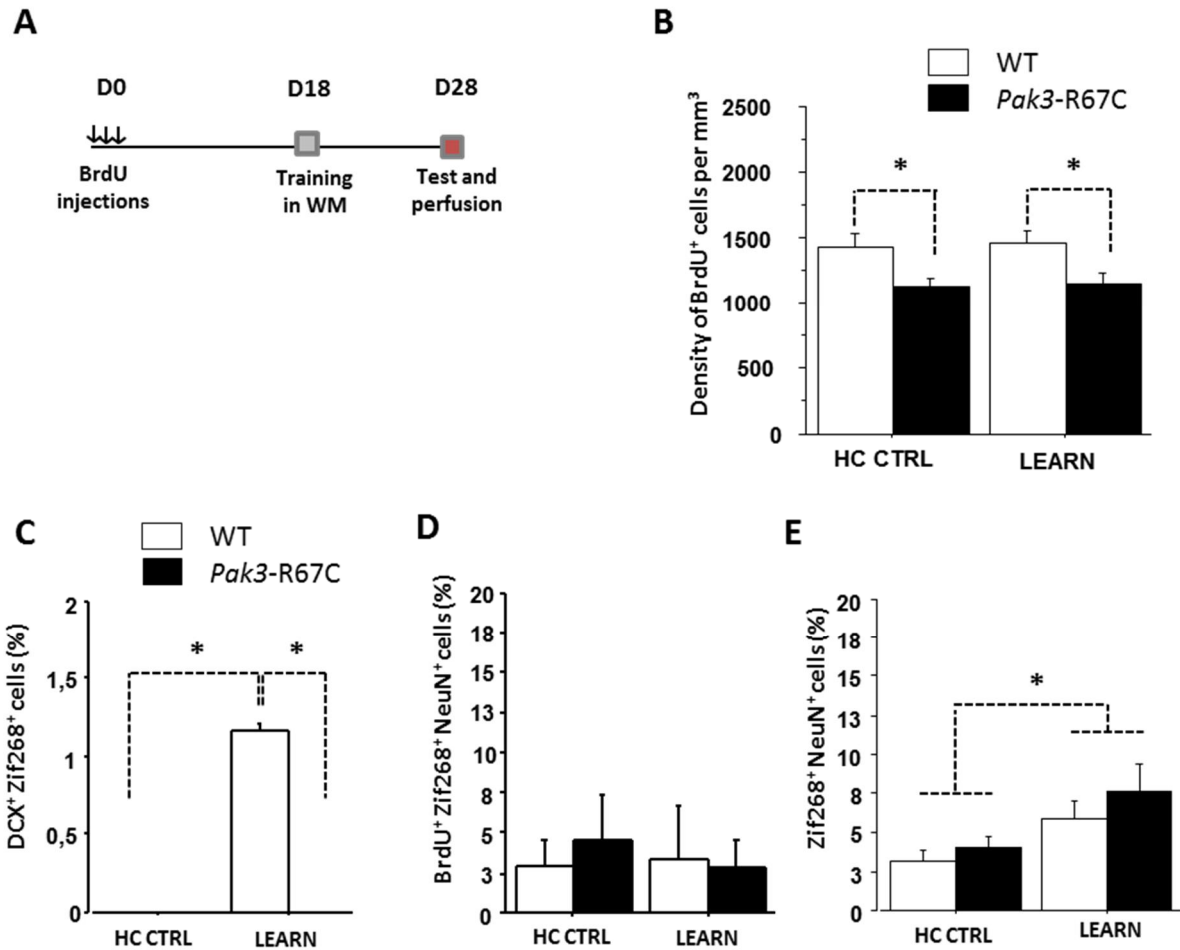


Figure 5 : Effect of spatial learning and recall on adult-born hippocampal neurons in *Pak3-R67C* mice.

(A) Mice received three injections of BrdU on day 0, were submitted to spatial learning in the water maze on day 18 (D18) and to retention test 10 days later (D28). (B) The spatial behavioral task had no significant impact on survival of newly born 28-day-old BrdU⁺ neurons. Home-cage controls (HC CTRL: WT, n=5; *Pak3-R67C*, n=4). Learning groups (LEARN: WT, n=5; *Pak3-R67C*, n=4). (C,D,E) Analysis of Zif268-expressing neurons of different ages following recall. (C) Percentage of DCX⁺ dentate granule cells expressing Zif268 upon recall is increased in WT mice, but there is a complete failure of recruitment of young DCX⁺ newborn neurons in *Pak3-R67C* mice (HC CTRL: WT, n=4; *Pak3-R67C*, n=4); (LEARN: WT, n=4; *Pak3-R67C*, n=4). (D) Upon spatial memory recall, the number of BrdU⁺/NeuN⁺ DGCs expressing Zif268 was identical in WT and *Pak3-R67C* mice (HC CTRL: WT, n=4; *Pak3-R67C*, n=4; LEARN: WT, n=5; *Pak3-R67C*, n=5). (E) Percentage of NeuN⁺ DGCs expressing Zif268 is increased after recall in both WT and *Pak3-R67C* mice with significant difference between genotypes (HC CTRL: WT, n=4; *Pak3-R67C*, n=4; LEARN: WT, n=5; *Pak3-R67C*, n=5). Data are means ± SEM. * indicates significant differences between groups.

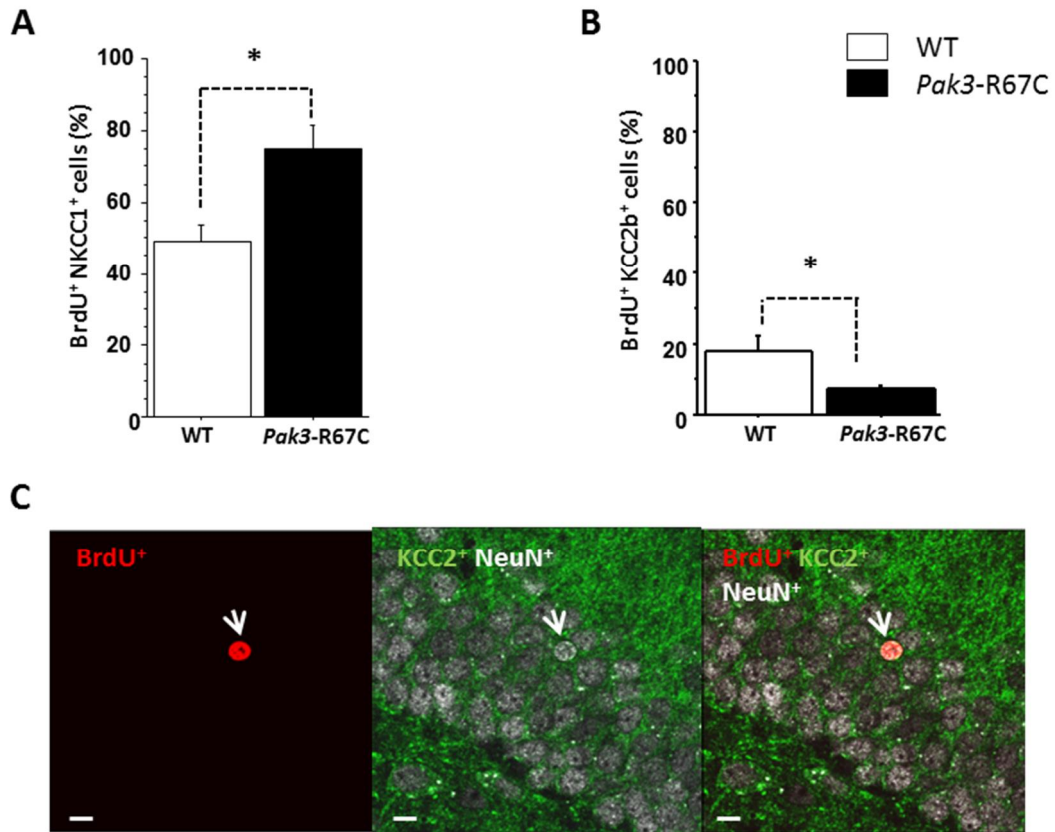
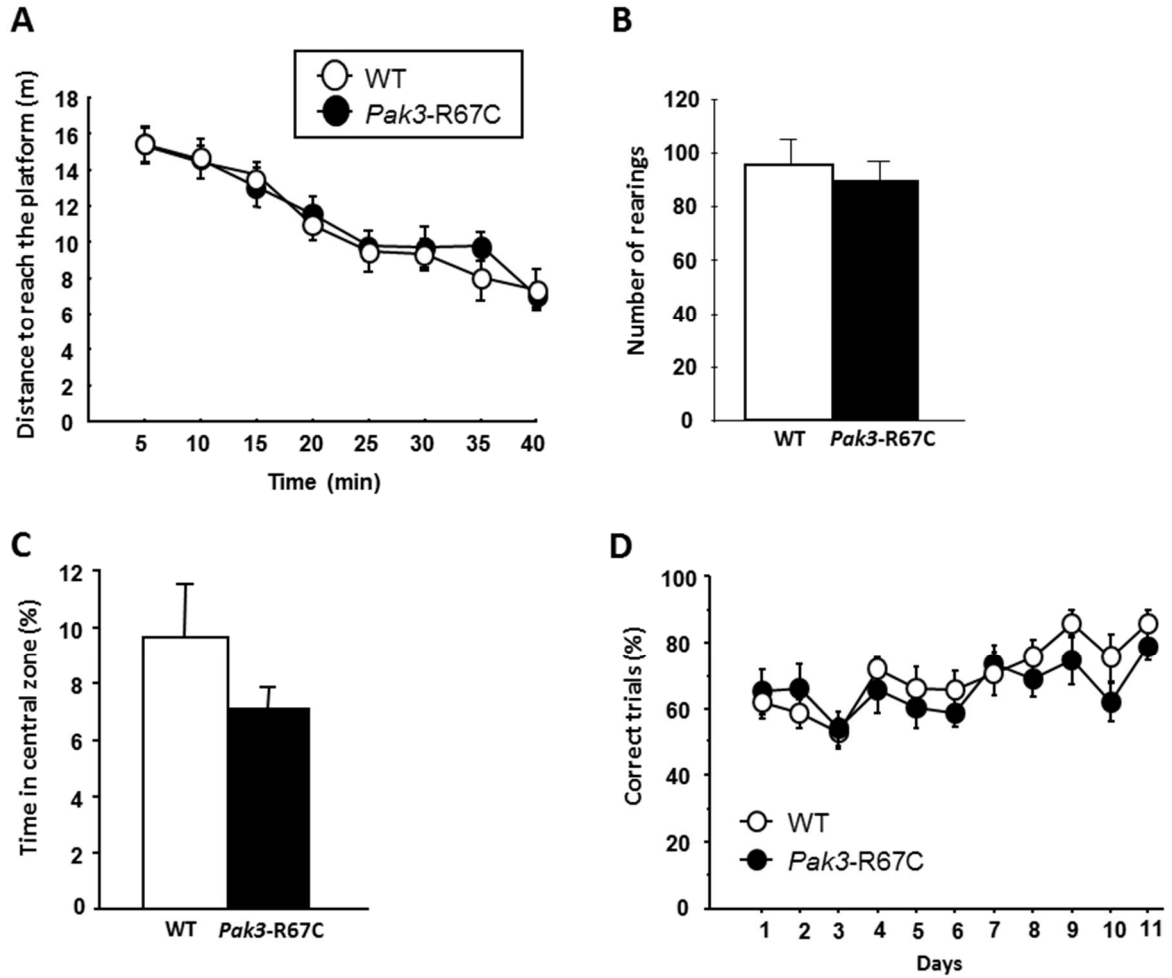


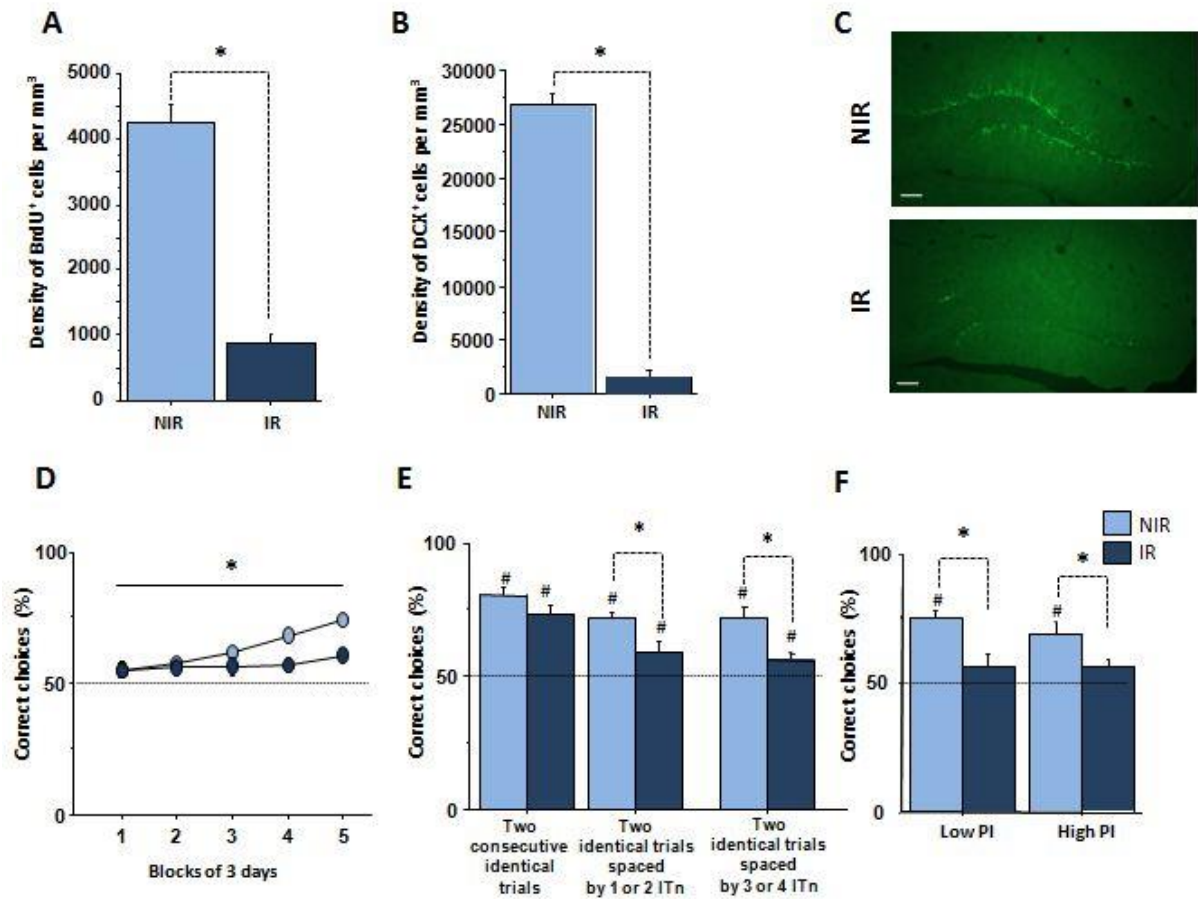
Figure 6 : Effect of R67C mutation of *Pak3* gene on functional maturation of newborn cells in *Pak3-R67C* mice.

(A) The percentage of 18-day-old newborn BrdU⁺ DGCs expressing NKCC1 is higher in *Pak3-R67C* mice (n=4) than in WT mice (n=4), whereas (B) the percentage of 18-day-old newborn BrdU⁺ DGCs expressing KCC2b is lower in *Pak3-R67C* (n=5) than in WT (n=5) mice. (C) Confocal micrographs of 18-day-old newborn BrdU⁺ cells expressing KCC2 in a WT mouse. Scale bars = 10 μm. * indicates significant differences between groups.



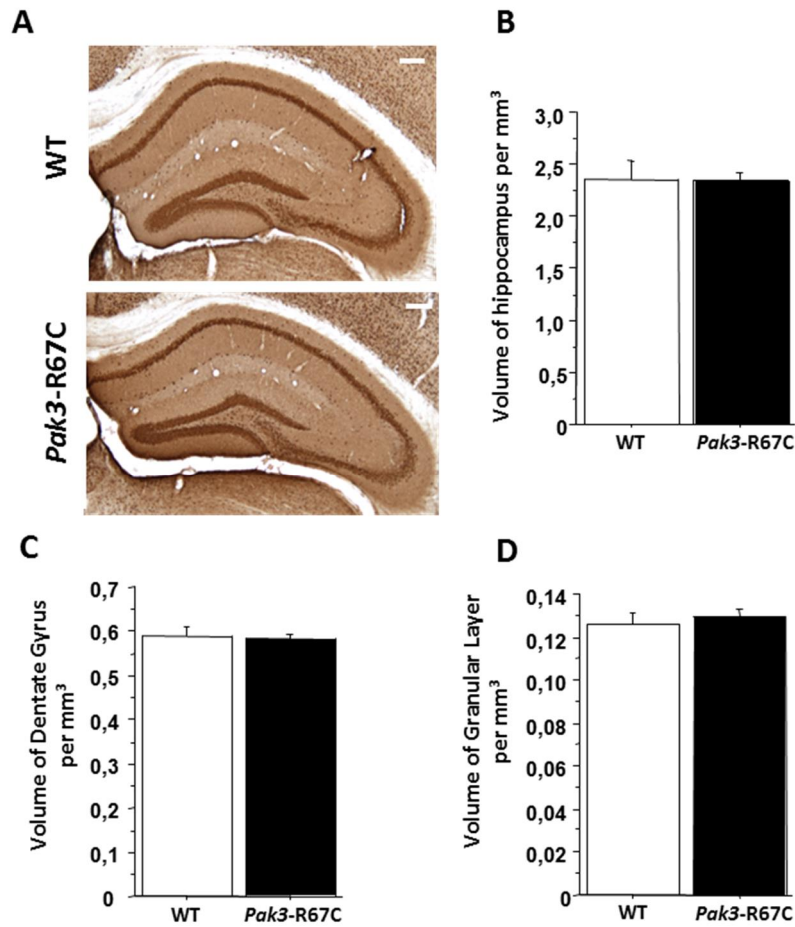
Supplementary figure 1: General behavioural characterisation of *Pak3-R67C* mice.

(A) Total distance travelled in an open-field task in WT (n=12) and *Pak3-R67C* (n=15) mice. (B) Vertical activity (number of rearings) in the open-field task. (C) Percentage of time spent in the central zone of the open field. (D) Working memory errors on the 8-arm radial maze in WT (n=10) and *Pak3-R67C* (n=11) mice.



Supplementary figure 2: High sensitivity to interference in irradiated mice.

Effect of irradiation on the density of 35 day-old BrdU⁺ cells (A), and immature newborn neurons DCX⁺ (B). (C) Representative microphotographs illustrating DCX labelling in the DG of NIR (top) and IR mice (bottom, scale bar = 100 μ m). (D) The percent of correct choices increased progressively during training in NIR (n=8) and IR mice (n=10), however performance of NIR mice was significantly above that of IR mice. (E) Performance during the last 3 training sessions as a function of the proximity between two identical tests. (F) Performance during the last 3 sessions as a function of the level of proactive interference for a given trial (Low PI, High PI) for NIR and IR mice. The horizontal black line represents chance. Error bars indicate SEM. * indicates significant differences between groups. # indicates significant differences compared to chance (50 %).



Supplementary figure 3: Neuronal architecture of the hippocampal anatomy in *Pak3-R67C* mice.

(A) NeuN immunoreactivity in WT and *Pak3-R67C* mice. Scale bar = 200 μ m. (B) Volume of dorsal hippocampus (mm³) in WT and *Pak3-R67C* mice (factorial ANOVA, $F(1,8)=0.010$, $p=0.9244$). (C) Volume of dorsal dentate gyrus (mm³) in WT and *Pak3-R67C* mice (factorial ANOVA, $F(1,8)=0.082$, $p=0.7814$). (D) Volume of granule cells layer (mm³) in WT and *Pak3-R67C* mice (factorial ANOVA, $F(1,8)=0.301$, $p=0.5980$).

III. Etude de la neurogenèse adulte et des fonctions cognitives, chez le modèle murin *Dp71-KI*

La myopathie de Duchenne (DMD) est une maladie neuromusculaire due à une dégénérescence des muscles dans laquelle un tiers des patients DMD présente également des troubles cognitifs (Hinton *et al.* 2000). Cette pathologie est due à des mutations du gène *dmd* qui code la dystrophine, une protéine du cytosquelette (cf. Introduction III.3.3). La présence de plusieurs promoteurs indépendants internes au gène *dmd* entraîne l'expression de dystrophines de longueurs variables, dont la Dp71, une forme courte de la dystrophine produite majoritairement dans le cerveau et exprimée dans les neurones et la glie (pour revue, Perronnet & Vaillend, 2010). L'étiologie de la DI dans la DMD est complexe (Perronnet & Vaillend, 2010). Néanmoins, plusieurs études des relations génotypes-phénotypes ont permis de révéler une corrélation entre des mutations du gène affectant la Dp71 et la sévérité de la DI (Desguerre *et al.* 2009 ; Daoud *et al.* 2009a ; cf. Introduction III.3.3b).

Les données actuelles suggèrent que la Dp71 a des fonctions ambivalentes à la fois dans les cellules gliales et neuronales (pour revue, Tadayoni *et al.* 2012). Par exemple, à l'interface gliovasculaire, la Dp71 est nécessaire pour le regroupement normal d'un sous-ensemble d'aquaporines (AQP4) et de canaux potassiques (Kir4.1), participant ainsi aux processus majeurs impliqués dans la fonction de la barrière hémato-encéphalique (Haenggi *et al.* 2004 ; Nicchia *et al.* 2008 ; Tadayoni *et al.* 2012). D'autre part, au niveau neuronal, des études d'hybridation *in situ* ont détecté une expression prédominante de l'ARNm de la Dp71 dans une sous-population neuronale spécifique, les cellules granulaires du GD et du bulbe olfactif, les deux régions principales de la neurogenèse adulte (Gorecki & Barnard, 1995). Enfin, de manière intéressante, la Dp71 a également été détectée *in vitro* dans le noyau des cellules PC12 où elle participerait au cycle de la division cellulaire et notamment à la cytokinèse (Acosta *et al.* 2004 ; Villarreal-Silva *et al.* 2010).

Afin d'étudier le rôle de la Dp71 *in vivo*, nous disposons au laboratoire d'une souris *Dp71-KI* qui ne présente pas de myopathie et dont une partie de la caractérisation comportementale a été menée par C. Vaillend. Hormis une anxiété légèrement plus forte, leurs performances motrices et exploratoires sont identiques à celles des souris contrôles (Daoud *et al.* 2009b ; mémoire M2 D. Le Verger 2014). Ces souris présentent également un retard d'acquisition en piscine de Morris, un déficit de mémoire spatiale à court et à long terme en labyrinthe en T, des déficits de mémoire de reconnaissance spatiale dans une tâche d'alternance, ainsi qu'un déficit de mémoire spatiale de travail en labyrinthe radial (Daoud *et al.* 2009 ; Chaussonnet *et al.* en préparation). Leur flexibilité

cognitive est altérée dans deux apprentissages impliquant la mémoire de référence spatiale (piscine de Morris et labyrinthe radial ; Chausseot *et al.* en préparation). Au niveau de la physiologie de l'hippocampe, plusieurs altérations ont été mises en évidence. En effet, une altération de l'organisation, de la maturation et une diminution de la densité des synapses ont été observées dans le CA1 de l'hippocampe (Miranda *et al.* 2011), ainsi qu'une augmentation de la transmission glutamatergique qui déséquilibre la balance excitation/inhibition en faveur de l'excitation (Daoud *et al.* 2009b). L'ensemble de ces données semble donc mettre en évidence de potentielles altérations de l'hippocampe et de ses fonctions. Néanmoins, pour le moment, il n'est pas connu si l'ensemble des déficits observés sont une conséquence de la perte de fonction de Dp71 synaptique, un effet secondaire de l'altération de la fonction gliale, ou une combinaison des deux.

Au cours de ma thèse, guidés par plusieurs études montrant, entre autre, l'expression de la Dp71 dans les deux principales zones neurogéniques (GD et les bulbes olfactifs; Górecki & Barnard, 1995 ; Daoud *et al.* 2009b), nous nous sommes intéressés plus spécifiquement à la fonction de la Dp71 dans la neurogenèse adulte du GD de l'hippocampe. Nous avons donc tout d'abord poursuivi l'étude du phénotype comportemental des souris *Dp71-KI* en testant notamment la fonction de séparation de patterns. Par la suite, nous avons examiné si l'absence de la protéine Dp71 affecte l'une des étapes clés de la neurogenèse basale en étudiant la dynamique de la neurogenèse : prolifération, différenciation, maturation et survie des nouveaux neurones dans l'hippocampe adulte des souris *Dp71-KI in vivo*. Cependant ces résultats restent à approfondir. D'ailleurs, en raison de quelques contraintes techniques, nous n'avons pas encore pu mettre en évidence la présence de la Dp71 au sein des nouveaux neurones générés à l'âge adulte.

3.1. L'absence de la Dp71 entraîne un déficit de reconnaissance de la localisation d'objets

Comme rappelé précédemment, les souris *Dp71-KI* présentent un déficit de mémoire de travail en labyrinthe radial mais aucun déficit dans une tâche classique de reconnaissance d'objets. Ainsi nous avons utilisé un nouveau protocole comportemental de séparation de patterns basé sur la reconnaissance de la localisation spatiale d'objets (van Hagen *et al.* 2015). Ce test repose sur la discrimination d'emplacements d'objets qui sont disposés de façon plus ou moins proche dans un open-field (OPS task ; cf. Mat et Met II.2.3). Dans cette tâche spécifique, après la phase d'acquisition, un des objets est déplacé de manière plus ou moins éloignée de sa position initiale (configuration proche vs éloignée ; cf. Mat et Met II.2.3 ; Figure 29). Cette tâche repose sur l'attrait naturel des souris pour la nouveauté, qui vont explorer davantage l'objet qui a été déplacé si le souvenir de la

position initiale des objets est suffisamment précis pour qu'un changement de localisation soit détecté. Plus l'objet déplacé est proche de sa position initiale, plus la détection sera difficile.

Au cours de l'acquisition, le comportement exploratoire est identique entre les deux groupes de souris, comme le montre les temps d'exploration global et nombre de contacts avec les objets (ANOVA Factorielle ; ANOVA Factorielle ; effet génotype: « Temps d'exploration » : $F(1,28)=1.478$, NS ; « Nombre de contacts » : $F(1,28)=0.005$, NS). Durant la phase de test, 1h après la première exposition, les souris WT ($n=14$) passent significativement plus de temps à explorer l'objet déplacé dans les deux configurations, indiquant qu'elles réalisent une bonne reconnaissance spatiale, que l'objet soit proche ou éloigné de sa position initiale (Figure 31 ; test de Student : WT : proche, $t(7)=3.223$, $p=0.0146$; éloigné, $t(7)=4.521$, $p=0.0027$). En revanche, les souris *Dp71-KI* ($n=12$) passent autant de temps à explorer l'objet déplacé que non déplacé et ce, dans les deux configurations (éloignée/proche), signifiant que les souris *Dp71-KI* n'ont pas pris en compte le déplacement de l'un des deux objets (ANOVA Factorielle ; WT : $F(1,13)=7.992$, $p=0.0143$; *Dp71-KI* : $F(1,13)=7.999$, $p=0.0142$; *Dp71-KI* : proche, $t(6)=-0.160$, NS ; éloigné, $t(6)=-0.646$, NS). Ce déficit de reconnaissance n'est pas lié au comportement exploratoire puisque le temps d'exploration global et le nombre de contacts avec les objets durant la rétention sont similaires entre les deux groupes de souris (ANOVA Factorielle ; effet génotype: « Temps d'exploration » : $F(1,28)=0.048$, NS ; « Nombre de contacts » : $F(1,28)=1.117$, NS). Les déficits observés chez les souris *Dp71-KI* pourraient être liés à l'association des déficits de mémoire de travail et de mémoire spatiale précédemment observés.

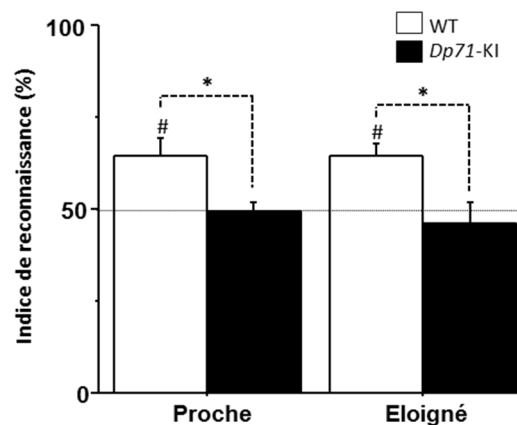


Figure 31 : Performances des souris *Dp71-KI* en séparation de patterns dans le test de reconnaissance spatiale d'objets (van Hagen *et al.* 2015).

L'indice de reconnaissance correspond au temps passé à explorer l'objet déplacé par rapport au temps total d'exploration des deux objets multiplié par 100 (config proche : WT : $n=7$; *Dp71-KI* : $n=6$; config éloignée : WT : $n=7$; *Dp71-KI* : $n=6$). Les résultats sont exposés en fonction de la configuration proche et éloignée des objets dans l'open-field. *Effet génotype $p<0.05$; # test-t de Student comparé à la chance (50%).

Pour cette tâche, compte tenu des déficits observés que l'objet soit proche ou éloigné de sa position initiale, il n'est pas possible de conclure sur les capacités de séparation de patterns dans le domaine spatial pour les souris *Dp71-KI*.

3.2. La perte de la *Dp71* affecte la survie des nouveaux neurones de l'hippocampe dorsal

Afin d'étudier la neurogenèse hippocampique adulte, la première partie de l'étude a consisté à faire une analyse des volumes du GD dorsal et des couches granulaires. Les résultats indiquent que ces volumes sont identiques entre les génotypes (ANOVA Factorielle : « Volume GD » : $F(1,9)=1.083$, NS ; « volume couche granulaire » : $F(1,9)=1.431$, NS ; Figure 32).

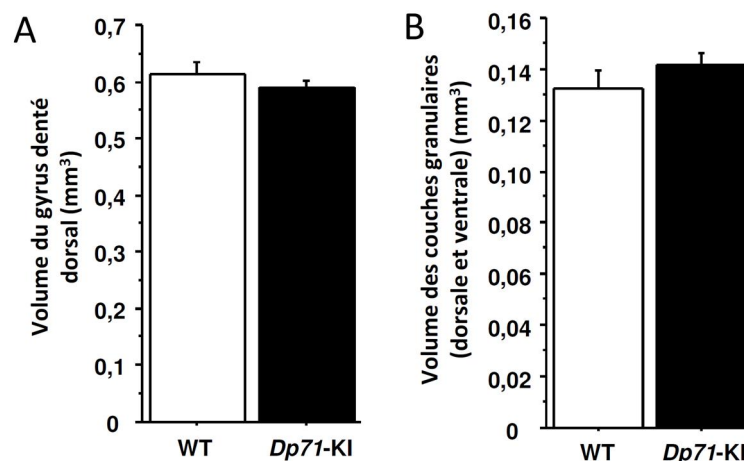


Figure 32 : Volumes en mm³ du GD dorsal et des couches granulaires qui le compose chez les souris WT et *Dp71-KI*. Mesure du GD dorsal de l'hippocampe : bregma -1.15mm à -3.30mm (WT n=5 ; *Dp71-KI* n=6).

Pour étudier la prolifération et la survie cellulaire chez les souris WT et *Dp71-KI*, nous avons réalisé une dynamique de la neurogenèse adulte au sein du GD dorsal. Nous avons analysé la densité de cellules BrdU⁺/mm³ dans les couches granulaires du GD de l'hippocampe dorsal, 2h, 24h et 3 jours après une injection de 150 mg/kg de la BrdU pour étudier la prolifération (Figure 34), et 18 jours, 28 jours et 38 jours après trois injections de 100 mg/kg de BrdU espacées de 4 heures, pour étudier la survie cellulaire (Figure 35 ; cf. Mat et Met III).

Premièrement, l'analyse statistique de la prolifération des nouvelles cellules à 2h, 24h et 3 jours n'a révélé aucune différence significative entre les souris WT et *Dp71-KI* (ANOVA Factorielle: « 2h » : $F(1,10)=2.061$, NS ; « 24h » : $F(1,7)=0.616$, NS ; « 3 Jours » : $F(1,5)=0.040$, NS ; Figure 33A). Cependant, comme des données de la littérature ont montré, *in vitro*, que la *Dp71* participe à la progression du cycle cellulaire (progression des phases G0/G1 à S) et que la perte de la *Dp71* peut altérer la prolifération cellulaire en entraînant l'instabilité de fuseau mitotique durant la cytokinèse

(Acosta *et al.* 2004 ; Villarreal-Silva *et al.* 2010 ; Herrera-Salazar *et al.* 2016), nous avons étudié plus précisément l'étape de prolifération cellulaire. Pour cela, nous avons utilisé les marqueurs de prolifération ki67 (marqueur des cellules prolifératives présent en phase G1, S, G2 et M) et de mitose P-H3 (marqueur des cellules prolifératives présente en phase G2 ou M ; cf. Mat et Met III.3.3). Les résultats confirment le résultat obtenu par notre étude à la BrdU : aucune différence n'a été observée entre les deux groupes de souris pour les densités de cellules ki67⁺ et P-H3⁺ (Figure 33B-C ; ANOVA Factorielle : « ki67 » : F(1,12)=0.164, NS ; « P-H3 » : F(1,9)=0.012, NS). L'ensemble de ces résultats indique donc que la prolifération des nouvelles cellules dans le GD adulte n'est pas affectée par la perte de la Dp71 *in vivo*.

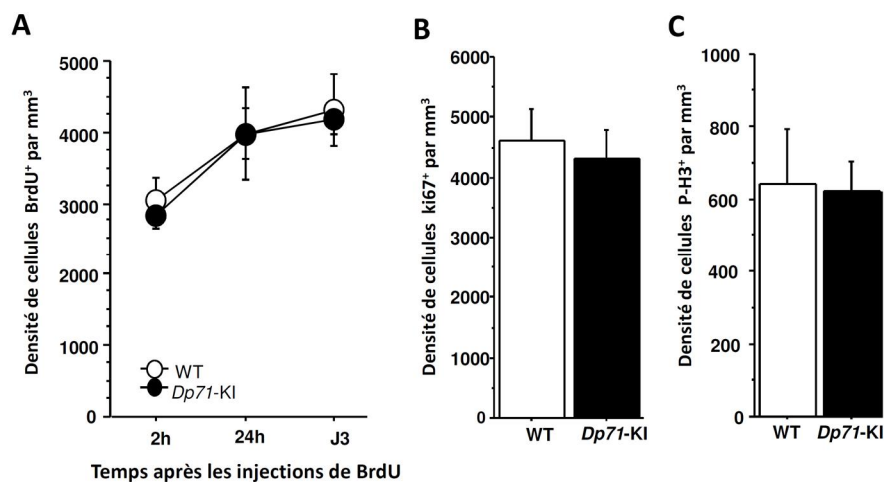


Figure 33 : Prolifération cellulaire chez les souris *Dp71-KI*.

(A) Moyennes des densités de cellules BrdU⁺/mm³ dans la couche granulaire du GD de l'hippocampe dorsal, 2h, 24h et 3 jours après une injection de BrdU (2h : WT n=3 *Dp71-KI* n=9 ; 24h : WT n=5 *Dp71-KI* n=4 ; 3 jours : WT n=4 *Dp71-KI* n=3; cf Mat et Met III). (B) Mesures des densités de cellules ki67⁺ (WT n=5 *Dp71-KI* n=9) et P-H3⁺ (WT n=5 *Dp71-KI* n=6). Les barres représentent les erreurs standards à la moyenne.

Deuxièmement, l'analyse de la survie cellulaire indique, quant à elle, qu'un taux élevé de nouvelles cellules est éliminé chez les souris WT et *Dp71-KI* durant les premières semaines après leur naissance (entre 18 et 28 jours post natal). Néanmoins, alors que les souris WT montrent une perte progressive de cellules BrdU⁺ entre 18 et 38 jours post injections, l'étude de la survie des nouvelles cellules des souris *Dp71-KI* montre une mort accélérée entre 18 et 28 jours post injections avec significativement moins de cellules BrdU⁺ âgées de 28 jours post injections (Figure 34A ; ANOVA Factorielle ; effet génotype : « 18 dpi » : F(1,5)=0.167, NS ; « 28 dpi » : F(1,9)=28.444, p=0.0005 ; « 38 dpi » : F(1,8)=0.026, NS). Néanmoins, cette mort accélérée n'a aucun impact sur la densité de nouvelles cellules plus âgées (38 jours dpi) qui est similaire entre les deux groupes de souris (Figure 34A) et n'a pas d'impact non plus sur la densité totale de nouveaux neurones immatures DCX⁺ (ANOVA Factorielle « DCX » : F(1,7)=0.017, NS ; Figure 34B)

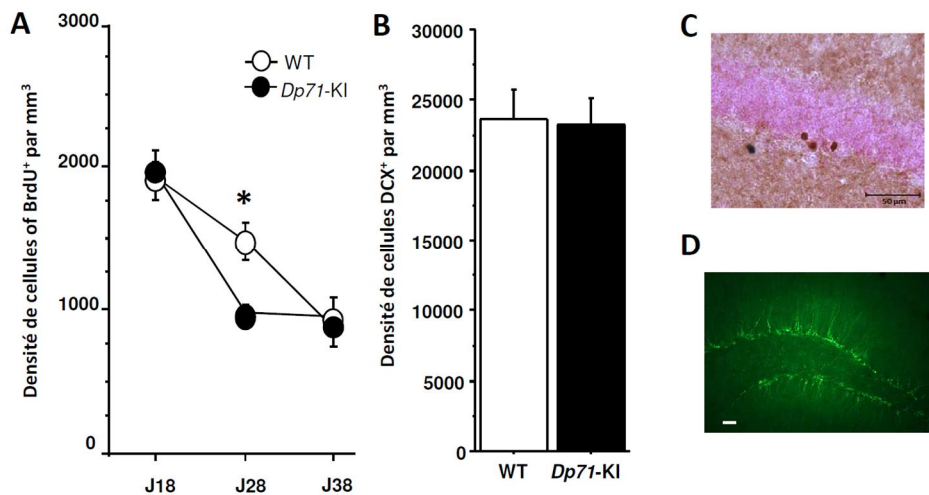


Figure 34 : Survie cellulaire chez les souris *Dp71-KI*.

(A) Moyennes des densités de cellules BrdU^+ / mm^3 dans la couche granulaire du GD de l'hippocampe dorsal, 18, 28 et 38 jours après trois injections de BrdU (18 jours : WT n=4 *Dp71-KI* n=3 ; 28 jours : WT n=5 *Dp71-KI* n=6 ; 38 jours : WT n=5 *Dp71-KI* n=5 ; cf Mat et Met III). (B) Mesures des densités de neurones DCX^+ (WT n=5 *Dp71-KI* n=4). (C) Image illustrant le marquage BrdU dans la couche granulaire du GD (barre d'échelle : 50 μm). (D) Image illustrant le marquage DCX dans le GD (barre d'échelle : 50 μm). Les barres représentent les erreurs standards à la moyenne. *Effet génotype $p < 0.05$

L'ensemble de ces données indique donc qu'en absence de la *Dp71*, la prolifération cellulaire n'est pas altérée mais qu'en revanche, la survie des nouveaux neurones est modifiée durant la période critique durant laquelle ils peuvent être sélectionnés et intégrés dans les réseaux préexistants de l'hippocampe. Cependant, cette mort accélérée des nouveaux neurones n'affecte pas la densité finale des nouveaux neurones qui survivent à plus long terme.

3.3. Etude du rôle de la *Dp71* dans la maturation neuronale, la différenciation gliale, et la maturation dendritique

Par la suite, nous avons également étudié le processus de maturation neuronale des nouveaux neurones en réalisant un triple marquage des cellules BrdU^+ (âgées de 18, 28 et 38 jours) avec des marqueurs de neurones immatures et matures (*DCX* et *NeuN* respectivement). Nos résultats montrent que le processus de maturation est identique entre les génotypes (Figure 35A ; ANOVA Factorielle: 18 jours : $\text{BrdU}^+/\text{DCX}^+/\text{NeuN}^+$ $F(1,5)=0.650$, NS ; $\text{BrdU}^+/\text{DCX}^-/\text{NeuN}^+$ $F(1,5)=0.497$, NS ; $\text{BrdU}^+/\text{DCX}^+/\text{NeuN}^-$ $F(1,5)=0.042$, NS ; 28 jours : $\text{BrdU}^+/\text{DCX}^+/\text{NeuN}^+$ $F(1,6)=0.307$, NS ; 28 jours : $\text{BrdU}^+/\text{DCX}^-/\text{NeuN}^+$ $F(1,6)=0.707$, NS ; $\text{BrdU}^+/\text{DCX}^+/\text{NeuN}^-$ $F(1,6)=0.562$, NS ; 38 jours : $\text{BrdU}^+/\text{DCX}^+/\text{NeuN}^+$ $F(1,7)=4.254$, NS ; $\text{BrdU}^+/\text{DCX}^-/\text{NeuN}^+$ $F(1,7)=2.651$, NS).

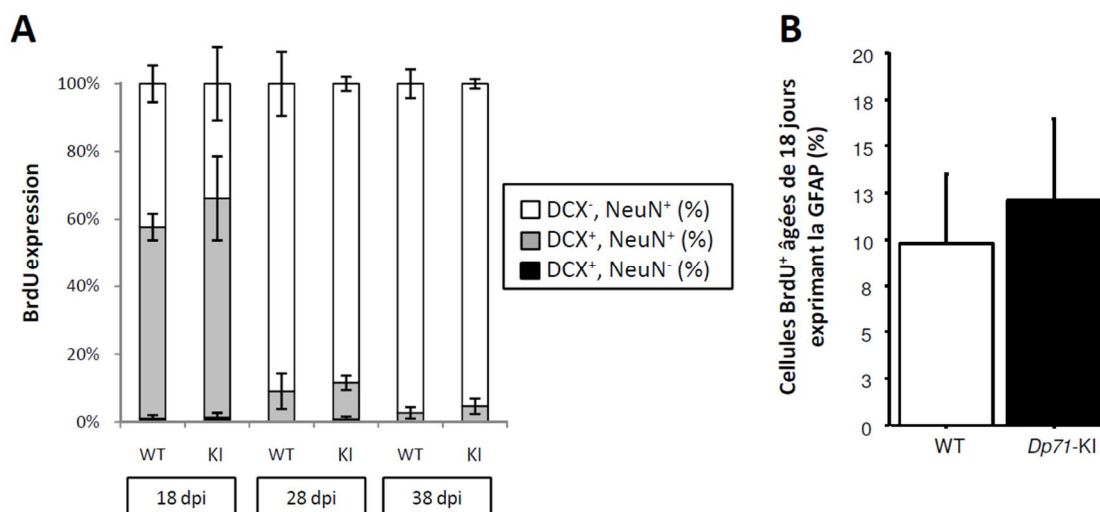


Figure 35 : Différenciation et maturation cellulaire chez les souris *Dp71-KI*.

(A) Pourcentage de cellules BrdU⁺ exprimant les marqueurs DCX et/ou NeuN à 18, 28 et 38 jours après injections de la BrdU chez les souris WT et *Dp71-KI* (18 jours : WT n=4 *Dp71-KI* n=3 ; 28 jours : WT n=3 *Dp71-KI* n=5 ; 38 jours : WT n=5 *Dp71-KI* n=4 ; cf Mat et Met III.3.4). (B) Pourcentage de cellules BrdU⁺ âgées de 18 jours exprimant la GFAP (WT n=4 ; *Dp71-KI* n=7 ; cf Mat et Met III.3.4).

Guidé par une étude de la littérature montrant, *in vitro*, une implication de la Dp71 dans la différenciation des astrocytes en culture (Imamura *et al.* 1998) mais aussi *in vitro* dans les cellules PC12 (Cisneros *et al.* 1996 ; Acosta *et al.* 2004), nous avons analysé, sur une population de nouvelles cellules âgées de 18 jours, la proportion d'entre elles exprimant le marqueur GFAP (fibrillary acidic protein), marqueur des cellules gliales. Cependant, nos résultats n'ont révélé aucune différence entre les génotypes indiquant une différenciation normale des nouvelles cellules chez les souris *Dp71-KI in vivo* (Figure 35B ; ANOVA Factorielle : $F(1,9)=0.127$, NS).

Comme mentionné dans l'introduction (cf. Introduction I.1.5.c), la maturation des dendrites et des épines dendritiques, ainsi que la synaptogenèse font parties des mécanismes les plus souvent altérés dans les modèles de DI, ainsi que chez les patients. D'autre part, il a été montré *in vivo* au laboratoire, une altération de la densité et de la morphologie des synapses excitatrices dans l'aire CA1 de l'hippocampe chez le modèle *Dp71-KI* (Daoud *et al.* 2009b). Ainsi, nous avons choisi de réaliser une première analyse de l'arborisation dendritique des neurones immatures du GD chez les souris *Dp71-KI* à l'aide du marqueur DCX (cf. Mat & Met IV). Notre étude a révélé une diminution de la complexité dendritique des neurones immatures chez les souris *Dp71-KI* (Figure 36). En effet, la longueur moyenne des dendrites et le nombre moyen d'intersections sont significativement plus faibles chez les souris *Dp71-KI* que chez les souris WT (ANOVA Factorielle : longueur moyenne: $F(1,6)=36.177$; $p=0.0010$; nombre de ramification moyenne: $F(1,6)=11.418$; $p=0.0149$). Ces résultats indiquent que la maturation des neurones immatures est modifiée en l'absence de la Dp71.

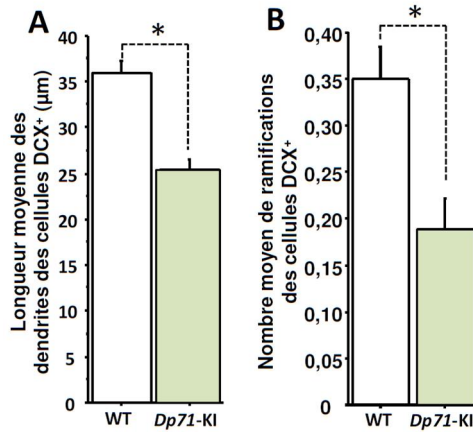


Figure 36 : Maturation morphologique des nouveaux neurones chez les souris *Dp71-KI*.

(A) Longueur moyenne des dendrites des neurones DCX⁺ chez les souris WT et *Dp71-KI*. (B) Nombre moyen d'intersections des neurones DCX⁺ chez les souris WT (n=4) et *Dp71-KI* (n=4). Les barres représentent les erreurs standards à la moyenne. *Effet génotype p<0.05

3.4. Discussion des résultats obtenus pour le modèle *Dp71-KI*

Les résultats que nous avons obtenus *in vivo* chez la souris *Dp71-KI* sont encore succincts et doivent être complétés. Nos études comportementales ne nous permettent pas de conclure véritablement à un déficit de séparation de patterns chez ce modèle. Il nous faudra mettre au point d'autres protocoles pour parvenir à tester cette fonction, tout en prenant en compte les déficits de mémoire de travail et de mémoire spatiale de ces souris. Concernant les étapes de la neurogenèse à l'état basal, aucun défaut de prolifération des nouvelles cellules au sein du GD n'a été détecté. Compte tenu du rôle de la Dp71 dans le cycle de division cellulaire et en particulier de la cytokinèse (Acosta *et al.* 2004 ; Villarreal-Silva *et al.* 2010 ; Herrera-Salazar *et al.* 2016), ceci peut paraître inattendu et pourrait engendrer des retards de cycle de division dans les premières étapes de la prolifération. C'est pourquoi, nous avons démarré une dernière analyse (non terminée à ce jour), pour étudier la vitesse de maturation des cellules de type 1, 2a, 2b et 3. D'autre part, nos résultats n'ont pas montré non plus de rôle de la Dp71 dans la différenciation phénotypique des cellules neuronales ou gliales. Là encore, cette étude *in vivo* ne corrobore pas celle d'Imamura *et al.* (1998) qui montre une implication de la Dp71 dans la différenciation des astrocytes *in vitro*. Enfin, bien que cela reste à approfondir, nos résultats ont montré deux faits intéressants : la survie des jeunes neurones est affectée au cours de la période critique (entre 18-28 jours), et le développement de l'arborisation dendritique des jeunes neurones est altéré en absence de Dp71. Ce dernier point conforte l'étude *in vitro* d'Acosta *et al.* (2004) mettant en évidence un rôle de la Dp71 dans la croissance neuritique. Ce résultat sera à compléter de manière plus approfondie en mesurant précisément les dendrites des nouveaux neurones de différents âges à l'aide d'un rétrovirus GFP. Nous pourrions également réaliser cette même étude sur les neurones matures pour déterminer s'il

s'agit d'un retard ou d'une altération durable. Concernant la mort accélérée des jeunes neurones, il nous faudra en déterminer les causes et vérifier s'il y a un lien avec un potentiel retard de maturation fonctionnelle, un défaut de recrutement et bien sûr, si cela peut affecter les fonctions cognitives en conséquence.

Pour finir, la littérature actuelle sur la Dp71 semble montrer qu'il s'agit d'une protéine bien plus complexe que ce que l'on pensait au départ. En effet, il a été mis en évidence l'existence de plusieurs variants de la protéine Dp71, générés par épissage alternatif dans le système nerveux central (Austin *et al.* 2000 ; Figure 37). La diversité des localisations cellulaires et subcellulaires de Dp71, et vraisemblablement de ses fonctions, pourrait être liée à la variété des isoformes de Dp71 générés par épissage alternatif dans le cerveau. On sait aujourd'hui que la Dp71 dispose d'au moins 3 groupes distincts d'isoformes : Dp71d, Dp71f et Dp71e, se différenciant par les exons qui les composent (Austin *et al.* 1995 ; Aragón *et al.* 2011 ; Saint Martín *et al.* 2012 ; Aragón *et al.* 2017). Notre équipe en collaboration avec un groupe mexicain a récemment montré que le groupe d'isoformes Dp71d était le groupe le plus exprimé dans le cerveau (Aragón *et al.* 2017). Ces différents isoformes semblent donc pouvoir s'exprimer de manière différentielle aux niveaux tissulaire et cellulaire et pourraient ainsi jouer des rôles dans des mécanismes différents, voire à différents moments au cours du développement ou du fonctionnement cérébral adulte, ce qui n'est pas encore connu. D'autre part, il est probable que des isoformes distincts soient exprimés dans les astrocytes et les neurones (Aléman *et al.* 2001, Szabó *et al.* 2004). Avec cette information supplémentaire, nous pourrions ainsi savoir plus précisément le ou les isoformes de la Dp71 présent au sein des nouveaux neurones afin de mettre en évidence le rôle précis de la Dp71 dans le neurogenèse adulte.

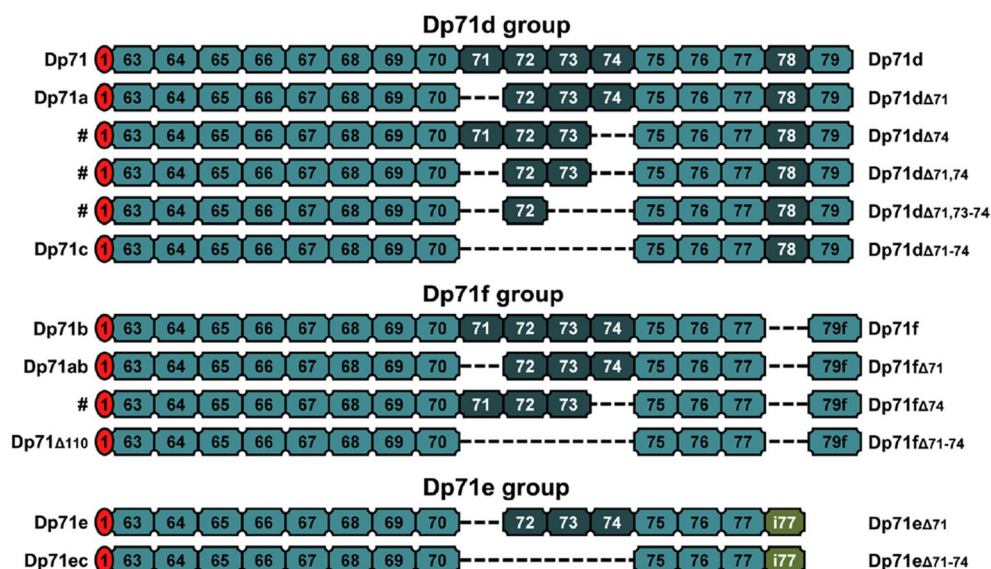


Figure 37: Représentation schématique des isoformes de la Dp71

(a) Groupes des isoformes de la Dp71 (Dp71d, Dp71f et Dp71e). Le groupe Dp71d se caractérise par la présence des exons 78 et 79, le groupe Dp71f a perdu l'exon 78 et possède un exon 79 alternatif (79f) tandis que le groupe Dp71e possède l'intron 77 (i77) et a perdu les exons 78 et 79 dans sa forme protéique. Les lignes pointillées indiquent les épissages alternatifs. Aragón *et al.* 2017.

Discussion générale

Au cours de cette thèse, nous nous sommes focalisés sur le processus de neurogenèse hippocampique adulte, un mécanisme de plasticité cérébrale qui joue un rôle crucial dans les fonctions cognitives et dont les altérations ont déjà été mises en cause dans les déficits cognitifs chez plusieurs modèles de DI (pour revue, voir Pons-Espinal *et al.* 2013). L'objectif initial de mon projet de thèse était d'entreprendre une étude comparative de la neurogenèse hippocampique adulte et des fonctions cognitives associées chez trois modèles murins de DI. Outre le fait que nous disposons de ces modèles murins au laboratoire et qu'il a précédemment été observé, chez deux d'entre eux, des déficits liés à un dysfonctionnement de l'hippocampe, il a également été montré que les trois protéines affectées dans ces modèles interviennent dans des voies de signalisation parallèles qui sont susceptibles de converger. De ce fait, on retrouve pour ces trois protéines des fonctions cellulaires communes.

Par ailleurs, au niveau neuronal, de nombreuses voies de signalisation impliquant un grand nombre de protéines sont d'ores et déjà connues pour leur rôle dans la plasticité et les fonctions cognitives. Lorsque certaines de ces protéines sont altérées, elles sont susceptibles d'entraîner des pathologies dont un des signes cliniques est la DI. Parmi ces protéines, on retrouve par exemple, PAK3 et RSK2, mais également CDC42, RAC1, FMRP, LIMK1 ou encore OPHN1... (Figure 39). Parmi ces voies de signalisation, on retrouve également des protéines impliquées dans d'autres pathologies telles que les « Rasopathies », qui correspondent à des pathologies liées à des altérations des protéines Ras (localisées en amont de la voie des MAPK ; Figure 39) et caractérisées par des DI (parmi d'autres signes cliniques), ou encore la maladie d'Alzheimer. Il a notamment été mis en évidence un lien entre PAK3 et la protéine APP (pour revue, Ma *et al.* 2012 ; Figure 39). Ainsi, mon travail permettra d'apporter des éléments supplémentaires nécessaires à la compréhension de ces voies de signalisations, à leur fonction et à leur fonctionnement afin de fournir des pistes pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Ce travail de thèse a permis de mettre en évidence, chez nos trois modèles murins de DI, des déficits cognitifs classiquement décrits comme dépendants de l'hippocampe, ainsi que des altérations de la neurogenèse hippocampique adulte. Toutefois, selon les modèles, les déficits ne sont pas observés dans les mêmes situations comportementales ou dans les mêmes étapes de la neurogenèse adulte ce qui nous a finalement conduit à effectuer différentes expériences non identiques chez les différents modèles.

Les résultats exposés dans cette thèse auront permis d'enrichir nos connaissances : (1) sur le rôle de la neurogenèse hippocampique dans les fonctions cognitives associées aux DI, (2) sur certains des mécanismes en cause dans les altérations de la neurogenèse adulte liées aux DI, (3) et sur les conséquences de ces altérations sur les fonctions cognitives.

- Dans un premier article publié dans la revue « *Neurobiology of disease* », nous avons montré que chez le modèle murin du CLS (souris *Rsk2*-KO), les premières étapes de la maturation des nouveaux neurones générés au sein du GD adulte, sont retardées, ce qui est possiblement lié au déficit d'activation des neurones immatures observé en relation avec l'apprentissage et la mémoire. Nous avons également mis en évidence un rôle de RSK2 dans la régulation de la neurogenèse suite à l'apprentissage. En plus de ces altérations de la neurogenèse, des déficits sélectifs dans les capacités de discrimination spatiale ont été observés, ce qui représente un nouveau mécanisme altéré qui peut contribuer, au moins en partie, aux déficits cognitifs observés dans le CLS.
- Dans un deuxième article actuellement en préparation, nous avons mis en évidence chez le modèle murin *Pak3*-R67C, une altération de la maturation fonctionnelle des nouveaux neurones au moment de leur période critique de maturation, qui empêche les jeunes nouveaux neurones d'être activés ou recrutés par une tâche comportementale ce qui est possiblement à l'origine de leur mort précoce. L'ensemble des altérations du processus de neurogenèse adulte pourrait, par conséquent, contribuer aux déficits cognitifs observés en mémoire spatiale et en séparation de patterns en présence de cette mutation du gène *Pak3*.
- Enfin, les premiers résultats obtenus pour l'étude de la souris *Dp71*-KI ont mis en évidence, au niveau cognitif, un déficit de reconnaissance dans une tâche de séparation de patterns en reconnaissance spatiale d'objets. Au niveau cellulaire, une mort accélérée des nouveaux neurones, ainsi qu'une altération de la morphologie des dendrites ont été mises en évidence. Les informations obtenues pour ce modèle constituent de premières indications quant à la probable contribution de la neurogenèse hippocampique adulte dans les déficits cognitifs liés à la *Dp71*. Cependant ces résultats restent à approfondir.

Ma discussion générale sera orientée autour d'une comparaison entre nos trois modèles de DI, ceux de la littérature et l'ensemble sera mis en relation avec quelques données rapportées chez les patients DI. Je vais notamment me focaliser sur d'autres modèles de DI d'origine monogénique, comme par exemple l'X Fragile, puisque qu'il existe un lien entre les protéines PAK et la protéine FMRP (Hayashi *et al.* 2007 ; Dolan *et al.* 2013), ou encore le syndrome de Rubinstein Taybi impliquant la protéine CBP, puisque cette dernière interagit avec la protéine RSK2. Ces 2 protéines forment ensemble le complexe CBP-RSK2 capable de phosphoryler des facteurs de transcription tels que CREB (De Cesare *et al.* 1998 ; Figure 39), et peuvent ainsi réguler l'expression de gènes (tels que *c-fos*) en remodelant la structure de la chromatine (Merienne *et al.* 2001). Ma discussion sera également l'occasion de revenir sur quelques expériences complémentaires réalisées pendant ma thèse, dont les premiers résultats restent à être complétés, mais qui apportent tout de même quelques informations supplémentaires.

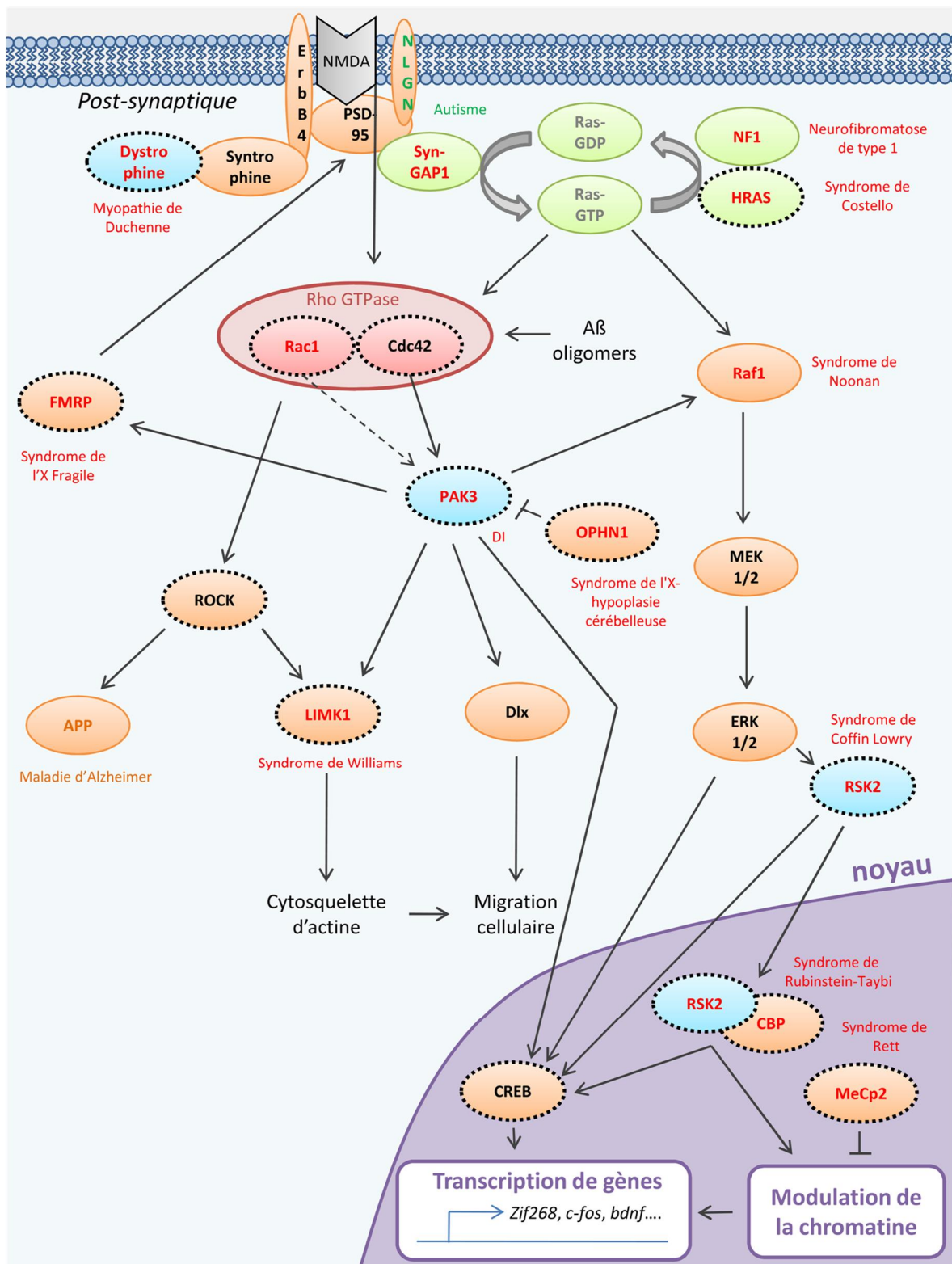


Figure 38 : Représentation schématique illustrant certaines des voies de signalisation neuronales impliquées dans la DI.

Les Rho GTPases sont indiquées en rouge, les Ras GTPase en vert et nos trois protéines d'intérêt en bleu. Les protéines impliquées dans des DI sont notées en rouge, ainsi que la pathologie associée. Les protéines impliquées dans la neurogenèse sont indiquées en pointillé. Modifié d'après Vaillend *et al.* 2008.

I. Fonctions cognitives chez les trois souris modèles de DI

Au cours de la première partie de mon étude, j'ai tout d'abord approfondi l'analyse du phénotype comportemental des trois modèles de souris en réalisant des tests d'apprentissage et de mémoire dépendants de la neurogenèse adulte. Selon la littérature, il est désormais largement admis que les nouveaux neurones générés dans le GD à l'âge adulte sont notamment impliqués dans la mémoire spatiale (pour revue, Marín-Burgin & Schinder, 2011 ; Veyrac *et al.* 2013), ce que nous avons testée avec la tâche d'apprentissage et de mémoire spatiale en piscine de Morris. Pour les souris *Rsk2-KO*, Poirier *et al.* en 2007 ont mis en évidence un retard d'apprentissage et un déficit de mémoire spatiale, que nous avons confirmé au cours de mon doctorat. Dans cette même tâche où le protocole d'apprentissage est distribué sur plusieurs jours, les souris *Pak3-R67C* ne présentent pas d'altérations d'apprentissage, ni de mémoire spatiale. Par contre, lorsque l'apprentissage est massé (tous les essais sont réalisés en une seule journée), ces souris présentent un important déficit de mémoire à long terme en dépit d'un apprentissage normal. Concernant le modèle *Dp71-KI*, Daoud *et al.* (2009b) ont mis en évidence un retard d'apprentissage spatial en version distribuée. Au cours de ma thèse, en testant quelques-unes de ces souris dans le protocole massé, mes résultats préliminaires ne semblent pas mettre en évidence de déficits d'apprentissage, ni de mémoire (données non montrées). Cette étude reste cependant à être complétée avant de valider une absence de déficit.

Dans la littérature, à l'image des différents résultats obtenus pour nos trois modèles, les études sur différents modèles murins de DI montrent également des résultats hétérogènes. Le tableau 3A présente un résumé des résultats rapportés chez d'autres modèles murins de formes monogéniques de DI. Certains de ces modèles présentent des déficits très clairs d'apprentissage et de mémoire spatiale comme la souris *MeCP2-KO*, modèle du syndrome de Rett, la souris modèle du syndrome d'Angelman et la souris *Ophn1-KO*, modèle du Syndrome de l'X-hypoplasie cérébelleuse (Moretti *et al.* 2006 ; Khelifaoui *et al.* 2007 ; Leach *et al.* 2017). Chez le modèle murin *Fmr1-KO*, la littérature reste très contrastée. Certaines études ont mis en évidence des performances normales en piscine de Morris tandis que d'autres ont montré des déficits d'apprentissage et de mémoire (Tableau 3A). Les différences observées reposent parfois sur l'utilisation de différentes versions de la tâche comportementale. Chez le modèle *Fmr1-KO*, une étude n'a pas mis en évidence de déficit dans la version classique de la piscine de Morris, en revanche, dans la version « reversal » (lorsque la plateforme est déplacée), les souris présentent alors des déficits dans la réalisation de la tâche (Bakker *et al.* 1994), suggérant des déficits de flexibilité. Une étude a cependant clairement établi des altérations de mémoire spatiale dans des tâches en utilisant le labyrinthe radial (Mineur *et al.* 2002).

Modèles animaux	Syndrome de Coffin-Lowry Rsk2-KO	DI Pak3, Rb1c	Myopathie de Duchenne Dp71-KI	Angelman Ube3a m/p ⁺	Syndrome du Fragile X Fmr1-KO	Syndrome de Rett MeCP2-KO FoxG1	Syndrome de Rubinstein-Taybi cbp ^{+/+}	Syndrome de TX-hypoplasie cérébelleuse Opm1-KO	Syndrome de Williams Limk1-KO
Sévérité de la DI	Sévère (pourfois léger)	Sévère	Léger à sévère	Sévère	Léger à sévère	Sévère	Modéré à sévère	Léger à modéré	
Apprentissage spatial massé		∅	∅	NE	NE	NE	∅ / Déficit CBP1 transgénic mice	NE	NE
Apprentissage spatial distribué (WM)	Retard	∅	Retard	Leach et al., 2017	D'Hooge et al., 1997; Paradee et al., 1999; Ureña et al., 2012; Leach et al., 2016	Moretti et al., 2006	Alarcon et al., 2004; Wood et al., 2005	Kheifraoui et al., 2007	Meng Y et al., 2002
Apprentissage spatial (radial)	?	?	∅	NE	Minneur et al., 2002	NE	NE	NE	NE
Mémoire spatiale	Déficit (LT)	Déficit (LT)	∅	Déficit (CT)	∅	Déficit (LT)	Déficit (LT) CBP1 transgénic mice Wood et al., 2005	Déficit (CT)	∅
Mémoire de travail	Léger déficit Poitrier et al., 2007 ∅ Fischer et al., 2017	∅	Déficit Daoud et al., 2009b	Déficit Charlone et al., 2017	∅ Leach et al., 2016	NE	NE	Déficit Zhang et al., 2017	Déficit CD mice Borralleras et al.
Flexibilité	∅ Poitrier et al., 2007	?	Déficit (R Chaussefont)	NE	Déficit Bakker et al., 1994; D'Hooge et al., 1997; Baker et al., ∅ (WM) Paradee et al., 1999	NE	NE	NE	Déficit Meng Y et al., 2002
Mémoire de peur au contexte	∅	Retard d'acquisition Léger déficit rétention	∅	Déficit Jiang et al., 1998	∅ Peter et al., 2000	Déficit Moretti et al., 2006	Déficit Alarcon et al., 2004; Lopez-Atalaya et al., 2011	NE	Déficit Meng Y et al., 2002
Séparation de patrons	Déficit sep proche et éloigné en labyrinthe radial (S; Junion) Déficit OPS ∅ Peur au contexte	Déficit à J11 en sep proche en labyrinthe radial ? ∅ Peur au contexte	Déficit OPS objet proche et éloigné ∅ Peur au contexte	NE	Déficit sep proche et éloigné en labyrinthe radial; Guo et al., 2011 NE Déficit en peur au contexte; Eadie et al., 2012	NE	Déficit sep proche et éloigné en labyrinthe radial; Lopez-Atalaya et al., 2011 NE	NE	NE

Tableau 3A : Troubles comportementaux observés chez différents modèles de souris de DI.

Les colonnes oranges correspondent aux trois modèles murins analysés durant ce doctorat. Les colonnes bleues correspondent à d'autres souris modèles de DI étudiés dans la littérature. CT = court terme, LT = long terme, NE = non étudié à notre connaissance.

En résumé, dans l'ensemble, les données de la littérature s'accordent tout de même, sur le fait que les souris modèles de DI présentent des difficultés de mémoire spatiale. Ces données s'accordent aux troubles observés chez les patients DI qui présentent, par exemple, des difficultés à se rappeler l'emplacement d'un objet précédemment observé (patients trisomiques 21 ; Bellugi *et al.* 1994) ou des difficultés à se repérer dans un labyrinthe (patients « X Fragile » ; Macleod *et al.* 2010).

Au cours de ce travail, nous nous sommes également focalisés sur la fonction de séparation de patterns qui permet d'encoder deux souvenirs proches sans chevauchement et pour laquelle l'implication des nouveaux neurones hippocampiques adultes a été clairement démontrée (Rolls, 2013). Pour tester cette fonction, nous avons dans un premier temps utilisé le protocole publié par Clelland *et al.* (2009), basé sur la séparation de patterns en labyrinthe radial. Nous n'avons pas testé le modèle *Dp71-KI* dans cette tâche, car ces souris présentent un important déficit de mémoire de travail (Daoud *et al.* 2009b) qui aurait pu compromettre l'interprétation d'éventuels déficits de performance dans cette tâche. Concernant nos deux autres modèles, certaines divergences sont observées. Les souris *Pak3-R67C* parviennent à discriminer les différentes configurations de façon similaire aux souris WT au cours des 10 jours d'apprentissage. Cependant, lors de la réalisation de 3 essais consécutifs, les souris *Pak3-R67C* ne parviennent pas à faire cette discrimination en configuration difficile (configuration proche). Au contraire, les souris *Rsk2-KO* présentent, quant à elles, des déficits dans les deux configurations du labyrinthe (séparation proche et éloignée) tout au long de la discrimination (Thèse S. Lunion, 2014) qui pourraient résulter des légers déficits de mémoire de travail précédemment mis en évidence chez ce modèle (Poirier *et al.* 2007). Pour s'exempter des déficits de mémoire de travail observés chez les modèles *Dp71-KI* et *Rsk2-KO*, nous avons également utilisé un autre protocole comportemental de séparation de patterns basé sur la reconnaissance d'objets (van Hagen *et al.* 2015). Dans cette tâche, bien que les souris *Rsk2-KO* passent significativement plus de temps à explorer l'objet déplacé lorsqu'il est très éloigné de sa position initiale, elles n'explorent toutefois pas davantage l'objet déplacé en configuration proche montrant que les souris *Rsk2-KO* présentent un déficit de séparation de patterns dans cette tâche. En ce qui concerne les souris *Dp71-KI*, un déficit a également été mis en évidence, mais il reste difficile de conclure à un déficit de séparation de patterns *stricto sensu* puisqu'elles passent autant de temps à explorer l'objet déplacé que non déplacé et ceci dans les deux configurations (proche et éloignée). Cependant, malgré les divergences qui existent selon les tâches et protocoles, ces résultats semblent bien montrer, ici encore, que les trois modèles de souris présentent une difficulté dans cette fonction cognitive essentielle aux processus mnésiques. En parallèle de la réalisation de ces deux tâches de séparation de patterns, nous avons également testé une troisième tâche de séparation de patterns : la discrimination contextuelle en conditionnement de peur selon le protocole de Sahay *et al.* (2011 ; Annexe 1 ; Figure 40). Dans cette tâche, les souris doivent apprendre à discriminer deux contextes qui présentent de nombreuses similitudes mais dont seul l'un des deux est associé à un choc

électrique. L'équipe de Sahay *et al.* (2011) et de Tronel *et al.* (2012) ont mis en évidence l'implication de la neurogenèse adulte dans la réalisation de la tâche en montrant que les nouveaux neurones sont nécessaires à la réalisation de cette tâche. Dans notre étude, nos trois modèles mutants de souris parviennent à discriminer les deux contextes, après seulement quelques jours d'exposition, de manière comparable aux souris WT (Annexe 1 ; Figure 41). Ainsi, quelle que soit la lignée ; nos souris mutantes ne présentent donc pas de déficit de séparation de patterns dans cette tâche. Cependant, avant de valider ce résultat, il nous reste plusieurs hypothèses à contrôler. Tout d'abord, il est tout à fait probable que les deux contextes que nous avons choisis ne soient pas assez similaires ce qui aurait rendu la tâche de discrimination relativement facile à maîtriser. D'autre part, une récente étude analysant différentes versions de ce protocole a mis en évidence que l'ordre de présentations des contextes lors du 2^e jour de test est d'une importance primordiale pour la suite de la discrimination. En effet, dans le cas où le contexte non associé au choc est présenté en premier, la discrimination contextuelle est altérée en cas d'inhibition de la neurogenèse adulte (Yu *et al.* 2017). Dans notre étude, l'ordre n'était peut-être pas optimal pour l'étude de la séparation de patterns dans cette tâche. Cependant, les résultats obtenus suite à l'étude de la neurogenèse montrent que nos trois modèles ne présentent que de faibles altérations de la neurogenèse (absence stricte de prolifération et de survie des nouveaux neurones). Si les nouveaux neurones jouent un rôle important dans la réalisation de cette tâche, les déficits de neurogenèse observés, ne sont peut-être pas assez forts pour avoir une conséquence dans ce type de tâche basée sur un renforcement négatif relativement prégnant.

En comparant nos résultats avec les données de la littérature, nous pouvons remarquer qu'il a encore peu d'études qui analysent la fonction de séparation de patterns chez des modèles murins de DI et, à ma connaissance, aucune étude chez des patients DI. Toutefois, quelques études concernant, par exemple, les souris *Fmr1-KO*, montrent des déficits en séparation proche et en séparation éloignée lorsqu'elles sont évaluées dans le protocole en labyrinthe radial (Guo *et al.* 2011), ainsi que dans une tâche de discrimination de peur au contexte (Eadie *et al.* 2012). De même, le modèle souris *CBP^{+/-}* du syndrome de Rubinstein-Taybi montre un déficit en séparation de patterns dans un dispositif combinant une piscine de Morris à un labyrinthe radial, que la configuration du labyrinthe soit proche (configuration difficile) ou éloignée (configuration facile ; Lopez-Atalaya *et al.* 2011), ce déficit dans les 2 configurations étant comparable aux performances de nos souris *Rsk2-KO*.

Afin de préciser la nature des déficits observés en séparation de patterns en labyrinthe radial pour le modèle *Pak3-R67C*, nous avons également mis en place une tâche spatiale de non appariement retardé avec essais successifs (Al Abed *et al.* 2016) montrant une sensibilité importante des souris *Pak3-R67C* aux interférences. Guidés par les premières indications d'Al Abed *et al.* (2016) quant à l'implication du GD dans cette tâche, nous avons montré à l'aide de souris irradiées localement au niveau du GD dorsal, que les nouveaux neurones sont nécessaires pour la réalisation de cette tâche, puisque les souris irradiées présentent d'importants déficits. Cependant, ces déficits

sont plus sévères que ceux observés chez les souris mutantes *Pak3-R67C*, ce qui semble en accord avec l'étude de la neurogenèse. En effet, chez les souris irradiées, une absence quasiment totale de nouveaux neurones est observée comparée aux souris *Pak3-R67C* qui présentent de plus légères altérations de la neurogenèse adulte. La sévérité des déficits cognitifs seraient donc corrélés au taux de neurogenèse observés.

A ma connaissance, aucune autre étude chez des modèles murins de DI n'a testé la sensibilité aux interférences alors que chez certains patients DI la gestion des interférences semble altérée (Bexkens *et al.* 2014a, 2014b). Celle-ci a été abordée dans plusieurs études utilisant les tests de Stroop et de Fankers, dans lesquels le sujet doit répondre à un stimulus visuel sans tenir compte d'un stimulus interférent. Cependant, ces tests sont bien évidemment dépendants des processus attentionnels qui peuvent être altérés chez les patients DI (Iarocci & Burack, 1998), ce qui peut avoir pour conséquence d'amplifier la mauvaise gestion des interférences. Pour compléter notre étude il serait d'ailleurs intéressant de tester spécifiquement l'attention chez nos trois modèles de souris, ce qui n'a pas encore été réalisé.

En conclusion, chez les trois modèles de souris, les précédentes données comportementales obtenues au laboratoire, ainsi que celles obtenues au cours de mon doctorat confirment que les fonctions de l'hippocampe voire du GD sont altérées et que les animaux présentent des déficits au niveau de la mémoire spatiale et de la fonction de séparation de patterns. Toutefois, selon les modèles, les déficits ne sont pas d'intensité identique ni même observés dans les mêmes tâches comportementales. Il est probable que l'hétérogénéité des performances d'apprentissage et de mémoire entre les différents modèles de souris, soit due à une atteinte différente des mécanismes cellulaires et moléculaires sous-jacents. Cependant, compte tenu des atteintes cognitives parfois sévèrement altérées chez l'Homme, nous nous attendions à observer des déficits cognitifs plus importants chez nos trois modèles, comme par exemple, le modèle *Pak3-R67C*, qui, jusqu'à la récente mise en évidence d'une nouvelle mutation du gène *pak3* (Magini *et al.* 2014), présentait la mutation provoquant le phénotype de DI le plus sévère chez l'Homme. Cependant, il faut garder à l'esprit que la DI chez l'Homme, implique des limitations significatives à la fois dans le fonctionnement intellectuel (QI<70) et dans le comportement adaptatif, mais pas dans la perte complète des capacités cognitives. Ainsi, les patients DI sont capables de réaliser des tâches simples, mais présentent des difficultés à réaliser une tâche lorsque celle-ci se complique. Deuxièmement, chez l'Homme, les données sont la plupart du temps recueillies au cours du développement de l'enfant. Il est possible qu'en étudiant les performances des animaux à l'âge adulte nous soyons passé à côté de déficits de plus grande ampleur qui seraient compensés, en partie, à l'âge adulte. Ainsi, il serait intéressant, de tester les performances cognitives de nos animaux plus tôt au cours du développement.

II. Etude de certains mécanismes sous-jacents à la DI

2.1. Neurogenèse hippocampique adulte

Au cours de notre étude, nous avons commencé par analyser la neurogenèse hippocampique adulte en conditions basales chez les trois modèles. Classiquement, chez les modèles murins de DI, des altérations sont observées dans plusieurs étapes de la neurogenèse adulte. Ces altérations, également hétérogènes en fonction des modèles, sont résumées dans le tableau 3B. Par exemple, une diminution de la prolifération a été détectée chez les modèles de l'X Fragile (Patzlaff *et al.* 2017) et du syndrome de Rett (Tian *et al.* 2012) mais aucune altération n'a été mise en évidence dans l'un des modèles du syndrome d'Angelman (Mardirossian *et al.* 2009). De manière identique, une diminution de la survie cellulaire a été mise en évidence chez les souris modèles des syndromes de l'X Fragile (Luo *et al.* 2010), de Rett (Young *et al.* 2004), et de la DI syndromique liée au gène Ophn1 (Allegra *et al.* 2017), mais aucune altération n'a été mise en évidence pour les syndromes d'Angelman (Mardirossian *et al.* 2009) et de Rubinstein-Taybi (Lopez-Atalaya *et al.* 2011). Pour la différenciation des jeunes cellules, les souris modèles de l'X Fragile et du syndrome de Rett (modèle *Foxg1*-KO) montrent, toutes deux, une augmentation de la différenciation gliale (pour revue, Pons-Espinal *et al.* 2013). Plusieurs études montrent également une diminution de la différenciation neuronale chez différents modèles de DI (Tableau 3B).

Concernant nos trois modèles d'études, nous n'avons pas mis en évidence de potentiel rôle de ces trois protéines dans la prolifération cellulaire comme le laissait suggérer les études *in vitro* sur le cycle cellulaire. Par exemple, pour le modèle *Rsk2*-KO, la littérature a montré que la protéine RSK2 activée peut phosphoryler plusieurs substrats cytosoliques et nucléaires (ATF4, CREB, CBP, BAD, p53, Histone H3) suggérant un rôle potentiel de RSK2 dans divers processus cellulaires tels que la progression du cycle cellulaire et la mitose (Romeo *et al.* 2012 ; Park *et al.* 2016). Bien que nous n'ayons pas mis en évidence d'altérations de la prolifération à l'état basal dans notre étude *in vivo*, nous avons cependant mis en évidence un retard dans les premières étapes du développement des nouveaux neurones qui pourrait s'expliquer par des altérations dans la progression du cycle. Ce type de retard a déjà été observé chez un autre modèle de DI, le modèle *MeCP2*-KO, qui présente également un ralentissement de la maturation des nouveaux neurones du GD, non associé à des défauts de prolifération cellulaire et de survie neuronale (Smrt *et al.* 2007). Enfin, suite à l'apprentissage en piscine de Morris, nous avons mis en évidence une diminution de la prolifération des nouveaux neurones suggérant un rôle de RSK2 dans la régulation des premières étapes de la neurogenèse adulte. Pour le modèle *Dp71*-KI, compte tenu du potentiel rôle de la Dp71 dans la cytokinèse et du retard de transition des phases G0 / G1 à S en l'absence de la Dp71 (Villarreal-Silva *et al.* 2010 ; Herrera-Salazar *et al.* 2016), nous avons étudié plus précisément les étapes de la prolifération chez ce modèle. Toutefois, nos résultats obtenus *in vivo* avec les marqueurs ki67 et

Modèles animaux	Syndrome de Coffin-Lowry <i>Rsk2</i> -KO	DI <i>Pak3</i> -R67C	Myopathie de Duchenne <i>Dp71</i> -KI	Angelman <i>Ube3a</i> m-/p+	Syndrome de Fragile X <i>Fmr1</i> -KO	Syndrome de Rett <i>Mecp2</i> -KO		Syndrome de Rubinstein-Taybi <i>cbbp</i> ⁺	Syndrome de l'X-hypoplasie cérébelleuse <i>Ophn1</i> -KO	Syndrome de Williams <i>Limk1</i> -KO
	Sévére (parfois léger)	Sévére	Léger à sévère	Sévére	Léger à sévère	Sévére				Léger à modéré
Sévérité de la DI										
Prolifération	∅	∅	∅	Mardirossian et al. 2009 ↘ (in vivo) Godavarthi et al. 2015	↗ (in vitro) Luo et al. 2010 ; Guo et al. 2011 ↘ Patzlaff et al. 2017	∅ (in vitro / in vivo) Smt et al. 2007	↘ (in vivo) Shen et al. 2006 ; Tian et al. 2012	NE	∅ (in vivo) Allegre et al. 2017	NE
Maturation cellules en prolifération	retard	Retard de maturation fonctionnelle	en cours	NE	∅ maturation fonctionnelle Aducci et al. 2010	Ralentissement maturation Smt et al. 2007	NE	NE	NE	NE
Différenciation neuronale	∅	∅	∅	↘ BrdU ⁺ /NeuN ⁺ Mardirossian et al. 2009	↘ (in vitro / in vivo) Luo et al. 2010 ↘ Guo et al. 2011 (in vitro) ; Lazarov et al. 2012 (in vivo)	∅ (in vitro / in vivo) Smt et al. 2007	↘ (in vivo) Shen et al. 2006	∅	↘ DCX ⁺ /NeuN ⁺ Allegre et al. 2017	NE
Différenciation gliale	∅	∅	∅	NE	↗ (in vitro / in vivo) Luo et al. 2010	∅ (in vitro / in vivo) Smt et al. 2007	↗ (in vivo) Tian et al. 2012	NE	NE	NE
Survie	∅	Mort accélérée transitoire	Mort accélérée transitoire	Mardirossian et al. 2009	↘ (in vivo) Lazarov et al. 2012 ↘ (in vivo) Luo et al. 2010	∅ (in vivo) Smt et al. 2007 ↘ Young et al. 2004	↘ (in vivo) Shen et al. 2006 ; Tian et al. 2012	∅	↘ Allegre et al. 2017	NE
Activation neurones immatures	Déficit	Absence d'activation	?	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE
Activation neurones matures	∅	∅	?	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE

Tableau 3B : Altération de la neurogenèse adulte observés chez différents modèles de souris de DI.

Les colonnes oranges correspondent aux trois modèles murins analysés durant ce doctorat. Les colonnes bleues correspondent à d'autres souris modèles de DI étudiés dans la littérature. NE = non étudié à notre connaissance.

P-H3 n'ont montré aucune altération dans le déroulement du cycle cellulaire. Cependant, à l'image de ce que nous avons observé chez le modèle *Rsk2*-KO, il sera également nécessaire d'étudier plus précisément le phénotype des neurones immatures afin d'analyser plus finement la dynamique de maturation des nouvelles cellules. Enfin, chez le modèle *Pak3*-R67C, nous n'avons observé aucun déficit dans la phase de prolifération comme le laissait suggérer l'étude de Souopgui *et al.* (2002) *in vitro*. Cependant, contrairement à cette étude, notre modèle ne présente ni augmentation, ni absence totale de la protéine PAK3, les comparaisons restent donc à nuancer. De plus, Souopgui *et al.* (2002) ont mis en évidence un rôle de PAK3 dans le contrôle de la sortie du cycle cellulaire au cours du développement embryonnaire du Xénope. Ainsi, nous ne pouvons pas écarter l'hypothèse d'un rôle de PAK3 dans ces processus au cours du développement mais pas chez l'adulte. En effet, il est nécessaire de rappeler que les mécanismes régulant la neurogenèse à l'état embryonnaire diffèrent pour certains de ceux qui régulent la neurogenèse adulte hippocampique (pour revue, voir Kintner 2002).

Concernant la survie cellulaire, nous avons mis en évidence, chez les modèles *Pak3*-R67C et *Dp71*-KI, que les jeunes nouveaux neurones subissent une mort accélérée entre 18 et 28 jours. A notre connaissance, peu d'études sur des modèles de DI ont réalisé une dynamique de la neurogenèse adulte comme nous l'avons fait pour nos modèles. Par exemple, certains modèles de DI présentent des déficits de survie 28 jours après injections de BrdU (syndromes de Rett, souris *Foxg1*^{+/-} ; Shen *et al.* 2006 ; X Fragile ; Luo *et al.* 2010), mais aucun autre âge n'a été testé et nous ne pouvons pas écarter l'idée que ces altérations de la survie puissent être transitoires. Chez nos deux modèles, la survie cellulaire se trouve donc altérée durant la période critique, au moment où les nouveaux neurones de l'hippocampe sont le plus sensibles aux stimuli de l'environnement et présentent des propriétés particulières qui les rendent plus susceptibles de participer aux processus mnésiques dépendants de l'hippocampe (cf. Introduction II.2.2.c). Ainsi, la mort accélérée des nouveaux neurones mis en évidence chez les modèles *Pak3*-R67C et *Dp71*-KI pourrait contribuer aux déficits cognitifs observés. En outre, il a récemment été montré au laboratoire, que les souris *Zif268*-KO présentent de la même façon que les souris *Pak3*-R67C et *Dp71*-KI, une mort accélérée des nouveaux neurones pendant leur période critique, montrant que l'expression de *Zif268* durant la période critique de maturation des nouveaux neurones permet de promouvoir leur survie et leur recrutement (Veyrac *et al.* 2013). Un lien direct entre PAK3 ou la *Dp71* n'a jamais été fait avec *Zif268*. Cependant, en l'absence de PAK3, une forte réduction de la forme active phosphorylée de CREB a été mise en évidence (Meng *et al.* 2005), ce qui pourrait, en conséquence, affecter l'expression de *Zif268*. D'ailleurs, de manière intéressante, il a été montré que des mutations du gène *zif268* étaient responsables d'une DI non syndromique (Hamdan *et al.* 2014). Ceci a conforté notre intérêt à poursuivre nos investigations concernant l'expression de *Zif268*.

Comme nous l'avons vu en Introduction, les connaissances actuelles montrent que plusieurs facteurs cellulaires extrinsèques et intrinsèques sont capables de réguler la neurogenèse adulte durant la période critique de maturation des nouveaux neurones (\approx 2-6 semaines après leur naissance) et d'influencer le destin des nouvelles cellules, en favorisant soit leur mort (pour la majorité), soit leur survie et ainsi leur intégration dans des réseaux cortico-hippocampiques préexistants (pour revues, Aimone *et al.* 2014, Aasabø *et al.* 2011). Une fois intégrés, ces jeunes nouveaux neurones, encore immatures, jouent un rôle important dans les formes de mémoire dépendantes de l'hippocampe (pour revues, Aimone *et al.* 2014, Gonçalves *et al.* 2016, Anacker & Hen, 2017). Ainsi, nous avons émis l'hypothèse que les différents phénomènes qui ont lieu pendant la période critique chez nos différents modèles (retard de maturation/mort accélérée) pourraient avoir un impact sur leur activation et leur recrutement éventuels au moment de l'apprentissage. Nous avons choisi d'analyser l'expression du gène immédiat précoce *zif268* après le rappel dans la tâche de mémoire spatiale en piscine de Morris, au sein de nouveaux neurones à différents stades de maturité : jeunes neurones immatures, jeunes neurones tout juste matures et neurones matures intégrés dans le GD. En raison de l'avancement de l'étude chez le modèle *Dp71-KI*, et des premiers résultats obtenus, nous n'avons pas encore réalisé cette analyse chez ce modèle. Pour les modèles *Rsk2-KO* et *Pak3-R67C*, les souris mutantes présentent une très faible activation (souris *Rsk2-KO*) voire une absence d'activation des jeunes nouveaux neurones (modèle *Pak3-R67C*) après le test de mémoire. Dans les deux cas, nos recherches ont montré que ces nouveaux neurones ne seraient donc pas (ou de manière réduite) capables d'être activés au moment du rappel de la tâche. Pour ce qui est du modèle *Rsk2-KO*, le retard de maturation des jeunes neurones pourrait contribuer au déficit d'expression de *Zif268* observé. Compte tenu du rôle connu que jouent les nouveaux neurones (même immatures) dans les tâches dépendantes de l'hippocampe, cette absence de recrutement/activation pourrait participer aux déficits cognitifs observés.

Chez le modèle *Pak3-R67C*, nous avons étudié plus précisément l'expression des co-récepteurs NKCC1/KCC2b au sein des nouveaux neurones pour analyser la maturation des fonctions GABAergiques. Pour rappel, au cours du développement des nouveaux neurones, les co-transporteurs au Cl^- NKCC1 sont progressivement moins exprimés contrairement aux co-transporteurs KCC2b dont l'expression augmente (voir notion de « switch GABA » Introduction II.2.2.b). Nos résultats ont montré que les nouveaux neurones âgés de 18 jours présentent un déficit de maturation des fonctions GABAergiques. Ainsi, ces nouveaux neurones ne sont probablement pas assez matures fonctionnellement pour être recrutés au moment de l'apprentissage. Cette absence d'activation des neurones immatures pourrait ainsi contribuer à leur mort précoce observée durant la période critique de maturation. A ma connaissance, peu d'études ont étudié précisément la maturation fonctionnelle en évaluant le taux d'expression des récepteurs NKCC1 et KCC2b chez les modèles de DI et peu d'entre elles montrent des altérations. Aucune altération de l'expression de NKCC1/KCC2b n'a été mise en évidence dans le cerveau antérieur de souris au cours du

développement post natal de la souris *Fmr1*-KO (Adusei *et al.* 2010). Concernant l'un des modèles de trisomie 21 adulte (souris Ts65Dn), l'expression du récepteur NKCC1 et de son ARNm sont augmentées dans l'hippocampe total, contrairement au récepteur KCC2b dont l'expression n'est pas altérée (Deidda *et al.* 2015). De manière intéressante, ces mêmes résultats ont également été observés chez des patients trisomiques (Deidda *et al.* 2015) et des patients du syndrome de Rett (Duarte *et al.* 2013).

Le retard de maturation fonctionnelle des nouveaux neurones observé chez le modèle *Pak3*-R67C a lieu pendant la période où les nouveaux neurones reçoivent les premières afférences glutamatergiques (Hagihara *et al.* 2011, Toni & Sultan 2011), que la transmission GABAergique dépolarisante devient progressivement hyperpolarisante (Ge *et al.* 2006) et que l'arborisation dendritique et le nombre d'épines dendritiques se développent le plus (Zhao *et al.* 2006 ; Toni *et al.* 2007 ; Toni & Sultan, 2011). En conséquence, il serait intéressant de vérifier à la fois les propriétés électrophysiologiques, ainsi que la maturation morphologique de ces nouveaux neurones d'autant plus que PAK3 joue un rôle dans l'organisation du cytosquelette. Il est tout à fait envisageable, qu'en plus de l'altération de la maturation fonctionnelle observée, les nouveaux neurones présentent une altération de la morphologie des épines associée à des altérations de leurs propriétés électrophysiologiques, compatibles et complémentaires avec le déficit de recrutement observé lors de l'apprentissage. D'autre part, il serait également probable que les altérations que nous avons observées à l'âge adulte soient déjà présentes durant la neurogenèse embryonnaire, comme ce qui a déjà été observé chez certains modèles tels que *FoxG1*-KO, *Mecp2*-KO et *Fmr1*-KO (pour revue, Pons-Espinal *et al.* 2013). Compte tenu de l'expression de nos trois protéines durant le développement (RSK2 : Zeniou *et al.* 2002 ; PAK3 : Kreis *et al.* 2007 ; Dp71 : Rapaport *et al.* 1992 ; Sarig *et al.* 1999), une analyse précise des différentes étapes de la neurogenèse embryonnaire apporterait des informations cruciales sur la mise en place des mécanismes sous-jacents mis en cause dans les DI. Enfin, compte tenu de la mort accélérée des jeunes neurones chez le modèle *Dp71*-KI, il serait également judicieux de réaliser cette étude de la maturation fonctionnelle. L'existence d'une potentielle dérégulation de l'expression des co-transporteurs au Cl⁻ NKCC1/KCC2b pourrait, de la même façon que chez le modèle *Pak3*-R67C, contribuer à la mort neuronale précoce.

En résumé, bien que nos trois protéines participent à différentes voies de signalisation susceptibles de moduler des étapes de la neurogenèse adulte, les altérations que nous avons observées chez nos trois modèles sont diverses et étonnamment, peu d'altérations communes émergent entre les modèles excepté la mort précoce observée à 28 jours chez deux des modèles. En effet, malgré nos hypothèses et compte tenu de la littérature existante, nous n'avons pas observé, chez nos trois modèles, d'importantes altérations de la neurogenèse (prolifération, survie ou différenciation neuronale) comme on le voit plus classiquement dans les études sur les modèles de DI (pour revue, Pons Espinal *et al.* 2013 ; Tableau 3B).

2.2. Mécanismes moléculaires potentiels

Au cours des dernières années, il a été montré que de nombreuses molécules influencent la survie, la maturation et l'intégration fonctionnelle des nouveaux neurones au sein des réseaux neuronaux (Mu *et al.* 2010 ; Sun *et al.* 2011), parmi lesquelles on retrouve les récepteurs NMDA, le cotransporteur KCC2b, les facteurs neurotrophiques tels que BDNF, TrkB, FGF2 et NT3, les facteurs de transcription CREB, Cdk5, DISC1 et Klf9, ou encore les facteurs de régulations épigénétiques Gadd45, miR-132 et miR-124. Il est donc possible que via l'intermédiaire de ces molécules, les protéines impliquées dans la DI puissent influencer la neurogenèse adulte. A titre d'exemple, la protéine MeCP2, un activateur de transcription, permet la régulation de la prolifération et la différenciation des cellules progénitrices en modulant l'expression du miR-137 (Szulwach *et al.* 2010). MeCP2 régule également négativement l'expression du facteur de croissance BDNF, essentiel à la prolifération, la maturation neuronale et morphologique des nouveaux neurones et joue un rôle important dans la maturation neuronale et la formation des épines dendritiques des nouveaux neurones (Schmidt & Duman, 2007; Smrt *et al.* 2010). Pour ce qui est de nos modèles, il a auparavant été mis en évidence que certaines de nos protéines ont une action sur quelques-unes de ces protéines (CREB, BDNF, KCC2b) citées ci-dessus. Des études ultérieures concernant ces mécanismes moléculaires permettraient de mieux comprendre le potentiel rôle des interactions entre ces différentes protéines dans les étapes de la neurogenèse adulte.

Sur un autre plan, la protéine ERK1/2 active plusieurs régulateurs transcriptionnels et kinases comme RSK2, qui permettent, une fois transloqués dans le noyau, d'activer la transcription de gènes tels que *zif268* (Figure 38). Il a également été suggéré que ce dernier peut être directement régulé par ERK1/2 (Schneider *et al.* 2011). En l'absence de RSK2, une augmentation de la phosphorylation de ERK1/2 a été mise en évidence (Schneider *et al.* 2011). De même, une surexpression de ERK1/2 phosphorylée chez différents modèles mutants de *Pak3* a été mise en évidence (Magini *et al.* 2014), ainsi que chez le modèle *Fmr1-KO* (Sawicka *et al.* 2016). L'ensemble de ces indications laisse donc suggérer que la surexpression de ERK1/2 pourrait être une caractéristique commune dans certains modèles de DI. Pour appuyer cette supposition, il a été montré que la voie de signalisation ERK / MAPK a été plusieurs fois impliquée dans le développement du cerveau, la neurogenèse et les fonctions cognitives chez l'adulte. Plus précisément, la protéine ERK fait partie de la famille des ser/thr kinases qui régulent une variété de fonctions cellulaires telles que la prolifération, la différenciation et l'apoptose (pour revue, Samuels *et al.* 2009). Tout dérèglement de cette voie pourrait ainsi entraîner des conséquences importantes sur ces fonctions. ERK est également impliquée dans la régulation de l'activité synaptique et notamment dans la PLT et le DLT (Thomas & Huganir, 2004) ainsi que durant le développement neuronal (Newbern *et al.* 2008 ; Engel *et al.* 2009, Satoh *et al.* 2011), suggérant que ERK pourrait être un facteur important dans le neurodéveloppement humain et / ou les désordres psychiatriques. D'ailleurs, les mutations de gènes codant des protéines intervenant en amont de cette cascade de signalisation comme les protéines

Ras, ou agissant sur les protéines Ras (SYNGAP1 et HRAS qui sont des protéines Ras, NF1 (inhibiteur des protéines Ras)), ont été mises en évidence dans certaines DI (Figure 38). L'ensemble de ces pathologies porte le nom de Rasopathies. Parmi les modèles animaux de ces pathologies, on retrouve par exemple, le modèle *Syngap1*^{+/-} dont des mutations de perte de fonction SYNGAP1 ont été rapportées chez des patients présentant une DI et une épilepsie (Komiyama *et al.* 2002), les souris *Nf1*^{-/-} modèle de la neurofibromatose de type 1, une pathologie qui entraîne des déficits cognitifs chez les patients (pour revue, Samuels *et al.* 2009) et chez les souris *HRAS*^{G12V/G12V} modèles du syndrome de Costello (Schreiber *et al.* 2017) dont l'un des symptômes cliniques chez l'Homme est également une DI (pour revue, San Martín & Pagani, 2014). L'ensemble des modèles murins présentés ci-dessus présente également une surexpression de la protéine ERK1/2 phosphorylée. Il convient de noter que cette observation provient majoritairement d'études sur des cultures cellulaires et au cours du développement. Par conséquent, dans de telles conditions expérimentales, on peut s'attendre à ce qu'une activité plus élevée de la signalisation RAS / ERK soit impliquée dans la croissance, la prolifération, la migration et la survie des cellules, puisqu'un des rôles de la voie des MAPK est d'intervenir dans la prolifération cellulaire (pour revue, Krens *et al.* 2006), et pourrait ainsi avoir une conséquence sur la neurogénèse embryonnaire. Toutefois, comme cette surexpression de la protéine ERK est également retrouvée chez certains patients DI, comme par exemple les patients X Fragile (Wang *et al.* 2012), la dérégulation de cette voie de signalisation semble donc être préjudiciable.

2.3. Morphologie des dendrites

Dans les modèles d'études de la DI, ainsi que chez les patients, il est très fréquent d'observer une atteinte de l'arborisation dendritique, ainsi que de la densité des épines des neurones hippocampiques (cf. Introduction I.1.5c). Par exemple, chez les modèles murins des syndromes d'Angelman, de Rett et de l'X-hypoplasie cérébelleuse, une diminution de la densité des épines dendritiques a été mise en évidence (Tableau 3C). Ces différents modèles présentent également des altérations de la morphologie des dendrites avec par exemple des épines plus longues, ou plus courtes, ou plus ou moins ramifiées... (Tableau 3C). Nous avons ainsi réalisé, chez les trois modèles, une première approche afin d'étudier la maturation dendritique des neurones. Pour cela, nous avons utilisé le marquage DCX des neurones immatures. Bien qu'un des principaux rôles de PAK3 mis en évidence réside dans la régulation du cytosquelette (et par conséquent dans la formation des dendrites et la morphologie des épines), nous n'avons toutefois pas mis en évidence d'altération de la maturation dendritique chez notre modèle (Figure 40 D-E). Cependant, chez ce dernier, la protéine PAK3 est toujours fonctionnelle, seule une diminution de son activation par Cdc42 est observée (Kreis *et al.* 2007). D'autre part, nous n'avons pas réalisé cette étude pour les neurones matures mais uniquement pour des neurones immatures. Les modèles *Rsk2*-KO et *Dp71*-KI présentent quant à eux

Modèles animaux	Syndrome de Coffin-Lowry	Myopathie de Duchenne	Angelman	Syndrome du Fragile X	Syndrome de Rett		Syndrome de Rubinstein-Taybi	Syndrome de l'X hypoplasie cérébelleuse	Syndrome de Williams
	<i>Rsk2-KO</i>	<i>Dp71-KI</i>	<i>Ube3a m-/p+</i>	<i>Fmr1-KO</i>	<i>MeCP2-KO</i>	<i>FoxG1</i>	<i>cbp^{+/+}</i>	<i>Ophi1-KO</i>	<i>Link1-KO</i>
Sévérité de la DI	Sévère (parfois léger)	Léger à sévère	Sévère	Léger à sévère	Sévère		NE	Modéré à sévère	Léger à modéré
Morphologie des épines	↗ taille du cou des épines Morice <i>et al.</i> 2013	?	Epines plus courtes Dindot <i>et al.</i> 2008	Epines longues et fines Wisniewski <i>et al.</i> 1991 ; Grossman <i>et al.</i> 2006	↘ complexité arborisation dendritique (<i>in vivo</i>) Kishi & Macklis, 2004	NE	↘ Nbre de ramifications (Homme) Kaufmann <i>et al.</i> 1998	↗ Nbre de ramifications Allegra <i>et al.</i> 2017	cou plus épais et tête plus petite Meng <i>et al.</i> 2002
Densité des épines de l'hippocampe	∅	↗ (in vitro) Kreis <i>et al.</i> 2007	↘ Dindot <i>et al.</i> 2008	↗ Hinton <i>et al.</i> 1991 ; Wisniewski <i>et al.</i> 1991 ; Grossman <i>et al.</i> 2006	↘ Belichenko <i>et al.</i> 2009 (CA1) ; Kishi & Macklis, 2004 ; Smrt	NE	NE	↘ (CA1) Khelifaoui <i>et al.</i> 2007	↗ (in vitro) Chailangkarn & Muotri 2017
PLT	∅	?	↘ (Hpe) Jiang <i>et al.</i> 1998	↘ (Hpe) Tian <i>et al.</i> 2017	↘ (CA1) Moretti <i>et al.</i> 2006	NE	↘ (Hpe) Alarcon <i>et al.</i> 2004	∅ (CA1) Khelifaoui <i>et al.</i> 2007	↗ (low frequencies) ↘ (high frequencies) Meng <i>et al.</i> 2002
Expression de ERK	↗ Schneider <i>et al.</i> 2011	?	NE Jiang <i>et al.</i> 1998	↗ Wang <i>et al.</i> 2012 ; Sawicka <i>et al.</i> 2016	NE Moretti <i>et al.</i> 2006	NE	NE Alarcon <i>et al.</i> 2004	NE Khelifaoui <i>et al.</i> 2007	NE Meng <i>et al.</i> 2002

Tableau 3C : Altérations des épines et des dendrites, de la PLT, ainsi que de l'expression de ERK observés chez différents modèles de souris de DI.

Les colonnes oranges correspondent aux trois modèles murins analysés durant ce doctorat. Les colonnes bleues correspondent à d'autres souris modèles de DI étudiés dans la littérature. NE = non étudié à notre connaissance.

des anomalies des dendrites. Chez le modèle *Dp71-KI*, nous avons mis en évidence que les ramifications de neurones immatures DCX⁺ sont plus courtes et présentent moins de ramifications (Figure 40 F-G). Ces données corroborent avec celles obtenues dans l'étude d'Acosta *et al.* (2004) qui ont montré, sur des cellules PC12, une perturbation de la croissance neuritique en absence de la Dp71. Au contraire, chez le modèle *Rsk2-KO*, nous avons observé que les dendrites des neurones immatures DCX⁺ sont plus longues que ceux des souris WT et présentent plus de ramifications (Figure 40 A-B-C). Compte tenu de la littérature sur les modèles de DI, ces résultats sont assez surprenants mais restent en accord avec d'autres études montrant qu'en absence de RSK2, les neurites des neurones corticaux et les axones des motoneurones sont plus développés (Fischer *et al.* 2009). Ensemble, ces résultats constituent donc de premières pistes quant à l'implication des protéines Dp71 et RSK2 dans la croissance et le développement des dendrites. Par la suite, ces résultats seront à compléter avec des injections de rétrovirus-GFP dans les nouveaux neurones afin de déterminer avec plus de précision chez ces deux modèles murins, quelles sont les altérations de la morphologie des dendrites et des épines observées chez des nouveaux neurones. Ces résultats pourront par la suite être comparés avec l'analyse des neurones matures (dans le GD, voire dans d'autres aires de l'hippocampe) afin d'analyser s'il s'agit d'une altération durable.

Pour terminer, grâce à l'ensemble des données dont nous disposons, nous pouvons envisager que les altérations de la neurogenèse observées chez les trois modèles de DI contribuent en partie aux déficits cognitifs observés, mais il existe probablement d'autres mécanismes altérés également en cause. Pour les souris *Pak3-R67C* par exemple, des données *in vitro*, montrent une diminution de la densité des épines dendritiques observée dans ce modèle (Kreis *et al.* 2007), qui pourrait également contribuer aux déficits cognitifs. Pour les modèles *Rsk2-KO* et *Dp71-KI*, plusieurs études au sein de l'hippocampe montrent des anomalies de la morphologie des synapses et des altérations de la plasticité synaptique (Daoud *et al.* 2009b ; Morice *et al.* 2013), qui pourraient être liées aux déficits cognitifs. Enfin, nos trois modèles murins étant des modèles d'un trouble neurodéveloppemental, il ne faut pas écarter l'idée que les déficits cognitifs observés soient aussi dus à des altérations apparaissant durant le développement, comme par exemple, dans la neurogenèse embryonnaire. Ceci n'a encore jamais été étudié chez nos modèles, cependant, des études récentes au laboratoire ont montré que les souris *Pak3-R67C*, présentent une microcéphalie (C. Vaillend, données non publiées), ce qui pourrait être le signe d'un mauvais développement cérébral.

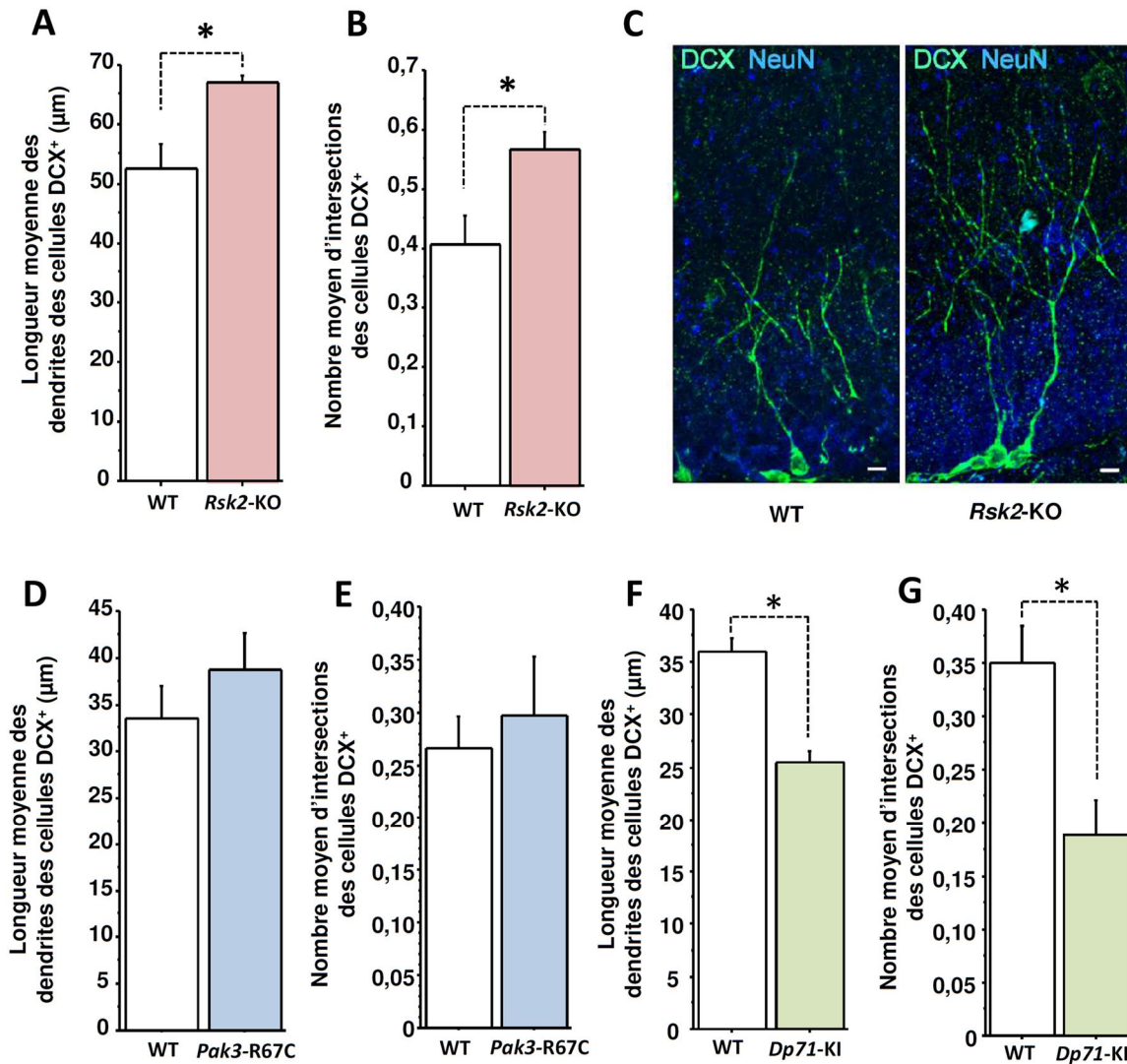


Figure 40 : Maturation morphologique des nouveaux neurones chez les souris *Rsk2*-KO, *Pak3*-R67C et *Dp71*-KI.

(A) Longueur moyenne des dendrites des neurones DCX⁺ chez les souris WT (n=5) et *Rsk2*-KO (n=4). (B) Nombre moyen d'intersections des neurones DCX⁺ chez les souris WT (n=5) et *Rsk2*-KO (n=4). (C) Images obtenues en microscopie confocale, de neurones DCX⁺ chez les souris WT et *Rsk2*-KO (Barre d'échelle = 10 µm). (D) Longueur moyenne des dendrites des neurones DCX⁺ chez les souris WT (n=4) et *Pak3*-R67C (n=5). (E) Nombre moyen d'intersections des neurones DCX⁺ chez les souris WT (n=4) et *Pak3*-R67C (n=5). (F) Longueur moyenne des dendrites des neurones DCX⁺ chez les souris WT (n=4) et *Dp71*-KI (n=4). (G) Nombre moyen d'intersections des neurones DCX⁺ chez les souris WT (n=4) et *Dp71*-KI (n=4). Les barres représentent les erreurs standards à la moyenne. *Effet génotype p<0.05

III. Validité et pertinence des modèles murins de DI utilisés

A travers cette étude, l'analyse de nos trois modèles murins nous a permis de nous renseigner davantage sur les fonctions des protéines impliquées. Cependant, le modèle *Rsk2*-KO ne mime pas exactement la pathologie associée qui n'est pas due à une absence de protéine. Dans le CLS, les mutations peuvent entraîner une perte de l'activité de la kinase RSK2 ou seulement une réduction de l'activité de la protéine (Pereira *et al.* 2010). Dans la myopathie de Duchenne, en fonction de la position de la mutation sur le gène, on retrouve une perte totale de plus ou moins toutes les formes de la dystrophine et non uniquement de la forme Dp71 (cas très rare). En conséquence, ces dernières remarques permettent de rebondir sur un point important de discussion concernant le choix du modèle d'étude. En effet, que ce soit pour le modèle *Rsk2*-KO ou *Dp71*-KI, l'utilisation d'une souris KO dont le gène d'intérêt n'est jamais exprimé chez la souris pose donc la question d'éventuels mécanismes de compensation qui pourraient se mettre en place chez ces souris *via* l'expression accrue d'autres gènes afin de pallier à l'absence de la protéine. Néanmoins, l'absence d'expression de RSK2 ou Dp71 chez ces souris induit des déficits de mémoire, de la transmission synaptique et de maturation des nouveaux neurones hippocampiques, indiquant que si des mécanismes de compensation se mettent en place, ils ne semblent pas suffisants pour compenser les effets de l'absence du gène dans les processus mnésiques et dans la neurogenèse adulte. Dans le cas du modèle *Rsk2*-KO, les deux autres membres de la famille des RSKs (RSK1 et RSK3), mais aussi les protéines MSKs partageant des caractéristiques structurales avec les RSK, pourraient compenser l'absence de RSK2 (pour revue, voir Cargnello & Roux, 2011). Cependant, il a été montré qu'en condition basale, l'expression de RSK1 et RSK3 chez les souris *Rsk2*-KO ne diffère pas par rapport aux souris WT dans le DG (Schneider *et al.* 2011 ; Morice *et al.* 2013). De la même manière, pour le modèle *Dp71*-KI, il est possible que l'absence de la Dp71 puisse être partiellement compensée par l'augmentation de l'utrophine, l'homologue autosomal de la dystrophine (Claudepierre *et al.* 2000 ; Fort *et al.* 2008), ainsi que par les autres isoformes de la dystrophine présents dans le cerveau. Cette étude est en cours dans notre équipe et les premiers résultats ne semblent pas valider cette hypothèse (O. Vacca & C. Vaillend, communication orale). Quant à la souris *Pak3*-R67C, le risque de compensation est fortement réduit du fait de la construction sous forme de Knock-in. En effet, la protéine ciblée est toujours présente, seule la fonctionnalité de cette dernière est altérée. Enfin, chez ces trois modèles, l'existence d'une éventuelle compensation par d'autres mécanismes prenant en charge tout ou une partie des fonctions déficientes, au cours du développement n'est également pas à ignorer. Par exemple, chez le modèle de souris *mdx*, correspondant à l'absence de la forme longue de la dystrophine (Dp427), une augmentation du nombre de synapses GABAergiques inhibitrices est observée (Del Tongo *et al.* 2009). Cette augmentation est probablement mise en place au cours du développement pour pallier à l'augmentation de l'excitabilité observée également chez ce modèle (Vaillend *et al.* 1998).

D'autre part, au cours de l'étude de la neurogenèse adulte, l'utilisation d'une souris KO ou KI pose également le problème de savoir si le produit du gène est nécessaire dans les nouveaux neurones eux-mêmes ou dans les cellules environnantes. En effet, dans le cas de l'étude de la neurogenèse, l'environnement des nouvelles cellules (comme par exemple les cellules endothéliales, les oligodendrocytes et les astrocytes) influence fortement leur prolifération, leur survie et leur devenir. Il est donc important de savoir si les protéines d'intérêt sont nécessaires au sein de l'environnement des nouvelles cellules ou directement au sein des nouveaux neurones. Pour vérifier ce point, plusieurs stratégies seraient envisageables. Premièrement, chez les souris KO, il serait possible de restaurer l'expression des gènes uniquement au sein des nouveaux neurones en injectant directement dans les nouveaux neurones un vecteur rétroviral composé de la séquence codante du gène, et qui permettrait l'incorporation du gène uniquement dans les cellules en division au moment des injections. Nous pourrions également utiliser une souris KO conditionnelle dont la construction génétique permettrait de restaurer la protéine uniquement au sein des cellules souches neuronales adulte. Par la suite, en étudiant la survie et le recrutement de ces nouveaux neurones lors d'un apprentissage spatial, nous pourrions déterminer si l'expression des gènes au sein des nouveaux neurones est suffisante pour restaurer les déficits observés à la fois sur la neurogenèse adulte mais également sur les fonctions cognitives. Autrement, chez des souris WT, nous pourrions inhiber spécifiquement l'expression du gène dans les nouveaux neurones grâce à une construction virale contenant un ARN interférent dirigé contre l'ARN de nos gènes d'intérêt ou bien en utilisant un inhibiteur pharmacologique dirigé contre la protéine d'intérêt quand cela est possible (par exemple le BI-D1870 pour la protéine RSK2) ou encore réaliser une souris KO conditionnelle dont la construction génétique permettrait, cette fois ci, d'inhiber l'expression de la protéine uniquement au sein des cellules souches neuronales adulte. Ces approches permettraient de déterminer si c'est l'expression des gènes dans l'environnement des nouveaux neurones, dans les nouveaux neurones eux-mêmes ou dans les deux, qui est responsable des déficits observés chez les souris KO et KI. Nous pourrions également utiliser ces mêmes modèles pour mettre en évidence quelle est l'importance de la présence de la protéine au cours du développement en inhibant l'expression de la protéine uniquement au cours du développement embryonnaire et post natal.

IV. Perspectives thérapeutiques

De récentes études sur des modèles animaux de pathologies neurodéveloppementales fournissent des preuves convaincantes que les déficits cognitifs associés aux troubles neurodéveloppementaux peuvent être inversés ou du moins atténués, même si le traitement est initié chez l'adulte (pour revue, Ehninger & Kempermann, 2008). Par exemple, de nouvelles informations apportées par différentes études suggèrent que cibler la voie de signalisation MAPK/ERK ouvre la possibilité de traiter la surexpression de ERK1/2 comme cela a déjà été observé

lors de traitements avec des statines (3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors), originellement utilisées pour soigner l'hypercholestérolémie (Borrie *et al.* 2017). En effet, la lovastatine réduit l'activation de Ras dans le cerveau de souris, ce qui semble constituer une voie prometteuse pour la correction de la signalisation aberrante de Ras. D'autre part, l'effet des statines, et plus particulièrement de la lovastatine, est de plus grande ampleur puisqu'il permet d'annuler les déficits de PLT hippocampique, de corriger les déficits comportementaux observés chez les souris *Nf1^{+/-}* (Li *et al.* 2005) et aurait un effet positif sur la neurogenèse et les performances cognitives chez des souris ayant subi une ischémie ou une lésion cérébrale (Chen *et al.* 2003 ; Lu *et al.* 2007). A ce jour, les statines sont donc nouvellement testées dans des pathologies psychiatriques telles que la DI. La lovastatine fait partie de plusieurs essais cliniques ciblant à la fois les enfants atteints de neurofibromatose de type 1 mais également les enfants atteints de l'X fragile (Borrie *et al.* 2017).

D'autre part, compte tenu de l'implication de la neurogenèse adulte dans de nombreux processus tels que l'apprentissage et la mémoire, celle-ci pourrait être ciblée par des interventions pharmacologiques comme par exemple, la fluoxétine, un antidépresseur connu pour augmenter la neurogenèse hippocampique adulte. Un traitement à la fluoxétine permet en parallèle, d'apporter un effet bénéfique sur les comportements anxieux dans un modèle murin de dépression (David *et al.* 2009), ainsi que sur les performances d'apprentissage et de mémoire (Vahid-Ansari & Albert, 2017). D'autre part, un effet positif de la fluoxétine a également été mis en évidence chez des modèles murins de DI. Par exemple, l'utilisation de la fluoxétine pendant le développement permet de restaurer, à l'âge adulte, les altérations de l'hippocampe, ainsi que les fonctions cognitives chez les souris *Ts65Dn* (Trisomie 21 ; Stagni *et al.* 2015). De même, chez l'un des modèles du syndrome d'Angelman *Ube3a m-/p+*, le traitement à la fluoxétine restaure partiellement les déficits de neurogenèse hippocampique adulte (Godavarthi *et al.* 2015).

Les altérations de la neurogenèse adulte à l'origine des déficits cognitifs pourraient également être ciblées par des interventions non pharmacologiques comme l'exercice physique ou l'enrichissement comportemental. Chez les rongeurs, l'enrichissement environnemental correspond à des conditions d'élevage permettant l'augmentation des stimulations sensorielles, motrices, cognitives, sociales, olfactives et auditives des animaux. Les effets bénéfiques de l'enrichissement environnemental ont été mentionnés pour la première fois par Donald Hebb en 1947, lorsqu'il constatât que les rats domestiques montraient de meilleures performances cognitives que ceux de laboratoire. Puis ces observations ont été largement documentées par les travaux d'expérimentation réalisés dans les années 1960-1970 par l'équipe de Rosenzweig (pour revue, Rosenzweig & Bennett, 1996). Depuis ces observations pionnières, les effets bénéfiques de l'enrichissement ont été largement démontrés, tant au niveau cérébral que cognitif. Au niveau de la neurogenèse adulte, l'enrichissement comportemental influence la survie des nouveaux neurones durant leur période critique de maturation (pour revue, Aimone *et al.* 2014) et contribue ainsi à l'amélioration des performances mnésiques. Outre l'effet sur la neurogenèse, l'enrichissement permet également de

stimuler d'autres structures cérébrales et, entre autres, de provoquer un épaississement du cortex cérébral, d'augmenter l'arborisation et la longueur des dendrites, le nombre d'épines dendritiques, la taille des synapses sur certains neurones ou encore de modifier l'expression de certains gènes, l'expression des protéines synaptiques ou encore de modifier la sécrétion de certains facteurs de croissance (van Praag *et al.* 1999 ; Rampon *et al.* 2000 ; pour revue, Nithianantharajah & Hannan, 2006 ; Sale *et al.* 2014).

Les effets de l'enrichissement environnemental ont également été mis en évidence chez des modèles de DI. En effet, il a été montré que l'enrichissement pouvait restaurer les déficits cognitifs chez les souris modèles du syndrome de l'X fragile et du syndrome de Rett. Par exemple, un enrichissement permanent de 60 jours restaure un déficit d'exploration dans l'open-field, ainsi qu'un déficit de reconnaissance d'objets chez un modèle de l'X fragile (Restivo *et al.* 2005). Concernant le syndrome de Rett, un enrichissement permanent de 50 jours entraîne une restauration des déficits d'apprentissage spatiaux en piscine de Morris chez la souris modèle *MeCp2-KO* (Lonetti *et al.* 2010). Chez le modèle *Rsk2-KO*, l'effet de l'enrichissement comportemental sur la neurogenèse adulte et les fonctions cognitives a déjà fait l'objet d'une thèse dans l'équipe (Thèse S. Lunion, 2014). Les résultats obtenus dans cette étude ont montré qu'un protocole d'enrichissement environnemental de 3 heures par jours durant 24 jours est capable de compenser ou d'améliorer les performances des souris *Rsk2-KO* dans les tâches de mémoire spatiale et de séparation de patterns, ainsi que d'augmenter la neurogenèse hippocampique adulte. Afin de compléter cette étude et mieux comprendre l'origine de l'ensemble des modifications mises en place lors de l'exposition à un environnement enrichi, j'ai commencé à étudier les mécanismes induits suite à cette exposition en ciblant l'expression des protéines BDNF, P-ERK, CREB et Zif268. Le BDNF est un régulateur clé de la fonction synaptique et du développement neuronal tel que dans la neurogenèse (Bramham & Panja, 2014). Son action passe par l'activation de nombreuses protéines telles que PLD1 phosphorylée par RSK2 (Ammar *et al.* 2015). Dans l'hippocampe de souris *Rsk2-KO*, une augmentation de la phosphorylation de ERK1/2, de CREB et de l'activation de Zif268 ont été mises en évidence (Schneider *et al.* 2011). A ce jour, les résultats restent encore à être complétés mais il semblerait que l'exposition à un environnement enrichi permette, chez le modèle *Rsk2-KO*, de pallier à la surexpression de BDNF, de P-ERK et de Zif268. L'étude de la protéine CREB est également en cours.

Chez le patient DI, ce type d'intervention a déjà été mis en place sous forme de thérapies cognitivo-comportementales, et il est désormais connu que l'apport de ce type de stimulations physiques et/ou cognitives améliorent leurs performances globales. A titre d'exemple, une étude a récemment proposé à des enfants âgés de 2 à 6 ans et diagnostiqués pour le syndrome de Rett, de passer 3h par jour pendant plusieurs mois dans un environnement présentant des stimulations sociales, visuelles, sonores, gustatives, vestibulaires (balançoires) et tactiles. Les résultats de cette étude ont permis de montrer une amélioration des déficits dus au syndrome (Downs *et al.* 2018). L'enrichissement permet donc de compenser au moins une partie les déficits mnésiques (chez

l'Homme comme chez l'animal) et présente donc une voie intéressante pour évaluer chez les patients, les effets de procédures telles que la stimulation cognitive. La modélisation grâce aux modèles animaux permettra de mieux comprendre les mécanismes induits sous-jacents.

V. Conclusion

L'état actuel de mes investigations montre qu'à l'image de ce qui est observé chez les patients DI et chez les autres modèles de DI, mes trois modèles murins de DI présentent des déficits cognitifs hippocampe-dépendants (mémoire spatiale et fonction de séparation de patterns). D'autre part, à l'instar de ce qui est également observé dans les différentes études de la littérature chez les modèles murins, mes trois modèles de DI présentent également des altérations de la neurogenèse hippocampique adulte qui pourraient contribuer aux déficits cognitifs. Cette étude renforce donc le lien existant entre la neurogenèse hippocampique adulte et les déficits cognitifs associés à la DI et apporte des informations supplémentaires sur le rôle de ces trois protéines dans les mécanismes qui sous-tendent la DI.

L'ensemble des diagnostics de DI met en avant que les causes de la DI sont très diverses et conduisent à de multiples scénari physiopathologiques. Traditionnellement, ces troubles neurodéveloppementaux conduisant à des DI sont essentiellement attribués à des altérations survenant principalement au cours du développement (altérations de la neurogenèse embryonnaire, de la migration cellulaire et de la connectivité neuronale). Cependant, comme cela a été montré au cours de cette étude, des altérations spécifiques ayant lieu à l'âge adulte contribuent également aux déficits cognitifs. L'étude de la neurogenèse hippocampique adulte suscite donc un intérêt non négligeable au sein de la communauté scientifique, non seulement car elle est susceptible de fournir des pistes pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques visant à améliorer les performances cognitives et compenser les pertes neuronales observées dans certaines maladies neurodégénératives, mais aussi parce qu'elle apporte de nouvelles connaissances sur le fonctionnement cérébral, en relation avec les fonctions cognitives et notamment sur les dysfonctionnement cognitifs qui surviennent dans les DI d'origine génétique.

A ce jour, grâce à l'apport des nouvelles technologies, telles que les nouvelles techniques de séquençage, le nombre de patients DI, dont une cause génétique a été découverte, a fortement augmenté et avec lui le nombre de gènes impliqués dans ces DI (700 gènes au total en 2015). La découverte de ces nombreux gènes impliqués, fait progresser la recherche scientifique vers une étape visant à mettre en évidence des points communs entre toutes les protéines issues de ces gènes et ainsi déceler les mécanismes sous-jacents à ce trouble psychiatrique. Le champ de recherche reste immense et beaucoup de mécanismes restent à être élucidés mais ces recherches donnent l'espoir de trouver de nouvelles pistes thérapeutiques.

Annexe

Annexe 1

Tâche de discrimination contextuelle

Ce protocole a été testé chez les souris *Rsk2*-KO (WT n=12 et *Rsk2*-KO n=12), *Pak3*-R67C (WT n=12 et *Pak3*-R67C n=13) et *Dp71*-KI (WT n=13 et *Dp71*-KI n=12). La tâche de discrimination contextuelle est inspirée du protocole de Sahay *et al.* (2011). Les souris doivent apprendre à discriminer deux contextes environnementaux assez semblables dont un seul des deux est associé à un choc électrique. Cette tâche repose sur le principe de conditionnement de la peur.

Les deux contextes utilisés sont une boîte cubique (15 cm de côté) avec au sol une grille métallique sur fond blanc (Figure 40A). La boîte est laissée ouverte sur le dessus. Les différences entre les deux contextes reposent sur la couleur des parois, la luminosité et l'odeur. Les parois du contexte A sont entièrement blanches, avec une odeur d'alcool et une luminosité forte (Figure 40B). Les parois du contexte B sont de couleur noire ou rayées rouge et blanc, avec une odeur de citron et une luminosité plus faible (Figure 40C). Le contexte A est associé à un choc électrique de 0,75 mA alors qu'aucun choc électrique n'est délivré dans le contexte B.

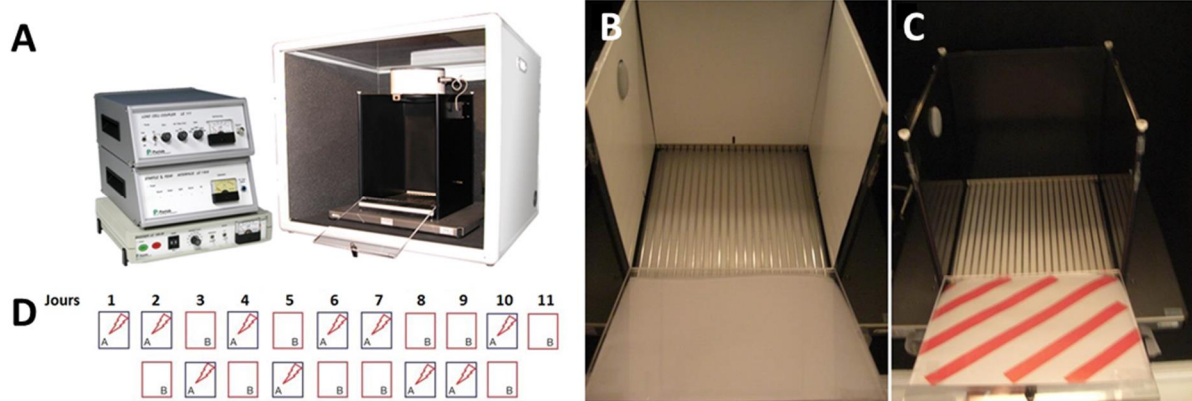


Figure 40: Dispositif expérimental utilisé pour la tâche de discrimination contextuelle (Sahay *et al.* 2011). (A) Dispositif expérimental. (B,C) Contextes du test de peur conditionnée : (B) Contexte A (C) Contexte B. (D) Protocole d'expérimentation.

Cette tâche se réalise sur une période de 11 jours. Le premier jour, les souris sont individuellement placées dans le contexte A. Au bout de 185 secondes d'exploration, elles reçoivent un choc électrique de 0,75 mA pendant deux secondes. Elles sont remises dans leur cage individuelle 15 secondes plus tard. Les jours suivants, les souris sont placées successivement dans les deux

contextes à 1 heure d'intervalle selon un ordre aléatoire. Dans le contexte A, elles reçoivent à chaque fois un léger choc électrique comme le 1^{er} jour et dans le contexte B, les souris ne reçoivent aucun choc électrique et y restent ainsi 180 secondes. Le 11^e jour les souris sont placées uniquement dans le contexte B (Figure 40D).

Durant les deux expériences, des enregistrements vidéo de tous les essais ont été effectués. Le pourcentage de temps passé à effectuer des réponses de peur dans les deux contextes pendant les 180 secondes d'exploration a été mesuré automatiquement par le dispositif.

Résultats obtenus

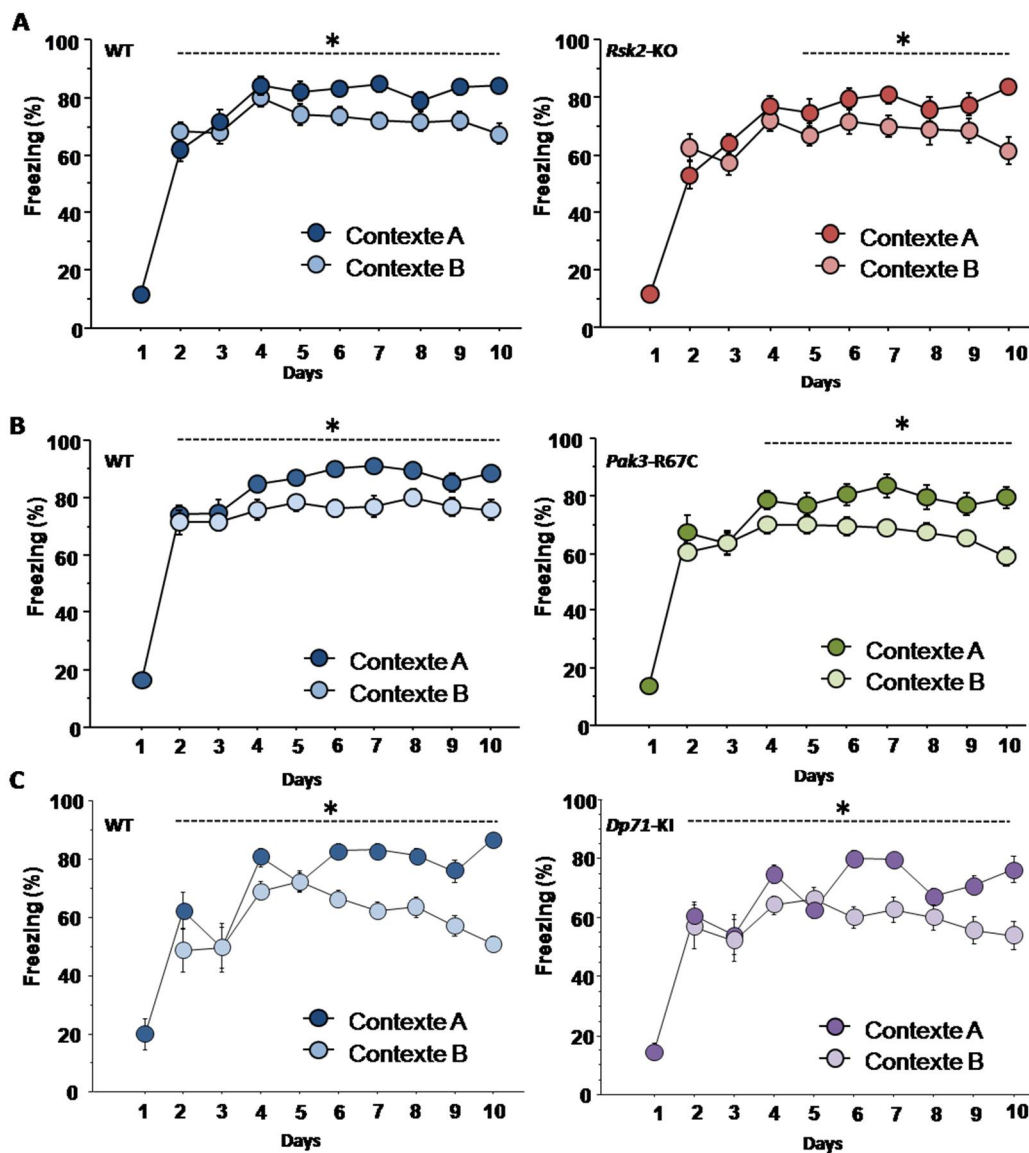


Figure 41 : Résultats obtenus lors de la tâche de discrimination contextuelle

Les souris mutantes parviennent à discriminer les deux contextes de manière comparable aux souris WT. (A) WT n=12 ; *Rsk2*-KO n=12 (B) WT n=12 ; *Pak3*-R67C n=13. (C) WT n=13 ; *Dp71*-KI n=10. *Interaction p<0.05

Bibliographie

- Aasebø IEJ, Blankvoort S, Tashiro A. 2011. Critical maturational period of new neurons in adult dentate gyrus for their involvement in memory formation. *Eur J Neurosci.* 33:1094–1100.
- Abidi F, Jacquot S, Lassiter C, Trivier E, Hanauer A, Schwartz CE. 1999. Novel mutations in Rsk-2, the gene for Coffin-Lowry syndrome (CLS). *Eur J Hum Genet.* 7:20–6.
- Acosta R, Montañez C, Fuentes-Mera L, Gonzalez E, Gómez P, Quintero-Mora L, Mornet D, Alvarez-Salas LM, Cisneros B. 2004. Dystrophin Dp71 is required for neurite outgrowth in PC12 cells. *Exp Cell Res.* 296:265-75.
- Adusei DC, Pacey LK, Chen D, Hampson DR. 2010. Early developmental alterations in GABAergic protein expression in fragile X knockout mice. *Neuropharmacology.* 59:167-71.
- Aguilar-Arredondo A, Arias C, Zepeda A. 2015. Evaluating the functional state of adult-born neurons in the adult dentate gyrus of the hippocampus: from birth to functional integration. *Rev Neurosci.* 26:269-79.
- 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.
- Akers KG, Martinez-Canabal A, Restivo L, Yiu AP, De Cristofaro A, Hsiang HL, Wheeler AL, Guskjolen A, Niibori Y, Shoji H, Ohira K, Richards BA, Miyakawa T, Josselyn SA, Frankland PW. 2014. Hippocampal neurogenesis regulates forgetting during adulthood and infancy. *Science.* 344:598-602.
- Al Abed AS, Sellami A, Brayda-Bruno L, Lamothe V, Noguès X, Potier M, Bennetau-Pelissero C, Marighetto A. 2016. Estradiol enhances retention but not organization of hippocampus-dependent memory in intact male mice. *Psychoneuroendocrino.* 69:77-89.
- Alarcon JM, Malleret G, Touzani K, Vronskaya S, Ishii S, Kandel ER, Barco A. 2004. Chromatin acetylation, memory, and LTP are impaired in CBP^{+/-} mice: a model for the cognitive deficit in Rubinstein-Taybi syndrome and its amelioration. *Neuron.* 42:947–959
- Alberini CM, Travaglia A. 2017. Infantile Amnesia: A Critical Period of Learning to Learn and Remember. *J Neurosci.* 37:5783-5795.
- Alderton GK, Galbiati L, Griffith E, Surinya KH, Neitzel H, Jackson AP, Jeggo PA, O'Driscoll M. 2006. Regulation of mitotic entry by microcephalin and its overlap with ATR signalling. *Nat Cell Biol.* 8:725-33.
- Aléman V, Osorio B, Chavez O, Rendon A, Mornet D, Martinez D. 2001. Subcellular localization of Dp71 dystrophin isoforms in cultured hippocampal neurons and forebrain astrocytes. *Histochem Cell Biol.* 115:243-54.
- Allegra M, Spalletti C, Vignoli B, Azzimondi S, Busti I, Billuart P, Canossa M, Caleo M. 2017. Pharmacological rescue of adult hippocampal neurogenesis in a mouse model of X-linked intellectual disability. *Neurobiol Dis.* 100:75-86.
- Allen KM, Gleeson JG, Bagrodia S, Partington MW, MacMillan JC, Cerione RA, Mulley JC, Walsh CA. 1998. PAK3 mutation in nonsyndromic X-linked mental retardation. *Nat Genet.* 20:25-30.
- Altman J, Das GD. 1965. Autoradiographic and Histochemical Evidence of Postnatal Hippocampal Neurogenesis in Rats. *J Comp Neurol.* 124:319–336.
- Ambrogini P, Cuppini R, Cuppini C, Ciaroni S, Cecchini T, Ferri P, Sartini S, Del Grande P. 2000. Spatial learning affects immature granule cell survival in adult rat dentate gyrus. *Neurosci Lett.* 286:21–24.
- Ambrogini P, Orsini L, Mancini C, Ferri P, Ciaroni S, Cuppini R. 2004. Learning may reduce neurogenesis in adult rat dentate gyrus. *Neurosci Lett.* 359:13–16.
- American Psychiatric Association. 2013. Diagnostic and Statistical Manual of Mental disorders, fifth edition (DSM V). American Psychiatric Publishing, Book.
- Amir RE, Van den Veyver IB, Wan M, Tran CQ, Francke U, Zoghbi HY. 1999. Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG-binding protein 2. *Nat Genet.* 23:185-8.
- Ammar M-R, Humeau Y, Hanauer A, Nieswandt B, Bader M-F, Vitale N. 2013. The Coffin-Lowry Syndrome-Associated Protein RSK2 Regulates Neurite Outgrowth through Phosphorylation of Phospholipase D1 (PLD1) and Synthesis of Phosphatidic Acid. *J Neurosci.* 33:19470–9.

- Ammar MR, Thahouly T, Hanauer A, Stegner D, Nieswandt B, Vitale N. 2015. PLD1 participates in BDNF-induced signalling in cortical neurons. *Sci Rep.* 5:14778.
- Anacker C, Hen R. 2017. Adult hippocampal neurogenesis and cognitive flexibility - linking memory and mood. *Nat Rev Neurosci.* 18:335-346.
- Andersen P, Morris RGM, Amaral DG, Bliss TVP, O'Keefe J. 2007. *The Hippocampus Book.* Oxford University Press.
- Anjum R, Roux PP, Ballif BA, Gygi SP, Blenis J. 2005. The tumor suppressor DAP kinase is a target of RSK-mediated survival signaling. *Curr Biol.* 15:1762-7.
- Anjum R, Blenis J. 2008. The RSK family of kinases: emerging roles in cellular signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 9:747-58.
- Aragón J, Romo-Yáñez J, Martínez-Herrera A, Ceja V, Rendon A, Montañez C. 2011. Characterization of Dp71Δ (78-79), a novel dystrophin mutant that stimulates PC12 cell differentiation. *J Neurochem.* 119:697-707.
- Aragón J, González-Reyes M, Romo-Yáñez J, Vacca O, Aguilar-González G, Rendón A, Vaillend C, Montañez C. 2017. Dystrophin Dp71 Isoforms Are Differentially Expressed in the Mouse Brain and Retina: Report of New Alternative Splicing and a Novel Nomenclature for Dp71 Isoforms. *Mol Neurobiol.* 27.
- Arber S, Barbayannis FA, Hanser H, Schneider C, Stanyon CA, Bernard O, Caroni P. 1998. Regulation of actin dynamics through phosphorylation of cofilin by LIM-kinase. *Nature.* 393:805-9.
- Ariani F, Hayek G, Rondinella D, Artuso R, Mencarelli MA, Spanhol-Rosseto A, Pollazon M, Buoni S, Spiga O, Ricciardi S, Meloni I, Longo I, Mari F, Broccoli V, Zappella M, Renieri A. 2008. FOXP1 is responsible for the congenital variant of Rett syndrome. *Am J Hum Genet.* 83:89-93.
- Arruda-Carvalho M, Sakaguchi M, Akers KG, Josselyn SA, Frankland PW. 2011. Posttraining ablation of adult-generated neurons degrades previously acquired memories. *J Neurosci.* 31:15113-15127.
- Austin RC, Howard PL, D'Souza VN, Klamut HJ, Ray PN. 1995. Cloning and characterization of alternatively spliced isoforms of Dp71. *Hum Mol Genet.* 4:1475-83.
- Austin RC, Morris GE, Howard PL, Klamut HJ, Ray PN. 2000. Expression and synthesis of alternatively spliced variants of Dp71 in adult human brain. *Neuromuscul Disord.* 10:187-93.
- Baddeley A. 1986. *Working Memory.* Oxford University Press, London.
- Baddeley A. 2003. Working memory: looking back and looking forward. *Nat Rev Neurosci.* 4:829-839.
- Bagni C, Oostra BA. 2013. Fragile X syndrome: From protein function to therapy. *Am J Med Genet A.* 161A:2809-21.
- Baker KB, Wray SP, Ritter R, Mason S, Lanthorn TH, Savelieva KV. 2010. Male and female Fmr1 knockout mice on C57 albino background exhibit spatial learning and memory impairments. *Genes Brain Behav.* 9:562-574.
- Baker PM, Jhou T, Li B, Matsumoto M, Mizumori SJ, Stephenson-Jones M, Vicentic A. 2016. The Lateral Habenula Circuitry: Reward Processing and Cognitive Control. *J Neurosci.* 36:11482-11488.
- Baker S, Hooper S, Skinner M, Hatton D, Schaaf J, Ornstein P, Bailey D. 2011. Working memory subsystems and task complexity in young boys with Fragile X syndrome. *J Intell Disabil Res.* 55: 19-29.
- Bannerman DM, Grubb MS, Deacon RMJ, Yee BK, Feldon J, Rawlins JNP. 2003. Ventral hippocampal lesions affect anxiety but not spatial learning. *Behav Brain Res.* 139:197-213.
- Bannerman DM, Rawlins JNP, Mchugh SB, Deacon RMJ, Yee BK, Bast T, Zhang WN, Pothuizen HHJ, Feldon J. 2004. Regional dissociations within the hippocampus - Memory and anxiety. *Neurosci Biobehav Rev.* 28:273-283.
- Barbujani G, Russo A, Danieli GA, Spiegler AW, Borkowska J, Petruszewicz IH. 1990. Segregation analysis of 1885 DMD families: significant departure from the expected proportion of sporadic cases. *Hum Genet.* 84:522-6.
- Barrouillet P, Camos V. 2007. Le développement de la mémoire de travail. In : *Psychologie du développement et de l'éducation.* LAUTREY J (Ed). PUF, Paris, 51-86.

- Bayer SA, Yackel JW, Puri PS. 1982. Neurons in the rat dentate gyrus granular layer substantially increase during juvenile and adult life. *Science*. 15:22–24.
- Beeser A, Chernoff J. 2005. Production and use of a cell permeable inhibitor of group A Paks (TAT-PID) to analyze signal transduction. *Methods*. 37:203-7.
- Beining M, Mongiat LA, Schwarzacher SW, Cuntz H, Jedlicka P. 2017. T2N as a new tool for robust electrophysiological modeling demonstrated for mature and adult-born dentate granule cells. *Elife*. 22;6.
- Belichenko PV, Hagberg B, Dahlström A. 1997. Morphological study of neocortical areas in Rett syndrome. *Acta Neuropathol*. 93:50-61.
- Belichenko PV, Wright EE, Belichenko NP, Masliah E, Li HH, Mobley WC, Francke U. 2009. Widespread changes in dendritic and axonal morphology in Mecp2-mutant mouse models of Rett syndrome: evidence for disruption of neuronal networks. *J Comp Neurol*. 20;514:240-58.
- Bellugi U, Wang P, Jernigan TL. 1994. Higher cortical functions: Evidence from specific genetically based syndromes of disorder. In S. Broman & J. Graffman (Eds.), *Cognitive deficits in developmental disorders: Implications for brain function* (pp. 23-56). Hillsdale, NJ: Lawrence Erlbaum.
- Bergami M, Berninger B. 2012. A fight for survival: the challenges faced by a newborn neuron integrating in the adult hippocampus. *Dev Neurobiol*. 72:1016-31.
- Bergeron MJ, Castonguay A, De Koninck Y. 2014. KCC2 : nouvelle cible thérapeutique pour le traitement de pathologies neurologiques. *Medecine/Sciences*. 30,514-517.
- Bergmann O, Spalding KL, Frisén J. 2015. Adult Neurogenesis in Humans. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 1;7:a018994.
- Bexkens A, Van der Molen MW, Collot d'Escury-Koenigs AML, Huizenga HM. 2014a. Interference control in adolescents with mild intellectual disabilities and/or behavior disorders. *Child Neuropsychology*. 20:398-414.
- Bexkens A, Ruzzano L, Collot D' Escury-Koenigs AM, Van der Molen MW, Huizenga HM. 2014b. Inhibition deficits in individuals with intellectual disability: a meta-regression analysis. *J Intellect Disabil Res*. 58:3-16.
- Bhakar AL, Dölen G, Bear MF. 2012. The pathophysiology of fragile X (and what it teaches us about synapses). *Annu Rev Neurosci*. 35:417-43
- Bienvenu T, des Portes V, McDonell N, Carrie A, Zemni R, Couvert P, Ropers HH, Moraine C, van Bokhoven H, Fryns JP, Allen K, Walsh CA, Boue J, Kahn A, Chelly J, Beldjord C, Am .2000. Missense mutation in PAK3, R67C, causes X-linked nonspecific mental retardation. *J Med Genet*. 93:294–298.
- Bienvenu T, Chelly J. 2006. Molecular genetics of Rett syndrome: when DNA methylation goes unrecognized. *Nat Rev Genet*. 7:415-26.
- Billuart P, Bienvenu T, Ronce N, des Portes V, Vinet MC, Zemni R, Carrié A, Beldjord C, Kahn A, Moraine C, Chelly J. 1998. Oligophrenin 1 encodes a rho-GAP protein involved in X-linked mental retardation. *Pathol Biol (Paris)*. 46:678.
- Blake DJ, Hawkes R, Benson MA, Beesley PW. 1999. Different dystrophin-like complexes are expressed in neurons and glia. *J Cell Biol*. 147: 645–658.
- Boda B, Alberi S, Nikonenko I, Node-Langlois R, Jourdain P, Moosmayer M, Parisi-Jourdain L, Muller D. 2004. The mental retardation protein PAK3 contributes to synapse formation and plasticity in hippocampus. *J Neurosci*. 24:10816–10825.
- Boda B, Nikonenko I, Alberi S, Muller D. 2006. Central nervous system functions of PAK protein family: from spine morphogenesis to mental retardation. *Mol Neurobiol*. 34:67-80.
- Bokoch GM. 2003. Biology of the p21-activated kinases. *Annu Rev Biochem*. 72:743-81.

- Bond J, Roberts E, Springell K, Lizarraga SB, Scott S, Higgins J, Hampshire DJ, Morrison EE, Leal GF, Silva EO, Costa SM, Baralle D, Raponi M, Karbani G, Rashid Y, Jafri H, Bennett C, Corry P, Walsh CA, Woods CG. 2005. A centrosomal mechanism involving CDK5RAP2 and CENPJ controls brain size. *Nat Genet.* 37:353-5.
- Bonni A, Brunet A, West AE, Datta SR, Takasu MA, Greenberg ME. 1999. Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription-dependent and -independent mechanisms. *Science.* 286:1358-62.
- Borralleras C, Mato S, Amédée T, Matute C, Mulle C, Pérez-Jurado LA, Campuzano V. 2016. Synaptic plasticity and spatial working memory are impaired in the CD mouse model of Williams-Beuren syndrome. *Mol Brain.* 2;9:76.
- Borrie SC, Brems H, Legius E, Bagni C. 2017. Cognitive Dysfunctions in Intellectual Disabilities: The Contributions of the Ras-MAPK and PI3K-AKT-mTOR Pathways. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 31;18:115-142.
- Bramham CR, Panja D. 2014. BDNF regulation of synaptic structure, function, and plasticity. *Neuropharmacology.* 76 Pt C, 601–602.
- Bray NW, Saarnio DA, Borges LM, Hawk LW. 1994. Intellectual and developmental differences in external memory strategies. *Am J Ment Retard.* 99, 19-31.
- Bray NW, Huffman L, Grupe L. 1998. Un cadre conceptuel pour l'étude des déficiences et des compétences de mémorisation chez les enfants présentant un retard mental. In : Attention, mémoire, apprentissage. Études sur le retard mental. BÜCHEL F, PAOUR JL, COURBOIS Y, SCHARNHORST U (Eds). Ed SPC, Lucerne, Suisse.
- Bruel-Jungerman E, Laroche S, Rampon C. 2005. New neurons in the dentate gyrus are involved in the expression of enhanced long-term memory following environmental enrichment. *Eur J Neurosci.* 21:513–521.
- Bussy G, Kientz C. 2012. Syndrome de l'X-Fragile. Guide Ressource pour comprendre et accompagner. Remédiacog Editions.
- Bussy G, Rigard C. 2013. Intérêt d'une rééducation neuropsychologique de la mémoire de travail dans la déficience intellectuelle. In R. Broca (Eds). La déficience intellectuelle face au défi des neurosciences. Lyon: Chroniques Sociales.
- Cameron HA, McKay RDG. 2001. Adult neurogenesis produces a large pool of new granule cells in the dentate gyrus. *J Comp Neurol.* 435:406–417.
- Cameron HA, Woolley CS, McEwen BS, Gould E. 1993. Differentiation of newly born neurons and glia in the dentate gyrus of the adult rat. *Neuroscience.* 56:337–344.
- Cargnello M, Roux PP. 2011. Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiol Mol Biol Rev.* 75:50-83.
- Carlén M, Cassidy RM, Brismar H, Smith GA, Enquist LW, Frisén J. 2002. Functional integration of adult-born neurons. *Curr Biol.* 12:606-8.
- Carney DP, Brown JH, Henry LA. 2013. Executive function in Williams and Down syndromes. *Res Dev Disabil.* 34:46-55.
- Castilla-Ortega E, Hoyo-Becerra C, Pedraza C, Chun J, De Fonseca FR, Estivill-Torrús G, Santín LJ. 2011. Aggravation of Chronic Stress Effects on Hippocampal Neurogenesis and Spatial Memory in LPA₁ Receptor Knockout Mice. *PLoS One.* 6:e25522.
- Castren M, Tervonen T, Karkkainen V, Heinonen S, Castren E, Larsson K, Bakker CE, Oostra BA, Akerman K. 2005. Altered differentiation of neural stem cells in fragile X syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA.* 102:17834–17839.
- Catavero C, Bao H, Song J. 2017. Neural mechanisms underlying GABAergic regulation of adult hippocampal neurogenesis. *Cell Tissue Res.* 371:33-46.

- Cayre M, Malaterre J, Scotto-lomassese S, Strambi C, Strambi A. 2002. The common properties of neurogenesis in the adult brain: from invertebrates to vertebrates. *Comp Biochem Physiol. Part B* 132:1–15.
- Chailangkarn T, Muotri AR. 2017. Modeling Williams syndrome with induced pluripotent stem cells. *Neurogenesis (Austin)*. 6;4(1):e1283187.
- Chen J, Zhang ZG, Li Y, Wang Y, Wang L, Jiang H, Zhang C, Lu M, Katakowski M, Feldkamp CS, Chopp M. 2003. Statins induce angiogenesis, neurogenesis, and synaptogenesis after stroke. *Ann Neurol*. 53:743-51.
- Chen RH, Sarnecki C, Blenis J. 1992. Nuclear localization and regulation of erk- and rsk-encoded protein kinases. *Mol Cell Biol*. 12:915-27.
- Cheng MF. 2013. Hypothalamic neurogenesis in the adult brain. *Front Neuroendocrinol*. 34:167-78.
- Chiurazzi P, Schwartz CE, Gecz J, Neri G. 2008. XLMR genes: update 2007. *Eur J Hum Genet*. 16:422–34.
- Cho Y, He Z, Zhang Y. 2005. The p53 Protein Is a Novel Substrate of Ribosomal S6 Kinase 2 and a Critical Intermediary for Ribosomal S6 Kinase 2 and Histone H3 Interaction. *Cancer Research*. 65:3596-603.
- Ciarlone SL, Wang X, Rogawski MA, Weeber EJ. 2017. Effects of the synthetic neurosteroid ganaxolone on seizure activity and behavioral deficits in an Angelman syndrome mouse model. *Neuropharmacology*. 116:142-150.
- Cisneros B, Rendon A, Genty V, Aranda G, Marquez F, Mornet D, Montañez C. 1996. Expression of dystrophin Dp71 during PC12 cell differentiation. *Neurosci Lett*. 213:107-10.
- Clark PJ, Bhattacharya TK, Miller DS, Kohman R a, DeYoung EK, Rhodes JS. 2012. New neurons generated from running are broadly recruited into neuronal activation associated with three different hippocampus-involved tasks. *Hippocampus*. 22:1860–1867.
- Claudepierre T, Mornet D, Pannicke T, Forster V, Dalloz C, Bolaños F, Sahel J, Reichenbach A, Rendon A. 2000. Expression of Dp71 in Müller glial cells: a comparison with utrophin- and dystrophin-associated proteins. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 41:294-304.
- Clelland CD, Choi M, Romberg C, Clemenson GD, Fragniere A, Tyers P, Jessberger S, Saksida LM, Barker RA, Gage F. 2009. A functional role for adult hippocampal neurogenesis in spatial pattern separation. *Science*. 325:210.
- Cobos I, Borello U, Rubenstein JL. 2007. Dlx transcription factors promote migration through repression of axon and dendrite growth. *Neuron*. 54:873-88.
- Coffin GS, Siris E, Calif E, Wegienka LC. 1966. Mental retardation with osteocartilaginous anomalies. *Am J Dis Child*. 112: 205–213.
- Comery TA, Harris JB, Willems PJ, Oostra BA, Irwin SA, Weiler IJ, Greenough WT. 1997. Abnormal dendritic spines in fragile X knockout mice: maturation and pruning deficits. *Proc Natl Acad Sci USA*. 5401-4.
- Contestabile A, Fila T, Ceccarelli C, Bonasoni P, Bonapace L, Santini D, Bartesaghi R, Ciani E. 2007. Cell cycle alteration and decreased cell proliferation in the hippocampal dentate gyrus and in the neocortical germinal matrix of fetuses with Down syndrome and in Ts65Dn mice. *Hippocampus*. 17:665–678.
- Corbo JC, Deuel TA, Long JM, LaPorte P, Tsai E, Wynshaw-Boris A, Walsh CA. 2002. Doublecortin is required in mice for lamination of the hippocampus but not the neocortex. *J Neurosci*. 22:7548-57.
- Cotton S, Voudouris NJ, Greenwood KM. 2001. Intelligence and Duchenne muscular dystrophy: full-scale, verbal, and performance intelligence quotients. *Dev Med Child Neurol*. 43:497-501.
- Creer DJ, Romberg C, Saksida LM, van Praag H, Bussey TJ. 2010. Running enhances spatial pattern separation in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 107:2367–2372.
- Curlik DM 2nd, Shors TJ. 2011. Learning Increases the Survival of Newborn Neurons Provided That Learning Is Difficult to Achieve and Successful. *J Cogn Neurosci*. 23:2159–2170.
- D'Adamo P, Menegon A, Lo Nigro C, Grasso M, Gulisano M, Tamanini F, Bienvenu T, Gedeon AK, Oostra B, Wu SK, Tandon A, Valtorta F, Balch WE, Chelly J, Toniolo D. 1998. Mutations in GDI1 are responsible for X-linked non-specific mental retardation. *Nat Genet*. 19:134-9.

- D'Hooge R, Nagels G, Franck F, Bakker CE, Reyniers E, Storm K, Kooy RF, Oostra BA, Willems PJ, De Deyn PP. 1997. Mildly impaired water maze performance in male *Fmr1* knockout mice. *Neuroscience* 76:367-376.
- Dai X, Iwasaki H, Watanabe M, Okabe S. 2014. *Dlx1* transcription factor regulates dendritic growth and postsynaptic differentiation through inhibition of neuropilin-2 and PAK3 expression. *Eur J Neurosci.* 39:531-47.
- Daoud F, Angeard N, Demerre B, Martie I, Benyaou R, Leturcq F, Cossée M, Deburgrave N, Saillour Y, Tuffery S, Urtizberea A, Toutain A, Echenne B, Frischman M, Mayer M, Desguerre I, Estournet B, Réveillère C, Penisson-Besnier, Cuisset JM, Kaplan JC, Héron D, Rivier F, Chelly J. 2009a. Analysis of *Dp71* contribution in the severity of mental retardation through comparison of Duchenne and Becker patients differing by mutation consequences on *Dp71* expression. *Hum Mol Genet.* 18:3779-94.
- Daoud F, Candelario-Martínez A, Billard JM, Avital A, Khelfaoui M, Rozenvald Y, Guegan M, Mornet D, Jaillard D, Nudel U, Chelly J, Martínez-Rojas D, Laroche S, Yaffe D, Vaillend C. 2009b. Role of mental retardation-associated dystrophin-gene product *Dp71* in excitatory synapse organization, synaptic plasticity and behavioral functions. *PLoS One.* 4:e6574.
- Darcq E, Koebel P, Del Boca C, Pannetier S, Kirstetter AS, Garnier JM, Hanauer A, Befort K, Kieffer BL. 2011. RSK2 signaling in brain habenula contributes to place aversion learning. *Learn Mem.* 18:574-8.
- David JP, Mehic D, Bakiri L, Schilling AF, Mandic V, Priemel M, Idarraga MH, Reschke MO, Hoffmann O, Amling M, Wagner EF. 2005. Essential role of RSK2 in *c-Fos*-dependent osteosarcoma development. *J Clin Invest.* 115:664-72.
- David DJ, Samuels BA, Rainer Q, Wang JW, Marsteller D, Mendez I, Drew M, Craig DA, Guiard BP, Guilloux JP, 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.* 62:479-93.
- Davis S, Vanhoutte P, Pages C, Caboche J, Laroche S. 2000. The MAPK/ERK cascade targets both Elk-1 and cAMP response element-binding protein to control long-term potentiation-dependent gene expression in the dentate gyrus in vivo. *J Neurosci.* 20:4563-72.
- Davis S, Renaudineau S, Poirier R, Poucet B, Save E, Laroche S. 2010. The formation and stability of recognition memory: what happens upon recall? *Front Behav Neurosci.* 4:177.
- 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
- de Brouwer AP, Nabuurs SB, Verhaart IE, Oudakker AR, Hordijk R, Yntema HG, Hordijk-Hos JM, Voeselek K, de Vries BB, van Essen T, Chen W, Hu H, Chelly J, den Dunnen JT, Kalscheuer VM, Aartsma-Rus AM, Hamel BC, van Bokhoven H, Kleefstra T. 2014. A 3-base pair deletion, *c.9711_9713del*, in *DMD* results in intellectual disability without muscular dystrophy. *Eur J Hum Genet.* 22:480-5.
- De Cesare D, Jacquot S, Hanauer A, Sassone-Corsi P. 1998. *Rsk-2* activity is necessary for epidermal growth factor-induced phosphorylation of CREB protein and transcription of *c-fos* gene. *Proc Natl Acad Sci USA.* 95:12202-7.
- Deidda G, Parrini M, Naskar S, Bozarth IF, Contestabile A, Cancedda L. 2015. Reversing excitatory GABAAR signaling restores synaptic plasticity and memory in a mouse model of Down syndrome. *Nat Med.* 21:318-26.
- Del Tongo C, Carretta D, Fulgenzi G, Catini C, Minciacchi D. 2009. Parvalbumin-positive GABAergic interneurons are increased in the dorsal hippocampus of the dystrophic *mdx* mouse. *Acta Neuropathol.* 118:803-12.
- Delaunoy JP, Dubos A, Marques Pereira P, Hanauer A. 2006. Identification of novel mutations in the RSK2 gene (*RPS6KA3*) in patients with Coffin-Lowry syndrome. *Clin Genet.* 70:161-6.
- Deng B, Glanzman D, Tidball JG. 2009. Nitric oxide generated by muscle corrects defects in hippocampal neurogenesis and neural differentiation caused by muscular dystrophy. *J Physiol.* 587(Pt 8):1769-78.

- 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.
- Deng W, Aimone JB, Gage FH. 2010. New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? *Nat Rev Neurosci.* 11(5):339-50.
- Deng W, Mayford M, Gage FH. 2013. Selection of distinct populations of dentate granule cells in response to inputs as a mechanism for pattern separation in mice. *Elife.* 2:1–21.
- des Portes V, Francis F, Pinard JM, Desguerre I, Moutard ML, Snoeck I, Meiners LC, Capron F, Cusmai R, Ricci S, Motte J, Echenne B, Ponsot G, Dulac O, Chelly J, Beldjord C. 1998. Doublecortin is the major gene causing X-linked subcortical laminar heterotopia (SCLH). *Hum Mol Genet.* 7:1063-70.
- Desguerre I, Christov C, Mayer M, Zeller R, Becane HM, Bastuji-Garin S. 2009. Clinical heterogeneity of duchenne muscular dystrophy (DMD): Definition of sub-phenotypes and predictive criteria by long-term follow-up. *PLoS ONE.* 4, e4347.
- Dieni S, Rees S. 2003. Dendritic morphology is altered in hippocampal neurons following prenatal compromise. *J Neurobiol.* 55:41-52.
- Dierssen M, Benavides-Piccione R, Martínez-Cué C, Estivill X, Flórez J, Elston GN, DeFelipe J. 2003. Alterations of neocortical pyramidal cell phenotype in the Ts65Dn mouse model of Down syndrome: effects of environmental enrichment. *Cereb Cortex.* 13:758-64.
- Dindot SV, Antalffy BA, Bhattacharjee MB, Beaudet AL. 2008. The Angelman syndrome ubiquitin ligase localizes to the synapse and nucleus, and maternal deficiency results in abnormal dendritic spine morphology. *Hum. Mol. Genet.* 17:111–118.
- Döbrössy MD, Drapeau E, Arousseau C, Le Moal M, Piazza P-V, Abrous DN. 2003. Differential effects of learning on neurogenesis: learning increases or decreases the number of newly born cells depending on their birth date. *Mol Psychiatry.* 8:974–982.
- Doetsch F. 2003. A niche for adult neural stem cells. *Curr Opin Genet Dev* 13:543–550.
- Dolan BM, Duron SG, Campbell DA, Vollrath B, Shankaranarayana Rao BS, Ko HY, Lin GG, Govindarajan A, Choi SY, Tonegawa S. 2013. Rescue of fragile X syndrome phenotypes in Fmr1 KO mice by the small-molecule PAK inhibitor FRAX486. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2;110:5671-6.
- Downs J, Rodger J, Li C, Tan X, Hu N, Wong K, de Klerk N, Leonard H. 2018. Environmental enrichment intervention for Rett syndrome: an individually randomised stepped wedge trial. *Orphanet J Rare Dis.* 10;13:3.
- Drapeau E, Mayo W, Arousseau 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. *Proc Natl Acad Sci USA.* 100:14385–14390.
- Driscoll I, Howard SR, Stone JC, Monfils M-H, Tomanek B, Brooks WM, Sutherland RJ. 2006. The aging hippocampus: A multi-level analysis in the rat. *Neuroscience.* 139:1173–1185.
- Duarte ST, Armstrong J, Roche A, Ortez C, Pérez A, O'Callaghan Mdel M, Pereira A, Sanmartí F, Ormazábal A, Artuch R, Pineda M, García-Cazorla A. 2013. Abnormal expression of cerebrospinal fluid cation chloride cotransporters in patients with Rett syndrome. *PLoS One.* 19;8:e68851.
- Dubos A, Combeau G, Bernardinelli Y, Barnier JV, Hartley O, Gaertner H, Boda B, Muller, D. 2012. Alteration of synaptic network dynamics by the intellectual disability protein PAK3. *J Neurosci* 32. 519–27.
- Dufresne SD, Bjørbaek C, El-Haschimi K, Zhao Y, Aschenbach WG, Moller DE, Goodyear LJ. 2001. Altered extracellular signal-regulated kinase signaling and glycogen metabolism in skeletal muscle from p90 ribosomal S6 kinase 2 knockout mice. *Mol Cell Biol.* 21:81-7.
- Dugani CB, Paquin A, Kaplan DR, Miller FD. 2010. Coffin-Lowry syndrome: A role for RSK2 in mammalian neurogenesis. *Developmental biology.* 347:358-59.

- 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:e214.
- Dupret D, Abrous DN. 2010. Un nouveau chapitre dans le domaine de la mémoire : la néo- neurogenèse hippocampique. *Biol Aujourd'hui.* 204:113–129.
- Eadie BD, Cushman J, Kannagara TS, Fanselow MS, Christie BR. 2012. NMDA receptor hypofunction in the dentate gyrus and impaired context discrimination in adult *Fmr1* knockout mice. *Hippocampus.* 22:241–54.
- Edwards DC, Sanders LC, Bokoch GM, Gill GN. 1999. Activation of LIM-kinase by Pak1 couples Rac/Cdc42 GTPase signalling to actin cytoskeletal dynamics. *Nat Cell Biol.* 1(5):253–9.
- Ehninger D, Kempermann G. 2006. Paradoxical effects of learning the Morris water maze on adult hippocampal neurogenesis in mice may be explained by a combination of stress and physical activity. *Genes brain behav.* 5:29–39.
- Ehninger D, Kempermann G. 2008. Neurogenesis in the adult hippocampus. *Cell Tissue Res.* 331:243–250.
- Ellison JW, Rosenfeld JA, Shaffer LG. 2013. Genetic basis of intellectual disability. *Annu Rev Med.* 64:441–50.
- Encinas JM, Vaahtokari A, Enikolopov G. 2006. Fluoxetine targets early progenitor cells in the adult brain. *Proc Natl Acad Sci USA.* 103:8233–8238.
- Engel de Abreu PMJ, Conway ARA, Gathercole SE. 2010. Working memory and fluid intelligence in young children. *Intelligence.* 38:552–561.
- Engel SR, Creson TK, Hao Y, Shen Y, Maeng S, Nekrasova T, Landreth GE, Manji HK, Chen G. 2009. The extracellular signal-regulated kinase pathway contributes to the control of behavioral excitement. *Mol Psychiatry.* 14:448–61.
- Epp JR, Spritzer MD, Galea LAM. 2007. Hippocampus-dependent learning promotes survival of new neurons in the dentate gyrus at a specific time during cell maturation. *Neuroscience.* 149:273–285.
- Epp JR, Haack AK, Galea LAM. 2010. Task difficulty in the Morris water task influences the survival of new neurons in the dentate gyrus. *Hippocampus.* 20:866–876.
- Epp JR, Haack AK, Galea LAM. 2011. Activation and survival of immature neurons in the dentate gyrus with spatial memory is dependent on time of exposure to spatial learning and age of cells at examination. *Neurobiol Learn Mem.* 95:316–325.
- Epp JR, Chow C, Galea LAM. 2013. Hippocampus-dependent learning influences hippocampal neurogenesis. *Front Neurosci.* 7:1–9.
- Epp JR, Silva Mera R, Köhler S, Josselyn SA, Frankland PW. 2016. Neurogenesis-mediated forgetting minimizes proactive interference. *Nat Commun.* 7:10838.
- Eriksson PS, Perfilieva E, Björk-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, Gage FH. 1998. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med.* 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.
- 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 Biol.* 6:e246.
- Faulkner RL, Jang M, Liu X, Duan X, Sailor KA, Kim JY, Ge S, Jones EG, Ming G, Song H, Cheng H-J. 2008. Development of hippocampal mossy fiber synaptic outputs by new neurons in the adult brain. *Proc Natl Acad Sci.* 105:14157–14162.
- Feng R, Rampon C, Tang YP, Shrom D, Jin J, Kyin M, Sopher B, Miller MW, Ware CB, Martin GM, Kim SH, Langdon RB, Sisodia SS, Tsien JZ. 2001. Deficient neurogenesis in forebrain-specific presenilin-1 knockout mice is associated with reduced clearance of hippocampal memory traces. *Neuron.* 32:911–26.

- Fiala JC, Spacek J, Harris KM. 2002. Dendritic spine pathology: cause or consequence of neurological disorders? *Brain Res Brain Res Rev.* 39:29-54.
- Filippov V, Kronenberg G, Pivneva T, Reuter K, Steiner B, Wang L-P, 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.
- Fischer M, Pereira PM, Holtmann B, Simon CM, Hanauer A, Heisenberg M, Sendtner M. 2009. P90 Ribosomal s6 kinase 2 negatively regulates axon growth in motoneurons. *Mol Cell Neurosci.* 42:134-41.
- Fischer M, Cabello V, Popp S, Krackow S, Hommers L, Deckert J, Lesch KP, Schmitt-Böhrer AG. 2017. Rsk2 Knockout Affects Emotional Behavior in the IntelliCage. *Behav Genet.* 47:434-448.
- Fish JL, Kosodo Y, Enard W, Pääbo S, Huttner WB. 2006. Aspm specifically maintains symmetric proliferative divisions of neuroepithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 103:10438-43.
- Fisher TL, Blenis J. 1996. Evidence for Two Catalytically Active Kinase Domains in pp90 rsk. *Molecular and cellular biology.* 16:1212–1219.
- Florian C, Bahi-Buisson N, Bienvendu T. 2012. FOXG1-Related Disorders: From Clinical Description to Molecular Genetics. *Mol Syndromol.* 2:153-163.
- Fort PE, Sene A, Pannicke T, Roux MJ, Forster V, Mornet D, Nudel U, Yaffe D, Reichenbach A, Sahel JA, Rendon A. 2008. Kir4.1 and AQP4 associate with Dp71- and utrophin-DAPs complexes in specific and defined microdomains of Müller retinal glial cell membrane. *Glia.* 15;56:597-610.
- Frints SG, Froyen G, Marynen P, Fryns JP. 2002. X-linked mental retardation: vanishing boundaries between non-specific (MRX) and syndromic (MRXS) forms. *Clin Genet.* 62:423-32.
- Friocourt G, Marcorelles P, Saugier-veber P, Quille ML, Marret S, Laquerrière A. 2011. Role of cytoskeletal abnormalities in the neuropathology and pathophysiology of type I lissencephaly. *Acta Neuropathol.* 121:149-70.
- Fritschy JM, Schweizer C, Brünig I, Lüscher B. 2003. Pre- and post-synaptic mechanisms regulating the clustering of type A gamma-aminobutyric acid receptors (GABAA receptors). *Biochem Soc Trans.* 31:889-92.
- Frödin M, Gammeltoft S. 1999. Role and regulation of 90 kDa ribosomal S6 kinase (RSK) in signal transduction. *Mol Cell Endocrinol.* 151:65-77.
- Frödin M, Jensen CJ, Merienne K, Gammeltoft S. 2000. A phosphoserine-regulated docking site in the protein kinase RSK2 that recruits and activates PDK1. *EMBO J.* 19:2924-34.
- Fujimoto T, Itoh K, Yaoi T, Fushiki S. 2014. Somatodendritic and excitatory postsynaptic distribution of neuron-type dystrophin isoform, Dp40, in hippocampal neurons. *Biochem Biophys Res Commun.* 452:79-84.
- Fujita N, Sato S, Tsuruo T. 2003. Phosphorylation of p27Kip1 at threonine 198 by p90 ribosomal protein S6 kinases promotes its binding to 14-3-3 and cytoplasmic localization. *J Biol Chem.* 278:49254–60.
- Fukuda S, Kato F, Tozuka Y, Yamaguchi M, Miyamoto Y, Hisatsune T. 2003. Two distinct subpopulations of nestin-positive cells in adult mouse dentate gyrus. *J Neurosci.* 23:9357-66.
- Garthe A, Behr J, Kempermann G. 2009. Adult-generated hippocampal neurons allow the flexible use of spatially precise learning strategies. *PLoS One.* 4:e5464.
- Ge S, Goh ELK, Sailor K a, 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, Hsu K, Guo-li M, Song H. 2007. A critical period for enhanced synaptic plasticity in newly generated neurons of the adult brain. *Neuron.* 54: 559–566.
- Ge S, Sailor KA, Ming GL, Song H. 2008. Synaptic integration and plasticity of new neurons in the adult hippocampus. *J Physiol.* 586:3759-65.
- Gedeon AK, Nelson J, Gécz J, Mulley JC. 2003. X-linked mild non-syndromic mental retardation with neuropsychiatric problems and the missense mutation A365E in PAK3. *Am J Med Genet A.* 120A:509-17.
- Gilbert PE, Kesner RP, Lee I. 2001. Dissociating hippocampal subregions: double dissociation between dentate gyrus and CA1. *Hippocampus.* 11:626-36.

- Godavarthi SK, Dey P, Sharma A, Jana NR. 2015. Impaired adult hippocampal neurogenesis and its partial reversal by chronic treatment of fluoxetine in a mouse model of Angelman syndrome. *Biochem Biophys Res Commun.* 464:1196-201.
- Gonçalves JT, Schafer ST, Gage FH. 2016. Adult Neurogenesis in the Hippocampus: From Stem Cells to Behavior. *Cell.* 167:897-914.
- Goodman T, Trouche S, Massou I, Verret L, Zerwas M, Roulet P, Rampon C. 2010. Young hippocampal neurons are critical for recent and remote spatial memory in adult mice. *Neuroscience.* 171:769–778.
- Górecki DC, Barnard EA. 1995. Specific expression of G-dystrophin (Dp71) in the brain. *Neuroreport.* 6, 893–896.
- Gould E. 2007. How widespread is adult neurogenesis in mammals? *Nat Rev Neurosci.* 8(6):481-8.
- Gould E, Beylin A, Tanapat P, Reeves A, Shors TJ. 1999. Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation. *Nat Neurosci.* 2:260–265.
- Grant SG. 2012. Synaptopathies: diseases of the synaptome. *Curr Opin Neurobiol.* 22:522-9.
- Greer J, Hamilton C, Riby DM, Riby LM. 2014. Deeper processing is beneficial during episodic memory encoding for adults with Williams syndrome. *Res Dev Disabil.* 35:1720-6.
- Grossman AW, Aldridge GM, Weiler IJ, Greenough WT. 2006. Local protein synthesis and spine morphogenesis: Fragile X syndrome and beyond. *J Neurosci.* 26:7151-5.
- Groves JO, Leslie I, Huang G-J, McHugh SB, Taylor A, Mott R, Munafò M, Bannerman DM, Flint J. 2013. Ablating adult neurogenesis in the rat has no effect on spatial processing: evidence from a novel pharmacogenetic model. *PLoS Genet.* 9:e1003718.
- Gu Y, Arruda-Carvalho M, Wang J, Janoschka SR, Josselyn SA, Frankland PW, Ge S. 2012. Optical controlling reveals time-dependent roles for adult-born dentate granule cells. *Nat Neurosci.* 15:1700–1706.
- Guidi S, Bonasoni P, Ceccarelli C, Santini D, Gualtieri F, Ciani E, Bartesaghi R. 2008. Neurogenesis impairment and increased cell death reduce total neuron number in the hippocampal region of fetuses with Down syndrome. *Brain Pathol.* 18:180–197.
- Guimiot F, Delezoide AL, Hanauer A, Simonneau M. 2004. Expression of the RSK2 gene during early human development. *Gene Expression Patterns.* 4:111–114.
- Guo W, Allan AM, Zong R, Zhang L, Johnson EB, Schaller EG, Murthy AC, Goggin SL, Eisch AJ, Oostra BA, Nelson DL, Jin P, Zhao X. 2011. Ablation of Fmrp in adult neural stem cells disrupts hippocampus-dependent learning. *Nature medicine.* 17:559-65.
- Guzowski JF, Setlow B, Wagner EK, Mcgaugh JL. 2001. Experience-Dependent Gene Expression in the Rat Hippocampus after Spatial Learning : A Comparison of the Immediate-Early Genes Arc, c-fos, and zif268. *J Neurosci.* 21:5089–5098.
- Hagihara H, Ohira K, Toyama K, Miyakawa T. 2011. Expression of the AMPA Receptor Subunits GluR1 and GluR2 is Associated with Granule Cell Maturation in the Dentate Gyrus. *Front Neurosci.* 5:100.
- Hairston IS, Little MTM, Scanlon MD, Barakat MT, Palmer TD, Sapolsky RM, Heller SC. 2005. Sleep Restriction Suppresses Neurogenesis Induced by Hippocampus-Dependent Learning. *J Neurophysiol.* 94:4224–33.
- Hamdan FF, Srour M, Capo-Chichi JM, Daoud H, Nassif C, Patry L, Massicotte C, Ambalavanan A, Spiegelman D, Diallo O, Henrion E, Dionne-Laporte A, Fougerat A, Pshezhetsky AV, Venkateswaran S, Rouleau GA, Michaud JL. 2014. De novo mutations in moderate or severe intellectual disability. *PLoS Genet.* 10:e1004772.
- Hanauer A, Young ID. 2002. Coffin-Lowry syndrome: clinical and molecular features. *J Med Genet.* 39:705–13.
- Hayashi ML, Choi SY, Rao BS, Jung HY, Lee HK, Zhang D, Chattarji S, Kirkwood A, Tonegawa S. 2004. Altered cortical synaptic morphology and impaired memory consolidation in forebrain-specific dominant-negative PAK transgenic mice. *Neuron.* 42:773-87.

- Hayashi ML, Rao BS, Seo JS, Choi HS, Dolan BM, Choi SY, Chattarji S, Tonegawa S. 2007. Inhibition of p21-activated kinase rescues symptoms of fragile X syndrome in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 3;104:11489-94.
- Hendriksen JG, Vles JS. 2008. Neuropsychiatric disorders in males with duchenne muscular dystrophy: frequency rate of attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD), autism spectrum disorder, and obsessive-compulsive disorder. *J Child Neurol*. 23:477-81.
- Henrichs J, Ghassabian A, Peeters RP, Tiemeier H. 2013. Maternal hypothyroxinemia and effects on cognitive functioning in childhood: how and why? *Clin Endocrinol (Oxf)*. 79:152-62.
- Héron D, des Portes V. 2008. Déficience intellectuelle non syndromique : quel bilan étiologique ? *Medecine Therapeutique Pediatrie*. 11,4:202-210.
- Herrera-Salazar A, García-Villegas R, Aragón J, Sánchez-Trujillo A, Ceja V, Martínez-Herrera A, Merino-Jiménez C, Montañez C. 2016. Overexpression of mutant dystrophin Dp71[78-79] stimulates cell proliferation. *Neuroreport*. 27, 6–11.
- Hertecant J, Komara M, Nagi A, Al-Zaabi O, Fathallah W, Cui H, Yang Y, Eng CM, Al Sorkhy M, Ghattas MA, Al-Gazali L, Ali BR. 2017. A de novo mutation in the X-linked PAK3 gene is the underlying cause of intellectual disability and macrocephaly in monozygotic twins. *Eur J Med Genet*. 60:212-216.
- Hinton VJ, Brown WT, Wisniewski K, Rudelli RD. 1991. Analysis of neocortex in three males with the fragile X syndrome. *Am J Med Genet*. 41:289–294
- Hinton VJ, De Vivo DC, Nereo NE, Goldstein E, Stern Y. 2000. Poor verbal working memory across intellectual level in boys with Duchenne dystrophy. *Neurology*. 54:2127-32.
- Houles T, Roux PP. 2017. Defining the role of the RSK isoforms in cancer. *Semin Cancer Biol*. S1044-579X(17)30115-3.
- Huber KM, Gallagher SM, Warren ST, Bear MF. 2002. Altered synaptic plasticity in a mouse model of fragile X mental retardation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 99:7746-50.
- Huckleberry KA, Kane GA, Mathis RJ, Cook SG, Clutton JE, Drew MR. 2015. Behavioral experience induces zif268 expression in mature granule cells but suppresses its expression in immature granule cells. *Front Syst Neurosci*. 9:118.
- Hunsaker MR, Kesner RP. 2008. Evaluating the differential roles of the dorsal dentate gyrus, dorsal CA3, and dorsal CA1 during a temporal ordering for spatial locations task. *Hippocampus*. 18:955–964.
- Hussain NK, Thomas GM, Luo J, Huganir RL. 2015. Regulation of AMPA receptor subunit GluA1 surface expression by PAK3phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 112:E5883-90.
- Iarocci G, Burack JA. 1998. Understanding the development of attention in persons with mental retardation: Challenging the myths. In: Burack JA, Hodapp RM, editors. *Handbook of mental retardation and development*. New York: Cambridge University Press. 349–381.
- Imamura M, Ozawa E. 1998. Differential expression of dystrophin isoforms and utrophin during dibutyryl-cAMP-induced morphological differentiation of rat brain astrocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 95:6139-44.
- Imayoshi I, Sakamoto M, Ohtsuka T, Takao K, Miyakawa T, Yamaguchi M, Mori K, Ikeda T, Itohara S, Kageyama R. 2008. Roles of continuous neurogenesis in the structural and functional integrity of the adult forebrain. *Nat Neurosci*. 11:1153–1161.
- Iwata Y, Suzuki K, Wakuda T, Seki N, Thanseem I, Matsuzaki H, Mamiya T, Ueki T, Mikawa S, Sasaki T, Suda S, Yamamoto S, Tsuchiya KJ, Sugihara G, Nakamura K, Sato K, Takei N, Hashimoto K, Mori N. 2008. Irradiation in adulthood as a new model of schizophrenia. *PloS one*. 3:e2283.
- Jacobs KM, Bhawe SR, Ferraro DJ, Jaboin JJ, Hallahan DE, Thotala D. 2012. GSK-3 β : A Bifunctional Role in Cell Death Pathways. *Int J Cell Biol*. 930710.
- Jacquot S, Merienne K, Pannetier S, Blumenfeld S, Schinzel A, Hanauer A. 1998. Germline mosaicism in Coffin-Lowry syndrome. *Eur J Hum Genet*. 6:578-82.

- Jäkälä P, Hänninen T, Ryyänen M, Laakso M, Partanen K, Mannermaa A, Soininen H. 1997. Fragile-X: neuropsychological test performance, CGG triplet repeat lengths, and hippocampal volumes. *J Clin Invest.* 100:331-8.
- Jensen CJ, Buch MB, Krag TO, Hemmings BA, Gammeltoft S, Frödin M. 1999. 90-kDa ribosomal S6 kinase is phosphorylated and activated by 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1. *J Biol Chem.* 274:27168-76.
- Jessberger S, Kempermann G. 2003. Adult-born hippocampal neurons mature into activity-dependent responsiveness. *Eur J Neurosci.* 18:2707–2712.
- Jiang YH, Armstrong D, Albrecht U, Atkins CM, Noebels JL, Eichele G, Sweatt JD, Beaudet AL. 1998. Mutation of the Angelman ubiquitin ligase in mice causes increased cytoplasmic p53 and deficits of contextual learning and long-term potentiation. *Neuron.* 21, 799-811.
- Jones SW, Eriksont E, Blenis J, Mallert JL, Erikson RL. 1988. A *Xenopus* ribosomal protein S6 kinase has two apparent kinase domains that are each similar to distinct protein kinases. 85:3377–3381.
- Jones MW, Errington ML, French PJ, Fine A, Bliss TV, Garel S, Charnay P, Bozon B, Laroche S, Davis S. 2001. A requirement for the immediate early gene *Zif268* in the expression of late LTP and long-term memories. *Nat Neurosci.* 4:289-96.
- Josselyn SA, Frankland PW. 2012. Infantile amnesia: a neurogenic hypothesis. *Learn Mem.* 19:423-33.
- Kaplan MS, Hinds JW. 1977. Neurogenesis in the adult rat: electron microscopic analysis of light radioautographs. *Science.* (80-) 197:1092–1094.
- Kaufmann WE, Pearlson GD, Naidu S. 1998. The neuroanatomy of Rett syndrome: neuropathological and neuroimaging studies. *Riv Med.* 4:187–199.
- Kee N, Teixeira CM, Wang AH, Frankland PW. 2007. Preferential incorporation of adult-generated granule cells into spatial memory networks in the dentate gyrus. *Nat Neurosci.* 10:355–362.
- Kempermann G, Gage FH. 2002. Genetic influence on phenotypic differentiation in adult hippocampal neurogenesis. *Brain Res Dev Brain Res.* 134:1–12.
- Kempermann G, Gast D, Kronenberg G, Yamaguchi M, Gage FH. 2003. Early determination and long-term persistence of adult-generated new neurons in the hippocampus of mice. *Development.* 130:391–399.
- Kempermann G, Wiskott L, Gage FH. 2004. Functional significance of adult neurogenesis. *Curr Opin Neurobiol.* 14:186-91.
- Kempermann G, Song H, Gage FH. 2015. Neurogenesis in the Adult Hippocampus. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 7:a018812.
- Khelifaoui M, Denis C, van Galen E, de Bock F, Schmitt A, Houbroun C, Morice E, Giros B, Ramakers G, Fagni L, Chelly J, Nosten-Bertrand M, Billuart P. 2007. Loss of X-linked mental retardation gene *oligophrenin1* in mice impairs spatial memory and leads to ventricular enlargement and dendritic spine immaturity. *J Neurosci.* 27:9439-50.
- Kintner C. 2002. Neurogenesis in embryos and in adult neural stem cells. *J Neurosci.* 1;22:639-43.
- Kishi N, Macklis JD. 2004. *MECP2* is progressively expressed in post-migratory neurons and is involved in neuronal maturation rather than cell fate decisions. *Mol Cell Neurosci.* 27:306-21.
- Kleefstra T, Schenck A, Kramer JM, van Bokhoven H. 2014. The genetics of cognitive epigenetics. *Neuropharmacology.* 80:83-94.
- Ko H-G, Jang D-J, Son J, Kwak C, Choi J-H, Ji Y-H, Lee Y-S, Son H, Kaang B-K. 2009. Effect of ablated hippocampal neurogenesis on the formation and extinction of contextual fear memory. *Mol Brain.* 2:1.
- Kochinke K, Zweier C, Nijhof B, Fenckova M, Cizek P, Honti F, Keerthikumar S, Oortveld MA, Kleefstra T, Kramer JM, Webber C, Huynen MA, Schenck A. 2016. Systematic Phenomics Analysis Deconvolutes Genes Mutated in Intellectual Disability into Biologically Coherent Modules. *Am J Hum Genet.* 98:149-64.
- Koenig M, Monaco AP, Kunkel LM. 1988. The complete sequence of dystrophin predicts a rod-shaped cytoskeletal protein. *Cell.* 53, 219–228.

- Kohn M, Hameister H, Vogel M, Kehrer-Sawatzki H. 2003. Expression pattern of the Rsk2, Rsk4 and Pdk1 genes during murine embryogenesis. *Gene Expr Patterns*. 3:173–177.
- Komiyama NH, Watabe AM, Carlisle HJ, Porter K, Charlesworth P, Monti J, Strathdee DJ, O'Carroll CM, Martin SJ, Morris RG, O'Dell TJ, Grant SG. 2002. SynGAP regulates ERK/MAPK signaling, synaptic plasticity, and learning in the complex with postsynaptic density 95 and NMDA receptor. *J Neurosci*. 22:9721–32.
- Kooy RF, D'Hooge R, Reyniers E, Bakker CE, Nagels G, De Boule K, Storm K, Clincke G, De Deyn PP, Oostra BA, Willems PJ. 1996. Transgenic mouse model for the fragile X syndrome. *Am J Med Genet*. 64:241–245.
- Kreis P, Thévenot E, Rousseau V, Boda B, Muller D, Barnier JV. 2007. The p21-activated kinase 3 implicated in mental retardation regulates spine morphogenesis through a Cdc42-dependent pathway. *J Biol Chem*. 282:21497–506.
- Kreis P, Rousseau V, Thévenot E, Combeau G, Barnier JV. 2008. The four mammalian splice variants encoded by the p21-activated kinase 3 gene have different biological properties. *J Neurochem*. 106:1184–97.
- Kreis P, Barnier JV. 2009. PAK signalling in neuronal physiology. *Cell Signal*. 21:384–93.
- Krens SF, Spaink HP, Snaar-Jagalska BE. 2006. Functions of the MAPK family in vertebrate-development. *FEBS Lett*. 580:4984–90.
- 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.
- Lafenetre P, Leske O, Wahle P, Heumann R. 2011. The beneficial effects of physical activity on impaired adult neurogenesis and cognitive performance. *Frontiers in neuroscience*. 5:5:51.
- Lanfranchi S, Jerman N O, Dal PE, Alberti A, Vianello R. 2010. Executive function in adolescents with Down Syndrome. *J Intellect Disabil Res*. 54:308–319.
- Laumonnier F, Bonnet-Brilhault F, Gomot M, Blanc R, David A, Moizard MP, Raynaud M, Ronce N, Lecomte E, Calvas P, Laudier B, Chelly J, Fryns JP, Ropers HH, Hamel BC, Andres C, Barthélémy C, Moraine C, Briault S. 2004. X-linked mental retardation and autism are associated with a mutation in the NLGN4 gene, a member of the neuroligin family. *Am J Hum Genet*. 74:552–7.
- Lazarov O, Demars MP, Zhao KDT, Ali HM, Grauzas V, Kney A, Larson J. 2012. Impaired survival of neural progenitor cells in dentate gyrus of adult mice lacking FMRP. *Hippocampus*. 22:1220–4.
- Leach PT, Hayes J, Pride M, Silverman JL, Crawley JN. 2016. Normal Performance of Fmr1 Mice on a Touchscreen Delayed Nonmatching to Position Working Memory Task. *eNeuro*. 15;3(1). 0143–15.2016.
- Leach PT, Crawley JN. 2017. Touchscreen learning deficits in Ube3a, Ts65Dn and Mecp2 mouse models of neurodevelopmental disorders with intellectual disabilities. *Genes Brain Behav*.
- 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.
- Leuner B, Mendolia-Loffredo S, Kozorovitskiy Y, Samburg D, Gould E, Shors TJ. 2004. Learning enhances the survival of new neurons beyond the time when the hippocampus is required for memory. *J Neurosci*. 24:7477–7481.
- Leuner B, Gould E, Shors TJ. 2006. Is there a link between adult neurogenesis and learning? *Hippocampus*. 16:216–224.
- Leutgeb JK, Moser EI. 2007. Enigmas of the dentate gyrus. *Neuron*. 55:176–8.
- Li W, Cui Y, Kushner SA, Brown RAM, Jentsch JD. 2005. The HMG-CoA reductase inhibitor lovastatin reverses the learning and attention deficits in a mouse model of neurofibromatosis type 1. *Curr Biol*. 15:1961–67.
- Lonetti G, Angelucci A, Morando L, Boggio EM, Giustetto M, Pizzorusso T. 2010. Early environmental enrichment moderates the behavioral and synaptic phenotype of MeCP2 null mice. *Biol Psychiatry*. 67:657–65.
- Lopez-Atalaya JP, Ciccarelli A, Viosca J, Valor LM, Jimenez-Minchan M, Canals S, Giustetto M, Barco A. 2011. CBP is required for environmental enrichment-induced neurogenesis and cognitive enhancement. *EMBO J*. 30:4287–98.

- Lopez-Atalaya JP, Barco A. 2014. Can changes in histone acetylation contribute to memory formation? *Trends Genet.* 30:529-39.
- Lowry RB, MacLean R, McLean DM, Tischler B. 1971. Cataracts, microcephaly, kyphosis, and limited joint movement in two siblings: a new syndrome. *J Pediatr.* 79:282-4.
- Lu L, Bao G, Chen H, Xia P, Fan X, Zhang J, Pei G, Ma L. 2003. Modification of hippocampal neurogenesis and neuroplasticity by social environments. *Exp Neurol.* 183:600–609.
- Lu D, Qu C, Goussev A, Jiang H, Lu C, Schallert T, Mahmood A, Chen J, Li Y, Chopp M. 2007. Statins increase neurogenesis in the dentate gyrus, reduce delayed neuronal death in the hippocampal CA3 region, and improve spatial learning in rat after traumatic brain injury. *J Neurotrauma.* 24:1132–1146.
- Lubs HA, Stevenson RE, Schwartz CE. 2012. Fragile X and X-linked intellectual disability: four decades of discovery. *Am J Hum Genet.* 90:579–90.
- Luo Y, Shan G, Guo W, Smrt RD, Johnson EB, Li X, Pfeiffer RL, Szulwach KE, Duan R, Barkho BZ, Li W, Liu C, Jin P, Zhao X. 2010. Fragile x mental retardation protein regulates proliferation and differentiation of adult neural stem/progenitor cells. *PLoS genetics.* 6:e1000898.
- Ma QL, Yang F, Frautschy SA, Cole GM. 2012. PAK in Alzheimer disease, Huntington disease and X-linked mental retardation. *Cell Logist.* 2:117-125.
- Macleod LS, Kogan CS, Collin CA, Berry-Kravis E, Messier C, Gandhi R. 2010. A comparative study of the performance of individuals with fragile X syndrome and *Fmr1* knockout mice on Hebb-Williams mazes. *Genes Brain Behav.* 9: 53–64.
- Madsen T, Kristjansen P, Bolwig T, Wortwein G. 2003. Arrested neuronal proliferation and impaired hippocampal function following fractionated brain irradiation in the adult rat. *Neuroscience.* 119:635–642.
- Magini P, Pippucci T, Tsai IC, Coppola S, Stellacci E, Bartoletti-Stella A, Turchetti D, Graziano C, Cenacchi G, Neri I, Cordelli DM, Marchiani V, Bergamaschi R, Gasparre G, Neri G, Mazzanti L, Patrizi A, Franzoni E, Romeo G, Bordo D, Tartaglia M, Katsanis N, Seri M. 2014. A mutation in *PAK3* with a dual molecular effect deregulates the RAS/MAPK pathway and drives an X-linked syndromic phenotype. *Hum Mol Genet.* 23:3607-17.
- Maglorius Renkilaraj MRL, Baudouin L, Wells CM, Doulazmi M, Wehrlé R, Cannaya V, Bachelin C, Barnier JV, Jia Z, Nait Oumesmar B, Dusart I, Bouslama-Oueghlani L. 2017. The intellectual disability protein *PAK3* regulates oligodendrocyte precursor cell differentiation. *Neurobiol Dis.* 98:137-148.
- Mah JK, Korngut L, Dykeman J, Day L, Pringsheim T, Jette N. 2014. A systematic review and meta-analysis on the epidemiology of Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Neuromuscular Disorders.* 24, 482–491.
- Mangan PA. 1992. Spatial memory abilities and abnormal development of the hippocampal formation in Down syndrome. Unpublished doctoral dissertation, university of Arizona, Tucson.
- Manser E, Chong C, Zhao ZS, Leung T, Michael G, Hall C, Lim L. 1995. Molecular cloning of a new member of the p21-Cdc42/Rac-activated kinase (PAK) family. *J Biol Chem.* 270:25070-8.
- Mardirossian S, Rampon C, Salvert D, Fort P, Sarda N. 2009. Impaired hippocampal plasticity and altered neurogenesis in adult *Ube3a* maternal deficient mouse model for Angelman syndrome. *Exp Neurol.* 220:341-8.
- Marín-Burgin A, Schinder AF. 2011. Requirement of adult-born neurons for hippocampus-dependent learning. *Behav Brain Res.* 227:391-9.
- Marín-Burgin A, Mongiat LA, Pardi MB, Schinder AF. 2012. Unique Processing During a Period of High Excitation/Inhibition Balance in Adult-Born Neurons *Science.* 335:1238–1242.
- Marr D. 1971. Simple memory: a theory for archicortex. *Phil Trans Roy Soc Lond.* B262, 23–81
10.1098/rstb.1971.0078
- Martinez-Canabal A, Akers KG, Josselyn SA, Frankland PW. 2012. Age-dependent effects of hippocampal neurogenesis suppression on spatial learning. *Hippocampus.* 23:66–74.

- McGreevy JW, Hakim CH, McIntosh Ma, Duan D. 2015. Animal models of Duchenne muscular dystrophy: from basic mechanisms to gene therapy. *Dis Mod & Mechanisms*. 8, 195–213.
- McHugh TJ, Jones MW, Quinn JJ, Balthasar N, Coppari R, Elmquist JK, Lowell BB, Faselow MS, Wilson M a, Tonegawa S. 2007. Dentate gyrus NMDA receptors mediate rapid pattern separation in the hippocampal network. *Science*. (80-) 317:94–99.
- McMichael G, Bainbridge MN, Haan E, Corbett M, Gardner A, Thompson S, van Bon BW, van Eyk CL, Broadbent J, Reynolds C, O'Callaghan ME, Nguyen LS, Adelson DL, Russo R, Jhangiani S, Doddapaneni H, Muzny DM, Gibbs RA, Gecz J, MacLennan AH. 2015. Whole-exome sequencing points to considerable genetic heterogeneity of cerebral palsy. *Mol Psychiatry*. 20 176-82.
- McNaughton BL, Barnes CA, Meltzer J, Sutherland RJ. 1989. Hippocampal granule cells are necessary for normal spatial learning but not for spatially-selective pyramidal cell discharge. *Exp Brain Res*. 76:485-96.
- McPhie DL, Coopersmith R, Hines-Peralta A, Chen Y, Ivins KJ, Manly SP, Kozlowski MR, Neve KA, Neve RL. 2003. DNA synthesis and neuronal apoptosis caused by familial Alzheimer disease mutants of the amyloid precursor protein are mediated by the p21 activated kinase PAK3. *J Neurosci*. 23:6914-27.
- Mehmood T, Schneider A, Sibille J, Marques Pereira P, Pannetier S, Ammar MR, Dembele D, Thibault-Carpentier C, Rouach N, Hanauer A. 2011. Transcriptome profile reveals AMPA receptor dysfunction in the hippocampus of the Rsk2-knockout mice, an animal model of Coffin-Lowry syndrome. *Hum. Genet*. 129, 255-269.
- Mehmood T, Schneider A, Pannetier S, Hanauer A. 2013. Rsk2 Knockdown in PC12 Cells Results in Sp1 Dependent Increased Expression of the Gria2 Gene, Encoding the AMPA Receptor Subunit GluR2. *Int J Mol Sci*. 14:3358-75.
- Mencarelli MA, Spanhol-Rosseto A, Artuso R, Rondinella D, De Filippis R, Bahi-Buisson N, Nectoux J, Rubinsztajn R, Bienvenu T, Moncla A, Chabrol B, Villard L, Krumina Z, Armstrong J, Roche A, Pineda M, Gak E, Mari F, Ariani F, Renieri A. 2010. Novel FOXG1 mutations associated with the congenital variant of Rett syndrome. *J Med Genet*. 47:49-53.
- Meng Y, Zhang Y, Tregoubov V, Janus C, Cruz L, Jackson M, Lu WY, MacDonald JF, Wang JY, Falls DL, Jia Z. 2002. Abnormal spine morphology and enhanced LTP in LIMK-1 knockout mice. *Neuron*. 35:121-33.
- Meng J, Meng Y, Hanna A, Janus C, Jia Z. 2005. Abnormal long-lasting synaptic plasticity and cognition in mice lacking the mental retardation gene Pak3. *J Neurosci*. 25:6641-50.
- Menghini D, Finzi A, Benassi M, Bolzani R, Facoetti A, Giovagnoli S. 2010. Different underlying neurocognitive deficits in developmental dyslexia: a comparative study. *Neuropsychologia*. 48, 863–872.
- Merienne K, Pannetier S, Harel-Bellan A, Sassone-Corsi P. 2001. Mitogen-regulated RSK2-CBP interaction controls their kinase and acetylase activities. *Mol Cell Biol*. 21:7089-96.
- Merrill DA, Karim R, Darraq M, Chiba AA, Tuszyński MH. 2003. Hippocampal cell genesis does not correlate with spatial learning ability in aged rats. *J Comp Neurol*. 459:201–207.
- Meshi D, Drew MR, Saxe M, Ansoorge 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.
- Migaud M, Batailler M, Segura S, Duittoz A, Franceschini I, Pilon D. 2010. Emerging new sites for adult neurogenesis in the mammalian brain: A comparative study between the hypothalamus and the classical neurogenic zones. *Eur J Neurosci*. 32:2042–2052.
- Mineur YS, Sluyter F, de Wit S, Oostra BA, Crusio WE. 2002. Behavioral and neuroanatomical characterization of the Fmr1 knockout mouse. *Hippocampus*. 12:39-46.
- Ming G-L, Song H. 2005. Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. *Annu Rev Neurosci*. 28:223–250.
- Ming G-L, Song H. 2011. Adult neurogenesis in the Mammalian brain: significant answers and significant questions. *Neuron*. 70:687–702.

- Miranda R, Nudel U, Laroche S, Vaillend C. 2011. Altered presynaptic ultrastructure in excitatory hippocampal synapses of mice lacking dystrophins Dp427 or Dp71. *Neurobiol Dis.* 43:134-41.
- Mirescu C, Gould E. 2006. Stress and adult neurogenesis. *Hippocampus.* 16:233-8.
- Mohapel P, Mundt-Petersen K, Brundin P, Frielingsdorf H. 2006. Working memory training decreases hippocampal neurogenesis. *Neuroscience.* 142:609–613.
- Mongiat LA, Espósito MS, Lombardi G, Schinder AF. 2009. Reliable activation of immature neurons in the adult hippocampus. *PLoS One.* 4:e5320.
- Mongiat LA, Schinder AF. 2011. Adult neurogenesis and the plasticity of the dentate gyrus network. *Eur J Neurosci.* 33:1055–1061.
- Moon HM, Wynshaw-Boris A. 2013. Cytoskeleton in action: lissencephaly, a neuronal migration disorder. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol.* 2:229-45.
- Moretti P, Levenson JM, Battaglia F, Atkinson R, Teague R, Antalffy B, Armstrong D, Arancio O, Sweatt JD, Zoghbi HY. 2006. Learning and memory and synaptic plasticity are impaired in a mouse model of Rett syndrome. *J Neurosci.* 26:319-27.
- Morice E, Farley S, Poirier R, Dallerac G, Chagneau C, Pannetier S, Hanauer A, Davis S, Vaillend C, Laroche S. 2013. Defective synaptic transmission and structure in the dentate gyrus and selective fear memory impairment in the Rsk2 mutant mouse model of Coffin-Lowry syndrome. *Neurobiol Dis.* 58:156-68.
- Morris RG, Frey U. 1997. Hippocampal synaptic plasticity: role in spatial learning or the automatic recording of attended experience? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 352:1489-503.
- Morris AM, Churchwell JC, Kesner RP, Gilbert PE. 2012. Selective lesions of the dentate gyrus produce disruptions in place learning for adjacent spatial locations. *Neurobiol Learn Mem.* 97:326–331.
- Moser M-B, Moser EI. 1998. Functional differentiation in the hippocampus. *Hippocampus.* 8:608–619.
- Moser HW. 2004. Genetic causes of mental retardation. *Ann NY Acad Sci.* 1038:44-8.
- Mu Y, Lee SW, Gage FH. 2010. Signaling in adult neurogenesis. *Curr Opin Neurobiol.* 20:416–423.
- Nakashiba T, Cushman JD, Pelkey KA, Renaudineau S, Buhl DL, McHugh TJ, Barrera VR, 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.
- Nanry KP, Mundy WR, Tilson HA. 1989. Colchicine-induced alterations of reference memory in rats: role of spatial versus non-spatial task components. *Behav Brain Res.* 35:45-53.
- Newbern J, Zhong J, Wickramasinghe RS, Li X, Wu Y, Samuels I, Cherosky N, Karlo JC, O'Loughlin B, Wikenheiser J, Garghesha M, Doughman YQ, Charron J, Ginty DD, Watanabe M, Saitta SC, Snider WD, Landreth GE. 2008. Mouse and human phenotypes indicate a critical conserved role for ERK2 signaling in neural crest development. *Proc Natl Acad Sci USA.* 105:17115-20.
- Ng MC, Yang YL, Lu KT. 2013. Behavioral and synaptic circuit features in a zebrafish model of fragile X syndrome. *PLoS One.* 8:e51456.
- Nicchia GP, Rossi A, Nudel U, Svelto M, Frigeri A. 2008. Dystrophin-dependent and -independent AQP4 pools are expressed in the mouse brain. *Glia.* 56:869-76.
- Nico B, Paola Nicchia G, Frigeri A, Corsi P, Mangieri D, Ribatti D, Svelto M, Roncali L. 2004. Altered blood-brain barrier development in dystrophic MDX mice. *Neuroscience.* 125, 921–935.
- Nithianantharajah J, Hannan AJ. 2006. Enriched environments, experience-dependent plasticity and disorders of the nervous system. *Nature reviews. Neuroscience.* 7:697–709.
- Nottebohm F. 2002. Neuronal replacement in adult brain. *Brain Res Bull.* 57:737–749.
- O'Hearn K, Landau B, Hoffman J. 2005. Multiple object tracking in people with Williams syndrome and in normally developing children. *Psychol. Sci* In press.
- Oeseburg B, Dijkstra GJ, Groothoff JW, Reijneveld SA, Jansen DE. 2011. Prevalence of chronic health conditions in children with intellectual disability: a systematic literature review. 49:59-85.

- Ogryzko VV, Schiltz RL, Russanova V, Howard BH, Nakatani Y. 1996. The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases. *Cell*. 87:953-9.
- Olariu A, Cleaver KM, Shore LE, Brewer MD, Cameron HA. 2005. A natural form of learning can increase and decrease the survival of new neurons in the dentate gyrus. *Hippocampus*. 15:750-62.
- Ong WY, Wang XS, Manser E. 2002. Differential distribution of alpha and beta isoforms of p21-activated kinase in the monkey cerebral neocortex and hippocampus. *Exp Brain Res*. 144:189-99.
- Overstreet-Wadiche LS, Bromberg DA, Bensen AL, Westbrook GL. 2005. GABAergic signaling to newborn neurons in dentate gyrus. *J Neurophysiol*. 94:4528-4532.
- Palmer A, Gavin AC, Nebreda AR. 1998. A link between MAP kinase and p34(cdc2)/cyclin B during oocyte maturation: p90(rsk) phosphorylates and inactivates the p34(cdc2) inhibitory kinase Myt1. *EMBO J*. 17:5037-47.
- Paradee W, Melikian HE, Rasmussen DL, Kenneson A, Conn PJ, Warren ST. 1999. Fragile X mouse: strain effects of knockout phenotype and evidence suggesting deficient amygdala function. *Neuroscience*. 94:185-92.
- Park YY, Nam HJ, Do M, Lee JH. 2016. The p90 ribosomal S6 kinase 2 specifically affects mitotic progression by regulating the basal level, distribution and stability of mitotic spindles. *Exp Mol Med*. 48:e250.
- Patzlaff NE, Nemecek KM, Malone SG, Li Y, Zhao X. 2017. Fragile X related protein 1 (FXR1P) regulates proliferation of adult neural stem cells. *Hum Mol Genet*. 26:1340-1352.
- Pavlovsky A, Chelly J, Billuart P. 2012. Emerging major synaptic signaling pathways involved in intellectual disability. *Mol Psychiatry*. 17:682-93.
- Peier AM, McIlwain KL, Kenneson A, Warren ST, Paylor R, Nelson DL. 2000. (Over) correction of FMR1 deficiency with YAC transgenics: behavioral and physical features. *Hum Mol Genet*. 9, 1145–1159.
- Peippo M, Koivisto AM, Särkämö T, Sipponen M, von Koskull H, Ylisaukko-oja T, Rehnström K, Froyen G, Ignatius J, Järvelä I. 2007. PAK3 related mental disability: further characterization of the phenotype. *Am J Med Genet A*. 143A:2406-16.
- Pelka GJ, Watson CM, Radziewicz T, Hayward M, Lahooti H, Christodoulou J, Tam PP. 2006. Mecp2 deficiency is associated with learning and cognitive deficits and altered gene activity in the hippocampal region of mice. *Brain*. 129:887-98.
- Penn AC, Zhang CL, Georges F, Royer L, Breillat C, Hosy E, Petersen JD, Humeau Y, Choquet D. 2017. Hippocampal LTP and contextual learning require surface diffusion of AMPA receptors. *Nature*. 549:384-388.
- Pereira PM, Schneider A, Pannetier S, Heron D, Hanauer A. 2010. Coffin-Lowry syndrome. *Eur J Hum Genet*. 18:627-33.
- Perronnet C, Vaillend C. 2010. Dystrophins, utrophins, and associated scaffolding complexes: role in mammalian brain and implications for therapeutic strategies. *J Biomed Biotechnol*. 849426.
- Phillips M, Pozzo-Miller L. 2015. Dendritic spine dysgenesis in autism related disorders. *Neurosci Lett*. 601:30-40.
- Pieretti M, Zhang FP, Fu YH, Warren ST, Oostra BA, Caskey CT, Nelson DL. 1991. Absence of expression of the FMR-1 gene in fragile X syndrome. *Cell*. 66:817-22.
- Poirier R, Jacquot S, Vaillend C, Souththiphong AA, Libbey M, Davis S, Laroche S, Hanauer A, Welzl H, Lipp HP, Wolfer DP. 2007. Deletion of the Coffin-Lowry syndrome gene Rsk2 in mice is associated with impaired spatial learning and reduced control of exploratory behavior. *Behavior genetics*. 37:31–50.
- Pons-Espinal M, De Lagran MM, Dierssen M. 2013. Functional implications of hippocampal adult neurogenesis in intellectual disabilities. *Amino acids*. 45:113-31.
- Purpura DP. 1974. Dendritic spine 'dysgenesis' and mental retardation. *Science*. 186: 1126–1128.
- 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. *Radiat Res*. 162:39–47.

- Ramos-Brossier M, Montani C, Lebrun N, Gritti L, Martin C, Seminatore-Nole C, Toussaint A, Moreno S, Poirier K, Dorseuil O, Chelly J, Hackett A, Gecz J, Bieth E, Faudet A, Heron D, Frank Kooy R, Loeys B, Humeau Y, Sala C, Billuart P. 2015. Novel IL1RAPL1 mutations associated with intellectual disability impair synaptogenesis. *Hum Mol Genet.* 24:1106-18.
- Rampon C, Jiang CH, Dong H, Tang YP, Lockhart DJ, Schultz PG, Tsien JZ, Hu Y. 2000. Effects of environmental enrichment on gene expression in the brain. *Proc Natl Acad Sci USA.* 7;97:12880-4.
- Rapaport D, Passos-Bueno MR, Takata RI, Campiotto S, Eggers S, Vainzof M, Makover A, Nudel U, Yaffe D, Zatz M. 1992. A deletion including the brain promoter of the Duchenne muscular dystrophy gene is not associated with mental retardation. *Neuromuscular Disord.* 2, 117–120.
- Rejeb I, Saillour Y, Castelnau L, Julien C, Bienvenu T, Taga P, Chaabouni H, Chelly J, Ben Jemaa L, Bahi-Buisson N. 2008. A novel splice mutation in PAK3 gene underlying mental retardation with neuropsychiatric features. *Eur J Hum Genet.* 16:1358-63.
- Restivo L, Ferrari F, Passino E, Sgobio C, Bock J, Oostra BA, Bagni C, Ammassari-Teule M. 2005. Enriched environment promotes behavioral and morphological recovery in a mouse model for the fragile X syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA.* 102:11557-62.
- Rola R, Raber J, Rizk A, Otsuka S, Vandenberg SR, Morhardt DR, Fike JR. 2004. Radiation-induced impairment of hippocampal neurogenesis is associated with cognitive deficits in young mice. *Exp Neurol.* 188:316–330.
- Rolls ET. 2013. The mechanisms for pattern completion and pattern separation in the hippocampus. *Front Syst Neurosci.* 7:74.
- Romeo Y, Zhang X, Roux PP. 2012. Regulation and function of the RSK family of protein kinases. *The Biochem J.* 441:553–69.
- Ropers HH, Hamel BCJ. 2005. X-linked mental retardation. *Nature reviews. Genetics.* 6:46–57.
- Ropers HH. 2010. Genetics of early onset cognitive impairment. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 11:161-87.
- Rosenzweig MR, Bennett EL. 1996. Psychobiology of plasticity: effects of training and experience on brain and behavior. *Behav Brain Res.* 78:57-65.
- Rousseau V, Goupille O, Morin N, Barnier JV. 2003. A new constitutively active brain PAK3 isoform displays modified specificities toward Rac and Cdc42 GTPases. *J Biol Chem.* 278:3912-20.
- 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.
- Saint Martín A, Aragón J, Depardon-Benítez F, Sánchez-Trujillo A, Mendoza-Hernández G, Ceja V, Montañez C. 2012. Identification of Dp71e, a new dystrophin with a novel carboxy-terminal end. *FEBS J.* 279:66-77.
- Sale A, Berardi, N, Maffei L. 2014. Environment and brain plasticity: towards an endogenous pharmacotherapy. *Physiological reviews.* 94:189-234.
- Samuels IS, Saitta SC, Landreth GE. 2009. MAP'ing CNS development and cognition: an ERKsome process. *Neuron.* 61:160–167.
- San Martín A, Pagani MR. 2014. Understanding intellectual disability through RASopathies. *J Physiol Paris.* 108:232-9.
- Sandoval CJ, Martínez-Claros M, Bello-Medina PC, Pérez O, Ramírez-Amaya V. 2011. When are new hippocampal neurons, born in the adult brain, integrated into the network that processes spatial information? *PLoS One.* 6:e17689.
- Sarig R, Mezger-Lallemand V, Gitelman I, Davis C, Fuchs O, Yaffe D, Nudel U. 1999. Targeted inactivation of Dp71, the major non-muscle product of the DMD gene: differential activity of the Dp71 promoter during development. *Hum Mol Genet.* 8:1-10.
- Sassone-Corsi P, Mizzen CA, Cheung P, Crosio C, Monaco L, Jacquot S, Hanauer A, Allis CD. 1999. Requirement of Rsk-2 for epidermal growth factor-activated phosphorylation of histone H3. *Science.* 285:886-91.

- Satoh Y, Kobayashi Y, Takeuchi A, Pagès G, Pouysségur J, Kazama T. 2011. Deletion of ERK1 and ERK2 in the CNS causes cortical abnormalities and neonatal lethality: Erk1 deficiency enhances the impairment of neurogenesis in Erk2-deficient mice. *J Neurosci.* 31:1149-55.
- Sawicka K, Pyronneau A, Chao M, Bennett MV, Zukin RS. 2016. Elevated ERK/p90 ribosomal S6 kinase activity underlies audiogenic seizure susceptibility in fragile X mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 113:E6290-E6297.
- Saxe MD, Battaglia F, Wang J-W, Malleret G, David DJ, Monckton JE, Garcia a DR, Sofroniew M V, 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.
- Saxe MD, Malleret G, Vronskaya S, Mendez I, Garcia AD, Sofroniew M V, Kandel ER, Hen R. 2007. Paradoxical influence of hippocampal neurogenesis on working memory. *Proc Natl Acad Sci USA.* 104:4642–4646.
- Schalock RL, Verdugo MA, Gomez LE. 2011. Evidence-based practices in the field of intellectual and developmental disabilities: an international consensus approach. *Eval Program Plann.* 34:273-82.
- Schmidt-Hieber C, Jonas P, Bischofberger J. 2004. Enhanced synaptic plasticity in newly generated granule cells of the adult hippocampus. *Nature.* 429:184-7.
- Schmidt HD, Duman RS. 2007. The role of neurotrophic factors in adult hippocampal neurogenesis, antidepressant treatments and animal models of depressive-like behavior. *Behav Pharmacol.* 18:391–418.
- Schneider A, Mehmood T, Pannetier S, Hanauer A. 2011. Altered ERK/MAPK signaling in the hippocampus of the *mrsk2_KO* mouse model of Coffin-Lowry syndrome. *J Neurochem.* 119:447-59.
- Schreiber J, Grimbergen LA, Overwater I, Vaart TV, Stedehouder J, Schuhmacher AJ, Guerra C, Kushner SA, Jaarsma D, Elgersma Y. 2017. Mechanisms underlying cognitive deficits in a mouse model for Costello Syndrome are distinct from other RASopathy mouse models. *Sci Rep.* 28;7:1256.
- Seri B, Alvarez-Buylla A. 2002. Neural stem cells and the regulation of neurogenesis in the adult hippocampus. *Clin Neurosci Res.* 2:11-16.
- Shen L, Nam HS, Song P, Moore H, Anderson SA. 2006. FoxG1 haploinsufficiency results in impaired neurogenesis in the postnatal hippocampus and contextual memory deficits. *Hippocampus.* 16:875–90.
- 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.
- Shors TJ, Anderson ML, Curlik DM 2nd, Nokia MS. 2012. Use it or lose it: how neurogenesis keeps the brain fit for learning. *Behav Brain Res.* 227:450-8.
- Smrt RD, Eaves-Egenes J, Barkho BZ, Santistevan NJ, Zhao C, Aimone JB, Gage FH, Zhao X. 2007. *Mecp2* deficiency leads to delayed maturation and altered gene expression in hippocampal neurons. *Neurobiology of disease.* 27:77–89.
- Smrt RD, Zhao X. 2010. Epigenetic regulation of neuronal dendrite and dendritic spine development. *Front Biol (Beijing).* 5: 304–323.
- Snyder JS, Hong NS, McDonald RJ, Wojtowicz JM. 2005. A role for adult neurogenesis in spatial long-term memory. *Neuroscience.* 130:843–852.
- Snyder JS. 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.
- Souopgui J, Sölter M, Pieler T. 2002. XPA3 promotes cell cycle withdrawal during primary neurogenesis in *Xenopus laevis*. *EMBO J.* 21:6429-39.
- Spalding KL, Bergmann O, Alkass K, Bernard S, Salehpour M, Huttner HB, Boström E, Westerlund I, Vial C, Buchholz B a, Possnert G, Mash DC, Druid H, Frisén J. 2013. Dynamics of hippocampal neurogenesis in adult humans. *Cell.* 153:1219–1227.

- Stagni F, Giacomini A, Guidi S, Ciani E, Ragazzi E, Filonzi M, De lasio R, Rimondini R, Bartesaghi R. 2015. Long-term effects of neonatal treatment with fluoxetine on cognitive performance in Ts65Dn mice. *Neurobiol Dis.* 74:204-18.
- Steiner B, Kronenberg G, Jessberger S, Brandt MD, Reuter K, Kempermann G. 2004. Differential regulation of gliogenesis in the context of adult hippocampal neurogenesis in mice. *Glia.* 46:41–52.
- Stone SSD, Teixeira CM, Zaslavsky K, Wheeler AL, Martinez-Canabal A, Wang A, Sakaguchi M, Lozano AM, Frankland PW. 2011. Functional convergence of developmentally and adult-generated granule cells in dentate gyrus circuits supporting hippocampus-dependent memory. *Hippocampus.* 21:1348–1362.
- Sun J, Sun J, Ming GL, Song H. 2011. Epigenetic regulation of neurogenesis in the adult mammalian brain. *Eur J Neurosci.* 33:1087–1093.
- Sutherland C, Leighton IA, Cohen P. 1993. Inactivation of glycogen synthase kinase- 3 beta by phosphorylation: new kinase connections in insulin and growth-factor signalling. *Biochem J.* 15–9.
- Sutherland RJ, Whishaw IQ, Kolb B. 1983. A behavioural analysis of spatial localization following electrolytic, kainate- or colchicine-induced damage to the hippocampal formation in the rat. *Behav Brain Res.* 7:133-53.
- Szabó A, Jancsik V, Mornet D, Kálmán M. 2004. Immunofluorescence mapping of dystrophin in the rat brain: astrocytes contain the splice variant Dp71f, but this is confined to subpopulations. *Anat Embryol (Berl).* 208:463-77.
- Szulwach KE, Li X, Smrt RD, Li Y, Luo Y, Lin L, Santistevan NJ, Li W, Zhao X, Jin P. 2010. Cross talk between microRNA and epigenetic regulation in adult neurogenesis. *J Cell Biol.* 189:127–141.
- Tadayoni R, Rendon A, Soria-Jasso LE, Cisneros B. 2012. Dystrophin Dp71: the smallest but multifunctional product of the Duchenne muscular dystrophy gene. *Mol Neurobiol.* 45:43-60.
- Takashima S, Becker LE, Armstrong DL, Chan F. 1981. Abnormal neuronal development in the visual cortex of the human fetus and infant with down's syndrome. A quantitative and qualitative Golgi study. *Brain Res.* 225:1-21.
- Tan Y, Ruan H, Demeter MR, Comb MJ. 1999. p90RSK Blocks Bad-mediated Cell Death via a Protein Kinase C-dependent Pathway. *J Biol Chem.* 274:34859–34867.
- Tarpey PS, Smith R, Pleasance E, Whibley A, Edkins S, Hardy C, O'Meara S, Latimer C, Dicks E, Menzies A, Stephens P, Blow M, Greenman C, Xue Y, Tyler-Smith C, Thompson D, Gray K, Andrews J, Barthorpe S, Buck G, Cole J, Dunmore R, Jones D, Maddison M, Mironenko T, Turner R, Turrell K, Varian J, West S, Widaa S, Wray P, Teague J, Butler A, Jenkinson A, Jia M, Richardson D, Shepherd R, Wooster R, Tejada MI, Martinez F, Carvill G, Goliath R, de Brouwer AP, van Bokhoven H, Van Esch H, Chelly J, Raynaud M, Ropers HH, Abidi FE, Srivastava AK, Cox J, Luo Y, Mallya U, Moon J, Parnau J, Mohammed S, Tolmie JL, Shoubridge C, Corbett M, Gardner A, Haan E, Rujirabanjerd S, Shaw M, Vandeleur L, Fullston T, Easton DF, Boyle J, Partington M, Hackett A, Field M, Skinner C, Stevenson RE, Bobrow M, Turner G, Schwartz CE, Gecz J, Raymond FL, Futreal PA, Stratton MR. 2009. A systematic, large-scale resequencing screen of X-chromosome coding exons in mental retardation. *Nat Genet.* 41:535-43.
- Tashiro A, Makino H, Gage FH. 2007. Experience-specific functional modification of the dentate gyrus through adult neurogenesis: a critical period during an immature stage. *J Neurosci.* 27:3252–3259.
- Teo M, Manser E, Lim L. 1995. Identification and molecular cloning of a p21cdc42/rac1-activated serine/threonine kinase that is rapidly activated by thrombin in platelets. *J Biol Chem.* 270:26690-7.
- Tervonen TA, Louhivuori V, Sun X, Hokkanen ME, Kratochwil CF, Zebryk P, Castren E, Castren ML. 2009. Aberrant differentiation of glutamatergic cells in neocortex of mouse model for fragile X syndrome. *Neurobiol Dis.* 33:250–259.
- Thibaut JP, Fayasse M. 2009. Approche neuropsychologique du syndrome de Williams. Aspects visuo-spatiaux. In M. Poncelet, S. Majerus, & M. Van der Linden (Eds), *Traité de neuropsychologie de l'enfant*. Marseille, France: Solal.

- Thomas GM, Huganir RL. 2004. MAPK cascade signalling and synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci.* 5:173-83.
- Tian C, Gong Y, Yang Y, Shen W, Wang, K, Liu J, Xu B, Zhao J, Zhao C. 2012. Foxg1 has an essential role in postnatal development of the dentate gyrus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience.* 32:2931-49.
- Tian Y, Yang C, Shang S, Cai Y, Deng X, Zhang J, Shao F, Zhu D, Liu Y, Chen G, Liang J, Sun Q, Qiu Z, Zhang C. 2017. Loss of FMRP Impaired Hippocampal Long-Term Plasticity and Spatial Learning in Rats. *Front Mol Neurosci.* 10:269.
- Tokarz SA, Duncan NM, Rash SM, Sadeghi A, Dewan AK, Pillers DA. 1998. Redefinition of dystrophin isoform distribution in mouse tissue by RT-PCR implies role in nonmuscle manifestations of duchenne muscular dystrophy. *Mol Genet Metab.* 65:272-81.
- 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.
- Toni N, Sultan S. 2011. Synapse formation on adult-born hippocampal neurons. *Eur J Neurosci.* 33:1062-1068.
- Tozawa T, Itoh K, Yaoi T, Tando S, Umekage M, Dai H, Hosoi H, Fushiki S. 2012. The shortest isoform of dystrophin (Dp40) interacts with a group of presynaptic proteins to form a presumptive novel complex in the mouse brain. *Mol Neurobiol.* 45:287-97.
- Treves A, Tashiro A, Witter MP, Moser EI. 2008. What is the mammalian dentate gyrus good for? *Neuroscience.* 154, 1155-1172.
- Trivier E, De Cesare D, Jacquot S, Pannetier S, Zackai E, Young I, Mandel JL, Sassone-Corsi P, Hanauer A. 1996. Mutations in the kinase Rsk-2 associated with Coffin-Lowry syndrome. *Nature.* 384:567-70.
- Tronel S, Belnoue L, Grosjean N, Revest JM, Piazza PV, Koehl M, Abrous DN. 2012. Adult-born neurons are necessary for extended contextual discrimination. *Hippocampus.* 22:292-8.
- Tronel S, Charrier V, Sage C, Maitre M, Leste-Lasserre T, Abrous DN. 2015. Adult-born dentate neurons are recruited in both spatial memory encoding and retrieval. *Hippocampus.* 25:1472-9.
- Trouche S, Bontempi B, Rouillet P, Rampon C. 2009. Recruitment of adult-generated neurons into functional hippocampal networks contributes to updating and strengthening of spatial memory. *Proc Natl Acad Sci USA.* 106:5919-5924.
- Tsujimura K, Abematsu M, Kohyama J, Namihira M, Nakashima K. 2009. Neuronal differentiation of neural precursor cells is promoted by the methyl-CpG-binding protein MeCP2. *Exp Neurol.* 219:104-111.
- Tzschach A, Grasshoff U, Beck-Woedl S, Dufke C, Bauer C, Kehrer M, Evers C, Moog U, Oehl-Jaschkowitz B, Di Donato N, Maiwald R, Jung C, Kuechler A, Schulz S, Meinecke P, Spranger S, Kohlhase J, Seidel J, Reif S, Rieger M, Riess A, Sturm M, Bickmann J, Schroeder C, Dufke A, Riess O, Bauer P. 2015. Next-generation sequencing in X-linked intellectual disability *Eur J Hum Genet.* 23: 1513-1518.
- Urbán N, Guillemot F. 2014. Neurogenesis in the embryonic and adult brain: same regulators, different roles. *Front Cell Neurosci.* 8:396.
- Uutela M, Lindholm J, Louhivuori V, Wei H, Louhivuori LM, Per-tovaara A, Akerman K, Castrén E, Castrén ML. 2012. Reduction of BDNF expression in Fmr1 knockout mice worsens cognitive deficits but improves hyperactivity and sensorimotor deficits. *Genes Brain Behav.* 11:513-523.
- Vahid-Ansari F, Albert PR. 2017. Chronic Fluoxetine Induces Activity Changes in Recovery From Poststroke Anxiety, Depression, and Cognitive Impairment. *Neurotherapeutics.*
- Vaillend C, Billard JM, Claudepierre T, Rendon A, Dutar P, Ungerer A. 1998. Spatial discrimination learning and CA1 hippocampal synaptic plasticity in mdx and mdx3cv mice lacking dystrophin gene products. *Neuroscience.* 86, 53-66.
- Vaillend C, Poirier R, Laroche S. 2008. Genes, plasticity and mental retardation. *Behavioural brain research.* 192:88-105.

- van Bokhoven H. 2011. Genetic and epigenetic networks in intellectual disabilities. *Annu Rev Genet.* 45:81-104.
- van Hagen BT, van Goethem NP, Lagatta DC, Prickaerts J. 2015. The object pattern separation (OPS) task: a behavioral paradigm derived from the object recognition task. *Behav Brain Res.* 285:44-52.
- 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.
- Verkerk AJ, Pieretti M, Sutcliffe JS, Fu YH, Kuhl DP, Pizzuti A, Reiner O, Richards S, Victoria MF, Zhang FP. 1991. Identification of a gene (FMR-1) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome. *Cell.* 65(5):905-14.
- Veyrac A, Gros A, Bruel-jungerman E, Rochefort C, Borgmann FBK, Jessberger S, Laroche S. 2013. Zif268/egr1 gene controls the selection, maturation and functional integration of adult hippocampal newborn neurons by learning. *Proc Natl Acad Sci.* 110:7062–7067.
- Vicari S. 2001. Implicit versus explicit memory function in children with Down and Williams syndrome. *Downs Syndr Res Pract.* 7:35-40.
- Vicari S, Bellucci S, Carlesimo GA. 2005. Visual and spatial long-term memory: differential pattern of impairments in Williams and Down syndromes. *Dev Med Child Neurol.* 47:305-11.
- Villarreal-Silva M, Suárez-Sánchez R, Rodríguez-Muñoz R, Mornet D, Cisneros B. 2010. Dystrophin Dp71 is critical for stability of the DAPs in the nucleus of PC12 cells. *Neurochem Res.* 35:366-73.
- Vissers LE, Gilissen C, Veltman JA. 2015. Genetic studies in intellectual disability and related disorders. *Nat Rev Genet.* 17:9-18.
- von Bohlen, Halbach O. 2007. Immunohistological markers for staging neurogenesis in adult hippocampus. *Cell Tissue Res.* 329:409-20.
- Waddell J, Shors TJ. 2008. Neurogenesis, learning and associative strength. *Eur J Neurosci.* 27:3020-8.
- Waddell J, Anderson ML, Shors TJ. 2011. Changing the rate and hippocampal dependence of trace eyeblink conditioning: Slow learning enhances survival of new neurons *Neurobiol Learn Mem.* 95: 159–165.
- Wang R, Jung SY, Wu CF, Qin J, Kobayashi R, Gallick GE, Kuang J. 2010. Direct roles of the signaling kinase RSK2 in Cdc25C activation during *Xenopus* oocyte maturation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 107, 19885-19890.
- Wang X, Snape M, Klann E, Stone JG, Singh A, Petersen RB, Castellani RJ, Casadesus G, Smith MA, Zhu X. 2012. Activation of the extracellular signal-regulated kinase pathway contributes to the behavioral deficit of fragile x-syndrome. *J Neurochem.* 121:672-9.
- Weiler IJ, Irwin SA, Klintsova AY, Spencer CM, Brazelton AD, Miyashiro K, Comery TA, Patel B, Eberwine J, Greenough WT. 1997. Fragile X mental retardation protein is translated near synapses in response to neurotransmitter activation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 94:5395-400.
- Weisz VI, Argibay PF. 2012. Neurogenesis interferes with the retrieval of remote memories: forgetting in neurocomputational terms. *Cognition.* 125:13-25.
- Wenar C, Kerig P. 2006. *Developmental psychopathology: From infancy through adolescence (5th ed.).* New York: McGraw-Hill.
- Winocur G, Becker S, Luu P, Rosenzweig S, Wojtowicz JM. 2012. Adult hippocampal neurogenesis and memory interference. *Behav Brain Res.* 227:464-9.
- Wiskott L, Rasch MJ, Kempermann G. 2006. A functional hypothesis for adult hippocampal neurogenesis: avoidance of catastrophic interference in the dentate gyrus. *Hippocampus.* 16:329-43.
- Wisniewski KE, Segan SM, Miezieski CM, Sersen EA, Rudelli RD. 1991. The Fra(X) syndrome: neurological, electrophysiological, and neuropathological abnormalities. *Am J Med Genet.* 38:476-80.
- Witter MP. 2007. The perforant path: projections from the entorhinal cortex to the dentate gyrus. *Prog Brain Res.* 163:43-61.

- Wixted JT. 2007. Forgetting: it's not just the opposite of remembering. In *Science of Memory: Concepts* (Roediger, H.L. et al., eds). Oxford University Press. 329–338.
- Wong EV, Schaefer AW, Landreth G, Lemmon V. 1996. Involvement of p90^{rsk} in neurite outgrowth mediated by the cell adhesion molecule L1. *J Biol Chem.* 271:18217-23.
- Wood MA, Kaplan MP, Park A, Blanchard EJ, Oliveira AM, Lombardi TL, Abel T. 2005. Transgenic mice expressing a truncated form of CREB-binding protein (CBP) exhibit deficits in hippocampal synaptic plasticity and memory storage. *Learn Mem.* 12:111-9.
- Xu Z, Li J, Zhang F, Wu Y, Gao Y, Liang J, Zhang C. 2011. Working memory task decreases the survival of newly born neurons in hippocampus. *Neurobiol Learn Mem.* 95:239–247.
- Yang N, Higuchi O, Ohashi K, Nagata K, Wada A, Kangawa K, Nishida E, Mizuno K. 1998. Cofilin phosphorylation by LIM-kinase 1 and its role in Rac-mediated actin reorganization. *Nature.* 393:809-12.
- Yang X, Matsuda K, Bialek P, Jacquot S, Masuoka HC, Schinke T, Li L, Brancorsini S, Sassone-Corsi P, Townes TM, Hanauer A, Karsenty G. 2004. ATF4 is a substrate of RSK2 and an essential regulator of osteoblast biology ; implication for Coffin-Lowry Syndrome. *Cell.* 117:387-98
- Yassa MA, Stark CEL. 2011. Pattern separation in the hippocampus. *Trends Neurosci.* 34:515–525.
- Young JI, Zoghbi HY. 2004. X-chromosome inactivation patterns are unbalanced and affect the phenotypic outcome in a mouse model of rett syndrome. *Am J Hum Genet.* 74:511-20.
- Yu TS, Tensaouti Y, Bagha ZM, Davidson R, Kim A, Kernie SG. 2017. Adult newborn neurons interfere with fear discrimination in a protocol-dependent manner. *Brain Behav.* 7:e00796.
- Zeniou M, Ding T, Trivier E, Hanauer A. 2002. Expression analysis of RSK gene family members: the RSK2 gene, mutated in Coffin-Lowry syndrome, is prominently expressed in brain structures essential for cognitive function and learning. *Hum Mol Genet.* 11:2929-40.
- Zeniou M, Gattoni R, Hanauer A, Stévenin J. 2004. Delineation of the mechanisms of aberrant splicing caused by two unusual intronic mutations in the RSK2 gene involved in Coffin-Lowry syndrome. *Nucleic Acids Res.* 32:1214-23.
- Zeniou-Meyer M, Liu Y, Béglé A, Olanich ME, Hanauer A, Becherer U, Rettig J, Bader MF, Vitale N. 2008. The Coffin-Lowry syndrome-associated protein RSK2 is implicated in calcium-regulated exocytosis through the regulation of PLD1. *Proc Natl Acad Sci USA.* 105:8434-9.
- Zhang CL, Aime M, Laheranne E, Houbaert X, El Oussini H, Martin C, Lepleux M, Normand E, Chelly J, Herzog E, Billuart P, Humeau Y. 2017. Protein Kinase A Deregulation in the Medial Prefrontal Cortex Impairs Working Memory in Murine Oligophrenin-1 Deficiency. *J Neurosci.* 37:11114-11126.
- Zhao C, Teng EM, Summers RG, Ming GL, Gage FH. 2006. Distinct morphological stages of dentate granule neuron maturation in the adult mouse hippocampus. *J Neurosci.* 26:3–11.
- Zhao C, Deng W, Gage FH. 2008. Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell.* 132:645–660.
- Zhao MG, Toyoda H, Ko SW, Ding HK, Wu LJ, Zhuo M. 2005. Deficits in trace fear memory and long-term potentiation in a mouse model for fragile X syndrome. *J Neurosci.* 25:7385-92.
- Zhao X, Ueba T, Christie BR, Barkho B, McConnell MJ, Nakashima K, Lein ES, Eadie BD, Willhoite AR, Muotri AR, Summers RG, Chun J, Lee KF, Gage FH. 2003. Mice lacking methyl-CpG binding protein 1 have deficits in adult neurogenesis and hippocampal function. *Proc Natl Acad Sci.* 100:6777–6782.

Titre : Etude de la neurogenèse hippocampique adulte et des fonctions cognitives chez trois souris modèles de déficience intellectuelle

Mots clés : Neurogenèse hippocampique adulte, Déficience intellectuelle, Fonctions cognitives

Résumé: Les dernières années témoignent d'une remarquable accélération dans la compréhension des facteurs génétiques impliqués dans la déficience intellectuelle (DI) et de nombreux gènes responsables ont été identifiés. Néanmoins, les mécanismes cellulaires et moléculaires sous-jacents à la DI sont encore mal connus. Une hypothèse attractive est que les mutations à l'origine de DI affectent la neurogenèse hippocampique adulte (NGA), une forme de plasticité qui joue un rôle crucial dans la mémoire. L'objectif de ce projet est d'entreprendre une analyse comparative de la NGA chez trois modèles murins de pathologies d'origine génétique, menant à une DI sévère, impliquant des gènes localisés sur le chromosome X et participant à différentes voies de signalisation susceptibles de moduler la NGA : le syndrome de Coffin-Lowry (gène *rsk2*), la dystrophie musculaire de Duchenne (gène *dmd*) et une DI liée au gène *pak3*. Mes recherches actuelles montrent que ces trois modèles présentent des déficits cognitifs dépendants de

l'hippocampe, dont des altérations de la fonction de séparation de patterns. Nous avons également mis en évidence des altérations de la NG adulte, avec, entre autres, des altérations du recrutement des jeunes neurones par l'apprentissage qui pourraient contribuer aux déficits cognitifs observés en particulier dans la fonction de séparation de patterns. Toutefois, selon les gènes en cause, les déficits ne sont pas observés dans les mêmes étapes de la NGA ni dans les mêmes situations comportementales. L'ensemble de ces résultats laisse donc suggérer que chacun des gènes étudiés pourrait jouer un rôle différent dans la NGA, mais qu'*in fine* des altérations de cette forme de plasticité contribuent, au moins en partie, aux déficits cognitifs associés à la DI dans les trois modèles. Ensemble, ces résultats apportent des informations supplémentaires qui seront directement pertinentes pour d'autres pathologies neuro-développementales conduisant à des déficits cognitifs liés à des altérations de la NG, et pourraient ouvrir de nouvelles pistes thérapeutiques.

Title: Hippocampal adult neurogenesis and cognitive functions in three mouse models of intellectual disability

Keywords: Adult hippocampal neurogenesis, Intellectual disability, Cognitive functions

Abstract: Recent years have shown a remarkable acceleration in the understanding of genetic factors involved in intellectual disability (ID) and many genes responsible have been identified. However, the cellular and molecular underlying mechanisms are still poorly understood. An attractive hypothesis is that mutations causing ID may affect adult hippocampal neurogenesis (ANG), a form of plasticity that plays a crucial role in learning and memory. The objective of this project was to undertake a comparative analysis of adult hippocampal neurogenesis in three mouse models of genetic diseases involving genes located on the X chromosome and participating in different signalling pathways that may modulate ANG: the Coffin-Lowry syndrome (*rsk2* gene), Duchenne muscular dystrophy (*dmd* gene) and ID due to mutation of the *pak3* gene. My current research shows that these three models present hippocampal dependent cognitive deficits.

Among these deficits, major deficits in spatial pattern separation function have been highlighted. We also showed specific alterations of basal ANG, together with alterations in the recruitment of young newborn neurons by learning that could contribute to the observed cognitive deficits, in particular in pattern separation function. However, depending on the genes involved, the deficits are not observed in the same steps of adult NG and in the same behavioural situations. In all, the results suggest that each of the genes plays a different role in ANG, but *in fine* that alterations of this form of plasticity may contribute to the cognitive deficits associated with ID in the three models. Together, these results provide additional information that will be directly relevant to other neurodevelopmental disorders leading to cognitive deficits related to NG alterations, and could open new therapeutic tracks.