

Université de Montréal

Mécanismes moléculaires impliqués dans la régulation de l'acide polysialique (PSA) dans le néocortex visuel des souris durant la maturation des synapses GABAergiques

Par Marie-Claude Bélanger

Programme de Sciences Biomédicales
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de M.Sc
en Sciences Biomédicales, option générale

Août 2010

© Marie-Claude Bélanger, 2010

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé:

Mécanismes moléculaires impliqués dans la régulation de l'acide polysialique (PSA) dans le néocortex visuel des souris durant la maturation des synapses GABAergiques

Présenté par : Marie-Claude Bélanger

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Dr Christophe Faure
Président-rapporteur

Dr Graziella Di Cristo
Directeur de recherche

Dr J. Alex Parker
Membre du jury

"It is this potential for plasticity of the relatively stereotyped units of the nervous system that endows each of us with our individuality."

- Eric R. Kandel

RÉSUMÉ ET MOTS CLÉS

Le fonctionnement du cortex cérébral nécessite l'action coordonnée de deux des sous-types majeurs de neurones, soient les neurones à projections glutamatergiques et les interneurones GABAergiques. Les interneurones GABAergiques ne constituent que 20 à 30% des cellules corticales par rapport au grand nombre de neurones glutamatergiques. Leur rôle est toutefois prépondérant puisqu'ils modulent fortement la dynamique et la plasticité des réseaux néocorticaux. Il n'est donc pas surprenant que les altérations de développement des circuits GABAergiques soient associées à plusieurs maladies du cerveau, incluant l'épilepsie, le syndrome de Rett et la schizophrénie. La compréhension des mécanismes moléculaires régissant le développement des circuits GABAergiques est une étape essentielle menant vers une meilleure compréhension de la façon dont les anomalies se produisent. Conséquemment, nous nous intéressons au rôle de l'acide polysialique (PSA) dans le développement des synapses GABAergiques. PSA est un homopolymère de chaînes polysialylés en α -2,8, et est exclusivement lié à la molécule d'adhésion aux cellules neuronales (NCAM) dans les cerveaux de mammifères. PSA est impliqué dans plusieurs processus développementaux, y compris la formation et la plasticité des synapses glutamatergiques, mais son rôle dans les réseaux GABAergiques reste à préciser. Les données générées dans le laboratoire du Dr. Di Cristo démontrent que PSA est fortement exprimé post-natalement dans le néocortex des rongeurs, que son abondance diminue au cours du développement, et, faits importants, que son expression dépend de l'activité visuelle

et est inversement corrélée à la maturation des synapses GABAergiques. La présente propose de caractériser les mécanismes moléculaires régulant l'expression de PSA dans le néocortex visuel de la souris. Les enzymes polysialyltransférases ST8SiaII (STX) et ST8SiaIV (PST) sont responsables de la formation de la chaîne de PSA sur NCAM. En contrôlant ainsi la quantité de PSA sur NCAM, ils influenceraient le développement des synapses GABAergiques. Mon projet consiste à déterminer comment l'expression des polysialyltransférases est régulée dans le néocortex visuel des souris durant la période post-natale; ces données sont à la fois inconnues, et cruciales. Nous utilisons un système de cultures organotypiques dont la maturation des synapses GABAergiques est comparable au modèle *in vivo*. L'analyse de l'expression génique par qPCR a démontré que l'expression des polysialyltransférases diminue au cours du développement; une baisse majeure corrélant avec l'ouverture des yeux chez la souris. Nous avons de plus illustré pour la première fois que l'expression de STX, et non celle de PST, est activité-dépendante, et que ce processus requiert l'activation du récepteur NMDA, une augmentation du niveau de calcium intracellulaire et la protéine kinase C (PKC). Ces données démontrent que STX est l'enzyme régulant préférentiellement le niveau de PSA sur NCAM au cours de la période post-natale dans le cortex visuel des souris. Des données préliminaires d'un second volet de notre investigation suggèrent que l'acétylation des histones et la méthylation de l'ADN pourraient également contribuer à la régulation de la transcription de cette enzyme durant le développement. Plus d'investigations seront toutefois nécessaires afin de confirmer cette hypothèse. En somme, la connaissance des mécanismes par lesquels l'expression des

polysialyltransférases est modulée est essentielle à la compréhension du processus de maturation des synapses GABAergiques. Ceci permettrait de moduler pharmacologiquement l'expression de ces enzymes; la sur-expression de STX et/ou PST pourrait produire une plus grande quantité de PSA, déstabiliser les synapses GABAergiques, et conséquemment, ré-induire la plasticité cérébrale.

MOTS CLÉS: Interneurones GABAergiques, plasticité, acide polysialique (PSA), polysialyltransférases, transcription activité-dépendante, NMDA, épigénétique

SUMMARY AND KEY WORDS

The functioning of the cerebral cortex requires coordinated action of two major neuronal subtypes - the glutamatergic projection neurons and the GABAergic interneurons. GABAergic interneurons represent 20 to 30% of all cortical cells. Even though they are a minor cell population in the cerebral cortex compared to glutamatergic neurons, they are key modulators of network dynamics and plasticity of neocortical circuits. It is therefore not surprising that aberrant development of GABAergic circuits is implicated in many neurodevelopmental disorders including epilepsy, Rett syndrome and schizophrenia. Understanding the molecular mechanisms governing the development of GABAergic inhibitory synapses in neocortex is important towards a better comprehension of how abnormalities in this developmental process can occur. Therefore, we focus specifically on the role of polysialic acid (PSA) in the development of GABAergic synapses. PSA is a α -2,8 polysialylated homopolymer, which is exclusively linked to the Neural Cell Adhesion Molecule (NCAM) in the mammalian brain. It is involved in several developmental processes including formation and plasticity of glutamatergic synapses; however its role in GABAergic circuit formation has not been explored so far. Previously in Dr Di Cristo's lab, we showed that PSA is strongly expressed post-natally and its expression steadily declines during development in mice neocortex. We also showed that the developmental and activity-dependant regulation of PSA expression is inversely correlated with the maturation of perisomatic GABAergic innervation. Our aim is to characterize the molecular mechanisms regulating PSA expression in mouse

visual cortex during post-natal development. Two polysialyltransferases, ST8SiaII (STX) and ST8SiaIV (PST), are responsible for PSA attachment to NCAM. By controlling the amount of PSA on NCAM, they can influence GABAergic synapses development. The mechanisms regulating STX and PST expression is crucial but remain still unknown. My research project focused on the mechanisms regulating STX and PST transcription in the mouse postnatal cortex. We used an organotypic culture system, which recapitulates many aspects of GABAergic synapse maturation as observed *in vivo*. Polysialyltransferases transcript levels were measured by qPCR and showed that STX and PST mRNA levels steadily decline during post-natal development in the mouse cortex; the sharpest reduction in the expression of both enzymes correlate with eye opening. We further demonstrate for the first time that STX mRNA levels is activity-dependant, requires the activation of NMDA receptors, an increase in intracellular Calcium levels and is PKC-dependent. Altogether, we show that the regulation of the expression of STX is the main mechanism responsible for PSA expression levels in the cortex around eyes opening. We next investigated whether epigenetic mechanisms regulate STX transcription and preliminary data suggest that histone acetylation and DNA methylation may contribute to STX expression during development. However, further experiments are required to confirm this hypothesis. In summary, understanding the mechanisms modulating STX and PST expression in the neocortex is essential for the comprehension of their precise role in GABAergic synapse maturation. This knowledge could allow us to modulate pharmacologically the expression of these enzymes; in turn overexpression

of STX and PST may re-induce PSA expression, thereby destabilizing GABAergic synapses, and ultimately facilitating cortical plasticity in the adult.

KEY WORDS: GABAergic interneurons, plasticity, polysialic acid (PSA), polysialyltransferases, activity-dependent transcription, NMDA, epigenetic

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ ET MOTS CLÉS	i
SUMMARY AND KEY WORDS	iv
TABLE DES MATIÈRES	vii
LISTE DES FIGURES	ix
LISTE DES SIGLES ET DES ABRÉVIATIONS	xi
CHAPITRE 1 : INTRODUCTION	1
1.1 Le système GABAergique néocortical.....	2
1.1.1 Généralité.....	2
1.1.2 Le développement des interneurons GABAergiques	4
1.2 PSA-NCAM : Les modulateurs de l'adhésion cellulaire.....	5
1.2.1 La molécule d'adhésion aux cellules neuronales (NCAM).....	5
1.2.2 L'acide polysialique (PSA).....	8
1.3 Les polysialyltransférases ST8SiaII et ST8SiaIV.....	14
1.3.1 Description.....	14
1.3.2 Rôles des polysialyltransférases dans le cerveau adulte et en développement.....	16
1.3.3 Profils d'expression.....	18
1.3.4 Impacts et perspectives.....	19
1.4 Mécanismes de régulation de la transcription génique dépendant de l'activité neuronale.....	20
1.5 Autres mécanismes impliqués dans la régulation de la transcription des polysialyltransférases	22
1.5.1 Brain-derived Neurotrophic Factor (BDNF).....	23
1.5.2 Insulin-like Growth Factor 1 (IGF-1).....	24
1.5.3 La méthylation de la chromatine.....	25
1.5.4 L'acétylation des histones.....	26
1.6 Objectifs de recherche.....	29
1.6.1 Contexte.....	29
1.6.2 Objectif principal.....	29
1.6.3 Objectifs spécifiques.....	30
CHAPITRE 2 : MANUSCRIT	31
«Sensory Experience Differentially Modulates STX and PST mRNA Expression in Postnatal Mouse Visual Cortex».....	32
CHAPITRE 3 : PROJETS PILOTES	65
3.1 Méthodologie.....	66
3.1.1 Animaux.....	66
3.1.2 Cultures organotypiques.....	66

3.1.3	Injection de L-méthionine.....	68
3.1.4	PCR quantitatif en temps réel.....	68
3.1.5	Analyse du PCR quantitatif en temps réel.....	70
3.1.6	Western blot.....	70
3.1.7	Analyses statistiques.....	72
3.2	Résultats.....	73
3.2.1	Effets de BDNF et de IGF-1 sur l'expression des polysialyltransférases.....	73
3.2.2	Expression développementale de MeCP ₂	75
3.2.3	Effet de l'application <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i> de L-méthionine sur l'expression des polysialyltransférase.....	77
3.2.4	Effet de l'application d'inhibiteurs de HDACs sur l'expression de STX et de PST.....	81
CHAPITRE 4 : DISCUSSION		84
4.1	STX est la principale enzyme régulant PSA durant la période post-natale..	85
4.2	La régulation de la transcription de STX est activité-dépendante et relève du récepteur NMDA.....	86
4.3	L'hypothèse du répresseur transcriptionnel.....	90
4.4	La Protéine Kinase C (PKC) : le chaînon manquant?.....	93
4.5	La méthylation de l'ADN, une avenue prometteuse.....	96
4.6	Le remodelage de la chromatine via l'acétylation des histones contribue à la modulation de l'expression de STX.....	97
4.7	Conclusion et signification des résultats.....	99
4.8	Directions futures.....	101
CHAPITRE 5 : BIBLIOGRAPHIE		102
ANNEXE		xiii
A.1	L'expression de PSA diminue au cours du développement post-natal.....	xiv

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1. Structure des trois isoformes de NCAM.....	7
Figure 1.2. Schématisation de l'effet stérique de PSA à la surface cellulaire.....	9
Figure 1.3. Rôles et expression de PSA au cours du développement.....	12
Manuscrit, Figure 1. Expression levels of STX and PST mRNA decline <i>in vivo</i> and <i>in vitro</i> with a similar time course during postnatal development.....	58
Manuscrit, Figure 2. Sensory experience regulates STX, but not PST, mRNA levels <i>in vivo</i>	59
Manuscrit, Figure 3. Spiking activity regulates STX, but not PST, mRNA expression levels in cortical organotypic cultures.....	60
Manuscrit, Figure 4. NMDA-mediated excitation regulates STX mRNA expression levels, likely through Ca ²⁺ dependent mechanisms.....	60
Manuscrit, Figure 5. PKC signalling pathway positively regulates STX and PST mRNA expression levels.....	61
Manuscrit, Figure S.1 Graphs comparing mRNA expression levels of STX and PST during postnatal development <i>in vivo</i> and <i>in vitro</i>	61
Figure 3.1. BDNF et IGF-1 ne sont pas impliqués dans la régulation de la transcription des polysialyltransférases STX et PST <i>in vitro</i> chez la souris.....	74
Figure 3.2. Expression développementale de MeCP ₂	76
Figure 3.3. Effet de l'injection de L-méthionine chez les souris de P4 à P11.....	78
Figure 3.4. Application de concentration croissante de L-méthionine dans les cultures organotypiques de cerveau de souris de EP8-14.	80
Figure 3.5. Application d'inhibiteurs de HDACs dans les cultures organotypiques de cerveau de souris de EP11-14.....	83
Figure 4.1. Schéma illustrant que l'enzyme STX serait régulée via un répresseur transcriptionnel activité-dépendant impliquant le récepteur NMDA....	92

Figure 4.2. Effet synergique de PKC et de l'activité neuronale sur l'expression de STX.....	94
A.1. L'expression de PSA diminue au cours du développement post-natal.....	114

LISTE DES SIGLES ET DES ABRÉVIATIONS

ADN :	Acide désoxyribonucléique
AMPA :	a-amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionate
APV :	<i>D-(-)-2-Amino-5-phosphonopentanoic acid</i>
ARNm :	Acide ribonucléique messenger/ <i>mRNA Messenger ribonucleic acid</i>
BD :	Déprivation binoculaire
BDNF :	<i>Brain-Derived Neurotrophic Factor</i>
BMI :	Bicuculline méthiodide
CAMKII :	Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II
CAMKIV :	Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase IV
CBP :	Protéines de liaison au calcium
CHE :	Chelerythrine
CNQX :	6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione
CREB :	<i>cAMP response element-binding</i>
CR :	Calrétinine
DNMT1 :	ADN-méthyltransférase 1
DNMT3a :	ADN-méthyltransférase 3a
E :	Jour embryonnaire
ECM :	Matrice extracellulaire
ENDO N :	Endo-N-acetylneuraminidase
ERK :	<i>Extracellular Regulated Kinase</i>
EP :	Âge équivalent post-natal
FDA :	<i>US Food & Drug Administration</i>
FGFR :	Récepteur des facteurs de croissance des fibroblastes
FNIII :	Fibronectine de type III
GABA :	Acide γ -aminobutyrique
GAD67 :	Acide glutamique décarboxylase
GAPDH :	Glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogenase
GPI :	Glycosylphosphatidylinositol
HAT :	Histones acétyl transférase
HDAC :	Histone déacétylase
HDACi :	Inhibiteurs d'histones déacétylases
Ig :	Immunoglobuline
IGF-1 :	<i>Insulin-like Growth Factor 1</i>
IP :	Intrapéritonéal/ Intrapéritonéalement
KCC2 :	co-transporteur neuronal de K^+ /Cl ⁻
KO :	<i>Knock-out</i>
M :	Manuscrit
MD :	Déprivation monoculaire
MeCP₂ :	<i>Methyl-CpG binding protein 2</i>
MEF2 :	<i>Myocyte Enhancer Factor-2</i>

Mg²⁺ :	Magnésium
MiR :	Micro-ARN
NCAM :	Molécule d'adhésion aux cellules neuronales
NMDA :	N-methyl-D-aspartate
ODP :	Plasticité de la dominance oculaire / <i>Ocular dominance plasticity</i>
P :	Jour post-natal
PKA :	Protéine kinase dépendante de l'AMP cyclique
PKC :	Protéine kinase C
PKG :	Protéine kinase dépendante du GMP cyclique
PSA :	Acide polysialique/ <i>polysialic acid</i>
PST :	ST8SialIV
PV :	Parvalbumine
qPCR :	PCR quantitatif en temps réel
SAHA :	Acide suberoylanilide hydroxamique
SB :	Butyrate de sodium
SEM :	Erreur type de la moyenne/ <i>Standard error of the mean</i>
SNP :	<i>Single nucleotide polymorphism</i>
SST :	Somatostatine
STX :	ST8SialII
SVZ :	Zone subventriculaire
TSA :	Trichostatin A
TTX :	Térodotoxine/ <i>Tetrodotoxin</i>
VPA :	Acide valproïque
VGCC :	Canaux calciques voltage-dépendant de type L

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION

1.1 *Le système GABAergique néocortical*

1.1.1 Généralité

Les circuits neuronaux du cortex cérébral sont composés de deux populations majeures de cellules, soient les neurones à projection excitateurs, dont la neurotransmission est assurée par le glutamate, et les interneurones GABAergiques inhibiteurs, lesquels relâchent plutôt le neurotransmetteur acide γ -aminobutyrique (GABA) suite à l'excitation neuronale. Bien qu'étant constitués que d'une petite population de cellules – les interneurones GABAergiques ne forment que 20 à 30% de tous les neurones corticaux – ils exercent un puissant contrôle sur la modulation des réseaux cérébraux¹. Ces derniers sont subdivisés en 3 sous-groupes distincts par leur expression respective de différentes protéines de liaison au calcium (CBP) : (i) interneurones exprimant la parvalbumine (PV), (ii) la somatostatine (SST), et (iii) la calrétinine (CR)^{2, 3}. Une des caractéristiques intéressantes des interneurones GABAergiques provient du fait que les axones de ces différentes classes ciblent diverses régions des neurones glutamatergiques post-synaptiques. Par exemple, les interneurones SST innervent sélectivement les dendrites distales, tandis que les interneurones PV forment des contacts spécifiquement au niveau du soma et des dendrites proximales des neurones³.

L'apport inhibiteur exercé par les interneurons GABAergiques est essentiel au maintien de l'équilibre fonctionnel entre les niveaux d'excitation et d'inhibition, et participe au développement de la complexité structurale des circuits neuronaux^{4, 5}. Mais cette contribution va bien au-delà de la simple fonction d'atténuation de l'excitation neuronale⁶. En effet, les interneurons GABAergiques jouent également un rôle essentiel dans plusieurs étapes-clés du développement du cortex, telles la prolifération neuronale, la migration et différenciation cellulaire, ainsi que dans le raffinement des circuits corticaux locaux activités-dépendants^{7, 8}. Étant donné l'importance de ce système, il n'est donc pas surprenant que des altérations des circuits GABAergiques soient associées à diverses pathologies neurodéveloppementales, comme la schizophrénie⁹, l'épilepsie¹⁰ ou le syndrome de Rett¹¹. Par exemple, une étude a démontré un lien positif entre un *single nucleotide polymorphism* (SNP) dans la région 5' du gène *Gad1* – lequel code pour l'acide glutamique décarboxylase (GAD67), l'enzyme responsable de la synthèse de GABA – et l'apparition précoce de la schizophrénie¹². Cette observation est d'autant plus intéressante, car la réduction de GAD67 dans la région dorsale latérale du cortex préfrontal est également un des résultats constamment associé à l'étiologie de la maladie⁹. Toutefois, si et comment ce variant génétique est impliqué dans la régulation de *Gad1* demeure à ce jour inconnu. Il appert donc que la compréhension du mécanisme entourant la formation du système GABAergiques est une étape essentielle menant vers une meilleure conception de la façon dont ces anomalies se produisent.

1.1.2 Le développement des interneurons GABAergiques

Ainsi, le déploiement de l'innervation périsomatique des interneurons GABAergiques sur les cellules pyramidales glutamatergiques est un phénomène se produisant durant la période post-natale et corrèle avec l'ouverture des yeux (Jour post-natal (P) 13). Cette étape ne se termine que vers la fin de l'adolescence¹³. Le développement des synapses GABAergiques est un processus progressif, marqué par l'extension des branches terminales des neurones – et donc de l'arborisation axonale – et par l'augmentation du nombre de boutons périsomatiques. Fait marquant, ce processus est dépendant de l'activité neuronale¹⁴⁻¹⁶. En effet, Chattopadhyaya *et al.*¹⁵, le groupe ayant caractérisé le développement en conditions normales chez la souris, ont observé que la maturation du système GABAergique est retardée suite à des déprivations monoculaires effectuées chez la souris durant la troisième semaine post-natale. Notons que la même expérience effectuée au cours de la cinquième semaine post-natale n'a eu aucun effet significatif, démontrant l'importance de l'activité sensorielle durant une phase donnée sur le développement de ces circuits; intervalle nommée période critique de plasticité. En somme, même si la formation de synapses périsomatiques est un élément intrinsèque au cortex, il n'en demeure pas moins que les expériences sensorielles occupent une place prépondérante dans le développement et la maturation du système GABAergique durant la période critique de plasticité post-natale¹⁵. Toutefois, les mécanismes moléculaires entourant le développement des circuits d'interneurones GABAergiques demeurent à ce jour peu étudiés. Mon

laboratoire s'intéresse ainsi au mécanisme cellulaire et moléculaire régissant ce processus, d'où le sujet de mon mémoire :

« Mécanismes moléculaires impliqués dans la régulation de l'acide polysialique (PSA) dans le néocortex visuel des souris durant la maturation des synapses GABAergiques »

1.2 PSA-NCAM : Les modulateurs de l'adhésion cellulaire

1.2.1 La molécule d'adhésion aux cellules neuronales (NCAM)

Nos études s'intéressent plus particulièrement à la molécule d'adhésion aux cellules neuronales (NCAM), laquelle est un membre de la superfamille des immunoglobulines¹⁷. Cette glycoprotéine est exprimée à la surface de la majorité des cellules neurales. Tout comme son nom l'indique, NCAM est un médiateur primaire de l'adhésion entre les cellules¹⁸. Lorsque deux molécules de NCAM se rencontrent, il y a adhésion cellulaire menant fréquemment à la formation de synapses. Cette particularité lui permet de jouer un rôle prépondérant dans le développement du système nerveux et de la plasticité synaptique reliée, par exemple, à la consolidation de la mémoire¹⁹⁻²².

NCAM est encodé par un seul gène, localisé sur le chromosome 9 chez la souris. L'épissage alternatif de ses 20 exons majeurs et de ses 6 mineurs donne lieu à une variété intéressante d'isoformes, dénommés selon leurs poids moléculaires respectifs²³. Ces derniers possèdent un domaine extracellulaire identique; seul leur domaine C-terminal varie de l'un à l'autre. Ainsi, NCAM-180, généré à partir des exons 0-19, est une protéine transmembranaire à passage unique possédant un domaine C-terminal intracellulaire. NCAM-140 ne lui diffère que par son domaine C-terminal considérablement plus court, attribuable à l'exemption de la traduction de l'exon 18. NCAM-120, quant à lui, est une protéine ancrée dans la membrane cytoplasmique par un lien glycosylphosphatidylinositol (GPI) et transcrit à partir des exons 0-15²³. La forme soluble de NCAM peut également être générée par clivage enzymatique du lien GPI-NCAM-120²⁴ ou par clivage protéolytique de la partie extracellulaire de la molécule NCAM²⁵. Tel que mentionné précédemment, la partie extracellulaire N-terminale de tous les isoformes de NCAM est identique. Elle est composée de cinq modules homologues d'immunoglobulines (Ig), et de deux domaines de fibronectine de type III (FNIII) proximal à la membrane plasmique^{22, 26, 27} (Figure 1.1). Cette structure permet de former des liens *cis* et des liens *trans* homo et hétérophile. Les liens *cis* se font exclusivement entre les Ig de molécules NCAM juxtaposées d'une même cellule. On réfère plutôt au terme lien *trans* lorsque l'on désigne l'adhésion entre les Ig de NCAM et toutes molécules situées sur une cellule voisine. Notons que ce sont ces liens *trans* qui sont d'une importance capitale dans la formation de synapses. NCAM peut établir des liens homophiles avec une autre molécule de NCAM et forme aisément des liens *trans* hétérophiles^{28, 29}, permettant,

entre autres, l'activation du récepteur des facteurs de croissance des fibroblastes (FGFR)³⁰, l'interaction avec plusieurs membres de la matrice extracellulaire (ECM)³¹ et sa liaison avec d'autres immunoglobulines, telles L1 ou TAG-1^{17, 26}. Une des caractéristiques les plus intéressantes de NCAM réside toutefois dans sa capacité à être glycosylé post-traductionnellement dans le réseau trans-Golgi via l'ajout d'une chaîne d'acide polysialique (PSA) sur le 5^e Ig^{26, 32}. Cette particularité, simple à première vue, s'avérera être d'une importance capitale dans le développement des circuits neuronaux chez les mammifères^{33, 34}.

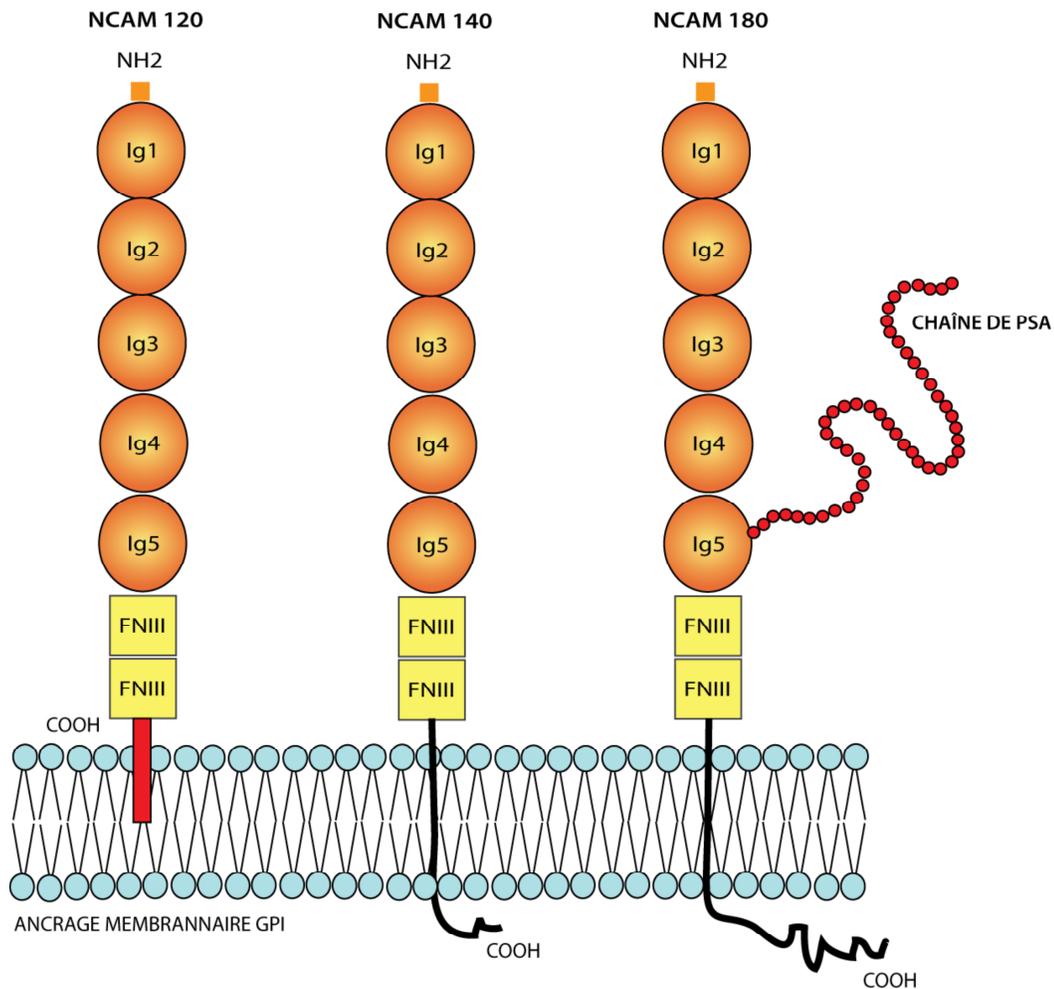


Figure 1.1 Structure des trois isoformes de NCAM

1.2.2 L'acide polysialique (PSA)

PSA est un long homopolymère linéaire d'acide polysialique α -2,8 lié presque exclusivement à NCAM dans les cellules des vertébrés³⁵. Sa chaîne polyanionique lui confère la propriété d'être une molécule hautement hydratée ayant un large volume par rapport à la protéine NCAM seule. Des évidences suggèrent que cet énorme espace occupé par PSA lui permettrait de moduler directement la distance entre les cellules via les mécanismes de répulsion stérique, perturbant de ce fait les propriétés adhésives de NCAM. En effet, plus l'espace occupé par PSA est important, moins les contacts neurones-neurones (et du fait même, les contacts *trans*-NCAM) seraient possibles (Figure 1.2). Dans le système nerveux en développement, PSA serait donc un régulateur permissif des interactions cellulaires^{33, 36 37, 38}.

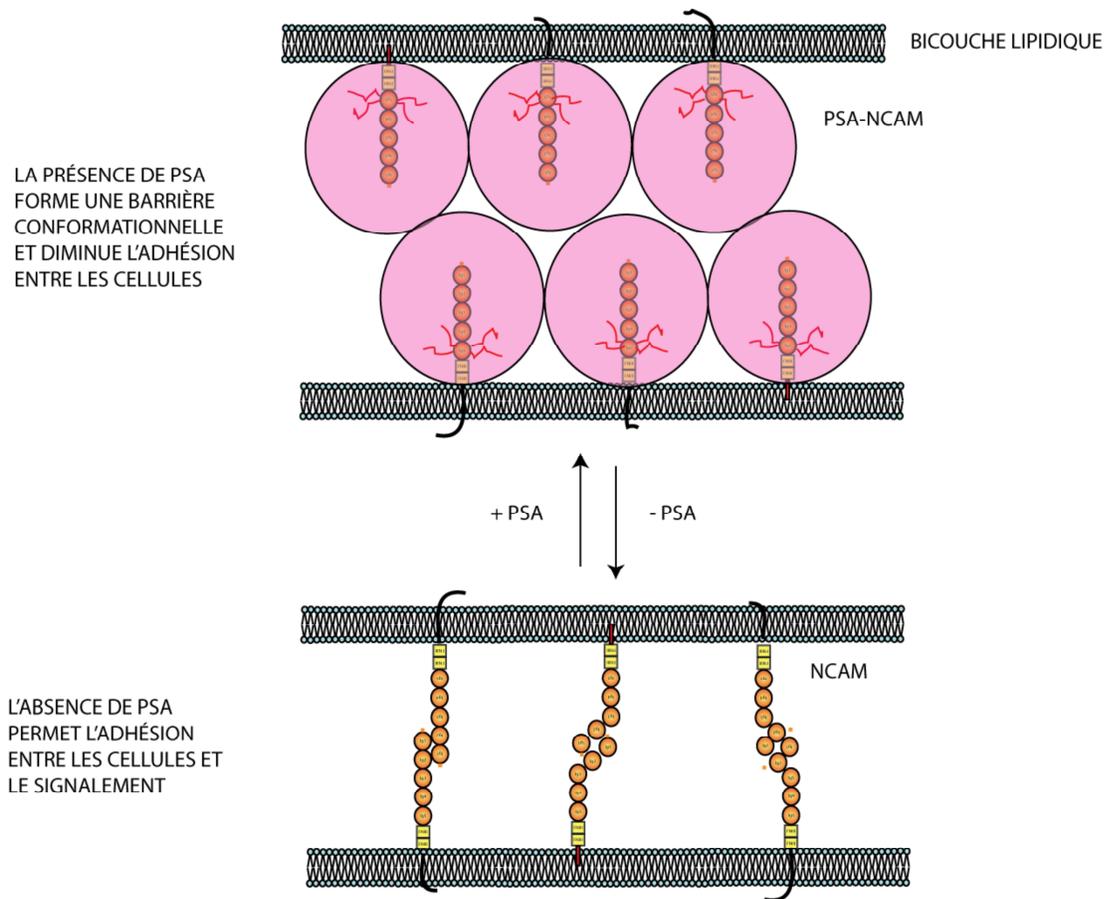


Figure 1.2. Schématisation de l'effet stérique de PSA à la surface cellulaire

Ces changements dans l'expression de PSA sont au cœur même des mécanismes impliqués dans la régulation du développement des circuits neuronaux chez les vertébrés^{33, 39, 40}. La présence de PSA dans le système nerveux central peut être subdivisée en quatre phases développementales consécutives physiologiquement distinctes; chaque phase corrélant avec une diminution de l'expression de PSA³³ (Figure 1.3). S'effectuant durant le stade embryonnaire, la migration des cellules progénitrices constitue la première étape. Dans ces conditions, l'expression développementale de PSA dans le néocortex y est le plus élevée³³. Par exemple, une

forte quantité de PSA sur NCAM est un facteur important dans le contrôle de la migration neuronale des cellules progénitrices post-mitotiques de la zone subventriculaire (SVZ) des ventricules latéraux jusqu'à leur lieu d'arrivée, le bulbe olfactif, où ces dernières se différencieront en interneurons. Toutes modifications de l'expression de PSA, tel le clivage enzymatique de ce dernier par une enzyme d'origine bactérienne, l'endo-N-acetylneuraminidase (EndoN)⁴¹, laquelle clive spécifiquement les liens α -2,8, inhibe l'habileté des cellules à migrer hors de leur zone germinale, engendrant ainsi d'évidentes aberrations migratoires⁴²⁻⁴⁴. La fin de cette phase est marquée par la différenciation cellulaire, où la présence de PSA masque les signalements pouvant engendrer ce processus. Son absence permettant les contacts cellulaires, ces mêmes cellules progénitrices de la SVZ peuvent, par exemple, exprimer prématurément des marqueurs neuronaux via le signalement de NCAM et de p59Fyn lorsqu'il y a préalablement eu coupure enzymatique de PSA⁴⁵.

La seconde phase se produit également au cours du stade embryonnaire et recoupe les processus de croissance axonale et de détermination des cibles dendritiques. Les axones des neurones doivent parfois parcourir de longues distances afin de former des synapses avec les dendrites des neurones-cibles; le tout devant s'effectuer en omettant tout contact ectopique avec les autres neurones le long du parcours. Par exemple, dans les projections optiques, les axones des cellules ganglionnaires de la rétine destinés à former des contacts synaptiques avec la portion distale du tectum optique parviennent à éviter tous liens avec la partie proximale.

Toutefois, l'absence de PSA provoque la formation d'un nombre important de synapses non-désirées le long du chemin des axones, résultant de surcroît en une voie empruntée plus tortueuse³⁹. Les propriétés «isolantes» de PSA sur NCAM lui permettent donc d'assurer une croissance des axones et une formation de synapse au lieu et moment appropriés.

Au stade néonatal, PSA est essentiel à la maturation des circuits neuronaux dans le néocortex. Son expression, tel que nous l'avons nous-même observé³⁴ y est activité-dépendante (Manuscrit (M), Figure 2), ne cesse d'y diminuer et y est pratiquement indétectable dès la troisième semaine post-natale (Annexe A.1). Bien que présent dans toutes les couches du cortex, on le retrouve toujours à plus forte proportion dans les couches 4 et 5/6. Le clivage enzymatique de PSA par EndoN dans un modèle *in vitro* de cultures organotypiques de cerveau de souris induit donc une maturation précoce des circuits GABAergiques, observable via une arborisation plus élaborée et un plus grand nombre de boutons périsonmatiques sur les cellules pyramidales glutamatergiques, lorsque comparée aux contrôles du même âge équivalent post-natal (EP). Ceci démontre donc le rôle crucial de PSA dans la maturation des circuits synaptiques³⁴.

La plasticité cérébrale est la capacité du cerveau à remodeler l'organisation de ses circuits synaptiques locaux en fonction des expériences sensorielles vécues par l'organisme; ceci ayant pour objectif de traiter de façon plus optimale ces dits stimuli. Ce phénomène se produit durant un stade spécifique du développement post-natal du

cerveau, nommé période critique de plasticité³³. Le rôle de PSA y est ici primordial. En effet, tel que suggéré ci-haut, l'expression de PSA diminue dans le cortex visuel suite à l'ouverture des yeux et cette chute est prévenue via des déprivations binoculaires effectuées chez la souris – l'expression y est donc activité-dépendante. Son niveau est de plus inversement corrélé à la maturation de l'innervation GABAergique, lequel est, fait important, requis pour la plasticité de la dominance oculaire (ODP) durant la période critique. Di Cristo *et al*³⁴ ont démontré que l'application d'EndoN afin d'enlever PSA prématurément du système visuel déclenche l'apparition précoce de la période critique de plasticité, démontrant ainsi l'apport crucial de PSA dans le cerveau en développement. Mais encore, PSA est essentiel au contrôle de la synaptogenèse (via un mécanisme analogue à celui décrit pour les projections optiques des axones), et cette régulation est également dépendante de l'activité sensorielle.

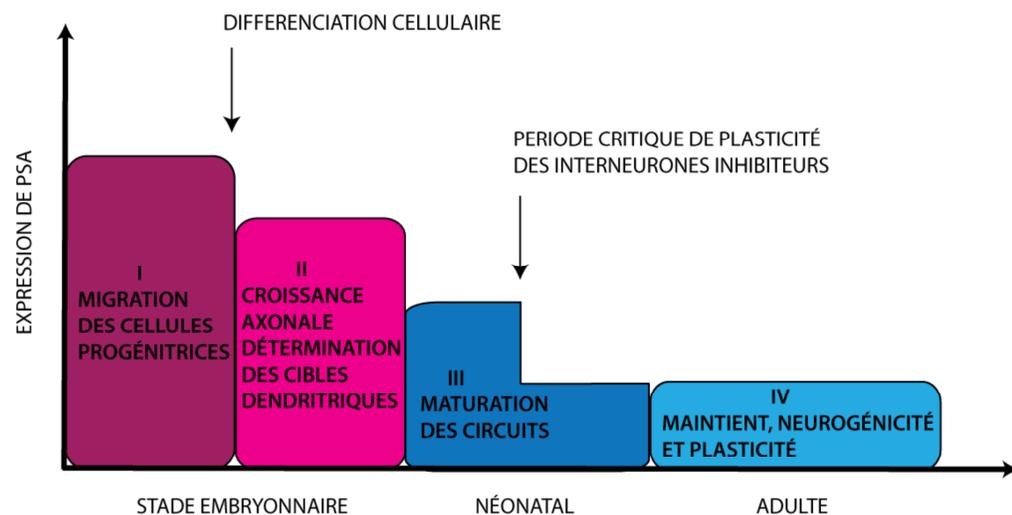


Figure 1.3. Rôles et expression de PSA au cours du développement (Inspiré de Rutishauser U, *Nat Rev Neurosci* (2008)³³)

Dans le cerveau adulte, suivant ainsi la période critique de plasticité, PSA est pratiquement indétectable. Toutefois, PSA y est également exprimé tout au long de la vie dans certaines régions distinctes, connues pour leur plasticité physiologique. Par exemple, PSA est constamment présent dans l'hypothalamus, le thalamus, le complexe entorinal-hippocampique, la matière grise du mésencéphale, et les noyaux latéraux géniculés^{46, 47}. On retrouve également PSA dans des régions démontrant des propriétés neurogéniques importantes, telle la couche granulaire de l'hippocampe⁴⁸. Quoique PSA a été principalement étudié pour son implication dans le système nerveux central, on le retrouve également exprimé de façon transitoire durant le développement de tissus dérivés de l'ectoderme, du mésoderme, ou de l'endoderme, tels les muscles cardiaques et squelettiques, les reins, et les follicules pileux⁴⁹. PSA est également essentiel au système nerveux gastro-intestinal^{50, 51}.

Jusqu'à présent, les recherches se sont principalement penchées sur la caractérisation de l'expression de PSA, ainsi que sur son rôle précis tout au cours des différents processus neurodéveloppementaux. Il importe maintenant d'obtenir plus de données quant à sa régulation; ceci ouvrant grand la porte à la possibilité ré-induire la plasticité cérébrale via la manipulation de son expression. Dans un ordre d'idées subtilement différent, Rutishauser *et al*⁵² ont d'ailleurs tenté de surexprimer PSA afin de promouvoir des conditions permissives à la réparation de tissus neuronaux endommagés, en l'occurrence les axones du tractus cortico-spinal. L'expression induite de PSA via la transfection d'astrocytes contenant un vecteur codant pour ses enzymes de synthèse au site lésé a permis la recroissance des axones

lésés. Ceci a également aidé au recrutement des cellules souches au site de la lésion et tout au long du parcours où PSA est exprimé. Cet exemple illustre donc l'importance du mécanisme de ré-induction de PSA dans les processus développementaux déficients, et la caractérisation du mécanisme régulateur basal s'avèrerait être un outil fort précieux.

1.3 Les polysialyltransférases *ST8SiaII* et *ST8SiaIV*

1.3.1 Description

Ainsi, la biosynthèse de PSA sur NCAM dépend exclusivement de deux enzymes, des α -2,8-polysialyltransférases, que l'on retrouve dans le réseau trans-Golgi : *ST8SiaII* (STX) et *ST8SiaIV* (PST)⁵³⁻⁵⁶. Le gène *SIAT8B*, encodant les 6 exons de STX, est localisé sur le chromosome 15q26 chez l'humain. Ce locus est associé à la schizophrénie et aux troubles bipolaires⁵⁷. Deux études indépendantes ont d'ailleurs associé positivement un polymorphisme de la région promotrice du gène *SIAT8B* avec la schizophrénie, augmentant de ce fait la possibilité qu'un défaut de polysialylation soit associé à l'étiologie de cette maladie^{58, 59}. L'épissage du gène *SIAT8D*, situé sur le chromosome 5 chez l'humain, donne quant à lui les 5 exons de PST.

À tâche semblable, structure similaire: ces deux enzymes partagent 56% d'homologie dans leur séquence d'acides aminés⁶⁰. PST et STX ont tous deux un court segment cytoplasmique ainsi qu'un large domaine intraluminal contenant une région-tige et un domaine catalytique. Chacune des enzymes peut, de manière indépendante, synthétiser une chaîne d'acide polysialique de près de 50 résidus sur le 5^e Ig de NCAM grâce à un motif de 32 acides aminés caractéristique du domaine catalytique des α -2,8-polysialyltransférases⁶¹. Des études effectuées *in vitro* ont démontré qu'individuellement, PST parvient à synthétiser une chaîne plus longue que son homologue STX, mais que c'est toutefois l'action coordonnée des deux enzymes qui potentialise les paramètres de la polymérisation^{62, 63}. Le mécanisme précis par lequel cette synthèse se produit n'est pas connu; toutefois, les études effectuées via les mutations sur NCAM ont révélé que le site d'arrimage de PST et STX est situé sur le premier domaine FNIII⁶⁴⁻⁶⁶, et que la synthèse s'effectue sur une asparagine³³. L'élongation de PSA sur NCAM ne semble pas avoir d'événement de terminaison distinct – PSA affichant des chaînes de toute la gamme de longueur⁶⁷ – et l'arrêt de la synthèse pourrait plutôt être le résultat d'une diminution progressive de l'affinité des polysialyltransférases pour PSA-NCAM⁶⁸.

1.3.2 Rôles des polysialyltransférases dans le cerveau adulte et en développement

Tout au cours du développement, les enzymes sont exprimées différemment dans des types de cellules et de tissus suivant un profil d'expression spécifique⁶⁹⁻⁷³. D'intéressantes études ont par ailleurs révélé que, malgré une activité de biosynthèse enzymatique semblables, ces profils d'expression différents pouvaient être associés à des fonctions visiblement distinctes au cours du développement^{51, 62, 74-77}. En effet, les souris *knock-out* (KO) pour PST⁷⁵ affichent des aberrations phénotypiques dissemblables aux souris KO pour STX⁷⁴. Ainsi, une insuffisance en PST cause sélectivement des déficiences au niveau de la plasticité hippocampale, de l'apprentissage et de la mémoire chez les souris adultes^{75, 78}. Fait intéressant, les effets d'une carence en PST sur la potentialisation à long terme ne sont observés que dans la région CA1 de l'hippocampe; aucune modification n'est remarquée dans la zone CA3⁷⁵. L'ablation du gène codant pour STX entraîne plutôt une lamination anormale des projections des fibres mossues de l'hippocampe, particulièrement dans la région CA3, est associée à une formation de synapse ectopique, et d'une transmission synaptique basale altérée au niveau du girus dentelé. Le processus de conditionnement par la peur est également touché chez les souris KO pour STX^{74, 79}. L'absence de ces enzymes n'affecte pas la masse du cerveau au cours du développement⁸⁰. Il est par ailleurs pertinent de souligner que chez ces mêmes souris KO, un déficit en STX cause des défauts de polysialylation de NCAM durant la phase périnatale, tandis que les animaux KO pour PST affichent une diminution de PSA dans le cerveau adulte. Suivant ces observations, il semblerait

donc que STX jouerait un rôle prépondérant au niveau du développement du néocortex post-natal, tandis que PST serait essentiel au niveau adulte. Ceci démontre de manière marquante qu'il existe des différences entre ces deux enzymes, et ce malgré des fonctions basales essentiellement similaires⁸⁰.

D'autres observations ont également été soutirées de ces expérimentations. Entre autres, NCAM est sialylé par les polysialyltransférases sans distinction pour l'un ou l'autre de ses isoformes, et l'absence des enzymes n'affecte pas l'expression de ces derniers⁸⁰. Mais un des aspects importants se dégageant de ces études provient du fait que le double KO pour PST et STX chez la souris est létal – 80% d'entre elles mourant au cours des quatre premières semaines post-natales dans un état de cachexie⁸¹. En effet, l'absence de PST et de STX empêche toute sialylation de NCAM, excluant de surcroît l'existence d'une troisième polysialyltransférase^{76, 81, 82}. Ainsi, ce serait plutôt le gain de fonction engendré par la molécule de surface cellulaire, ainsi «nue» et dépourvue de PSA, qui engendrerait des contacts cellulaires ectopiques. Le phénotype est caractérisé par une forme progressive de développement d'hydrocéphalie, d'amincissement de la couche corticale, d'hypoplasie du corps calleux et de malformation de l'hippocampe. On observe également une absence complète de commissure antérieure reliant les noyaux olfactifs aux lobes temporaux du cerveau. L'absence de PSA a de plus pour effet de créer des défauts au niveau des fibres du cerveau; ces dernières sont défasciculées et dévient de leur trajectoire normale⁸¹.

Le triple KO PST^{-/-}/STX^{-/-}/NCAM^{-/-}, quant à lui, survit. Toutes les malformations spécifiques au double KO ont été renversées, fournissant ainsi la preuve que le phénotype létal est effectivement causé par un gain de fonction de NCAM^{81, 82}. Cette observation renforce donc l'hypothèse selon laquelle PSA masquerait le signal de NCAM³³; la régulation de l'expression des enzymes – et donc de la polysialylation – serait alors le régulateur permissif et essentiel des interactions cellulaires *au stade développemental approprié*.

1.3.3 Profils d'expression

Les profils d'expression de PST et de STX sont donc, tel que suggéré précédemment, également divergents. STX est prédominant à la naissance, bien que la différence entre son niveau de transcrit d'ARN et celui de PST ne diffère que par moins d'un facteur deux. L'expression des enzymes décline par la suite. En effet, des recherches ont démontré une réduction de près de 60% de la transcription de PST au cours des 3 premières semaines post-natales; ce niveau chutait de près de 95% pour STX pour la même période, la plus forte baisse étant soulignée autour de P11. Malgré le fait que les niveaux demeurent faibles au niveau adulte, il subsiste une différence entre les taux d'expression des deux enzymes à ce stade. En effet, PST devient proéminent passé P21 avec un niveau de transcrits 5 fois supérieur à celui de STX. En somme, l'expression génique de STX est plus élevée autour de la période périnatale, stade durant lequel ce dernier pourrait avoir une fonction plus importante.

Une observation comparable peut être effectuée avec PST, lequel demeure plus élevé suivant la période critique de plasticité cérébrale^{26, 33, 63, 80, 81}.

À l'instar de PSA, on retrouve également – et en toute logique – PST et STX hors du système nerveux central. Il est, par exemple, retrouvé dans le système nerveux entérique, où son profil d'expression diffère de celui retrouvé dans les cerveaux des vertébrés. En effet, PST y est détectable dans l'intestin dès le 12^e jour embryonnaire (E12), et atteint un sommet d'expression entre E14 et E18. Son expression y décline à la naissance et demeure stable jusqu'au niveau adulte. L'expression de STX est quant à lui marquée par une nette diminution après P14, et est pratiquement indétectable au niveau adulte⁸³. Il est donc important de souligner que le contrôle de l'expression des enzymes est vraisemblablement tissu-spécifique⁵¹, et donc y occupe une fonction précise à un moment distinct.

1.3.4 Impacts et perspectives

De toutes ces études ressortent quelques fonctions primaires de PST et de STX. Toutefois, aucune donnée n'est connue quant à leur régulation. Une question s'impose alors d'elle-même : comment ces enzymes sont-elles régulées au niveau de la transcription génique? Puisque PSA est impliqué dans une multitude de processus neurodéveloppementaux³³, la connaissance de ce mécanisme s'avérerait être un outil essentiel afin de pouvoir manipuler pharmacologiquement l'expression de PST et de

STX. Ceci pourrait alors un impact important sur la formation de la chaîne de PSA sur NCAM, et donc, sur plusieurs changements neurologiques, dont, tel que cité antérieurement, la plasticité cérébrale. Les recherches de Di Cristo *et al*³⁴, précédemment mentionnées, ont démontrée que l'expression PSA était dépendent de l'activité neuronale. Cette observation est la fondation de nos subséquentes recherches portant sur les mécanismes régulant l'expression de PST et STX dans le néocortex des souris.

1.4 Mécanismes de régulation de la transcription génique dépendant de l'activité neuronale

Ainsi, puisque l'expression génique de PSA est activité-dépendante, mon laboratoire s'est penché sur les processus biologiques permettant l'entrée de calcium dans la cellule - une attention plus particulière a été portée sur les mécanismes pouvant ainsi inter-relier ces deux évènements. En effet, l'activité synaptique stimule l'influx de calcium dans le neurone post-synaptique, et met en branle une cascade de signalisation conduisant directement à des changements dans l'expression des gènes⁸⁴⁻⁸⁷. Ces modifications de l'expression génique peuvent affecter de nombreux aspects du développement du système nerveux, incluant la morphogenèse dendritique, la survie neuronale, le développement des synapses, ainsi que des réactions d'adaptation sous-tendant l'apprentissage et la mémoire dans le système nerveux adulte. Des mutations dans les composantes des voies de signalisations

participant à ce processus activité-dépendant peuvent donner naissance à une variété de troubles cognitifs, incluant notamment des troubles du spectre autistique⁸⁵⁻⁸⁹.

Ainsi, les neurones utilisent une proportion considérable de leur énergie afin de maintenir les niveaux basaux de calcium intracellulaire relativement bas; ces derniers pompant les ions dans les réticulums endoplasmiques et sarcoplasmiques internes pour fin d'entreposage, ou en les envoyant directement dans l'espace extracellulaire. Le maintien d'une faible concentration interne en calcium permet à la cellule de répondre rapidement à toute variation de la quantité de calcium cytoplasmique. Le neurone post-synaptique est doté de plusieurs systèmes via lesquels l'entrée de calcium peut s'effectuer suite à l'excitation neuronale. En effet, la dépolarisation post-synaptique engendrée via l'excitation glutamatergique entraîne l'ouverture des canaux ioniques (perméables au sodium, potassium et calcium) glutamate-dépendant N-méthyl-D-aspartate (NMDA) et α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionate (AMPA). Il est important de souligner que les récepteurs NMDA sont hétéromériques, et leurs compositions change au cours du développement. En effet, la sous-unité NR2-B, prépondérante au niveau post-natal, demeure ouverte plus longtemps que son homologue adulte NR2-A, laissant ainsi varier, pour un input similaire, la quantité de calcium entrant dans le neurone au cours du développement^{84, 90}. La dépolarisation subséquente causée par l'influx ionique passant via les canaux AMPA et NMDA met en branle un second mécanisme : l'ouverture des canaux calciques voltage-dépendant de type L (VGCC)^{86, 91, 92}, causant alors non seulement une plus forte dépolarisation, mais aussi une plus grande

entrée de calcium. La cellule étant en soi un élément complexe, il est intéressant d'observer que c'est l'origine du passage du calcium, et non la concentration intracellulaire, qui dicte quelle voie de signalisation, et donc quels effecteurs et quels gènes seront activés. Parmi ces effecteurs, on retrouve, entre autres, l'Extracellular Regulated Kinase (ERK), dont l'activation est un élément central de la plasticité visuelle corticale⁹³. S'en suit également les Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinases II et IV (CAMKII/IV)^{85, 94}, la protéine kinase dépendante de l'AMP cyclique (PKA)⁹⁵, la protéine kinase C (PKC)⁹⁶, ou la protéine kinase dépendante du GMP cyclique (PKG)^{97, 98}, tous étant des effecteurs activés via un influx calcique post-synaptique. En somme, le calcium est un élément essentiel à la transcription de type activité-dépendante. La voie de signalisation et l'induction génique qui s'en suit sont dictées par le choix de la voie d'entrée du calcium⁸⁶. Ceci permet d'entrevoir une possible élucidation de cette dite voie calcium-dépendante si une d'entre elles est impliquée dans la régulation de nos gènes d'intérêts.

1.5 Autres mécanismes impliqués dans la régulation de la transcription des polysialyltransférases

Plusieurs évidences suggèrent d'ores et déjà que d'autres mécanismes cellulaires et moléculaires seraient impliqués dans les pathologies liées à la maturation des synapses GABAergiques et à la plasticité cérébrale⁹⁹⁻¹⁰². Dans cette perspective, les voies de signalisations engendrées par les facteurs de croissance

Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) et Insulin Growth Factor-1 (IGF-1), ainsi que les phénomènes épigénétiques, tels la méthylation et l'acétylation des histones pourraient avoir un effet direct sur la transcription de STX et de PST. Étant donné que de nombreux arguments appuient implicitement ces hypothèses, en voici donc un survol.

1.5.1 Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF)

Ainsi, BDNF est une protéine membre de la famille des neurotrophines, dont la régulation de la transcription est assurée via l'activité neuronale¹⁰³⁻¹⁰⁷. Il est exclusivement sécrété par les neurones glutamatergiques¹. Il a été démontré que BDNF détient un rôle-clé dans le développement du système nerveux, de la formation des synapses inhibitrices⁹⁹ et de la plasticité^{84, 108-110}. Une influence majeure lui est attribuée dans le développement des interneurons GABAergiques. En effet, dans un article fort intéressant, Huang *et al*¹³ ont prouvé que des souris génétiquement modifiées surexprimant BDNF démontraient une accélération précoce de la maturation de l'innervation et de l'inhibition GABAergiques. Ces mêmes souris ont développé une acuité visuelle et se sont vues attribuées d'une terminaison de la période critique de plasticité oculaire prématurée par rapport à leur stade de développement. Chez ces mêmes souris, BDNF parvient à renverser les effets de déprivation binoculaires via la chambre noire, qui, chez les souris de type sauvage, provoque le prolongement de la période critique de plasticité et un retard marqué dans

la maturation de l'inhibition GABAergiques du cortex visuel¹⁶. En somme, BDNF, à l'instar de PSA, joue un rôle prépondérant dans la maturation des circuits GABAergiques. Reste à explorer s'il influence l'expression des polysialyltransférases.

1.5.2 Insulin-like Growth Factor 1 (IGF-1)

L'IGF-1 est une hormone dont la structure est similaire à l'insuline. Il joue un rôle important dans la croissance chez l'enfant et continue d'avoir des effets anaboliques chez l'adulte. Dans le système nerveux, il est plutôt un marqueur de longévité. Le mécanisme par lequel IGF-1 opère n'est à ce jour pas entièrement décodé. Toutefois, un impact certain au niveau cognitif lui est attribué. En effet, l'ajout de IGF-1 prévient les effets délétères de la déprivation monoculaire (MD) sur la plasticité de la dominance oculaire chez la souris *in vivo*¹⁰⁰. De plus, les souris génétiquement modifiées pour le gène MeCP₂, lesquelles démontrent un phénotype semblable au syndrome de Rett, se voient gratifiées d'un revers partiel de leurs syndromes suite à l'application d'IGF-1¹¹¹. Étant ainsi impliqué dans la plasticité cérébrale ainsi que dans une maladie liée au spectre autistique, il est donc possible que les IGF-1 ait une fonction dans le développement du système GABAergique.

1.5.3 La méthylation de la chromatine

Certains mécanismes moléculaires peuvent modifier la structure de la chromatine sans toutefois engendrer de mutations. Conséquemment, ces changements, dits «épigénétiques», peuvent affecter l'expression des gènes¹¹². Un de ces phénomènes est la méthylation des cytosines des îlots CpG de l'ADN. Ces modifications, produites par l'enzyme ADN-méthyltransférase 1^{101, 113} ou 3a¹¹⁴ (DNMT1/3a), engendrent généralement une répression génique; deux mécanismes illustrent à ce jour leur mode de fonctionnement. Le premier suggère que la méthylation d'îlots CpG des sites de liaison de facteurs de transcription aux promoteurs empêche l'arrimage de ces derniers, et donc, inhibe la transcription. Le second mécanisme démontre que la répression génique est médiée via une protéine se liant spécifiquement à l'ADN méthylée, le rendant ainsi inaccessible à toute autre machinerie transcriptionnelle. Cette protéine est la Methyl-CpG binding protein 2 (MeCP₂)^{115, 116}. Cela dit, les liens entre la méthylation et le développement du système GABAergique sont fort captivants; des anomalies à ce niveau ayant un lien causal avec certaines maladies neurodéveloppementales, telles la schizophrénie^{101, 117, 118} ou le syndrome de Rett¹¹⁹⁻¹²¹.

C'est ainsi qu'il a été démontré que les neurones GABAergiques expriment fortement la DNMT1, alors que cette enzyme est virtuellement absente dans les cellules pyramidales des patients schizophrènes et bipolaires^{101, 117, 122}, intensifiant ainsi les probabilités qu'un défaut de méthylation dans les neurones GABAergiques

soit impliqué dans ces pathologies. L'expression de certains gènes, dont la reelin et GAD67, est d'ailleurs modulée par les niveaux de méthylation, et donc, par l'activité de DNMT1¹¹³. Enfin, la cause directe d'une pathologie de type autistique, le syndrome de Rett, consiste en une mutation dans le gène MeCP2. En somme, plusieurs évidences démontrent l'implication du remodelage de la chromatine via la méthylation dans des défauts liés aux interneurons GABAergiques. Une investigation au sujet de l'implication de ce mécanisme dans la régulation génique de nos enzymes d'intérêts est à entrevoir.

1.5.4 L'acétylation des histones

L'adaptation neuronale aux variations de stimuli sensoriels engendre des modifications tant fonctionnelles que structurales des circuits neuronaux; lesquelles dépendent essentiellement des changements dans l'expression des gènes¹²³⁻¹²⁵. Les mécanismes sous-jacents ces phénomènes ne sont pas entièrement démystifiés. Toutefois, un second mécanisme épigénétique, entraînant le remodelage de la chromatine via l'acétylation des queues des histones, émerge en tant que mécanisme fondamental de la régulation génique^{126, 127}. De solides avancées ont démontré que ce mécanisme serait impliqué, entre autres, dans la formation de la mémoire et du processus d'apprentissage et de la plasticité synaptique^{125, 128-130}.

Ainsi, ce sont les activités opposées des enzymes histones acétyl transférase (HAT) et des histones déacétylases (HDAC), lesquelles permettent respectivement l'ajout et l'ablation de groupement acétyl sur les résidus lysines des histones, qui déterminent l'accessibilité de la machinerie transcriptionnelle à la chromatine. L'acétylation corrèle avec ouverture de la chromatine et une activation de la transcription génique chez les eucaryotes, tandis que la déacétylation la réprime¹³¹. Plusieurs portent une attention particulière aux HDACs. Sur la base de leur structure primaire, ces derniers sont subdivisés en classe I (HDAC1, 2, 3 et 8), classe II activité-dépendante (HDAC 4, 5, 6, 7 et 9), classe III (SIRT1-SIRT7) et classe IV (HDAC 11)¹³¹. Toutefois, un des aspect important des HDACs est que le phénomène qu'elles engendrent peut être bloqué via l'ajout d'inhibiteurs d'histones déacétylases (HDACi). Les HDACi interagissent avec les HDACs; l'inhibition de la déacétylation ayant pour effet d'augmenter la transcription de certains gènes. Les HDACi, tels l'acide valproïque (VPA), le butyrate de sodium (SB), la trichostatin A (TSA) ou l'acide suberoylanilide hydroxamique (SAHA) peuvent inhiber toutes les classes de HDACs), tandis que d'autres composés ont une spécificité pour certaines classes (MC1568, classe II), ou isoforme (MS275, HDAC1)¹³².

Tel que mentionné, quelques études se sont d'ailleurs penchées plus spécifiquement sur ces dites implications des HDACs dans les événements corticaux. Ainsi, il a été démontré qu'une diminution des modifications post-traductionnelles par les HDACs est à l'origine de la régulation de la plasticité corticale du système visuel¹³³ et que HDAC2 régule négativement la formation de la mémoire ainsi que de

la plasticité synaptique¹²⁵. De plus, la maturation des synapses excitatrices compte sur le relais entre la contribution de HDAC1 et 2 au cours du développement¹³⁴. Enfin, les HDACi, tel le VPA, est un composé approuvé par la *US Food & Drug Administration* (FDA) et Santé Canada afin de traiter l'épilepsie¹³⁵. En somme, ce mécanisme épigénétique est impliqué dans une panoplie de processus neurodéveloppementaux en lien, de près ou de loin, avec le développement du système GABAergique.

1.6 Objectifs de recherche

1.6.1 Contexte

PSA est connu comme étant l'élément-clé de la régulation du développement et de la maturation des synapses inhibitrices GABAergiques dans le néocortex visuel des souris, et que ce dernier détermine le début de la période critique de plasticité³⁴. Sa présence exclusive sur la protéine membranaire NCAM³⁵ est inversement corrélée à l'activité neuronale³⁴ et dépend essentiellement de deux polysialyltransférases, PST et STX^{136, 137}. Toutefois, les mécanismes moléculaires entourant la régulation de ces enzymes, et par conséquent, de PSA, demeurent à ce jour inconnus.

1.6.2 Objectif principal

L'objectif principal consiste donc à déterminer quels sont les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la modulation de PST et de STX durant la période post-natale précédant l'ouverture des yeux chez la souris. De plus, nous aimerions découvrir si PST ou STX, ou l'effet synergique des deux polysialyltransférases, contribuent activement à la régulation génique activité-dépendante de PSA dans le cortex visuel durant la période entourant l'ouverture des yeux (fin de la 2^e semaine post-natale).

1.6.3 Objectifs spécifiques

Nos recherches antérieures nous avaient déjà permis d'analyser l'expression *in vivo* et *in vitro* de PSA au cours du développement dans le néocortex chez la souris (Annexe A.1)³⁴. À partir de ces importantes informations, nous proposons de :

- 1) Effectuer une fine analyse de l'expression génique de PST et STX au cours du développement post-natal dans le cortex visuel des souris et dans les cultures organotypiques de cerveau de souris C57BL/6.
- 2) Déterminer si l'expression de PSA est affecté par les déprivations binoculaires chez la souris durant la période précédant l'ouverture des yeux jusqu'au début de la période critique de plasticité.
- 3) Vérifier dans des modèles *in vivo* de déprivations binoculaires et *in vitro* via l'ajout de TTX au milieu de culture si les expressions de PST et STX sont également activité-dépendantes.
- 4) Identifier quelles voies d'entrée du calcium intracellulaire, suite à l'excitation post-synaptique, influencent l'expression génique des polysialyltransférases.
- 5) Déterminer les effecteurs impliqués dans la voie de signalisation calcium-dépendante.
- 6) Tenter d'identifier si d'autres mécanismes, tels BDNF, IGF-1, la méthylation de l'ADN ou l'acétylation des histones sont impliqués dans la régulation de la transcription de PST et STX.

CHAPITRE 2 : MANUSCRIT

CHAPITRE 2 : MANUSCRIT

(En préparation)

Sensory Experience Differentially Modulates STX and PST mRNA Expression in Postnatal Mouse Visual Cortex

Marie-Claude Bélanger¹, Graziella Di Cristo^{1,*}

¹CHU Sainte-Justine and Université de Montréal, Montreal, Qc, Canada

*Corresponding author: Graziella Di Cristo

ABSTRACT

Polysialic acid (PSA) is a unique carbohydrate composed of a linear homopolymer of α -2,8 linked sialic acid, and is mainly attached to the fifth immunoglobulin-like domain of the neural cell adhesion molecule (NCAM) in vertebrate neural system. In the brain, PSA is exclusively synthesized by the two polysialyltransferases STX (also known as ST8SiaII) and PST (also known as ST8SiaIV). By modulating adhesive property of NCAM, PSA plays a critical role in several neural development processes such as cell migration, neurite outgrowth, axon pathfinding, synaptogenesis and activity-dependent plasticity. The expression of PSA is temporally and spatially regulated during neural development and a tight regulation of PSA expression is essential to its biological function. In mouse visual cortex, PSA is downregulated following eye opening and its decrease allows the maturation of GABAergic synapses and the opening of the critical period for ocular dominance plasticity. Relatively little is known about how PSA levels are regulated by sensory experience and neuronal activity. Here, we demonstrate that while both STX and PST mRNA levels decrease around the time of eye opening, only STX mRNA level reduction is regulated by sensory experience. Using an organotypic culture system, we further show that STX gene expression is regulated by spiking activity and NMDA-mediated excitation. Further, we show that both STX and PST mRNA levels are positively regulated by PKC-mediated signalling. Therefore, sensory experience-dependent STX gene expression regulates PSA levels in postnatal visual cortex, thus acting as molecular link between visual activity and PSA expression.

INTRODUCTION

Polysialic acid (PSA) moiety is a long, linear homopolymer of α -2,8-linked sialic acid attached almost exclusively to the neural cell adhesion molecule (NCAM) in vertebrates [1]. PSA modulates cell adhesion and signal transduction events mediated by NCAM and other adhesion molecules by virtue of its polyanionic nature and large hydrated volume [2].

In the developing system, PSA has been shown to play a role in neuronal migration [3], axonal fasciculation, branching, and targeting in the peripheral and central nervous system [4,5,6], synaptogenesis [7,8] and activity-dependent plasticity [9,10]. In addition, the persistent expression of PSA in certain regions of the adult nervous system, such as the hippocampus and the olfactory bulb, is correlated with the maintenance of neurogenesis and circuit remodelling [11,12].

As a widespread and general modulator of cell interaction, PSA in itself is unlikely to provide a specific signal for cell interactions [13]. Instead, its expression may represent a regulated permissive signal for allowing optimal levels of interactions between cell-cell or cell-extracellular matrix, which may either promote or inhibit specific morphogenic events at the appropriate time and with the appropriate order. In this context, a tight regulation of PSA expression appears to be essential to its biological function. A key issue is how the expression of PSA is regulated as a part of physiological process in the brain.

A recent study showed that PSA expression is downregulated in visual cortex after eye opening and its decline is dependent on sensory experience. Premature removal of PSA induced early maturation of GABAergic innervation and onset of critical period for ocular dominance plasticity [8]. Critical periods represent heightened epochs of brain plasticity, during which experience can produce permanent, large-scale changes in neuronal circuits [14]. Experience-dependent refinement of neural circuits has been described in many regions within the central nervous system, suggesting it is a fundamental mechanism for normal vertebrate CNS development. By regulating the timing of the onset of critical periods, PSA expression may influence how experience shapes brain wiring during early life and adolescence. The cellular mechanism that couples sensory experience and PSA expression in the developing brain are unknown.

NCAM is polysialylated by two polysialyltransferases ST8SiaII [15] and ST8SiaIV [16]. Studies of STX and PST knockout mice have revealed specific and distinct deficits in synaptic connectivity and plasticity, and learning and memory process reinforcing their role in synapse formation and neural circuits function [17,18,19]. The STX gene is strongly expressed in the fetal and neonatal brain, whereas PST gene expression predominates in the mature brain [20], but their individual roles *in vivo* are still not fully understood

Here, we examine the role of sensory experience and neural activity in the regulation of STX and PST gene expression in the postnatal brain. We showed that STX and PST mRNA levels were down-regulated around the second postnatal week in mouse visual cortex, paralleling the decrease in PSA expression levels. The decline in STX, but not PST mRNA levels, was dependent on visual experience deprivation *in vivo* and on NMDA activation *in vitro*. Further, PKC positively regulated both PST and STX expression. Altogether, our data suggest that sensory experience-dependent STX expression regulates PSA levels in postnatal visual cortex, therefore defining a molecular link between visual activity and PSA expression.

RESULTS

We first characterized the time course of STX and PST expression in mouse visual cortex (Figure 1A) and in organotypic culture prepared from mouse occipital cortex (Figure 1B) by using quantitative real-time PCR (qPCR) analysis. STX expression sharply declined around eye opening (postnatal day (P) 13) and was nearly absent in mouse visual cortex from P14 through adulthood (Figure 1A1). PST expression levels were also diminished by P14, but less dramatically than its counterpart STX; indeed low levels of PST transcripts could still be detected in adults (Figure 1A2). Overall, PST mRNA levels remain higher than STX mRNA levels (Supplemental Figure 1). The developmental decline in STX and PST mRNA levels parallel the observed decline of PSA expression [8], thus suggesting that the limiting step regulating PSA expression level is its synthesis.

Previous data showed that PSA expression decreases after eye opening and that its decline is dependent on visual experience [8]. Whether STX, PST or both are sensitive to visual experience is unknown. To assess the effect of visual-induced neuronal activity on STX and PST gene expression, we binocularly deprived (BD) mice by eyelid suture from P13 to P25 and quantified STX and PST transcript levels by qPCR. To correct for inter-individual variability in gene expression, we normalized the mRNA levels measured in occipital, visual cortex (OC) by the one measured in parietal cortex (PC), as described in Di Cristo et al (2007) [8]. STX, but not PST, mRNA levels were significantly higher in BD mice compared with non-

deprived, age-matched, control mice (Figure 2A,B; P25 ctr n=4 and P25 BD n=5; t-test, $p < 0.01$ for STX, $p > 0.05$ for PST). We further confirmed that PSA expression, quantified by immunoblot analysis, remained significantly higher in visual cortex from BD mice compared to P25 control littermates (Figure 2C, P25 Ctr n=3 mice, P25 BD n=3 mice; t-test, $p < 0.001$), similarly to what occurs in mice dark-reared from birth [8]. Altogether, these results suggest that 1) STX, but not PST, gene expression is regulated by visual experience and 2) STX is the main enzyme responsible for experience-dependent downregulation of PSA expression in the postnatal cortex around eye opening.

To further examine the molecular mechanisms regulating activity-dependent STX expression, we turned to cortical organotypic cultures. Many developmental processes occur in organotypic cultures with a time course similar to the *in vivo* brain [21,22,23]. In particular, PSA expression decreases between Equivalent Postnatal day 14 (EP 14= P4+10 days *in vitro*) and EP24 in cortical organotypic cultures. *In vitro* studies revealed a similar developmental time course for STX and PST expression, with both STX and PST steadily declining after the first week *in vitro* (Figure 1B); the most important decline being observed by EP14. We further examined whether STX gene expression was dependent on neuronal activity levels. To block spiking activity, 1 μ M tetrodotoxin (TTX) was added to the culture media from EP8-14 (Figure 3). This time window was chosen because STX expression sharply declined between EP8 and EP12 (Figure 1B1). We found that STX, but not PST,

developmental down-regulation was prevented by TTX application (Figure 3A, n=6 TTX-treated samples from EP8-14; n=6 Ctr samples; 2-way anova, post-hoc Holm-Sidak method, $p < 0.05$ for STX, $p > 0.05$ for PST). This effect was reproducible and independent from the litter. Long-lasting blockade of spiking activity could cause tissue damage, therefore we tested whether 3 days TTX application, that have been shown to not cause any neuronal death [23], could still affect STX mRNA expression. STX mRNA levels in TTX-treated cultures from EP11-14 were significantly increased compared to STX levels in age-matched cultures (Figure 3A; n=8 TTX-treated samples from EP11-14, n=11 Ctr samples; 2-way anova, post-hoc Holm-Sidak method, $p < 0.05$). PST levels were not affected (Figure 3B; 2-way anova, post-hoc Holm-Sidak method, $p > 0.05$). STX mRNA levels were proportional to the period of neuronal spiking blockade, indeed in cultures treated with TTX for 6-days we detected a 4-fold increase of STX transcript vs 2.2-fold increase in cultures treated for 3 days.

Next we investigated whether increasing neuronal activity could accelerate the down-regulation of STX mRNA. Indeed, adding 50 μ M bicuculline methiodide (BMI), a GABA_A receptor inhibitor, in culture media from EP11-14 accelerated STX mRNA decrease compared to aged-matched controls. No changes were observed for PST (Figure 3, n= 3 BMI-treated samples from EP11-14; n=6 Ctr samples). Altogether, these data strongly support the hypothesis that STX, but not PST, mRNA expression are dependent on neuronal activity levels during post-natal development in the cortex.

To investigate whether glutamatergic neurotransmission was involved in STX expression regulation, we blocked AMPA and NMDA receptors using respectively CNQX (10 μ M) and APV (50 μ M) from EP11-14. Compared to controls, STX expression levels were significantly increased by NMDA but not AMPA receptor blockers alone, and by the combination of both. (Figure 4A; n=3 APV-treated samples, n=4 CNQX-treated samples, n=5 CNQX + APV -treated samples, n=6 Ctr samples; 2-way ANOVA, post-hoc Holm-Sidak method, $p < 0.05$ for APV and APV+CNQX, $p > 0.05$ for CNQX). Importantly, STX levels in APV and APV+CNQX-treated cultures were not significantly different from the one in TTX-treated cultures (1-way ANOVA, post-hoc Holm Sidak method, $p < 0.05$). The larger effect elicited by APV compared to CNQX application suggests that Ca^{2+} entry through NMDA receptor may play a role in the regulation of STX expression. Indeed, spiking activity stimulates Ca^{2+} influx into the postsynaptic neuron through NMDA receptor and voltage-gated Ca^{2+} channel (VGCC); in turn Ca^{2+} triggers several signalling cascade leading directly to changes in gene expression [24,25]. To investigate whether calcium entry through VGCC plays also a role in regulating STX expression, we blocked VGCC using nimodipine (10 μ M) from EP11-14. Contrary to NMDA blockade, the effect of nimodipine on STX levels were somewhat variable and on the whole, not significantly different from controls (Figure 4A, n=5 nimodipine-treated samples, n=7 Ctr samples; 2-way ANOVA, post-hoc Holm-Sidak method, $p > 0.05$). To confirm that Ca^{2+} influx plays a role in the regulation of STX

expression, we incubated cortical cultures in calcium-free media from EP11-14. We found that STX levels were slightly, but significantly, increased in this condition compared to controls (Figure 4A, n=6 treated samples, n=2 control samples; t-test, $p < 0.05$). PST mRNA levels were not significantly affected by any of these treatment (Figure 4B, 2-way ANOVA, $p > 0.05$). Taken together, these results suggest that the developmental decline of STX mRNA levels during postnatal development is mediated by NMDA receptor activation, possibly through Ca^{2+} dependent mechanism.

Next, we tried to uncover which signalling pathways are involved in the activity-dependent downregulation of STX transcripts in the postnatal cortex. NMDA receptor activation is known to activate many signalling pathways, including: ERK [26], CAMKII [27], PKA [28], PKG-mediated pathway [29]. To test whether any of these pathways was involved in the regulation of STX gene expression, we added to the culture media specific pharmacological inhibitors from EP11-14. In particular, we tested the effect of inhibitor of ERK (U0126, 20 μ M), CaMKII (KN-62, 15 μ M), PKA (KT5823, 10 μ M) and PKG (KT5720, 1 μ M). No significant difference in STX and PST expression levels were reproducibly observed following any of these treatments (Figure 5, n=3 U0126-treated samples, n=4 KN-62-treated samples, n=3 KT5823-treated samples, n=3 KT5720- treated samples; two-way ANOVA, $p > 0.05$).

In vitro studies suggest that STX gene expression may be dependent on CREB or a CREB-like transcription factor [30]. PKC-mediated CREB activation could thus be involved in STX transcription. Blocking PKC activity by adding 10 μ M chelerythrine in the culture media from EP11-14 caused a reduction of both STX and PST mRNA levels (Figure 5; n=6 chelerythrine-treated samples; n= 4 Ctr samples; 2-way ANOVA post-hoc Holm Sidak method, $p < 0.05$). To test whether PKC activation modulates activity-dependent regulation of STX mRNA levels, we treated organotypic cultures with 1 μ M TTX + 10 μ M chelerythrine from EP11-14. STX mRNA levels in the treated group were not significantly different from untreated controls (Figure 5A, n=6 treated samples, n=4 control samples; two way ANOVA, $p > 0.05$), suggesting that PKC activation is at least partially involved in maintaining high STX mRNA levels when neuronal spiking is reduced. PST mRNA levels were very variable in the treated samples, increasing in some samples and decreasing in others (Figure 5B, 2-way ANOVA, $p > 0.05$).

Altogether, these results suggest that STX mRNA levels are finely tuned by NMDA-mediated excitation and PKC activation during postnatal development in visual cortex.

DISCUSSION

Previous work has shown that during development, PSA expression is dependent on sensory experience in mouse visual cortex, and its downregulation regulates the timing for GABAergic synapse maturation and the onset of ocular dominance plasticity [8]. The cellular mechanism that couples neural activity and PSA expression is a key to linking this general modulator of cell interaction to specific neural developmental events. The purpose of this study was to identify cellular mechanisms by which the experience-dependent regulation of PSA occurs, and to identify signalling pathways that might couple visual activity with PSA biosynthetic machinery.

We analyzed the developmental time course and the effect of visual deprivation *in vivo* on the expression of the genes encoding the enzymes responsible for PSA synthesis in mouse brain, the polysialyltransferases PST and STX. The results obtained were similar for STX and PST, in that the disappearance of NCAM polysialylation previously found during the period of synaptogenesis [8] is accompanied by a corresponding decrease in the levels of both STX and PST transcripts. Similar results were found in organotypic cultures system where PSA levels [8], STX and PST mRNA levels declined over the same period, in parallel to a steady increase in the levels of spontaneous activity [31]. Remarkably, mRNA levels for STX, but not PST, remain higher in the visual cortex of binocular deprived mice as compared to control littermates and in TTX-treated organotypic cultures,

paralleling the increase in PSA expression levels [8]. These findings suggest that activity-dependent regulation of STX transcript levels may be the molecular mechanism linking sensory experience and PSA expression in postnatal visual cortex.

Our evidence suggests that activity-dependent changes in STX transcription required (1) activation of NMDA receptors, and (2) calcium entry into the cell likely through the NMDA receptor. Under physiological conditions, extracellular Mg^{2+} blocks the NMDA receptor channel at the resting membrane potential. High-frequency stimulation of presynaptic afferents should activate non-NMDA receptor channels sufficiently to depolarize the postsynaptic cell, remove the Mg^{2+} blockade, and permit Ca^{2+} entry via NMDA receptor channels. In organotypic cultures, the developmental decrease of STX mRNA levels was suppressed by APV, suggesting a negligible role in this effect for Ca^{2+} influx through voltage-gated Ca^{2+} channels. This was confirmed by the overall lack of effects observed following application of nimodipine, an inhibitor of voltage-gated Ca^{2+} channels. NMDA receptor activation has been shown to differentially regulate PSA expression in several systems, with the direction of the change depending from the age and the region [32]. Similarly, the differential effect of NMDA activation on STX and PST transcript levels might be age specific in the visual cortex.

In addition to transcriptional control of polysialyltransferase(s), PSA expression at the cell surface could also be affected by nontranscriptional modulation of either STX

or PST activity or both. For example, it has been suggested that calcium-dependent regulatory mechanism [33] and polysialyltransferase phosphorylation [34] may be involved in the regulation of enzymatic activity. Finally, PSA expression on the cell surface can be more locally and rapidly regulated by activity-dependent differential delivery of presynthesized PSA–NCAM to the cell surface. Indeed, intracellular granules containing PSA have been described in pancreatic cells and the calcium-dependent fusion of these granules with the plasma membrane can be induced by depolarization of the membrane. Further, in oligodendrocyte precursors, NMDA can induce a glutamate receptor-dependent influx of calcium that is thought to enhance transport of PSA–NCAM to the cell surface [35].

The molecular mechanisms responsible for the activity-dependent reduction of STX transcripts are still unknown. STX transcription could be modulated by a transcriptional repressor, such as repressor-element 1 silencing transcription factor (REST) [36]. On the other hand, STX transcripts levels could also be negatively regulated by micro-RNA (mi-R). Indeed, miRs have been shown to play a role in multiple developmental processes, including synapse formation and plasticity [37]; moreover, the expression of some mi-Rs can be modulated by neuronal activity [38,39]. Further experiments will be required to investigate whether specific miR could target STX mRNA and thus reducing their stability.

Our findings suggest that both STX and PST gene expression is regulated by PKC; indeed treating organotypic cultures with chelerythrine, an inhibitor of all PKC isoforms, induces a precocious reduction of both STX and PST levels. Moreover, inhibition of PKC blocks the TTX-induced increase of STX transcripts. PKC-mediated CREB activation could be involved in STX and PST gene transcription. Indeed, *in vitro* studies indicate that STX, but not PST, gene expression is dependent on CREB or a CREB-like transcription factor [30]. In addition, it has been suggested that PKC can phosphorylate a repressor complex formed by HDAC1/2, thereby allowing gene transcription [40]. Further experiments will be required to establish whether the HDAC1/2 complex is involved in STX/PST expression. Interestingly, Gallagher et al (2001) [34] demonstrated that protein kinase C delta (PKC δ) negatively regulates polysialyltransferase activity in the rat hippocampus during memory consolidation. Thus, it is possible that different PKC isoforms play different roles or, alternatively, their effects could be age- or brain region- specific. Overall, the findings regarding the biosynthesis of STX and TTX are remarkable with respect to the specificity of the pharmacology: indeed, no perturbation of major second messenger pathways other than PKC pathway had any effect of STX and PST synthesis, indicating that polysialylation might not easily be perturbed by a wide spectrum of factors.

In conclusion, our findings suggest a dynamic model, where STX mRNA levels are positively regulated by PKC-mediated signalling and decreased by neural activity-

dependent mechanisms, in the developing visual cortex. The balance of these processes controls polysialyltransferases activity and, consequently, PSA expression levels. PSA levels, in turn, regulate the timing of specific cell-cell interaction events leading to neuronal circuit formation and plasticity.

The signalling mechanisms regulating PSA synthesis are of prime importance in the overall determination of neuroplastic state and synaptic networking. For example, variations in ST8SIA2 have been implicated in schizophrenia [41,42], providing a mechanism by which genetic interference with the complex coordination of NCAM polysialylation may lead to a neurodevelopmental predisposition to a neurodevelopmental disease. PSA production in the central nervous system may have therapeutic potential, but an understanding of the key processes leading to the polysialylation of NCAM by STX and PST is required before such treatment could be envisaged. The investigation of such mechanisms under normal and pathological conditions could pave the way to new treatment strategies to the repair damaged tissues in the central nervous system and to re-induce structural plasticity [13,43].

METHODS

Animals

C57BL/6 mice were purchased from Harlan Laboratories (Montreal, QC, Canada). The Canadian Council on Animal Care (CCAC) local committee approved the research protocols.

Organotypic culture

Postnatal day 4 (P4) to P6 mouse pups were decapitated and brains were rapidly removed and immersed in ice-cold culture medium (MEM enriched with Glutamax (cat. no. 42360, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 20% Horse serum, 1mM glutamine, 2mM MgSO₄, 1mM CaCl₂, 0.0012% ascorbic acid, 1µg/ml insulin, 30.04mM Hepes, 5.24mM NaHCO₃, 12.88mM D-glucose, pH 7.27). 400µm thick coronal brain slices were obtained using a Chopper (Stoelting, Wood Dale, IL, USA). Slices (usually 2-3) were placed onto Millicell membrane inserts (cat. no. PICMORG50), in a 6-well plate containing 750µl of culture medium per well. Tissues were incubated at 34°C in a 5% CO₂-enriched atmosphere humidified incubator. Medium was changed every second day. In experiments in which conditioned media was used, pharmacological agents were mixed directly with the media, filtered using 0.22µm filter fixed to a syringe, and added to cultures during specific time windows. Drugs were dissolved in DMSO and final concentration in culture media were as follow: Nimodipine 10µM, K252a 40µM, U0126 20µM, KN-62 15µM, KT5823 10µM, KT5720 1µM, and Chelerythrine chloride (CHE) 10µM (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA).

Bicuculline Methiodide (BMI, 50 μ M, Fluka Chemical Corp, Ronkonkoma, NY, USA) was dissolved in deionized water. CNQX (10 μ M, Tocris Bioscience) was dissolved in HCl 1N. APV (50 μ M, Tocris Bioscience) was dissolved in NaOH 1M. Finally, Tetrodotoxine (TTX, 1 μ M, Alomone Labs, Jerusalem, Israel), was diluted in citrate buffer pH 4.8. For experiments requiring calcium-free media, culture media was essentially the same as described above, with the exception that MEM enriched with Glutamax was replaced by S-MEM (Invitrogen, cat. no 11380-037) and no CaCl₂ was added.

Binocular deprivation

To assess the effect of visual deprivation on gene expression, P13 mice were anesthetized by isoflurane (2%) and binocularly deprived. Procedures were performed prior to eye opening. Lid margin were trimmed and sutured with 5-0 Monosoft Nylon. Mice recovered rapidly after the cessation of anesthesia and were returned to their cages. Mice showing lid opening were not included in the experiments. Mice were sacrificed at P25 by decapitation. Visual cortices from both hemispheres were collected and either frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C if used for protein extraction or kept at 4°C in RNAlater solution (Qiagen Inc, Mississauga, ON, Canada) if used for RNA extraction.

Immunoblotting

Immunoblotting was performed essentially as described [8]. Protein lysates were prepared by homogenizing tissue from either mouse visual cortex or cortical organotypic culture in 50mM Tris-HCl (pH 7.6), 150mM NaCl, 2mM EDTA, 1% Igepal CA-630, and 1x protease inhibitor cocktail (Roche, Basel, Switzerland). For *in vitro* analysis, 4-6 cortical slices were collected and pooled together for each developmental time point or pharmacological experiment; one mouse for each age point and at least 3 mice for sensory deprived experiments were used for *in vivo* analysis. Tissues were disrupted by pipetting up & down. The amount of protein extracted was quantified by Bradford protein assay (cat. no. 500-0006, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), and samples were adjusted to equivalent concentrations with deionized water. Samples were mixed with an equal volume of 2x Laemmli buffer, boiled for 5 min, and stored at -80°C. Equal amount were loaded to each lane. Proteins were separated using 6.5% polyacrylamide separation gels with 5% stacking gels (Bio-Rad Laboratories). Transfer process occurred onto Millipore Immobilon-P polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane (Millipore, Billerica, MA, USA), which was then blocked by incubation in TBS-T (0.1% Tween-20) with 5% dried milk. Membranes were probed with anti-PSA (1:1000, mouse monoclonal IgM, cat no. MAB5324, Chemicon (now part of Millipore) and anti-GAPDH (1:4000, mouse monoclonal IgG, cat no. AB4300, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse secondary antibody (Invitrogen) (Amersham - acquired by GE healthcare Bio-Sciences Corp, Piscataway,

NY, USA) was added to the blots prior to immunoreactive band detection by Western Lighting Plus Chemiluminescence Reagent (cat no. NEL103, Perkin-Elmer, Waltham, MA, USA). Signals were visualized by exposing membrane to Bioflex autoradiography film (InterScience, Markham, ON, Canada). Normalization of the amount of PSA to GAPDH was performed by scanning non-saturated immunoblots and analyzed band intensities with Image J software.

Quantitative Real-Time PCR

One mouse for each age point and at least 3 mice for binocular deprivation experiments were used for *in vivo* analysis. For *in vitro* analysis, 4-6 cortical slices were collected and pooled together for each developmental age point or pharmacological treatment. All samples were kept at 4°C in RNAlater solution (Qiagen Inc) for no more than one month prior to RNA extraction. RNA was extracted using the RNeasy mini kit (cat no. 74104, Qiagen Inc) following the manufacturer's instructions. RNA quantity and purity were determined by measuring the absorbance at 260 and 280nm. Samples were stored at -80°C. Reverse transcriptase reaction for cDNA synthesis was performed using RT Omniscript kit (cat no. 205111, Qiagen Inc). RNA was first denatured at 65°C for 5 min. Each 20µl-reaction contained 1µg of RNA, 1x RT Omniscript reaction buffer, 0.5mM of each dNTP, 4U RT Omniscript enzyme, 1µM Oligo-dT primers (Invitrogen), and 10U RNase inhibitor (Invitrogen). Samples were incubated at 37°C for 1h, and RT enzyme was inactivated at 93°C for 5 min. Experiments were carried-out on an ABI Prism

7900 Sequence Detection System (Applied Biosystems) using 384-wells plate. Each 10 μ l reaction contained 1.5 μ l of a 1/10 dilution of the cDNA reaction, 1x SYBR Green PCR Master Mix (cat no. 4309155, Applied Biosystems) and 0.4nM exon-spanning primers (STX 5'-CTCTCTGAGGATCAGGAAGCAAA-3' and 5'-AATAATGTCTCCAGGCTTCAGGG-3', PST 5'-GGAGATGGTGAAGTGTGTTTGAG-3' and 5'-ACAGAATGTTGGAAGATGGTGGAG-3', GAPDH 5'-GGTCGGTGTGAACGGATTTGGC-3' and 5'-TTGCCGTGAGTGGAGTCATACTGG-3'). Cycling conditions included a 10 min initial denaturation step at 95 °C, followed by 42 cycles at 95°C for 15sec and 60°C for 1 min. Melting curve analysis consisted of one cycle at 95°C for 15sec, followed by 15 sec at 60°C, and 95°C for 15sec. Note that all developmental time courses were normalized using both GAPDH and β -actin and results were identical. However, following experiments were performed using GAPDH only because it has been reported that β -actin expression might be regulated by neural activity.

qPCR data analysis

Relative quantification of STX, PST and GAPDH transcripts was determined by the standard curve method using serial dilution (1/2, 1/10, 1/50, 1/250, 1/1250) of a freshly prepared cDNA from P4 visual cortex RNA. Data was analyzed using the Real-Time PCR System Sequence Detection Software v2.2.2. Briefly, the amount of PCR transcripts was measured based on the threshold cycle (Ct), which is the cycle

where fluorescence is detected above baseline level. Each dilution of the standard curve was performed in triplicate. Standard curves were obtained by plotting the mean Ct values against the log concentration of the input starting material. Standard curves were then used to obtain the amount of transcripts for each sample. Each sample was analyzed in triplicate for STX, PST and GAPDH. The mean relative amount of transcripts of STX and PST of each sample was normalized to GAPDH levels.

Statistics

For *in vivo* experiment, we normalized mRNA or protein levels measured in occipital, visual cortex (OC) by the one measured in parietal cortex (PC), as described in Di Cristo et al (2007) [8], to correct for inter-individual variability in gene expression. PSA protein and STX and PST mRNA normalized values obtained in controls and binocular deprived animals were compared using t-test.

For *in vitro* experiment, STX and PST mRNA levels were very consistent within a single litter, but could vary a lot between litters. For this reason, each experiment was repeated using at least two different litters and raw data (STX/GAPDH and PST/GAPDH) for both control and treatment groups were compared using 2-way ANOVA, to account for both the treatment and the litter. Ratios treatment/controls were then compared between them using t-test if normally distributed or Mann-Whitney test on ranks if not-normally distributed.

ACKNOWLEDGEMENT

We thank Drs. Graçielá Pineyro and Bidisha Chattopadhyaya for valuable assistance in discussion and for critical reviewing this manuscript. GDC has support from CIHR, NARSAD, Scottish Rite Charitable Foundation, CFI and Canada Research Chair program. MCB has a fellowship from Sainte-Justine Hospital Foundation and Foundation of the Stars.

FIGURE LEGENDS

Figure 1 Expression levels of STX (black bars) and PST (gray bars) mRNA decline in mouse visual cortex (A) and organotypic culture (B) with a similar time course during postnatal development.

Figure 2 Sensory experience regulates STX, but not PST, mRNA levels *in vivo*. (A-B) STX (A), but not PST (B), mRNA levels are significantly higher in visual cortex from mice binocularly deprived from P13-25 (t-test, *p <0.01). For each animal, STX and PST expression levels in visual cortex (OC) are normalized to those found in parietal cortex (PC). (C) Left, immunoblot analysis of mouse visual cortex (OC) and parietal cortex (PC) using anti-PSA and anti-GAPDH antibodies. Right, quantification of PSA expression levels in mouse visual cortex (OC) normalized to parietal cortex (PC). PSA developmental down-regulation is impaired in binocular deprived animals (t-test, *p <0.01). The cross in the graph represents the average, while the horizontal bar is the median value. The box shows the interquartile range, which is used as a measure of data spread - spanning 50% of a data set and eliminating the influence of outliers. The whiskers go down to the smallest value and up to the largest. When n=3 or lower, there are no whiskers and the floating bar represents the maximum and the minimum values.

Figure 3 Spiking activity regulates STX, but not PST, mRNA expression levels in cortical organotypic cultures. STX (A) but not PST (B), developmental downregulation is impaired by TTX application (Two- Way ANOVA, Holm-Sidak

method $p < 0.05$ for STX in culture treated with TTX from EP8-14 and EP11-14; $p > 0.05$ for PST). Conversely, increasing spiking activity levels by BMI treatment accelerates STX (A), but not PST (B), mRNA level downregulation. The cross in the graph represents the average, while the horizontal bar is the median value. The box shows the interquartile range. The whiskers go down to the smallest value and up to the largest. When $n=3$ or lower, there are no whiskers and the floating bar represents the maximum and the minimum values.

Figure 4 NMDA-mediated excitation regulates STX mRNA expression levels, likely through Ca^{2+} dependent mechanisms. (A) STX mRNA levels are significantly higher in organotypic cultures treated from EP11-14 with APV, an inhibitor of NMDA receptor activation, compared to control values. This effect is potentiated by the simultaneous blockade of NMDA and AMPA receptor, via CNQX+APV treatment (Two-Way ANOVA, by post hoc Holm-Sidak method, $*p < 0.05$). Incubating organotypic cultures with Ca^{2+} free media causes a small but significant increase in STX expression levels ($*p < 0.05$). Blockade of L-type VGCC via nimodipine application does not significantly affect STX mRNA levels ($p > 0.05$). (B) None of these treatments affects PST mRNA levels ($p > 0.05$). The cross in the graph represents the average, while the horizontal bar is the median value. The box shows the interquartile range. The whiskers go down to the smallest value and up to the largest. When $n=3$ or lower, there are no whiskers and the floating bar represents the maximum and the minimum values.

Figure 5 PKC signalling pathway positively regulates STX and PST mRNA expression levels. Graphs illustrating the effect of the pharmacological inhibition of different signalling pathways on STX (A) and PST (B) mRNA levels. Both STX and PST mRNA levels are prematurely down-regulated in chelerythrine (CHE)-treated samples, compared to controls (Two-Way ANOVA, by post hoc Holm-Sidak method, $*p < 0.05$). TTX-induced increase in STX mRNA levels ($*p < 0.05$) does not occur in presence of CHE. Indeed, STX levels in CHE + TTX cultures are not significantly different from those found in controls (Two-Way ANOVA, by post hoc Holm-Sidak method, $p > 0.05$). Neither STX (A) or PST (A) mRNA levels are affected by the application of U0126, KN-62, KT5823 and KT5720 (Two-Way ANOVA, by post hoc Holm-Sidak method, $p > 0.05$). The cross in the graph represents the average, while the horizontal bar is the median value. The box shows the interquartile range. The whiskers go down to the smallest value and up to the largest. When $n=3$ or lower, there are no whiskers and the floating bar represents the maximum and the minimum values.

Supplemental Figure 1.

S.1 Graphs showing mRNA expression levels of STX and PST during postnatal development *in vivo* and *in vitro*. Black circles represent STX and black squares indicate PST mRNA expression levels. **(A)** STX and PST transcript levels decline during development in visual cortex *in vivo*; PST expression remains higher than STX from P9 through adulthood. **(B)** A similar expression pattern can be observed in cortical organotypic cultures. STX and PST raw values are normalized to GAPDH.

FIGURES

Figure 1

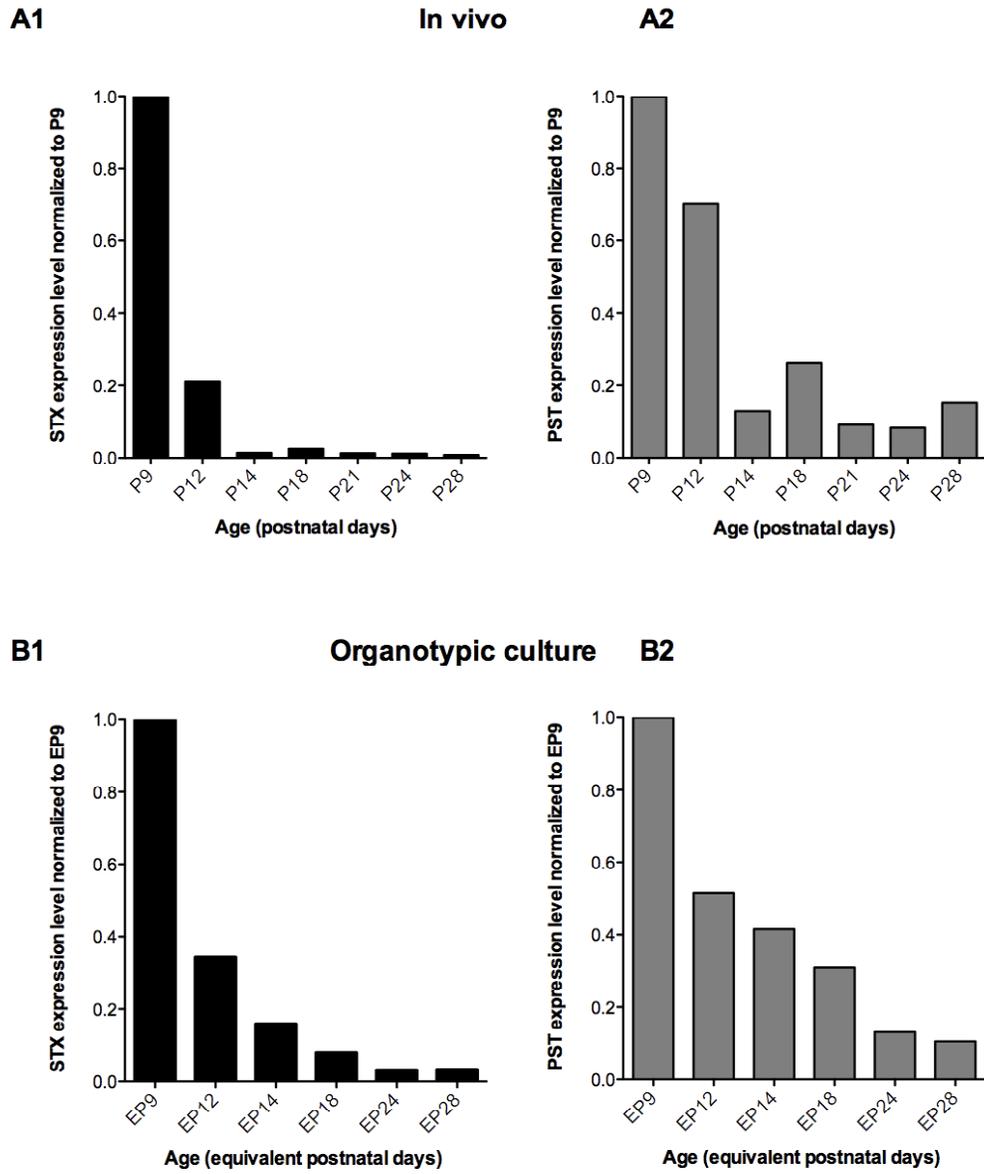


Figure 2

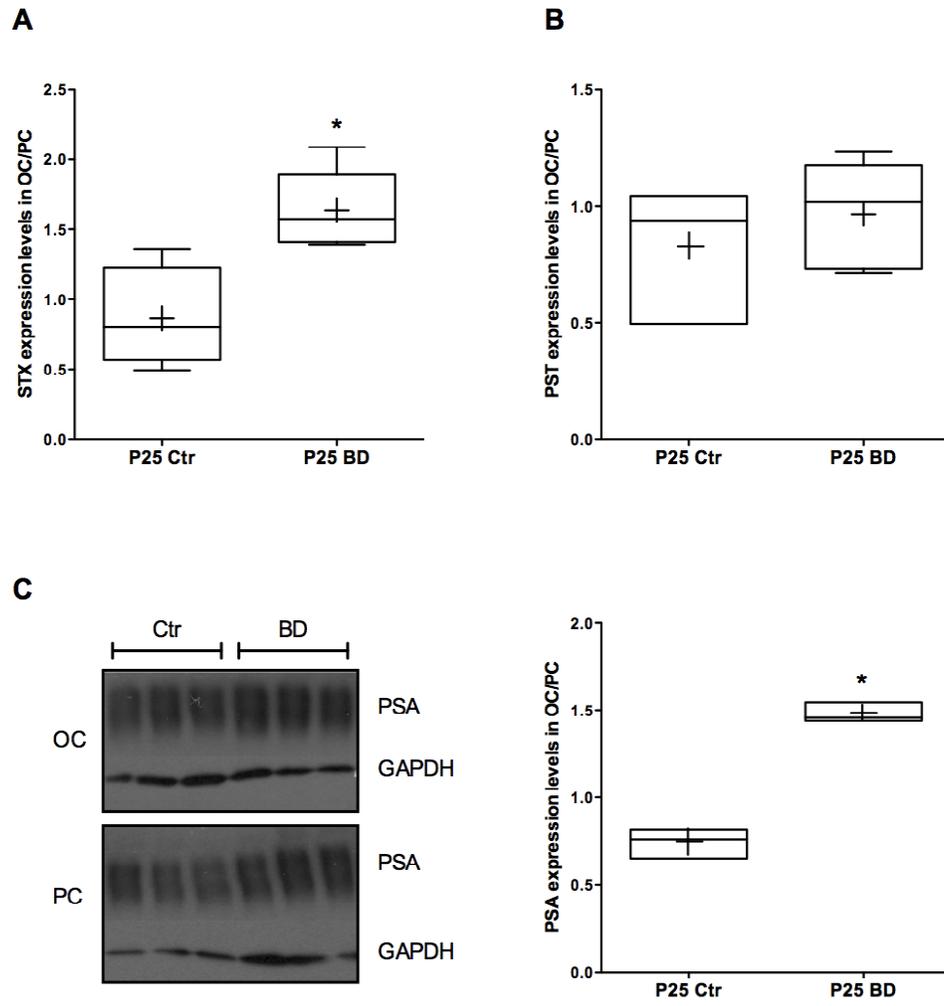


Figure 3

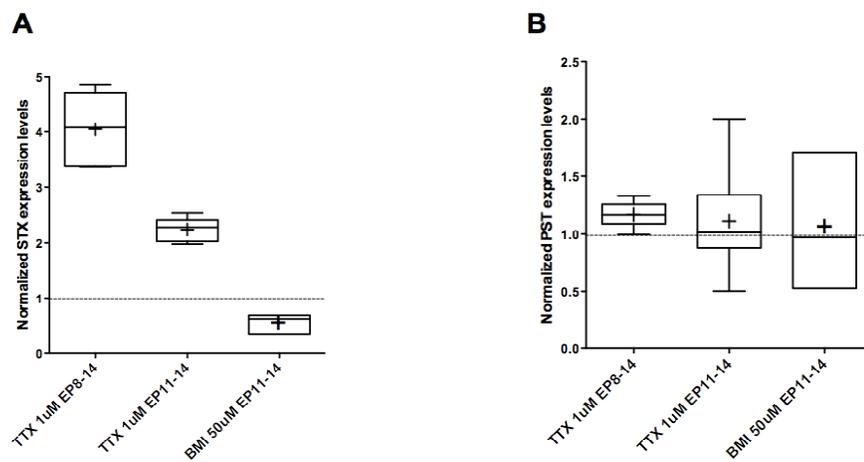


Figure 4

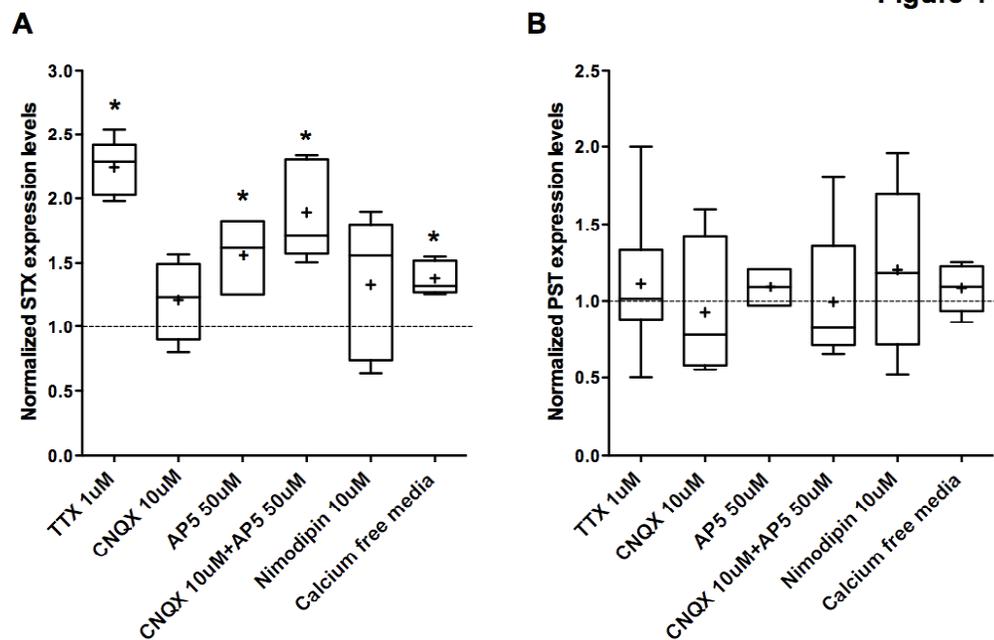
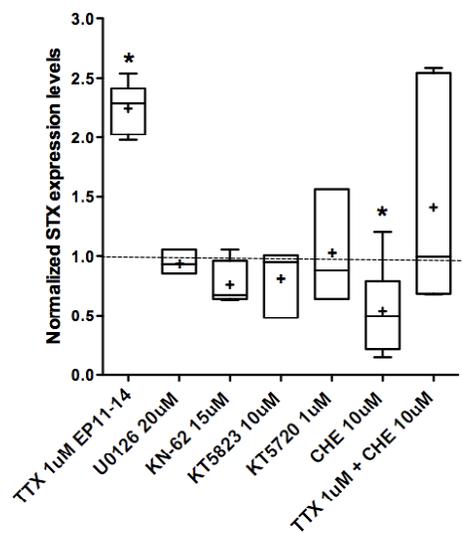
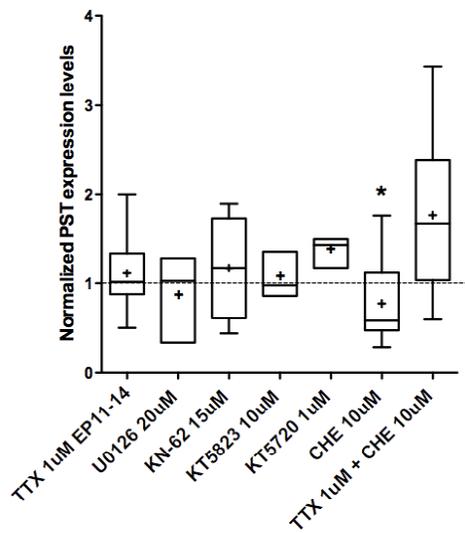


Figure 5

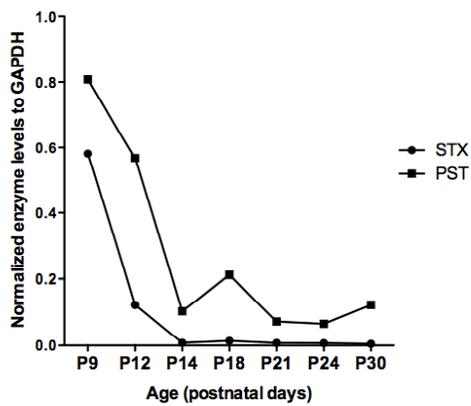
A



B

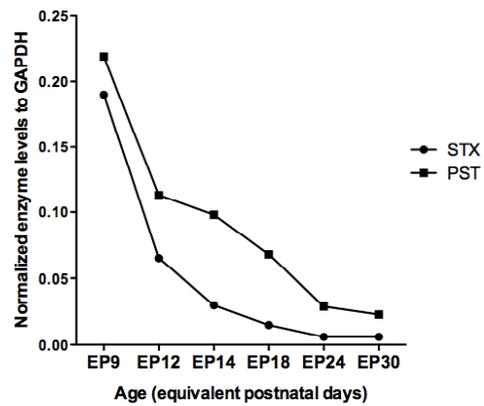


A



B

Supplemental data 1



REFERENCES

1. Rothbard JB, Brackenbury R, Cunningham BA, Edelman GM (1982) Differences in the carbohydrate structures of neural cell-adhesion molecules from adult and embryonic chicken brains. *J Biol Chem* 257: 11064-11069.
2. Johnson CP, Fujimoto I, Rutishauser U, Leckband DE (2005) Direct evidence that neural cell adhesion molecule (NCAM) polysialylation increases intermembrane repulsion and abrogates adhesion. *J Biol Chem* 280: 137-145.
3. Ono K, Tomasiewicz H, Magnuson T, Rutishauser U (1994) N-CAM mutation inhibits tangential neuronal migration and is phenocopied by enzymatic removal of polysialic acid. *Neuron* 13: 595-609.
4. O'Leary DD, Terashima T (1988) Cortical axons branch to multiple subcortical targets by interstitial axon budding: implications for target recognition and "waiting periods". *Neuron* 1: 901-910.
5. Yamamoto N, Inui K, Matsuyama Y, Harada A, Hanamura K, et al. (2000) Inhibitory mechanism by polysialic acid for lamina-specific branch formation of thalamocortical axons. *J Neurosci* 20: 9145-9151.
6. Tang J, Landmesser L, Rutishauser U (1992) Polysialic acid influences specific pathfinding by avian motoneurons. *Neuron* 8: 1031-1044.
7. Dityatev A, Dityateva G, Sytnyk V, Delling M, Toni N, et al. (2004) Polysialylated neural cell adhesion molecule promotes remodeling and formation of hippocampal synapses. *J Neurosci* 24: 9372-9382.
8. Di Cristo G, Chattopadhyaya B, Kuhlman SJ, Fu Y, Belanger MC, et al. (2007) Activity-dependent PSA expression regulates inhibitory maturation and onset of critical period plasticity. *Nat Neurosci* 10: 1569-1577.
9. Muller D, Wang C, Skibo G, Toni N, Cremer H, et al. (1996) PSA-NCAM is required for activity-induced synaptic plasticity. *Neuron* 17: 413-422.
10. Theodosis DT, Bonhomme R, Vitiello S, Rougon G, Poulain DA (1999) Cell surface expression of polysialic acid on NCAM is a prerequisite for activity-dependent morphological neuronal and glial plasticity. *J Neurosci* 19: 10228-10236.
11. Seki T, Arai Y (1993) Distribution and possible roles of the highly polysialylated neural cell adhesion molecule (NCAM-H) in the developing and adult central nervous system. *Neurosci Res* 17: 265-290.
12. Bonfanti L (2006) PSA-NCAM in mammalian structural plasticity and neurogenesis. *Prog Neurobiol* 80: 129-164.
13. Rutishauser U (2008) Polysialic acid in the plasticity of the developing and adult vertebrate nervous system. *Nat Rev Neurosci* 9: 26-35.
14. Hensch TK (2005) Critical period plasticity in local cortical circuits. *Nat Rev Neurosci* 6: 877-888.
15. Livingston BD, Paulson JC (1993) Polymerase chain reaction cloning of a developmentally regulated member of the sialyltransferase gene family. *J Biol Chem* 268: 11504-11507.

16. Eckhardt M, Muhlenhoff M, Bethe A, Koopman J, Frosch M, et al. (1995) Molecular characterization of eukaryotic polysialyltransferase-1. *Nature* 373: 715-718.
17. Angata K, Long JM, Bukalo O, Lee W, Dityatev A, et al. (2004) Sialyltransferase ST8Sia-II assembles a subset of polysialic acid that directs hippocampal axonal targeting and promotes fear behavior. *J Biol Chem* 279: 32603-32613.
18. Hildebrandt H, Muhlenhoff M, Oltmann-Norden I, Rockle I, Burkhardt H, et al. (2009) Imbalance of neural cell adhesion molecule and polysialyltransferase alleles causes defective brain connectivity. *Brain* 132: 2831-2838.
19. Eckhardt M, Bukalo O, Chazal G, Wang L, Goridis C, et al. (2000) Mice deficient in the polysialyltransferase ST8SiaIV/PST-1 allow discrimination of the roles of neural cell adhesion molecule protein and polysialic acid in neural development and synaptic plasticity. *J Neurosci* 20: 5234-5244.
20. Hildebrandt H, Becker C, Murau M, Gerardy-Schahn R, Rahmann H (1998) Heterogeneous expression of the polysialyltransferases ST8Sia II and ST8Sia IV during postnatal rat brain development. *J Neurochem* 71: 2339-2348.
21. Klostermann O, Wahle P (1999) Patterns of spontaneous activity and morphology of interneuron types in organotypic cortex and thalamus-cortex cultures. *Neuroscience* 92: 1243-1259.
22. Di Cristo G, Wu C, Chattopadhyaya B, Ango F, Knott G, et al. (2004) Subcellular domain-restricted GABAergic innervation in primary visual cortex in the absence of sensory and thalamic inputs. *Nat Neurosci* 7: 1184-1186.
23. Chattopadhyaya B, Di Cristo G, Higashiyama H, Knott GW, Kuhlman SJ, et al. (2004) Experience and activity-dependent maturation of perisomatic GABAergic innervation in primary visual cortex during a postnatal critical period. *J Neurosci* 24: 9598-9611.
24. Zieg J, Greer PL, Greenberg ME (2008) SnapShot: Ca(2+)-dependent transcription in neurons. *Cell* 134: 1080-1080 e1082.
25. Cohen S, Greenberg ME (2008) Communication between the synapse and the nucleus in neuronal development, plasticity, and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* 24: 183-209.
26. Di Cristo G, Berardi N, Cancedda L, Pizzorusso T, Putignano E, et al. (2001) Requirement of ERK activation for visual cortical plasticity. *Science* 292: 2337-2340.
27. Lee SJ, Escobedo-Lozoya Y, Szatmari EM, Yasuda R (2009) Activation of CaMKII in single dendritic spines during long-term potentiation. *Nature* 458: 299-304.
28. Kaltschmidt B, Ndiaye D, Korte M, Pothion S, Arbibe L, et al. (2006) NF-kappaB regulates spatial memory formation and synaptic plasticity through protein kinase A/CREB signaling. *Mol Cell Biol* 26: 2936-2946.
29. Girouard H, Wang G, Gallo EF, Anrather J, Zhou P, et al. (2009) NMDA receptor activation increases free radical production through nitric oxide and NOX2. *J Neurosci* 29: 2545-2552.

30. Nakagawa S, Kim JE, Lee R, Chen J, Fujioka T, et al. (2002) Localization of phosphorylated cAMP response element-binding protein in immature neurons of adult hippocampus. *J Neurosci* 22: 9868-9876.
31. Echevarria D, Albus K (2000) Activity-dependent development of spontaneous bioelectric activity in organotypic cultures of rat occipital cortex. *Brain Res Dev Brain Res* 123: 151-164.
32. Bouzioukh F, Tell F, Rougon G, Jean A (2001) Dual effects of NMDA receptor activation on polysialylated neural cell adhesion molecule expression during brainstem postnatal development. *Eur J Neurosci* 14: 1194-1202.
33. Bruses JL, Rutishauser U (1998) Regulation of neural cell adhesion molecule polysialylation: evidence for nontranscriptional control and sensitivity to an intracellular pool of calcium. *J Cell Biol* 140: 1177-1186.
34. Gallagher HC, Murphy KJ, Foley AG, Regan CM (2001) Protein kinase C delta regulates neural cell adhesion molecule polysialylation state in the rat brain. *J Neurochem* 77: 425-434.
35. Wang C, Pralong WF, Schulz MF, Rougon G, Aubry JM, et al. (1996) Functional N-methyl-D-aspartate receptors in O-2A glial precursor cells: a critical role in regulating polysialic acid-neural cell adhesion molecule expression and cell migration. *J Cell Biol* 135: 1565-1581.
36. Abrajano JJ, Qureshi IA, Gokhan S, Zheng D, Bergman A, et al. (2009) REST and CoREST modulate neuronal subtype specification, maturation and maintenance. *PLoS One* 4: e7936.
37. Vo NK, Cambronne XA, Goodman RH (2010) MicroRNA pathways in neural development and plasticity. *Curr Opin Neurobiol*.
38. Schrott GM, Tuebing F, Nigh EA, Kane CG, Sabatini ME, et al. (2006) A brain-specific microRNA regulates dendritic spine development. *Nature* 439: 283-289.
39. Fiore R, Khudayberdiev S, Christensen M, Siegel G, Flavell SW, et al. (2009) Mef2-mediated transcription of the miR379-410 cluster regulates activity-dependent dendritogenesis by fine-tuning Pumilio2 protein levels. *EMBO J* 28: 697-710.
40. Hait NC, Allegood J, Maceyka M, Strub GM, Harikumar KB, et al. (2009) Regulation of histone acetylation in the nucleus by sphingosine-1-phosphate. *Science* 325: 1254-1257.
41. Arai M, Yamada K, Toyota T, Obata N, Haga S, et al. (2006) Association between polymorphisms in the promoter region of the sialyltransferase 8B (SIAT8B) gene and schizophrenia. *Biol Psychiatry* 59: 652-659.
42. Tao R, Li C, Zheng Y, Qin W, Zhang J, et al. (2007) Positive association between SIAT8B and schizophrenia in the Chinese Han population. *Schizophr Res* 90: 108-114.
43. El Maarouf A, Petridis AK, Rutishauser U (2006) Use of polysialic acid in repair of the central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 16989-16994.

CHAPITRE 3 : PROJETS PILOTES

CHAPITRE 3: PROJETS PILOTES

3.1 Méthodologie

3.1.1 Animaux

Tous les animaux ont été achetés chez Harlan Laboratories (Montreal, QC, Canada). Le comité local du conseil canadien de protection des animaux (CCPA) a approuvé les protocoles de recherche.

3.1.2 Cultures organotypiques

Les souriceaux âgés de 4 à 6 jours post-nataux (P4-P6) ont été décapités et les cerveaux ont rapidement été immergés dans un milieu de culture très froid (MEM enrichi avec du Glutamax (no. cat. 42360, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 20% Serum de cheval, 1mM glutamine, 2mM MgSO₄, 1mM CaCl₂, 0.0012% acide ascorbique, 1µg/ml insuline, 30.04mM Hepes, 5.24mM NaHCO₃, 12.88mM D-glucose, pH 7.27). Les tranches coronales de 400µm d'épaisseur ont été obtenues en coupant les cerveaux avec un hachoir à tissus («*Chopper*», Stoelting, Wood Dale, IL, USA). Les tranches (généralement 2-3) ont été placées sur les membranes Millicell (no. cat. PICMORG50) dans une plaque de culture de 6 puits contenant 720µl de

milieu de culture par puit. Les tissus ont été incubés à 34°C dans un incubateur à atmosphère humidifiée contenant 5% de CO₂. Le milieu de culture a été changé à tous les 2 jours. Lorsqu'un milieu de culture conditionné devait être utilisé, les agents pharmacologiques étaient mélangés directement au milieu de culture, filtrés avec un filtre 0.22µm fixé à une seringue, puis ajoutés aux cultures organotypiques durant des fenêtres de temps spécifiques. Le K252a (Tocris Bioscience, Ellisville, MO, USA) a été dissout dans le DMSO. La concentration finale dans le milieu de culture est 40µM. L'analogue d'IGF-1 (Bachem, Torrance, CA, USA) a été dissout dans l'eau déionisée et les concentrations finales sont 1ng/ul et 10ng/ul. La L-méthionine (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA), a été dissoute dans de la solution saline NaCl 0.9% et les concentrations finales testées sont 2, 5 et 10 mM. Enfin, la trichostatin A (TSA) (concentration finale utilisée, 300nM) (Tocris Biosciences), le MS275 (4µM) (don du Dr RL Momparler, Centre de recherche du CHU Sainte-Justine, Montréal) et le MC1568 (5µM) (Sigma-Aldrich) ont été dissoutes dans le DMSO. Une solution de 1mM de Sphingosine-1-phosphate (S1P) (Tocris Bioscience) a été produite dans du tampon PBS 1X pH 7.4 contenant 4mg/ml de BSA. La concentration finale dans le milieu de culture est 1µM. Les concentrations en drogues telle que décrites dans la littérature. Enfin, Toutes les procédures ont été effectuées en conditions stériles.

3.1.3 Injection de L-méthionine

Les souris ont été injectées deux fois par jour, intrapéritonéalement (IP) de P4 à P12, avec 5.2 μ mol de L-méthionine/g (Sigma-Aldrich) dissoute dans de la solution saline NaCl 0.9% en utilisant une seringue 31 5/16G. Les contrôles ont été injectés avec de la solution saline seule. Les souris ont été sacrifiées par décapitation à P12 et les cortex visuels ont été prélevés et conservés pour un maximum d'un mois dans la solution RNAlater (Qiagen Inc).

3.1.4 PCR quantitatif en temps réel

Quatre à six tranches de cerveau ont été collectées et combinées pour chaque analyse de traitement pharmacologique. Les cortex visuels ont été collectés pour les analyses *in vivo*. Tous les échantillons *in vivo* et *in vitro* ont été conservés à 4°C dans la solution RNAlater (Qiagen Inc) pour un maximum d'un mois avant d'en extraire l'ARN via le RNeasy mini kit (no. cat. 74104, Qiagen Inc) en suivant le protocole du fabricant. La quantité et la pureté de l'ARN ont été déterminées en mesurant l'absorbance par spectrophotomètre à 260 et 280 nm. Les échantillons ont été conservés à -80°C. Une réaction de transcriptase inverse a été effectuée pour synthétiser le cDNA en utilisant le RT Omniscript (no cat. 205111, Qiagen Inc). L'ARN a d'abord été dénaturé à 65°C pour 5 min. Chaque réaction de 20 μ l contenait

1µg d'ARN, 1x de tampon RT Omniscript, 0.5mM de chacun des dNTPs, 4U de l'enzyme RT Omniscript, 1µM d'Oligo-dT primers (Invitrogen), et 10U d'inhibiteur de RNase (Invitrogen). Les échantillons ont été incubés à 37°C pour 1h, et l'enzyme RT enzyme a été inactivée à 93°C pour 5 min. Les expériences ont été effectuées dans un ABI Prism 7900 Sequence Detection System (Applied Biosystems) en utilisant des plaques de 384 puits. Chaque réaction de 10µl contenait 1.5µl d'une dilution 1/10 de la réaction de cDNA, 1x SYBR Green PCR Master Mix (no. cat. 4309155, Applied Biosystems) et 0.4nM de primers «exon-spanning» (STX 5'-CTCTCTGAGGATCAGGAAGCAAA-3' et 5'-AATAATGTCTCCAGGCTTCAGGG-3', PST 5'-GGAGATGGTGAAGTGTGTTTGAG-3' et 5'-ACAGAATGTTGGAAGATGGTGGAG-3', GAPDH 5'-GGTCGGTGTGAACGGATTTGGC-3' et 5'-TTGCCGTGAGTGGAGTCATACTGG-3'). Le cycle de PCR consistait en une dénaturation initiale d'un cycle à 95 °C pour 10 min, suivi par 42 cycles à 95°C pour 15sec; 60°C pour 1 min. Pour la courbe de fusion (*melting curve analysis*), le programme était constitué d'un cycle à 95°C pour 15sec, suivi par 15 sec à 60°C, et 95°C pour 15sec.

3.1.5 Analyse du PCR quantitatif en temps réel

Les quantifications relatives des transcrits de PST, STX et de GAPDH ont été effectuées en utilisant une courbe standard préparée à partir d'une dilution en série (1/2, 1/10, 1/50, 1/250, 1/1250) de cDNA fraîchement préparé d'ARN de cortex visuel de souris à P4. Les données ont été analysées avec le logiciel Real-Time PCR System Sequence Detection Software v2.2.2. Brièvement, la quantité de transcrits est mesurée en se basant sur les données recueillies à partir d'un cycle seuil (Ct), i.e. le cycle où la fluorescence est détectée au-dessus du niveau de base (*baseline level*). Chaque dilution de la courbe standard a été effectuée en triplicata. La courbe standard a été obtenue en mettant sur un graphique les valeurs des Ct des triplicatas en Y versus le log de la concentration du matériel de départ en X (quantité de matériel pour chacun des points de la dilution en série). La courbe standard a ensuite été utilisée pour obtenir la quantité de transcrits d'ARN pour chacun des échantillons analysés. Chaque échantillon a été analysé en triplicata pour PST, STX et GAPDH. La moyenne relative de transcrits obtenus pour chaque échantillon de PST et de STX a été normalisée avec celle de GAPDH.

3.1.6 Western blot

Le western blot a été effectué tel que décrit dans Di Cristo *et al*, 2007³⁴. Les lysats de protéines ont été préparés par homogénéisation des tissus prélevés à partir du

cortex visuel de souris dans une solution contenant 50mM de Tris-HCl (pH 7.6), 150mM de NaCl, 2mM d'EDTA, 1% d'Igepal CA-630, et 1x d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Roche, Basel, Switzerland). Au moins 3 cortex visuels de souris par âge ont été utilisés pour ces analyses *in vivo*. Les tissus ont été dissociés par pipetage. La quantité de protéine extraite a été quantifiée par l'essai de protéines Bradford (cat. no. 500-0006, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), et les concentrations des échantillons ont été ajustées afin d'être équivalentes avec de l'eau déionisée. Les échantillons ont ensuite été mélangés avec un volume égal de tampon Laemmli 2x, bouillis pour 5 min, et entreposés à -80°C. Des quantités égales ont été déposées dans chacun des puits. Les protéines ont été séparées avec un gel de séparation de polyacrylamide 6.5% et un gel de compaction de 5% (Bio-Rad Laboratories). Le transfert a été effectué sur une membrane Immobilon-P polyvinylidene fluoride (PVDF) de Millipore (Millipore, Billerica, MA, USA), et a été bloqué par incubation avec une solution de 5% de lait en poudre/TBS-T (0.1% Tween-20). Les membranes ont ensuite été incubées avec des anticorps primaires anti-MeCP₂ (1:1000, rabbit polyclonal antibody, no.cat. M9317, Sigma-Aldrich), et anti-GAPDH (1:4000, mouse monoclonal IgG, no. cat AB4300, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), et des anticorps secondaires anti-lapin et anti-souris conjugués à la peroxydase du raifort (Sigma-Aldrich ; Novus). La détection des bandes a été effectuée grâce à la solution Western Lighting Plus Chemiluminescence Reagent (no. cat NEL103, Perkin-Elmer, Waltham, MA, USA), préalablement incubée à température pièce. Le signal a été visualisé en exposant la membrane sur des films autoradiographiques Bioflex (InterScience, Markham, ON, Canada). La

normalisation de la quantité de MeCP₂ versus GAPDH a été faite en numérisant les films non-saturés et en analysant l'intensité des bandes avec le logiciel Image J.

3.1.7 Analyses statistiques

Les analyses *in vitro* par qPCR ont été analysées avec les données brutes (STX/GAPDH et PST/GAPDH) des groupes contrôles et des groupes expérimentaux. S'en est suivi le test Two-Way ANOVA et de la méthode post-hoc Holm-Sidak afin de comparer les portées et l'effet des traitements. Les ratios traitements/contrôles ont ensuite été comparés via le t-test si la distribution était normale, ou par le test de Mann-Whitney s'il ne l'étaient pas. Une différence significative entre des groupes expérimentaux et le groupe contrôle est considérée lorsque $p < 0.05$.

3.2 Résultats

3.2.1 Effets de BDNF et IGF-1 sur l'expression des polysialyltransférases

En compléments avec les résultats présentés dans le manuscrit, nous avons effectué quelques expériences exploratoires afin de déterminer si des mécanismes distincts de ceux précédemment démontrés étaient impliqués dans la régulation transcriptionnelle des polysialyltransférases STX et PST. Nous avons *a priori* tenté d'établir si les facteurs de croissance BDNF et IGF-1 étaient impliqués dans ce processus. Pour se faire, nous avons bloqué les récepteurs TrKB, responsables du signalement intracellulaire de BDNF, via l'application de K252a (40nM) au milieu de culture de EP11 à EP14. Nous avons de plus bloqué le signalement des récepteurs des IGF-1 via l'application de deux différentes concentrations d'un analogue d'IGF-1 (1ng/ μ l et 10ng/ μ l) pour la même période donnée (Figure 3.1). La quantification subséquente du nombre de transcrits par PCR quantitatif en temps réel (qPCR), lorsque comparé au contrôle âgé de EP14, n'a démontré aucun effet significatif de ces traitements sur l'expression de STX (Figure 3.1a; K252a n=3, analogue d'IGF-1 n=2) et PST (Figure 3.1b; K252a n=3, analogue d'IGF-1 n=2) (Two-Way ANOVA; $p > 0.05$). Augmenter le nombre de n pourrait toutefois être souhaitable. En somme, nos données semblent indiquer que les facteurs de croissance BDNF et IGF-1 ne sont pas impliqués dans la régulation de la transcription de STX et de PST.

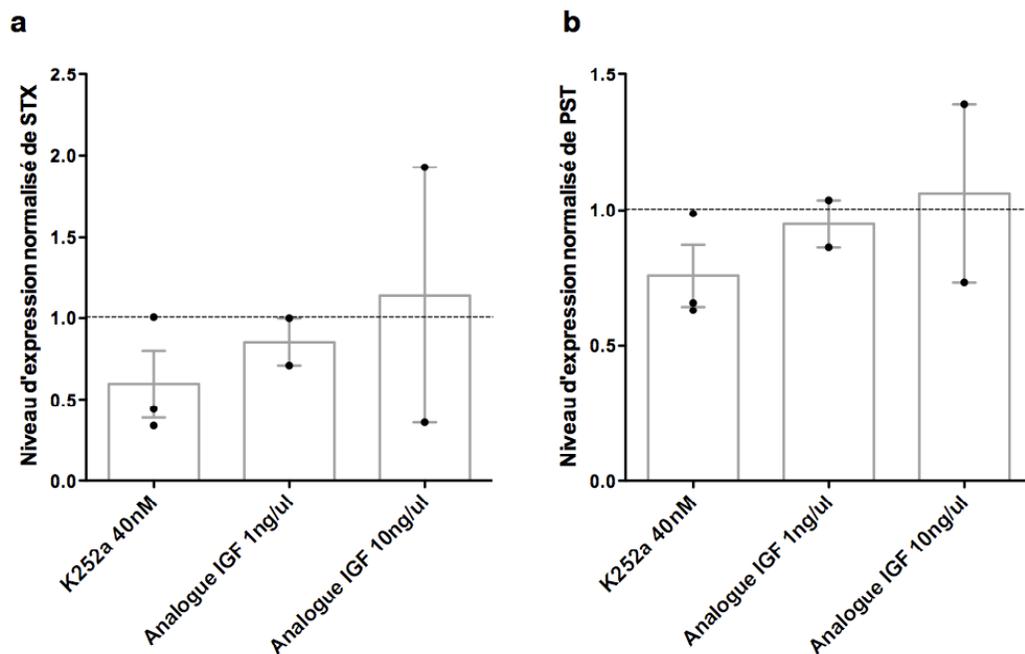


Figure 3.1. Le blocage des récepteurs TrKB et l'application d'un analogue d'IGF-1 dans les cultures organotypique de cerveau de souris de EP11-14 démontre que BDNF et IGF-1 ne sont pas impliqués dans la régulation de l'expression des polysialyltransférases (a) STX et (b) PST. Sur les graphiques, les histogrammes démontrent la moyenne \pm l'erreur type de la moyenne (SEM), et chaque point représente une valeur unique. STX et PST ont été normalisés avec GAPDH avant d'être normalisé avec un contrôle à EP14. La ligne horizontale illustre d'ailleurs la valeur normalisée du contrôle EP14. Aucune différence significative n'a été observée entre les groupes expérimentaux et contrôles (Two-Way ANOVA; $p > 0.05$). Pour les expériences avec K252a, $n=3$ et avec l'analogue d'IGF, $n=2$ pour les 2 concentrations utilisées. Chaque échantillon (n) contient 5-6 tranches de cerveau.

3.2.2 Expression développementale de MeCP₂

Nous avons ensuite poursuivi nos travaux en ébauchant un projet pilote explorant l'implication possible de la protéine MeCP₂ et de la méthylation des îlots CpG des promoteurs de l'ADN dans la régulation génique de STX et de PST. Il est à noter que ces résultats ne sont préliminaires, et que d'études plus avancées sont à entrevoir.

Nous avons d'abord effectué une quantification par western blot de l'expression de MeCP₂ dans cortex visuel de souris durant le développement post-natal (Figure 3.2; n=3 pour tous les âges). Il a été démontré que l'expression de MeCP₂ augmente au cours du développement jusqu'à l'âge adulte dans toutes les structures du cerveau¹³⁸. Toutefois, aucune donnée n'était connue quant à son expression post-natale dans le cortex visuel. Nos résultats démontrent une baisse marquée de l'expression de MeCP₂ à P14 par rapport à P9. L'expression de cette protéine reprend pratiquement ses niveaux initiaux dès P18, et l'atteint à P24. À l'âge adulte, on dénote une diminution de l'expression de la protéine, ce qui peut toutefois être attribuable à une certaine forme de dégénérescence; les souris étant âgées de 6 à 7 mois (Figure 3.2).

De plus, nous avons analysé l'effet de déprivation binoculaire de P13 à P25 chez les souris afin d'observer si l'expression de MeCP₂ était, tout comme PSA et STX, activité-dépendante. Nous avons démontré que l'expression de la protéine

MeCP₂ n'est pas dépendante de l'activité neuronale (données non-démontrées) (Two-Way ANOVA; $p > 0.05$).

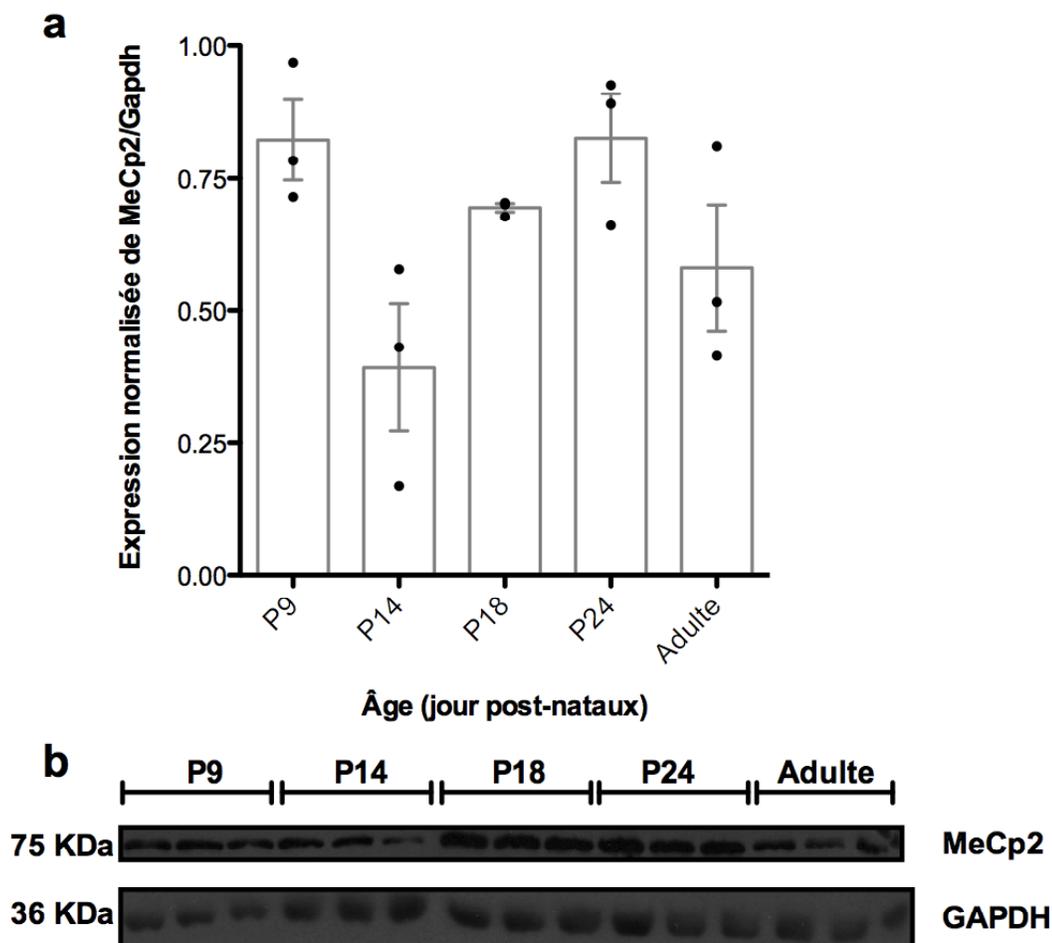


Figure 3.2. Expression développementale de MeCP₂ dans le cortex visuel de souris *in vivo*. On note une baisse marquée de l'expression de MeCP₂ à P14, corrélant avec la période d'ouverture des yeux chez la souris. (a) Les histogrammes représentent la moyenne \pm l'erreur type de la moyenne (SEM), et chaque point est une valeur unique. $n=3$ pour tous les âges. (b) Film représentant l'analyse par western blot de l'expression de MeCP₂ dans le cortex visuel au cours du développement via l'utilisation d'anticorps contre MeCP₂ (bande du haut) et contre GAPDH (bande du bas). Les masses moléculaires sont représentées à gauche. $n=3$ pour tous les âges.

3.2.3 Effet de l'application *in vivo* et *in vitro* de L-méthionine sur l'expression des polysialyltransférases

L'injection de L-méthionine a pour effet d'augmenter le nombre de groupements méthyle libres disponibles, et engendre alors une augmentation de la méthylation de certains gènes par les DNMT1/3a, et par conséquent, une répression génique. Nous avons donc examiné si l'injection de L-méthionine chez les souris pouvait modifier l'expression des polysialyltransférases STX et PST dans le cortex visuel de ces dernières (Figure 3.3). Pour se faire, nous avons injecté IP 5.2uM/g de L-méthionine bi-quotidiennement aux souris entre P4 et P12. L'analyse du nombre de transcrits est par la suite effectuée par qPCR. Ainsi, les souris ayant reçues de la L-méthionine de P4 à P12 se voient conférées d'une augmentation de 1.8x du nombre de transcrits de STX dans le cortex visuel (Figure 3.3a; n=6 L-met, n=2 Ctr Sln NaCl, n=3 Ctr) comparativement aux souris contrôles non-traitées du même âge. Toutefois, les souris ayant été injectées avec de la solution NaCl 0.9% ont également un accroissement du niveau de STX (1.6x), suggérant que (1) les injections répétitives engendrent un stress chez les souris, lequel peut affecter l'expression de STX et/ou (2) les données du traitement contrôle à la solution NaCl 0.9% sont biaisés dû à un nombre insuffisant d'échantillons. Nos données actuelles – et notons-le, préliminaires – suggèrent qu'il n'y a donc pas de différences significatives entre les groupes contrôles injectés à la solution NaCl 0.9% et le groupe expérimental traité à la méthionine 5.2uM/g (Two-Way ANOVA; $p > 0.05$). L'injection de méthionine *in vivo* n'a aucun effet sur l'expression de PST (Figure 3.3b; n=6 L-met, Ctr Sln NaCl

n=2, Ctr n=3). Aucune différence n'est d'ailleurs observée avec le groupe contrôle injecté à la solution NaCl 0.9% (Two-Way ANOVA; $p > 0.05$).

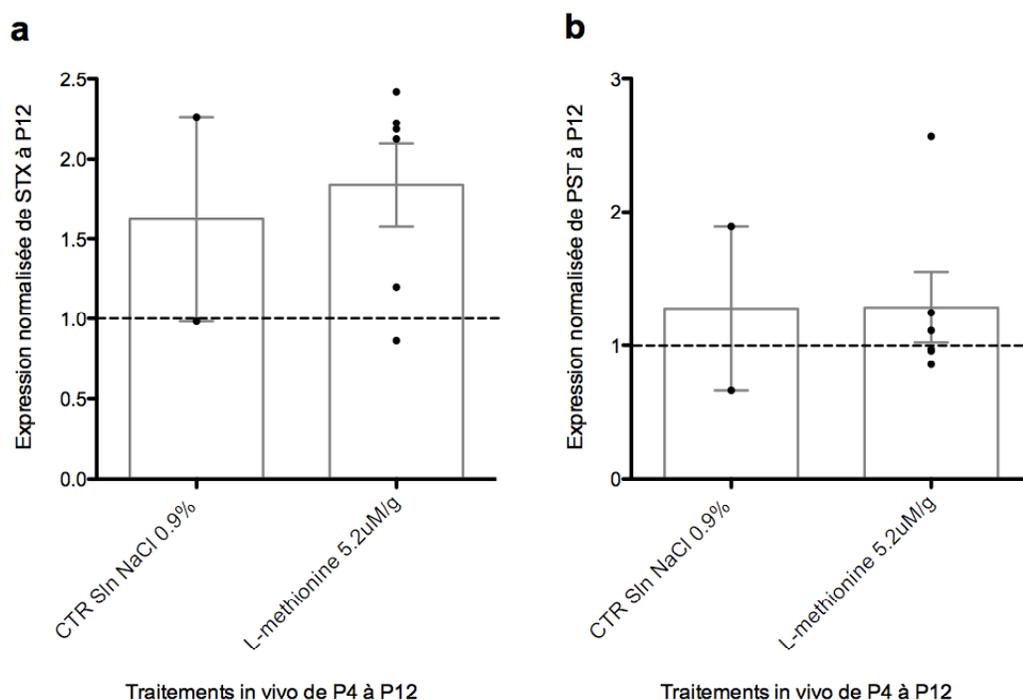


Figure 3.3. L'injection IP bi-quotidienne de 5.2uM/g de L-méthionine chez la souris de P4 à P12 a pour effet (a) d'augmenter l'expression de STX lorsque comparé à un contrôle du même âge (représenté par la ligne horizontale). Toutefois, comme cette augmentation est similaire à celle des souris injectée avec la solution NaCl 0.9% et que le nombre que n n'est que de 2 pour ces échantillons contrôles, nous devons présentement exclure la spécificité de ce traitement sur l'augmentation de l'expression de STX. (b) L'injection de L-méthionine *in vivo* n'a aucun effet sur l'expression de PST. Les histogrammes représentent la moyenne +/- l'erreur type de la moyenne (SEM), et chaque point est une valeur unique. n=2 pour CTR Sln NaCl 0.9%, et n=6 pour L-methionine 5.2uM/g. L'analyse statistique n'a démontré aucune différence entre les groupes (Two-Way ANOVA; $p > 0.05$).

L'application de différentes concentrations de L-méthionine (2mM, 5mM et 10mM) dans les cultures organotypiques de cerveau de souris révèle que STX (Figure 3.4a; n=1, 5-6 tranches/n) et PST (Figure 3.4b; n=1, 5-6 tranches/n) se voient gratifier

d'une élévation de leurs expressions géniques respectives lorsque mis en présence de cette substance. Pour STX, 10mM de L-méthionine appliquées de EP8 à EP14 sont nécessaires afin de doubler le nombre de transcrits (Figure 3.4a); pour PST, les concentrations 5mM et 10mM en L-méthionine ont un effet similaire et font augmenter de 1.5x par rapport au contrôle du même âge l'expression de PST (Figure 3.4b)

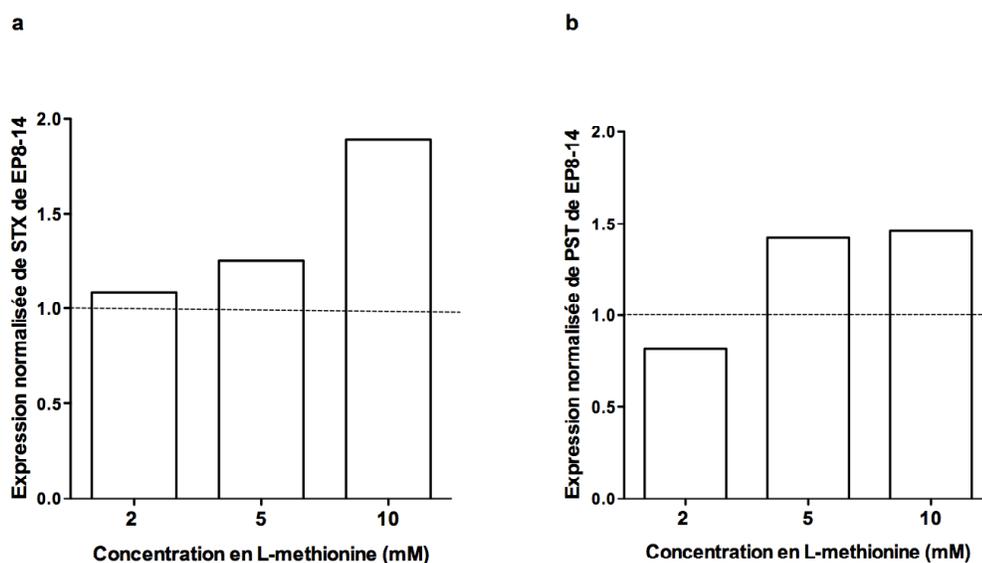


Figure 3.4. Application de concentration croissante de L-méthionine dans les cultures organotypiques de cerveau de souris de EP8-14. (a) Aucun effet marqué n'est observé à 2mM et 5mM de L-méthionine. Toutefois, l'application de 10mM de L-méthionine double la quantité de transcrits de STX. (b) L'expression de PST augmente de façon similaire lorsque mis en présence de 5 et 10mM de L-méthionine; une concentration de 2mM n'a aucun impact sur le nombre de transcrits. Sur le graphique, les histogrammes représentent la moyenne et une valeur unique de n=1 contenant 5-6 tranches de cerveau/n. STX et PST ont été normalisés avec GAPDH avant d'être normalisé avec un contrôle à EP14. La ligne horizontale représente la valeur normalisée du contrôle à EP14.

Nous avons finalement effectué une fine analyse de l'état de méthylation des îlots CpG du promoteur de STX par séquençage au bisulfite des cortex visuel de souris (n=3) à P9 et P25, et comparé les résultats à l'aide du logiciel BIC analyser (données non-démontrées). Le but de cette expérience consistait à révéler s'il y avait une différence entre les patrons de méthylation à P9 et à P25, et donc avec ou sans expérience visuelle. Il est à noter qu'une seule modification du statut de la méthylation d'un îlot CpG suffit pour compromettre l'efficacité de la machinerie transcriptionnelle, et donc diminuer l'expression d'un dit gène¹³⁹. Nos données ont révélé que non seulement il n'y avait aucune différence entre les patrons de méthylation à P9 et à P25, mais que ces derniers ne comportaient également aucun site méthylé. Il n'est toutefois pas exclu que, bien que nous ayons séquencé tous les îlots CpG connus du promoteur de STX, et que ceux-ci se trouvent tous dans la même région, d'autres îlots, inconnus à ce jour, peuvent se trouver sur un autre locus. Mais encore, comme l'ajout de L-méthionine tend à augmenter l'expression de STX *in vivo* et *in vitro*, mais qu'aucune méthylation du promoteur n'est détectée, ceci suggère en quelque sorte l'hypothèse d'un intermédiaire répressant l'expression de STX.

3.2.4 Effet de l'application d'inhibiteurs de HDACs sur l'expression de STX et de PST

Plusieurs évidences supportent implicitement l'idée que d'autres mécanismes pourraient également être impliqués dans la régulation des polysialyltransférases. Dans cet ordre d'idée, le mécanisme épigénétique qu'est l'acétylation des histones pourrait avoir un effet direct sur la transcription de STX et de PST. Afin de tester cette hypothèse, nous avons bloqué spécifiquement tous les isoformes des histones déacétylases (HDAC) via l'application de Trichostatine A (TSA) dans les cultures organotypiques de cerveau de souris de EP11-14 (Figure 3.5) et quantifié les niveaux de transcrits par qPCR. Nos données indiquent que TSA réduit significativement l'expression de STX (Figure 3.5a, n=10, Two-Way ANOVA; $p = 0,022$). L'effet de TSA sur PST est très variable, son expression passant de 0.5x à 5.4x comparé au contrôle à EP14 (Figure 3.5b, n=10, Two-Way ANOVA; $p > 0.05$). Ces données suggèrent donc que la transcription de STX pourrait être régulée par ce mécanisme épigénétique durant la période post-natale. De récentes avancées ont démontré l'importance de certains isoformes des HDACs dans l'établissement de la mémoire et de la plasticité^{125, 130}. D'ailleurs, PSA est également impliqué dans plusieurs paradigmes liés au processus d'apprentissage et de la mémoire. Nous avons donc testé l'effet *in vitro* des inhibiteurs de HDAC1 (4 μ M MS275) et 2 (1 μ M S1P) (classe I), et de la classe II (5 μ M MC1568) sur l'expression de STX et de PST. Les résultats suggèrent que le complexe formé par les HDAC1 et 2 préviendrait la diminution

développementale de STX (Figure 3.5a, n=6 MS275, n=6 S1P, n=4 MS275+S1P). En effet, l'effet combiné de MS275+S1P est plus important que leurs effets individuels. Aucun impact significatif sur l'expression de PST n'a été observé (Figure 3.5b, n=5 MS275, n=6 S1P, n=4 MS275+S1P, Two-Way ANOVA; $p > 0.05$). Enfin, le blocage de la classe II des HDACs via l'application de MC1568 n'a pas modifié l'expression de STX (Figure 3.5a, n=4). Une grande variabilité est observée dans les résultats de PST (Figure 3.5b, n=4) (Two-Way ANOVA; $p > 0.05$). Ces expériences doivent être répétées afin d'obtenir plus de n et être possiblement significatifs. Toutefois, ces données préliminaires suggèrent que le remodelage de la chromatine par l'acétylation des histones pourrait contribuer à la régulation de la transcription de STX durant la période post-natale, sans toutefois en constituer le mécanisme majeur.

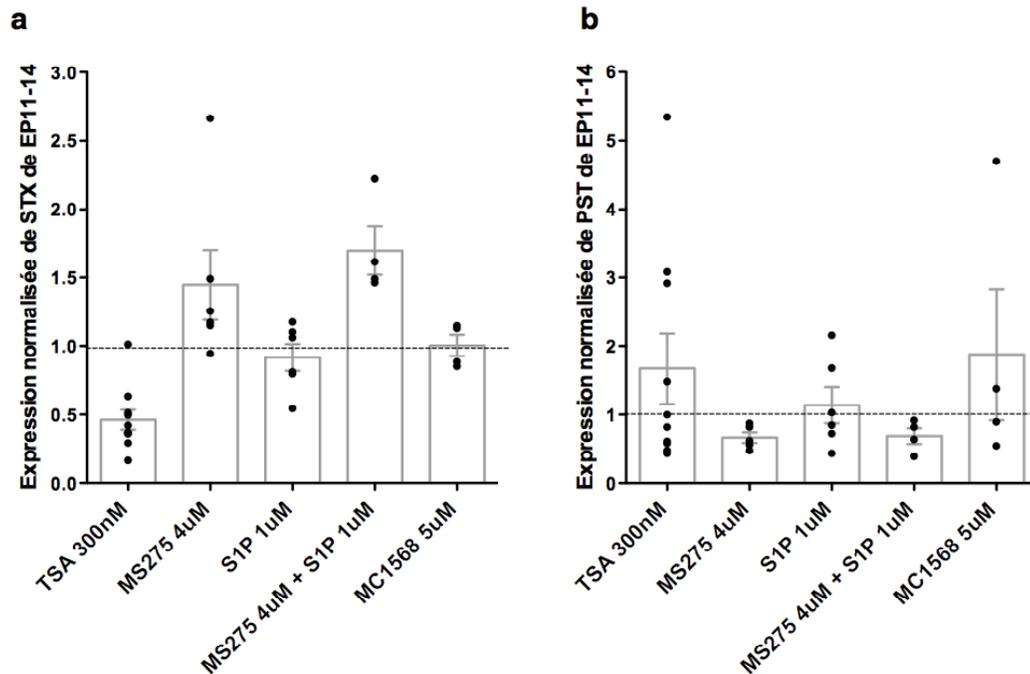


Figure 3.5 L'application des inhibiteurs de HDACs TSA et MS275+S1P de EP11-14 réduit prématurément l'expression de (a) STX dans les cultures organotypique de souris. Aucun effet sur (b) PST n'est observé. Les histogrammes représentent la moyenne +/- l'erreur type de la moyenne (SEM), et chaque point est une valeur unique. STX et PST sont normalisés avec GAPDH avant d'être normalisé avec leur contrôle à EP14. n=10 pour TSA, n=6 pour S1P, n=4 pour MS275+S1P, et n=4 pour MC1568. Pour MS275 seul, n=6 (STX) et n=5 (PST). L'analyse statistique a démontré une différence significative entre les échantillons traités avec TSA et les contrôles EP14 pour STX (Two-Way ANOVA; $p=0.022$).

CHAPITRE 4 : DISCUSSION

CHAPITRE 4: DISCUSSION

4.1 STX est la principale enzyme régulant PSA durant la période post-natale

Le développement de l'innervation GABAergique mature est assuré via une série d'évènements morphogéniques ordonnés incluant la migration cellulaire, l'élongation et l'arborisation des axones, la formation de synapses, ainsi que le raffinement des circuits corticaux locaux. Ces processus sont engendrés via un système de modulation de l'adhésion cellulaire, dont le principal acteur est PSA^{33, 36-38}. La régulation de cette molécule s'effectue tant au niveau de la programmation de l'expression génique intrinsèque à la cellule que par l'activité neuronale³⁴. Plusieurs données suggèrent que la régulation de l'expression de PSA serait l'élément crucial à l'établissement et à la plasticité de l'innervation GABAergique. En effet, la modulation de l'expression de PSA au cours du développement serait un régulateur permissif des interactions cellulaires entre les axones des interneurons GABAergiques et leurs cibles postsynaptiques, lesquelles peuvent engendrer les dits évènements morphogéniques au lieu et au moment approprié^{34, 36}. Nos données ainsi obtenues ont démontré que la polysialyltransférase STX est l'enzyme régulant préférentiellement les niveaux de PSA sur la protéine membranaire NCAM dans le cortex visuel de la souris durant le stade entourant l'ouverture des yeux. STX serait donc un élément régulateur du développement et de la maturation des circuits corticaux GABAergiques locaux dans le cortex visuel durant la période post-natale

(Chapitre 2; Manuscrit, Figure 2A-3A). Ces observations corrélaient de surcroît avec les informations actuelles, attribuant à STX un rôle prééminent durant cette période. En effet, son expression y est à ce stade majoritaire et son absence produit des formations synaptiques ectopiques et dont la transmission neuronale est déficiente⁷⁴. Sans toutefois en exclure son importance durant les premiers jours de vie, il apparaît que PST serait plutôt un élément important de la polysialylation au niveau adulte; hypothèse consistante avec la littérature stipulant que l'absence de PST engendre des déficiences au niveau de la plasticité hippocampale, de l'apprentissage et de la mémoire chez les souris adulte^{75, 78} et lui attribuant de surcroît une expression plus élevée que son homologue STX à ce moment⁵¹ (M, Figure S.1).

4.2 La régulation de la transcription de STX est activité-dépendante et relève du récepteur NMDA

Tel qu'énoncé, PSA est un élément essentiel à la maturation de l'innervation GABAergique périsomatique activité-dépendante durant le développement des circuits corticaux locaux pendant les premiers stades de la vie. La régulation de l'élongation de la chaîne de PSA sur NCAM y est à ce stade activité-dépendante³⁴ (Chapitre 2, Manuscrit, Figure 2C) et dépend essentiellement de l'enzyme STX. Cette suggestion est appuyée par le fait que la régulation de la transcription génique de STX, et non pas de PST, est dépendante de l'activité neuronale. En effet, les

expériences effectuées *in vivo* via les déprivations binoculaires effectuées chez la souris durant le stade précédant l'ouverture des yeux (vers la fin de la 2^e semaine post-natale) jusqu'au début de la période critique de plasticité oculaire ont permis de démontrer que la restriction en expériences visuelles prévient significativement le déclin développemental de la transcription de STX (M, Figure 2A). Ces observations ont été clairement confirmées *in vitro* via l'application de TTX de EP11-14 et EP8-14 au milieu des cultures organotypiques de cerveau de souris (M, Figure 3A). La durée du traitement pharmacologique est proportionnelle au niveau de transcrits de STX détecté par qPCR; le traitement de 6 jours ayant deux fois plus d'effet sur la prévention de la diminution de l'expression de STX qu'un traitement de 3 jours. Le blocage de l'activité neuronale n'a eu aucun effet sur l'expression génique de PST (M, Figure 2B-3B).

Dans le système nerveux central des mammifères adultes, GABA exerce une fonction de neurotransmetteur inhibiteur, grâce à sa capacité à augmenter la conductance des ions chlorure. Toutefois, au stade embryonnaire et néonatal, GABA provoque l'excitation des neurones post-synaptiques, puisque la concentration intracellulaire en chlore y est à ce moment plus élevée^{140, 141}. L'ajout de bicuculline méthiodide (BMI), un inhibiteur des récepteurs de GABA_A, dans les cultures organotypiques de cerveau de souris de EP11-14 tend à réprimer prématurément la transcription de STX (M, Figure 3A), et non pas de PST (M, Figure 3B). Ceci suggère que le changement du système GABAergique, passant d'excitateur à inhibiteur, soit déjà accompli à cet âge; le BMI provoquant un accroissement de

l'excitation post-synaptique. Ceci est consistant avec la littérature relevant que le changement de fonction excitatrice vers inhibitrice de GABA s'effectue vers P8-10 chez le rat¹⁴². Cette augmentation reflète une fois de plus l'importance de l'activité neuronale dans la régulation de l'expression post-natale de STX, causant cette fois une diminution précoce du niveau de transcrits de STX.

L'activité neuronale stimule l'influx de calcium dans le neurone post-synaptique et engendre une cascade signalétique menant directement à des modifications dans l'expression génique. La variation de l'activité sensorielle *in vivo* (BD) et *in vitro* (TTX, BMI) ont effectivement démontré l'importance de l'activité neurale dans régulation de la transcription de STX. C'est ainsi que basé sur les précédentes observations, nous avons tenté d'établir quel était le mécanisme cellulaire et moléculaire impliqué dans la régulation génique des polysialyltransférases. Nous avons posé l'hypothèse que les niveaux d'expression de STX pouvaient être directement régulés via un processus biologique relié à l'entrée de calcium dans la cellule, lequel engendrerait ainsi une modification de l'activité transcriptionnelle. Nos données suggèrent que la régulation activité-dépendante de l'expression de STX reposerait sur (i) l'activation des récepteurs NMDA et sur (ii) l'entrée du calcium dans le neurone post-synaptique via ces dits récepteurs. Ainsi, en conditions physiologiques, lorsque le potentiel de membrane est au repos, le magnésium (Mg^{2+}) extracellulaire bloque l'entrée des récepteurs NMDA. De suffisantes stimulations pré-synaptiques activent les récepteurs non-NMDA, tel AMPA, et permettent la dépolarisation du neurone post-synaptique. Conséquemment, ceci libère le Mg^{2+} et

permet l'entrée de calcium via les récepteurs NMDA. Nos données suggèrent que le récepteur NMDA joue un rôle prépondérant dans la régulation de la transcription de STX; son inhibition par l'APV prévenant significativement la diminution développementale de cette enzyme (M, Figure 4A). Sans être toutefois statistiquement significative, une tendance similaire est observée lorsque l'on inhibe le récepteur AMPA (M, Figure 4A). Une certaine implication de ce récepteur dans la régulation de l'expression de STX est donc suggérée. Ces effets sur la transcription de STX ont été potentialisés en combinant les inhibiteurs de AMPA et de NMDA (CNQX+APV) dans un milieu de culture (M, Figure 4A). De plus, les niveaux de STX augmentent significativement lorsque les cultures organotypiques sont mises en présence de milieu exempt de calcium (M, Figure 4A). Cette observation supporte donc l'idée que l'influx calcique passant via le récepteur NMDA aide à la régulation de l'expression de STX. D'un autre côté, le rôle du calcium entrant par les VGCC serait négligeable puisque peu d'effets sont observés lorsque l'on bloque les VGCC (M, Figure 4A). Aucun effet sur l'expression de PST n'a été observé pour toutes ces expériences (M, Figure 4B). En somme, ces résultats suggèrent donc que la polysialyltransférase STX serait régulée via un mécanisme NMDA-dépendant, impliquant l'entrée de calcium dans le neurone durant la période post-natale chez la souris et que la dépolarisation causée par l'activation du récepteur AMPA pourrait également contribuer à ce système .

4.3 L'hypothèse du répresseur transcriptionnel

Nous n'avons pu démontrer l'appartenance d'aucun effecteur dans les cascades signalétiques engendrées par l'entrée de calcium via le récepteur NMDA dans le système de régulation de l'expression génique des polysialyltransférases. Les essais *in vitro* ont en effet pratiquement exclu tous les candidats potentiels, tels ERK, CAMKII, PKA, et PKG de ces voies de signalisations (Chapitre 2, Manuscrit, Figure 5). Seul PKC pourrait avoir un effet modulateur – ces observations seront discutées plus loin (Section 4.4). Notons qu'il existe toutefois d'autres candidats, telle la calcineurine, mais aucun essai n'a été effectué afin de vérifier leur implication dans notre modèle. Les mécanismes actuels décrivent que l'activité neuronale et l'entrée de calcium subséquente engendrent une cascade mécanistique, qui, via les effecteurs nommés précédemment et les facteurs de transcription *cAMP response element-binding* (CREB) ou *myocyte enhancer factor-2* (MEF2) mènent à l'augmentation de transcription génique^{85, 143}. Notons d'ailleurs que certaines données suggèrent que la transcription d'une des polysialyltransférases serait CREB-dépendante¹⁴⁴. Nous observons plutôt que l'augmentation de l'activité neuronale réprime l'expression de STX, et aucun effecteur ne semblent directement impliqués dans la régulation de ces enzymes. Ces données suggèrent que l'enzyme STX serait régulée via un répresseur transcriptionnel activité-dépendant et régulé via les canaux NMDA. Nous proposons un modèle impliquant le *repressor-element-1-silencing transcription factor* (REST), un pro-répresseur, ou des micro-ARN (MiR) dans la régulation génique de STX (Figure 4.1).

Nous suggérons donc que cette inhibition activité-dépendante de STX pourrait être engendrée via un répresseur transcriptionnel classique, tel le REST^{145, 146}. REST est d'ailleurs impliqué dans la régulation de spécification neuronale, de la maturation et de la maintenance des neurones¹⁴⁵. Il régule, entre autres, l'expression développementale du co-transporteur neuronal de K^+/Cl^- (KCC2), lequel est responsable de la diminution rapide de la concentration intracellulaire de chlore nécessaire à l'établissement de la fonction GABAergique inhibitrice¹⁴⁶. Son mode de régulation n'est toutefois pas connu. La présence d'un pro-répresseur, devenant fonctionnel par clivage protéolytique est également envisageable. Ces mécanismes d'induction de la transcription du répresseur et de l'activation d'un pro-répresseur seraient tous deux activité-dépendants. Il est de plus envisageable que la régulation de la transcription de STX s'effectue via les MiRs. En effet, de récentes données démontrent que les MiRs sont impliqués dans le développement, la fonctionnalité, la survie, ainsi que la plasticité des neurones¹⁴⁷⁻¹⁴⁹. La liaison de ce court brin d'ARN à l'ARN messager de leurs gènes cible diminue la stabilité de ce dernier et en inhibe la traduction. C'est ainsi que, en concert avec les régulateurs transcriptionnels classiques, ils parviennent à moduler les événements neuronaux, tels la morphogénèse dendritique ou l'établissement de la synaptogénèse¹⁴⁷. Par exemple, MiR-132, lequel est régulé par CREB, est impliqué dans la plasticité dendritique et inhibe l'expression du gène p250GAP¹⁵⁰. De plus, MiR-134, dont l'amas de MiRs (*cluster*) est quant à lui modulé par MEF2, promeut l'élaboration de l'arborisation dendritique en proscrivant la traduction du répresseur Pumilio2¹⁵¹. En symbiose avec le mécanisme épigénétique d'acétylation des histones, il est aussi impliqué dans la

plasticité neuronale¹⁵². Fait à noter, l'expression de MiR-132 ou MiR-134, tout comme quelques autres MiRs, sont modulés positivement par l'activité neuronale^{149, 153, 154}. L'augmentation du nombre de MiRs matures via une augmentation de l'activité neurale, lequel engendre une répression génique nous amène à suggérer que les MiRs pourraient réguler l'expression de STX. De futures expériences afin de démontrer cette hypothèse sont ainsi à entrevoir.

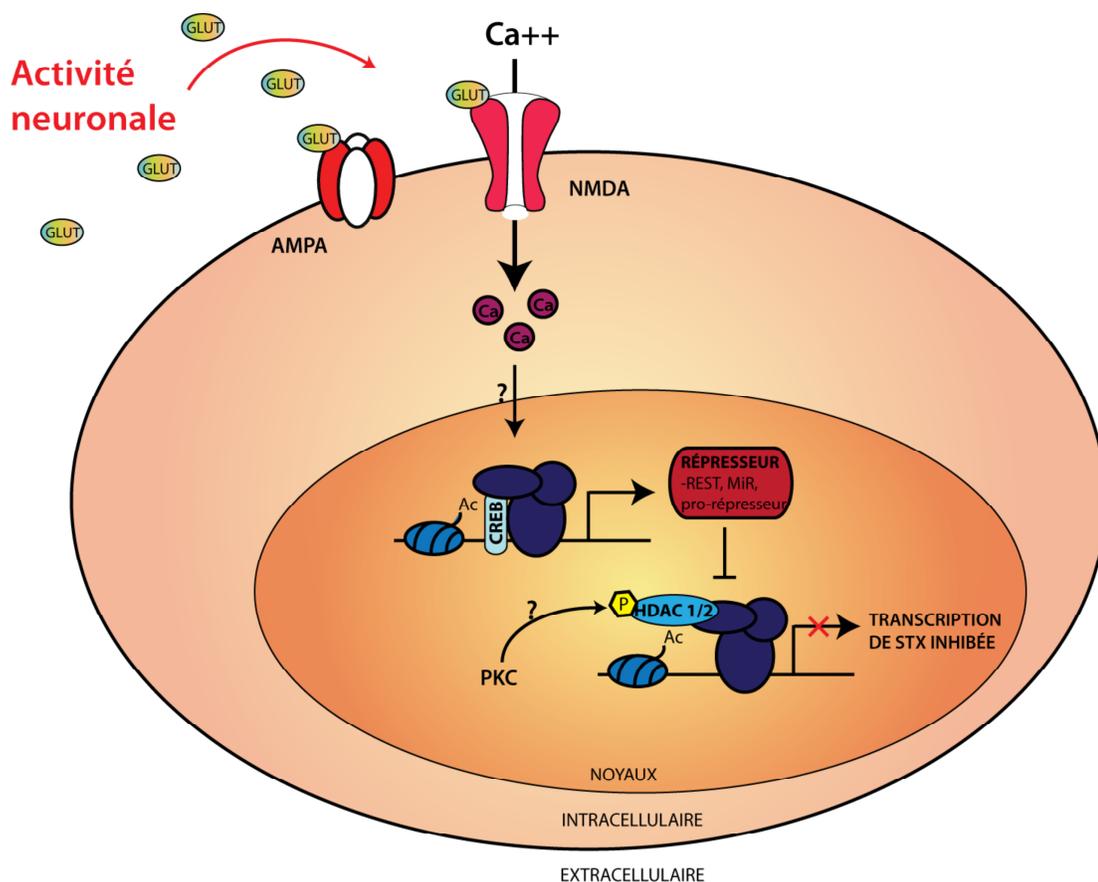


Figure 4.1. Schéma illustrant que l'enzyme STX serait régulée via un répresseur transcriptionnel activité-dépendant impliquant le récepteur NMDA.

4.4 La Protéine Kinase C (PKC) : le chaînon manquant?

Nos données suggèrent également l'implication de PKC dans la régulation de l'expression de STX. Nous suggérons que PKC serait un régulateur permissif de l'expression continue de STX dans le néocortex des rongeurs durant la période post-natale. En effet, le blocage de tous les isoformes de PKC par la chelerythrine (CHE) en présence d'activité neuronale induit une diminution précoce de l'expression de STX par rapport au contrôle du même âge (Chapitre 2, Manuscrit, Figure 5A). De plus, la double inhibition de PKC et de l'activité neuronale provoque une modeste augmentation du nombre de transcrits de STX, mais d'un niveau moindre que l'effet de l'application de TTX seul (M, Figure 5A). En effet, les niveaux d'expression de STX en présence de TTX et CHE ne sont pas statistiquement différents des contrôles à EP14. De ceci transgresse la possibilité que PKC soit impliqué dans la transcription continue de STX, tandis que l'augmentation de l'activité neuronale, telle que mentionné précédemment, pourrait activer un répresseur transcriptionnel de STX afin d'en diminuer l'expression au cours du développement (Figure 4.2). L'effet combiné engendrerait la courbe développementale, telle que l'on observe. Il serait d'ailleurs fort intéressant d'identifier quel isoforme spécifique de PKC est impliqué dans ce processus. Il est de plus possible que PKC phosphoryle le complexe répresseur formé, entre autres, par HDAC1/2¹⁰²; ceci ayant alors pour effet d'activer la transcription génique. Cet effet serait restreint en présence d'expériences sensorielles (Figure 4.1). Ces données seraient alors en lien avec nos observations montrant que les HDAC1 et 2 sont impliqués dans la régulation de l'expression de STX (Chapitre 3, Figure 3.5).

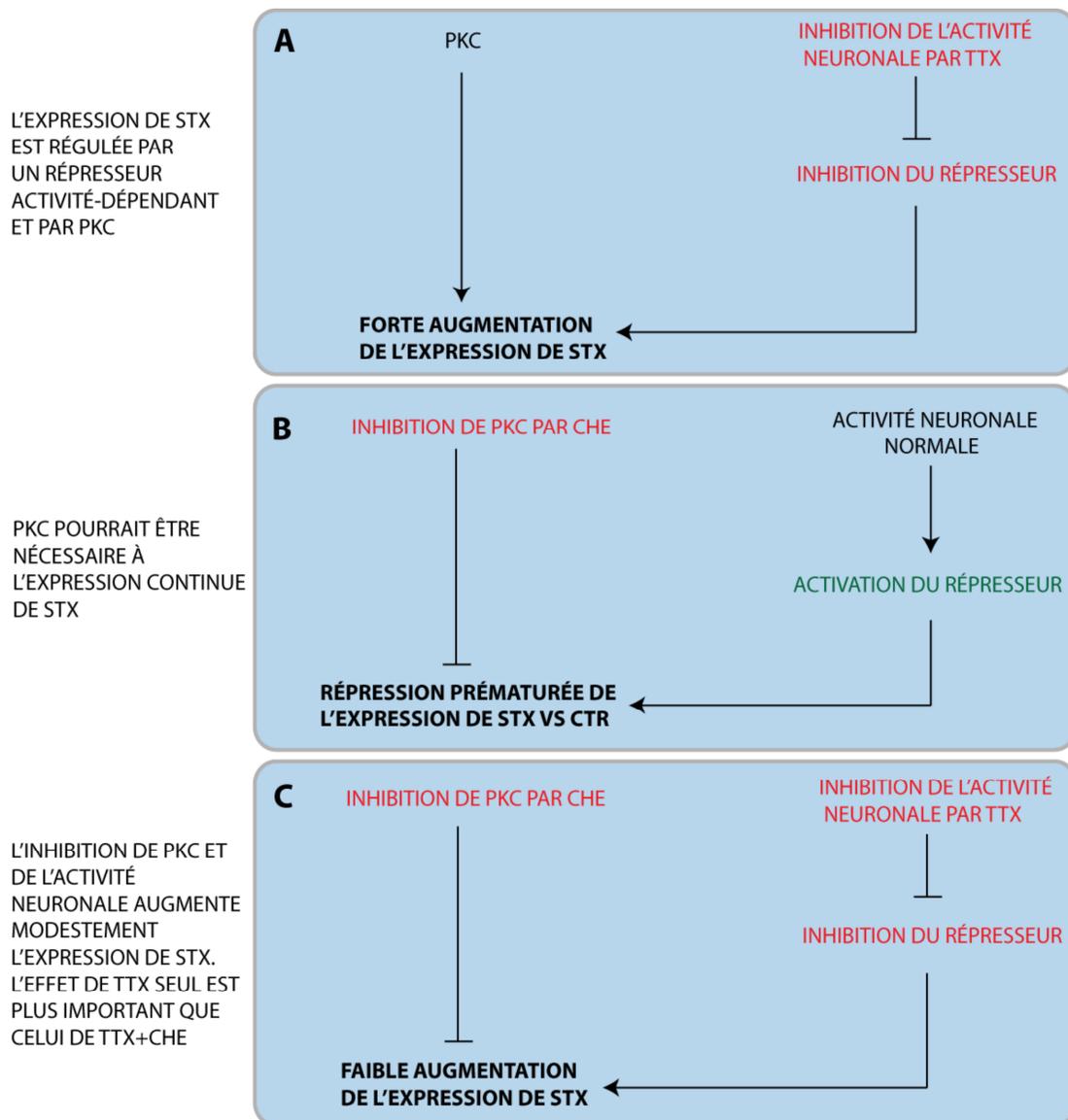


Figure 4.2. Effet synergique de PKC et de l'activité neuronale sur l'expression de STX. (A) Le blocage de l'activité neuronale inhibe un répresseur transcriptionnel sans toutefois influencer l'activité de PKC. La transcription de STX est donc potentialisée. (B) Le blocage de PKC engendre une diminution prématurée de l'expression de STX durant la période post-natale. (C) L'inhibition combinée de PKC et de l'activité neuronale engendre une faible augmentation de l'expression de STX.

Un effet similaire est observé pour PST; l'inhibition de PKC provoquant également une diminution hâtive de son expression (M, Figure 5B). PKC serait donc

impliqué dans l'expression de PST. La double inhibition de PKC et de l'activité neuronale provoque un effet variable sur le niveau de PST dans le modèle *in vitro*. Il est possible que PKC soit le lien entre les voies de signalisation de STX et de PST. Toutefois, de plus profondes investigations seront nécessaires afin d'expliquer plus amplement ce phénomène.

Nous avons observé l'effet de PKC sur la transcription des ARNm des polysialyltransférases. Cependant, l'effet sur l'activité de ces enzymes fonctionnelles et sur leur capacité à polymériser les chaînes de PSA sur NCAM n'a pas été exploré. Certaines données proposent que l'activation des polysialyltransférases pourrait être à la fois transitoire et réversible¹⁵⁵. Ceci est un outil important lors de phénomène nécessitant une augmentation rapide de PSA, tel que dans la consolidation de la mémoire. Ainsi, la quantité de PSA sur NCAM ne reposerait pas entièrement sur le niveau de transcription génique de STX et de PST. Les enzymes STX et de PST matures seraient plutôt dans un état dormant et non-fonctionnel via un mécanisme d'inhibition. Cette présence de polysialyltransférases matures et prêtes à être activées faciliterait donc l'établissement des mécanismes sous-tendant l'apprentissage. Il existerait donc deux mécanismes distincts, l'un régulant la diminution développementale de PSA sur NCAM via l'expression des polysialyltransférases, et un second permettant leur activation rapide des enzymes matures au lieu et au moment approprié. Un de ces mécanismes implique PKC δ ¹⁵⁵, lequel est activé par l'activité neuronale et régule négativement la polysialylation de NCAM. Il n'est pas

connu si l'effet est spécifique à STX ou à PST¹⁵⁵. Ceci suggère toutefois que les polysialyltransférases seraient régulées différemment à plusieurs niveaux – entre autres par l'activité neuronale et par PKC – soit au niveau transcriptionnel ou s'ils sont dans un état d'enzyme mature.

4.5 La méthylation de l'ADN, une avenue prometteuse.

MeCP₂ est *de facto* associée aux îlots CpG méthylés des promoteurs afin d'en restreindre la transcription génique. Certains de ces gènes peuvent être des facteurs de transcription, ou des répresseurs, ce pourquoi on attribue à MeCP₂ la capacité de réprimer ou d'augmenter la transcription génique¹¹⁹. Une diminution de l'expression de MeCP₂ est observée dans le cortex visuel des souris durant la période corrélant avec l'ouverture des yeux (i.e. P13-14) (Chapitre 3, Figure 3.2). Ces données suggèrent qu'il y aurait une régulation différée de la transcription génique dans le cortex visuel vers P14, correspondant avec les importants changements morphologiques observés à ce moment. De plus, les injections bi-quotidiennes de L-méthionine et l'ajout de concentrations croissantes de cette substance dans les cultures organotypiques de souris démontrent que le mécanisme de méthylation de l'ADN pourrait être impliqué dans la régulation de STX et de PST (Figure 3.3-3.4). En effet, les tests *in vivo* ont révélé une augmentation de l'expression de STX, tandis que les essais *in vitro* ont permis d'accroître de nombre de transcrits détectés pour les deux enzymes. MeCP₂ pourrait ainsi, en accord avec les précédentes hypothèses,

moduler directement la transcription de STX et de PST, ou d'un de leur régulateur/répresseur transcriptionnel. Toutefois, l'analyse par séquençage au bisulfite du promoteur de STX fait pencher la balance vers la seconde option – aucun site méthylé n'y a été détecté, et ce, tant à P9 qu'à P25 (données non-démontrées).

Comme les expériences suggérant que le mécanisme épigénétique de méthylation de l'ADN n'étaient incluses que dans un projet pilote mais sont cependant prometteuses, nous aimerions augmenter le nombre de n afin de renforcer nos statistiques. De plus, injecter une plus forte concentration de L-méthionine IP et séparer les mâles des femelles pourraient également constituer des avenues intéressantes.

4.6 Le remodelage de la chromatine via l'acétylation des histones contribue à la modulation de l'expression de STX.

Les mécanismes épigénétiques, tel l'acétylation des histones, régulent l'expression des gènes sans toutefois en modifier le code génétique. De nombreuses recherches soutiennent que ces modifications jouent un rôle primordial dans le bon fonctionnement du système nerveux. En effet, des défauts dans la régulation de la transcription génique ont été positivement associés plusieurs maladies neurodéveloppementales¹⁵⁶, et plusieurs de ces effets délétères ont pu être amélioré, voire renversé via l'usage de HDACi^{157, 158}. Il est de plus maintenant établi que

l'acétylation des histones est impliqué dans la plasticité synaptique, ainsi que dans les processus sous-tendant l'apprentissage et la mémoire^{156, 159-161}. PSA étant impliqué dans une multitude d'évènements corticaux, dont la plasticité du système GABAergique, nous avons donc testé si l'acétylation des histones régulaient la transcription de STX et PST¹⁵⁸. Nos données *in vitro* suggèrent l'acétylation des histones est impliqué dans la modulation de l'expression de STX (Chapitre 3, Figure 3.5A), mais pas de PST (Figure 3.5B), durant la période post-natale chez la souris. En effet, l'ajout de TSA, un bloqueur universel des HDACs, a provoqué une répression développementale prématurée de l'expression de STX (Figure 3.5A). Plusieurs évidences démontrent que certaines classes ou isoformes des HDACs réguleraient de manière plus spécifiques certains évènements corticaux, dont, de nouveau, la plasticité synaptique^{124, 125}. Parmi ces derniers, on retrouve les HDAC1 et 2, lesquels font partie de la classe I des HDACs. Nous avons observé que le blocage du complexe formé par HDAC1 et 2 augmentait l'expression de STX (Figure 3.5A). Cet effet est plus important que l'effet du blocage individuel de HDAC1 ou 2. Toutefois, une plus grande tendance vers l'accroissement du nombre de transcrits de STX est observée lorsque HDAC1 est bloqué seul, suggérant un apport supérieur de cet isoforme à la régulation de STX (Figure 3.5A). L'inhibition des HDACs de la classe II, laquelle est activité-dépendante, n'a eu aucun effet significatif sur STX (Figure 3.5A). Le TSA inhibe toutes les classes de HDACs. Ce faisant, il exerce un effet à large spectre, et pourrait influencer tous les éléments de la chaîne mécanistique régulant l'expression de STX, dont, par exemple, un répresseur. D'un autre côté, l'effet des isoformes HDAC1 et 2 est plus ciblé, et pourraient réguler directement le

gène STX. Des expériences de coimmunoprécipitation de la chromatine pourraient nous renseigner plus amplement à ce sujet, nous permettant de savoir si les HDAC1 et 2 sont liés au promoteur de STX afin d'en réguler la transcription. Cette connaissance précise du mécanisme régulant STX et/ou PST constituerait un excellent moyen d'en moduler pharmacologiquement l'expression. En somme, l'acétylation des histones joue un rôle important dans la régulation de l'enzyme STX, mais pas de PST. Bien que la raison soit à ce jour inconnue, ceci est une évidence supplémentaire démontrant que les modes de régulation des deux polysialyltransférases diffèrent et ouvre donc la porte à d'éventuelles recherches à ce sujet.

4.7 Conclusion et signification des résultats

En somme, nos données démontrent que la polysialyltransférase STX est l'enzyme modulant préférentiellement les niveaux de PSA sur NCAM dans le cortex visuel des souris durant la période post-natale. Nous proposons pour la première fois un modèle de régulation dynamique de l'expression de STX, où les niveaux d'ARNm dans le cortex visuel dépendent de l'activité neuronale post-synaptique. L'entrée de calcium extracellulaire via le récepteur NMDA activerait une cascade signalétique menant à la modification du taux de transcrits de cette enzyme. La littérature stipule que l'activation des récepteurs NMDA régule différemment l'expression de PSA dans plusieurs systèmes, variant selon le stade développemental ou le tissu¹⁶²; les

effets divergeants de l'activation de NMDA que nous observons sur la transcription de STX et de PST dans le cortex visuel pourraient donc être âge-dépendant. De plus, nous suggérons que PKC serait impliqué dans la transcription continue de STX. L'implication des mécanismes épigénétiques, comme la méthylation et l'acétylation des histones laisse entrevoir de prometteuses recherches; de plus profondes investigations sont à entrevoir afin de confirmer ce phénomène. La somme de ces processus contrôlerait les niveaux des polysialyltransférases au cours du développement, et conséquemment, les taux de PSA, lequel permet les interactions cellule-cellule au lieu et moment approprié. Le contrôle des quantités de PSA est ainsi un élément-clé dans la formation de circuits neuronaux et la plasticité cérébrale. Cette connaissance de la régulation génique de STX et de PST est donc un outil précieux. Ces polysialyltransférases, en modulant directement les niveaux de PSA dans le cortex visuel au cours du développement, jouent un rôle crucial dans le développement et la maturation des synapses GABAergiques. La compréhension de leurs mécanismes régulateurs ouvre donc la porte à la possibilité de moduler pharmacologiquement l'expression de ces enzymes. En sur-exprimant ainsi STX et/ou PST, ceci pourrait produire une plus importante polymérisation de PSA sur NCAM. Ce phénomène engendrerait possiblement une déstabilisation des synapses GABAergiques, et, souhaitons-le, permettrait de ré-induire la plasticité cérébrale.

4.8 Directions futures

Il importe maintenant de mieux caractériser la signification de cette divergence dans la régulation développementale des deux polysialyltransférases. Il est de plus essentiel de connaître les mécanismes moléculaires impliqués dans la transcription de PST et de mieux définir ceux impliqués dans la régulation de STX. Par exemple, de plus amples investigations quant au rôle des mécanismes épigénétiques sont à entrevoir. Résoudre quel isoforme de PKC est impliqué dans la régulation transcriptionnelle des enzymes est également primordial. Finalement, le but ultime de ces expérimentations étant de ré-induire la plasticité cérébrale, il est premièrement indispensable de tester *in vitro* l'effet de la modulation pharmacologique de la transcription de STX et de PST sur l'élongation de la chaîne de PSA. Puis, nous observerons l'effet sur le développement et la maturation des synapses GABAergiques *in vitro*. Dans le cas où un effet est observé, nous pourrions passer au modèle *in vivo* et injecter ces dits agents pharmacologiques chez les souris durant les premiers stades de vie. Des enregistrements *in vivo* durant les premières semaines post-natales nous indiqueraient si nous sommes en mesure d'ainsi influencer la période critique de plasticité. Ce que nous souhaitons ardemment.

CHAPITRE 5 : BIBLIOGRAPHIE

CHAPITRE 5: BIBLIOGRAPHIE

1. Di Cristo, G. Development of cortical GABAergic circuits and its implications for neurodevelopmental disorders. *Clin Genet* **72**, 1-8 (2007).
2. Markram, H., *et al.* Interneurons of the neocortical inhibitory system. *Nat Rev Neurosci* **5**, 793-807 (2004).
3. Somogyi, P., Tamas, G., Lujan, R. & Buhl, E.H. Salient features of synaptic organisation in the cerebral cortex. *Brain Res Brain Res Rev* **26**, 113-135 (1998).
4. Miles, R., Toth, K., Gulyas, A.I., Hajos, N. & Freund, T.F. Differences between somatic and dendritic inhibition in the hippocampus. *Neuron* **16**, 815-823 (1996).
5. Tamas, G., Buhl, E.H. & Somogyi, P. Fast IPSPs elicited via multiple synaptic release sites by different types of GABAergic neurone in the cat visual cortex. *J Physiol* **500 (Pt 3)**, 715-738 (1997).
6. Buzsáki, G. *Rhythms of the brain* (Oxford University Press, Oxford ; New York, 2006).
7. Hensch, T.K. Critical period plasticity in local cortical circuits. *Nat Rev Neurosci* **6**, 877-888 (2005).
8. Owens, D.F. & Kriegstein, A.R. Developmental neurotransmitters? *Neuron* **36**, 989-991 (2002).
9. Lewis, D.A., Hashimoto, T. & Volk, D.W. Cortical inhibitory neurons and schizophrenia. *Nat Rev Neurosci* **6**, 312-324 (2005).
10. Cossart, R., Bernard, C. & Ben-Ari, Y. Multiple facets of GABAergic neurons and synapses: multiple fates of GABA signalling in epilepsies. *Trends Neurosci* **28**, 108-115 (2005).
11. Dani, V.S., *et al.* Reduced cortical activity due to a shift in the balance between excitation and inhibition in a mouse model of Rett syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 12560-12565 (2005).
12. Addington, A.M., *et al.* GAD1 (2q31.1), which encodes glutamic acid decarboxylase (GAD67), is associated with childhood-onset schizophrenia and cortical gray matter volume loss. *Mol Psychiatry* **10**, 581-588 (2005).
13. Huang, Z.J., *et al.* BDNF regulates the maturation of inhibition and the critical period of plasticity in mouse visual cortex. *Cell* **98**, 739-755 (1999).
14. Fagiolini, M., Pizzorusso, T., Berardi, N., Domenici, L. & Maffei, L. Functional postnatal development of the rat primary visual cortex and the role of visual experience: dark rearing and monocular deprivation. *Vision Res* **34**, 709-720 (1994).
15. Chattopadhyaya, B., *et al.* Experience and activity-dependent maturation of perisomatic GABAergic innervation in primary visual cortex during a postnatal critical period. *J Neurosci* **24**, 9598-9611 (2004).

16. Gianfranceschi, L., *et al.* Visual cortex is rescued from the effects of dark rearing by overexpression of BDNF. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 12486-12491 (2003).
17. Brummendorf, T. & Rathjen, F.G. Cell adhesion molecules 1: immunoglobulin superfamily. *Protein Profile* **2**, 963-1108 (1995).
18. Rutishauser, U., Thiery, J.P., Brackenbury, R., Sela, B.A. & Edelman, G.M. Mechanisms of adhesion among cells from neural tissues of the chick embryo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **73**, 577-581 (1976).
19. Ronn, L.C., Hartz, B.P. & Bock, E. The neural cell adhesion molecule (NCAM) in development and plasticity of the nervous system. *Exp Gerontol* **33**, 853-864 (1998).
20. Ronn, L.C., Berezin, V. & Bock, E. The neural cell adhesion molecule in synaptic plasticity and ageing. *Int J Dev Neurosci* **18**, 193-199 (2000).
21. Berezin, V., Bock, E. & Poulsen, F.M. The neural cell adhesion molecule. *Curr Opin Drug Discov Devel* **3**, 605-609 (2000).
22. Ditlevsen, D.K., Povlsen, G.K., Berezin, V. & Bock, E. NCAM-induced intracellular signaling revisited. *J Neurosci Res* **86**, 727-743 (2008).
23. Walmod, P.S., Kolkova, K., Berezin, V. & Bock, E. Zippers make signals: NCAM-mediated molecular interactions and signal transduction. *Neurochem Res* **29**, 2015-2035 (2004).
24. He, H.T., Barbet, J., Chaix, J.C. & Goridis, C. Phosphatidylinositol is involved in the membrane attachment of NCAM-120, the smallest component of the neural cell adhesion molecule. *EMBO J* **5**, 2489-2494 (1986).
25. Hinkle, C.L., Diestel, S., Lieberman, J. & Maness, P.F. Metalloprotease-induced ectodomain shedding of neural cell adhesion molecule (NCAM). *J Neurobiol* **66**, 1378-1395 (2006).
26. Gascon, E., Vutskits, L. & Kiss, J.Z. Polysialic acid-neural cell adhesion molecule in brain plasticity: from synapses to integration of new neurons. *Brain Res Rev* **56**, 101-118 (2007).
27. Povlsen, G.K., Ditlevsen, D.K., Berezin, V. & Bock, E. Intracellular signaling by the neural cell adhesion molecule. *Neurochem Res* **28**, 127-141 (2003).
28. Kasper, C., *et al.* Structural basis of cell-cell adhesion by NCAM. *Nat Struct Biol* **7**, 389-393 (2000).
29. Soroka, V., *et al.* Structure and interactions of NCAM Ig1-2-3 suggest a novel zipper mechanism for homophilic adhesion. *Structure* **11**, 1291-1301 (2003).
30. Baldwin, T.J., Fazeli, M.S., Doherty, P. & Walsh, F.S. Elucidation of the molecular actions of NCAM and structurally related cell adhesion molecules. *J Cell Biochem* **61**, 502-513 (1996).
31. Cole, G.J. & Glaser, L. A heparin-binding domain from N-CAM is involved in neural cell-substratum adhesion. *J Cell Biol* **102**, 403-412 (1986).
32. Kiss, J.Z. & Rougon, G. Cell biology of polysialic acid. *Curr Opin Neurobiol* **7**, 640-646 (1997).
33. Rutishauser, U. Polysialic acid in the plasticity of the developing and adult vertebrate nervous system. *Nat Rev Neurosci* **9**, 26-35 (2008).

34. Di Cristo, G., *et al.* Activity-dependent PSA expression regulates inhibitory maturation and onset of critical period plasticity. *Nat Neurosci* **10**, 1569-1577 (2007).
35. Rothbard, J.B., Brackenbury, R., Cunningham, B.A. & Edelman, G.M. Differences in the carbohydrate structures of neural cell-adhesion molecules from adult and embryonic chicken brains. *J Biol Chem* **257**, 11064-11069 (1982).
36. Johnson, C.P., Fujimoto, I., Rutishauser, U. & Leckband, D.E. Direct evidence that neural cell adhesion molecule (NCAM) polysialylation increases intermembrane repulsion and abrogates adhesion. *J Biol Chem* **280**, 137-145 (2005).
37. Fujimoto, I., Bruses, J.L. & Rutishauser, U. Regulation of cell adhesion by polysialic acid. Effects on cadherin, immunoglobulin cell adhesion molecule, and integrin function and independence from neural cell adhesion molecule binding or signaling activity. *J Biol Chem* **276**, 31745-31751 (2001).
38. Tang, J., Rutishauser, U. & Landmesser, L. Polysialic acid regulates growth cone behavior during sorting of motor axons in the plexus region. *Neuron* **13**, 405-414 (1994).
39. El Maarouf, A. & Rutishauser, U. Removal of polysialic acid induces aberrant pathways, synaptic vesicle distribution, and terminal arborization of retinotectal axons. *J Comp Neurol* **460**, 203-211 (2003).
40. Seki, T. & Rutishauser, U. Removal of polysialic acid-neural cell adhesion molecule induces aberrant mossy fiber innervation and ectopic synaptogenesis in the hippocampus. *J Neurosci* **18**, 3757-3766 (1998).
41. Rutishauser, U., Watanabe, M., Silver, J., Troy, F.A. & Vimr, E.R. Specific alteration of NCAM-mediated cell adhesion by an endoneuraminidase. *J Cell Biol* **101**, 1842-1849 (1985).
42. Ono, K., Tomaszewicz, H., Magnuson, T. & Rutishauser, U. N-CAM mutation inhibits tangential neuronal migration and is phenocopied by enzymatic removal of polysialic acid. *Neuron* **13**, 595-609 (1994).
43. Hu, H., Tomaszewicz, H., Magnuson, T. & Rutishauser, U. The role of polysialic acid in migration of olfactory bulb interneuron precursors in the subventricular zone. *Neuron* **16**, 735-743 (1996).
44. Burgess, A., *et al.* Polysialic acid regulates the clustering, migration, and neuronal differentiation of progenitor cells in the adult hippocampus. *Dev Neurobiol* **68**, 1580-1590 (2008).
45. Petridis, A.K., El-Maarouf, A. & Rutishauser, U. Polysialic acid regulates cell contact-dependent neuronal differentiation of progenitor cells from the subventricular zone. *Dev Dyn* **230**, 675-684 (2004).
46. Seki, T. & Arai, Y. Distribution and possible roles of the highly polysialylated neural cell adhesion molecule (NCAM-H) in the developing and adult central nervous system. *Neurosci Res* **17**, 265-290 (1993).
47. Bonfanti, L. PSA-NCAM in mammalian structural plasticity and neurogenesis. *Prog Neurobiol* **80**, 129-164 (2006).
48. Seki, T. & Arai, Y. The persistent expression of a highly polysialylated NCAM in the dentate gyrus of the adult rat. *Neurosci Res* **12**, 503-513 (1991).

49. Lackie, P.M., Zuber, C. & Roth, J. Polysialic acid of the neural cell adhesion molecule (N-CAM) is widely expressed during organogenesis in mesodermal and endodermal derivatives. *Differentiation* **57**, 119-131 (1994).
50. Fu, M., Vohra, B.P., Wind, D. & Heuckeroth, R.O. BMP signaling regulates murine enteric nervous system precursor migration, neurite fasciculation, and patterning via altered Ncam1 polysialic acid addition. *Dev Biol* **299**, 137-150 (2006).
51. Angata, K., *et al.* Human STX polysialyltransferase forms the embryonic form of the neural cell adhesion molecule. Tissue-specific expression, neurite outgrowth, and chromosomal localization in comparison with another polysialyltransferase, PST. *J Biol Chem* **272**, 7182-7190 (1997).
52. El Maarouf, A., Petridis, A.K. & Rutishauser, U. Use of polysialic acid in repair of the central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 16989-16994 (2006).
53. Kojima, N., Yoshida, Y., Kurosawa, N., Lee, Y.C. & Tsuji, S. Enzymatic activity of a developmentally regulated member of the sialyltransferase family (STX): evidence for alpha 2,8-sialyltransferase activity toward N-linked oligosaccharides. *FEBS Lett* **360**, 1-4 (1995).
54. Eckhardt, M., *et al.* Molecular characterization of eukaryotic polysialyltransferase-1. *Nature* **373**, 715-718 (1995).
55. Nakayama, J., Fukuda, M.N., Fredette, B., Ranscht, B. & Fukuda, M. Expression cloning of a human polysialyltransferase that forms the polysialylated neural cell adhesion molecule present in embryonic brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 7031-7035 (1995).
56. Scheidegger, E.P., Sternberg, L.R., Roth, J. & Lowe, J.B. A human STX cDNA confers polysialic acid expression in mammalian cells. *J Biol Chem* **270**, 22685-22688 (1995).
57. Maziade, M., *et al.* Shared and specific susceptibility loci for schizophrenia and bipolar disorder: a dense genome scan in Eastern Quebec families. *Mol Psychiatry* **10**, 486-499 (2005).
58. Arai, M., *et al.* Association between polymorphisms in the promoter region of the sialyltransferase 8B (SIAT8B) gene and schizophrenia. *Biol Psychiatry* **59**, 652-659 (2006).
59. Tao, R., *et al.* Positive association between SIAT8B and schizophrenia in the Chinese Han population. *Schizophr Res* **90**, 108-114 (2007).
60. Kojima, N., *et al.* Biosynthesis and expression of polysialic acid on the neural cell adhesion molecule is predominantly directed by ST8Sia II/STX during in vitro neuronal differentiation. *J Biol Chem* **271**, 22058-22062 (1996).
61. Nakata, D., Zhang, L. & Troy, F.A., 2nd. Molecular basis for polysialylation: a novel polybasic polysialyltransferase domain (PSTD) of 32 amino acids unique to the alpha 2,8-polysialyltransferases is essential for polysialylation. *Glycoconj J* **23**, 423-436 (2006).
62. Angata, K., Suzuki, M. & Fukuda, M. Differential and cooperative polysialylation of the neural cell adhesion molecule by two polysialyltransferases, PST and STX. *J Biol Chem* **273**, 28524-28532 (1998).

63. Galuska, S.P., Geyer, R., Gerardy-Schahn, R., Muhlenhoff, M. & Geyer, H. Enzyme-dependent variations in the polysialylation of the neural cell adhesion molecule (NCAM) in vivo. *J Biol Chem* **283**, 17-28 (2008).
64. Nelson, R.W., Bates, P.A. & Rutishauser, U. Protein determinants for specific polysialylation of the neural cell adhesion molecule. *J Biol Chem* **270**, 17171-17179 (1995).
65. Mendiratta, S.S., *et al.* A novel alpha-helix in the first fibronectin type III repeat of the neural cell adhesion molecule is critical for N-glycan polysialylation. *J Biol Chem* **281**, 36052-36059 (2006).
66. Mendiratta, S.S., Sekulic, N., Lavie, A. & Colley, K.J. Specific amino acids in the first fibronectin type III repeat of the neural cell adhesion molecule play a role in its recognition and polysialylation by the polysialyltransferase ST8Sia IV/PST. *J Biol Chem* **280**, 32340-32348 (2005).
67. Livingston, B.D., Jacobs, J.L., Glick, M.C. & Troy, F.A. Extended polysialic acid chains (n greater than 55) in glycoproteins from human neuroblastoma cells. *J Biol Chem* **263**, 9443-9448 (1988).
68. Oka, S., Bruses, J.L., Nelson, R.W. & Rutishauser, U. Properties and developmental regulation of polysialyltransferase activity in the chicken embryo brain. *J Biol Chem* **270**, 19357-19363 (1995).
69. Hildebrandt, H., Becker, C., Murau, M., Gerardy-Schahn, R. & Rahmann, H. Heterogeneous expression of the polysialyltransferases ST8Sia II and ST8Sia IV during postnatal rat brain development. *J Neurochem* **71**, 2339-2348 (1998).
70. Kurosawa, N., Yoshida, Y., Kojima, N. & Tsuji, S. Polysialic acid synthase (ST8Sia II/STX) mRNA expression in the developing mouse central nervous system. *J Neurochem* **69**, 494-503 (1997).
71. Ong, E., *et al.* Developmental regulation of polysialic acid synthesis in mouse directed by two polysialyltransferases, PST and STX. *Glycobiology* **8**, 415-424 (1998).
72. Phillips, G.R., Krushel, L.A. & Crossin, K.L. Developmental expression of two rat sialyltransferases that modify the neural cell adhesion molecule, N-CAM. *Brain Res Dev Brain Res* **102**, 143-155 (1997).
73. Wood, G.K., *et al.* Cloning and in situ hybridization analysis of the expression of polysialyltransferase mRNA in the developing and adult rat brain. *Brain Res Mol Brain Res* **51**, 69-81 (1997).
74. Angata, K., *et al.* Sialyltransferase ST8Sia-II assembles a subset of polysialic acid that directs hippocampal axonal targeting and promotes fear behavior. *J Biol Chem* **279**, 32603-32613 (2004).
75. Eckhardt, M., *et al.* Mice deficient in the polysialyltransferase ST8SiaIV/PST-1 allow discrimination of the roles of neural cell adhesion molecule protein and polysialic acid in neural development and synaptic plasticity. *J Neurosci* **20**, 5234-5244 (2000).
76. Galuska, S.P., *et al.* Polysialic acid profiles of mice expressing variant allelic combinations of the polysialyltransferases ST8SiaII and ST8SiaIV. *J Biol Chem* **281**, 31605-31615 (2006).

77. Kojima, N., Tachida, Y. & Tsuji, S. Two polysialic acid synthases, mouse ST8Sia II and IV, synthesize different degrees of polysialic acids on different substrate glycoproteins in mouse neuroblastoma Neuro2a cells. *J Biochem* **122**, 1265-1273 (1997).
78. Markram, K., Gerardy-Schahn, R. & Sandi, C. Selective learning and memory impairments in mice deficient for polysialylated NCAM in adulthood. *Neuroscience* **144**, 788-796 (2007).
79. Stoenica, L., *et al.* In vivo synaptic plasticity in the dentate gyrus of mice deficient in the neural cell adhesion molecule NCAM or its polysialic acid. *Eur J Neurosci* **23**, 2255-2264 (2006).
80. Oltmann-Norden, I., *et al.* Impact of the polysialyltransferases ST8SiaII and ST8SiaIV on polysialic acid synthesis during postnatal mouse brain development. *J Biol Chem* **283**, 1463-1471 (2008).
81. Hildebrandt, H., Muhlenhoff, M., Weinhold, B. & Gerardy-Schahn, R. Dissecting polysialic acid and NCAM functions in brain development. *J Neurochem* **103 Suppl 1**, 56-64 (2007).
82. Weinhold, B., *et al.* Genetic ablation of polysialic acid causes severe neurodevelopmental defects rescued by deletion of the neural cell adhesion molecule. *J Biol Chem* **280**, 42971-42977 (2005).
83. Faure, C., *et al.* Gangliogenesis in the enteric nervous system: roles of the polysialylation of the neural cell adhesion molecule and its regulation by bone morphogenetic protein-4. *Dev Dyn* **236**, 44-59 (2007).
84. Cohen, S. & Greenberg, M.E. Communication between the synapse and the nucleus in neuronal development, plasticity, and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* **24**, 183-209 (2008).
85. Zieg, J., Greer, P.L. & Greenberg, M.E. SnapShot: Ca(2+)-dependent transcription in neurons. *Cell* **134**, 1080-1080 e1082 (2008).
86. Greer, P.L. & Greenberg, M.E. From synapse to nucleus: calcium-dependent gene transcription in the control of synapse development and function. *Neuron* **59**, 846-860 (2008).
87. Flavell, S.W. & Greenberg, M.E. Signaling mechanisms linking neuronal activity to gene expression and plasticity of the nervous system. *Annu Rev Neurosci* **31**, 563-590 (2008).
88. Gargus, J.J. Genetic calcium signaling abnormalities in the central nervous system: seizures, migraine, and autism. *Ann N Y Acad Sci* **1151**, 133-156 (2009).
89. Lohmann, C. Calcium signaling and the development of specific neuronal connections. *Prog Brain Res* **175**, 443-452 (2009).
90. Carmignoto, G. & Vicini, S. Activity-dependent decrease in NMDA receptor responses during development of the visual cortex. *Science* **258**, 1007-1011 (1992).
91. Berridge, M.J. Neuronal calcium signaling. *Neuron* **21**, 13-26 (1998).
92. Jonas, P. & Burnashev, N. Molecular mechanisms controlling calcium entry through AMPA-type glutamate receptor channels. *Neuron* **15**, 987-990 (1995).
93. Di Cristo, G., *et al.* Requirement of ERK activation for visual cortical plasticity. *Science* **292**, 2337-2340 (2001).

94. Lee, S.J., Escobedo-Lozoya, Y., Szatmari, E.M. & Yasuda, R. Activation of CaMKII in single dendritic spines during long-term potentiation. *Nature* **458**, 299-304 (2009).
95. Kaltschmidt, B., *et al.* NF-kappaB regulates spatial memory formation and synaptic plasticity through protein kinase A/CREB signaling. *Mol Cell Biol* **26**, 2936-2946 (2006).
96. Suh, Y.H., *et al.* Corequirement of PICK1 binding and PKC phosphorylation for stable surface expression of the metabotropic glutamate receptor mGluR7. *Neuron* **58**, 736-748 (2008).
97. Brahmachari, S., Fung, Y.K. & Pahan, K. Induction of glial fibrillary acidic protein expression in astrocytes by nitric oxide. *J Neurosci* **26**, 4930-4939 (2006).
98. Girouard, H., *et al.* NMDA receptor activation increases free radical production through nitric oxide and NOX2. *J Neurosci* **29**, 2545-2552 (2009).
99. Lu, B., Wang, K.H. & Nose, A. Molecular mechanisms underlying neural circuit formation. *Curr Opin Neurobiol* **19**, 162-167 (2009).
100. Tropea, D., *et al.* Gene expression changes and molecular pathways mediating activity-dependent plasticity in visual cortex. *Nat Neurosci* **9**, 660-668 (2006).
101. Veldic, M., Guidotti, A., Maloku, E., Davis, J.M. & Costa, E. In psychosis, cortical interneurons overexpress DNA-methyltransferase 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 2152-2157 (2005).
102. Hait, N.C., *et al.* Regulation of histone acetylation in the nucleus by sphingosine-1-phosphate. *Science* **325**, 1254-1257 (2009).
103. Tao, X., Finkbeiner, S., Arnold, D.B., Shaywitz, A.J. & Greenberg, M.E. Ca²⁺ influx regulates BDNF transcription by a CREB family transcription factor-dependent mechanism. *Neuron* **20**, 709-726 (1998).
104. Ghosh, A., Carnahan, J. & Greenberg, M.E. Requirement for BDNF in activity-dependent survival of cortical neurons. *Science* **263**, 1618-1623 (1994).
105. Timmusk, T., *et al.* Multiple promoters direct tissue-specific expression of the rat BDNF gene. *Neuron* **10**, 475-489 (1993).
106. Zafra, F., Hengerer, B., Leibrock, J., Thoenen, H. & Lindholm, D. Activity dependent regulation of BDNF and NGF mRNAs in the rat hippocampus is mediated by non-NMDA glutamate receptors. *EMBO J* **9**, 3545-3550 (1990).
107. Greenberg, M.E., Xu, B., Lu, B. & Hempstead, B.L. New insights in the biology of BDNF synthesis and release: implications in CNS function. *J Neurosci* **29**, 12764-12767 (2009).
108. Vicario-Abejon, C., Collin, C., McKay, R.D. & Segal, M. Neurotrophins induce formation of functional excitatory and inhibitory synapses between cultured hippocampal neurons. *J Neurosci* **18**, 7256-7271 (1998).
109. Rutherford, L.C., DeWan, A., Lauer, H.M. & Turrigiano, G.G. Brain-derived neurotrophic factor mediates the activity-dependent regulation of inhibition in neocortical cultures. *J Neurosci* **17**, 4527-4535 (1997).
110. Palizvan, M.R., *et al.* Brain-derived neurotrophic factor increases inhibitory synapses, revealed in solitary neurons cultured from rat visual cortex. *Neuroscience* **126**, 955-966 (2004).

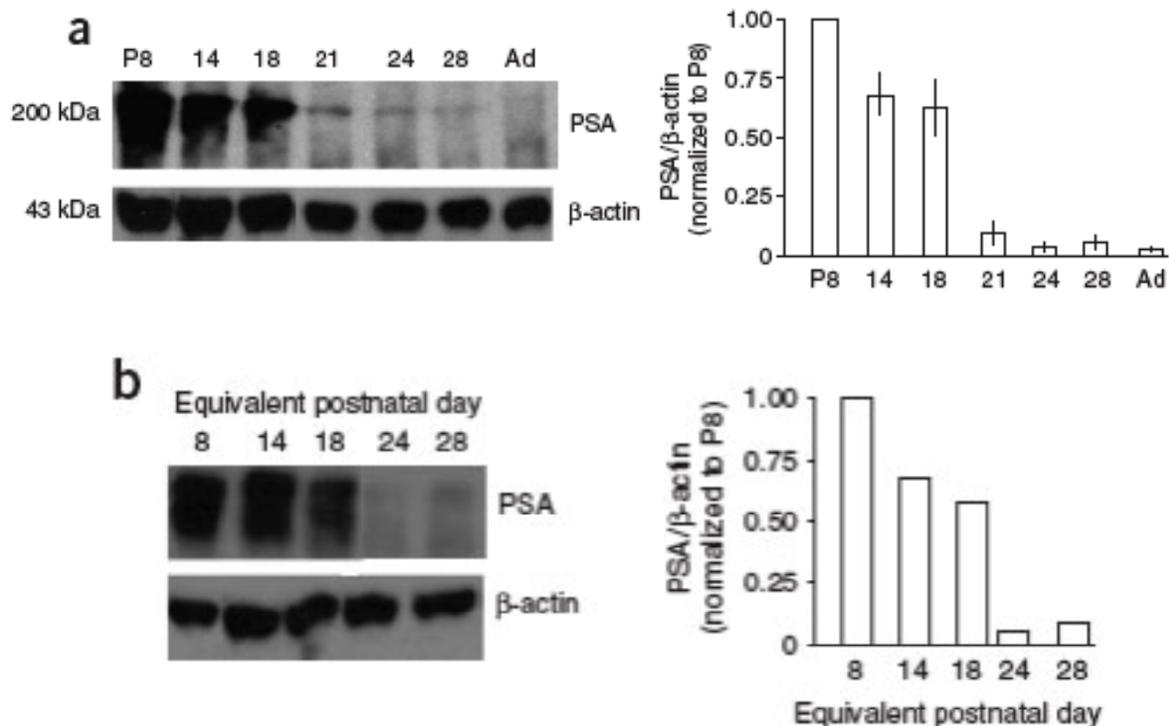
111. Tropea, D., *et al.* Partial reversal of Rett Syndrome-like symptoms in MeCP2 mutant mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 2029-2034 (2009).
112. Petronis, A. The origin of schizophrenia: genetic thesis, epigenetic antithesis, and resolving synthesis. *Biol Psychiatry* **55**, 965-970 (2004).
113. Noh, J.S., *et al.* DNA methyltransferase 1 regulates reelin mRNA expression in mouse primary cortical cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 1749-1754 (2005).
114. Dong, E., Nelson, M., Grayson, D.R., Costa, E. & Guidotti, A. Clozapine and sulpiride but not haloperidol or olanzapine activate brain DNA demethylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 13614-13619 (2008).
115. Chahrour, M. & Zoghbi, H.Y. The story of Rett syndrome: from clinic to neurobiology. *Neuron* **56**, 422-437 (2007).
116. Lewis, J.D., *et al.* Purification, sequence, and cellular localization of a novel chromosomal protein that binds to methylated DNA. *Cell* **69**, 905-914 (1992).
117. Costa, E., *et al.* Reviewing the role of DNA (cytosine-5) methyltransferase overexpression in the cortical GABAergic dysfunction associated with psychosis vulnerability. *Epigenetics* **2**, 29-36 (2007).
118. Grayson, D.R., *et al.* Reelin promoter hypermethylation in schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 9341-9346 (2005).
119. Chahrour, M., *et al.* MeCP2, a key contributor to neurological disease, activates and represses transcription. *Science* **320**, 1224-1229 (2008).
120. Zoghbi, H.Y. Postnatal neurodevelopmental disorders: meeting at the synapse? *Science* **302**, 826-830 (2003).
121. Amir, R.E., *et al.* Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG-binding protein 2. *Nat Genet* **23**, 185-188 (1999).
122. Veldic, M., *et al.* DNA-methyltransferase 1 mRNA is selectively overexpressed in telencephalic GABAergic interneurons of schizophrenia brains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 348-353 (2004).
123. West, A.E., *et al.* Calcium regulation of neuronal gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 11024-11031 (2001).
124. Guan, Z., *et al.* Integration of long-term-memory-related synaptic plasticity involves bidirectional regulation of gene expression and chromatin structure. *Cell* **111**, 483-493 (2002).
125. Guan, J.S., *et al.* HDAC2 negatively regulates memory formation and synaptic plasticity. *Nature* **459**, 55-60 (2009).
126. Kurdistani, S.K. & Grunstein, M. Histone acetylation and deacetylation in yeast. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 276-284 (2003).
127. Goldberg, A.D., Allis, C.D. & Bernstein, E. Epigenetics: a landscape takes shape. *Cell* **128**, 635-638 (2007).
128. Korzus, E., Rosenfeld, M.G. & Mayford, M. CBP histone acetyltransferase activity is a critical component of memory consolidation. *Neuron* **42**, 961-972 (2004).
129. Levenson, J.M., *et al.* Regulation of histone acetylation during memory formation in the hippocampus. *J Biol Chem* **279**, 40545-40559 (2004).
130. Fischer, A., Sananbenesi, F., Wang, X., Dobbin, M. & Tsai, L.H. Recovery of learning and memory is associated with chromatin remodelling. *Nature* **447**, 178-182 (2007).

131. de Ruijter, A.J., van Gennip, A.H., Caron, H.N., Kemp, S. & van Kuilenburg, A.B. Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochem J* **370**, 737-749 (2003).
132. Stimson, L., Wood, V., Khan, O., Fotheringham, S. & La Thangue, N.B. HDAC inhibitor-based therapies and haematological malignancy. *Ann Oncol* **20**, 1293-1302 (2009).
133. Putignano, E., *et al.* Developmental downregulation of histone posttranslational modifications regulates visual cortical plasticity. *Neuron* **53**, 747-759 (2007).
134. Akhtar, M.W., *et al.* Histone deacetylases 1 and 2 form a developmental switch that controls excitatory synapse maturation and function. *J Neurosci* **29**, 8288-8297 (2009).
135. Ollivier, M.L., Dubois, M.F., Krajinovic, M., Cossette, P. & Carmant, L. Risk factors for valproic acid resistance in childhood absence epilepsy. *Seizure* **18**, 690-694 (2009).
136. Kojima, N., Yoshida, Y. & Tsuji, S. A developmentally regulated member of the sialyltransferase family (ST8Sia II, STX) is a polysialic acid synthase. *FEBS Lett* **373**, 119-122 (1995).
137. Takashima, S., Yoshida, Y., Kanematsu, T., Kojima, N. & Tsuji, S. Genomic structure and promoter activity of the mouse polysialic acid synthase (mST8Sia IV/PST) gene. *J Biol Chem* **273**, 7675-7683 (1998).
138. Kishi, N. & Macklis, J.D. MECP2 is progressively expressed in post-migratory neurons and is involved in neuronal maturation rather than cell fate decisions. *Mol Cell Neurosci* **27**, 306-321 (2004).
139. McGowan, P.O., *et al.* Epigenetic regulation of the glucocorticoid receptor in human brain associates with childhood abuse. *Nat Neurosci* **12**, 342-348 (2009).
140. Ben-Ari, Y. Excitatory actions of gaba during development: the nature of the nurture. *Nat Rev Neurosci* **3**, 728-739 (2002).
141. Kriegstein, A.R. Constructing circuits: neurogenesis and migration in the developing neocortex. *Epilepsia* **46 Suppl 7**, 15-21 (2005).
142. Tyzio, R., Holmes, G.L., Ben-Ari, Y. & Khazipov, R. Timing of the developmental switch in GABA(A) mediated signaling from excitation to inhibition in CA3 rat hippocampus using gramicidin perforated patch and extracellular recordings. *Epilepsia* **48 Suppl 5**, 96-105 (2007).
143. Flavell, S.W., *et al.* Activity-dependent regulation of MEF2 transcription factors suppresses excitatory synapse number. *Science* **311**, 1008-1012 (2006).
144. Nakagawa, S., *et al.* Localization of phosphorylated cAMP response element-binding protein in immature neurons of adult hippocampus. *J Neurosci* **22**, 9868-9876 (2002).
145. Abrajano, J.J., *et al.* REST and CoREST modulate neuronal subtype specification, maturation and maintenance. *PLoS One* **4**, e7936 (2009).
146. Yeo, M., Berglund, K., Augustine, G. & Liedtke, W. Novel repression of *Kcc2* transcription by REST-RE-1 controls developmental switch in neuronal chloride. *J Neurosci* **29**, 14652-14662 (2009).

147. Vo, N.K., Cambronne, X.A. & Goodman, R.H. MicroRNA pathways in neural development and plasticity. *Curr Opin Neurobiol* (2010).
148. Edbauer, D., *et al.* Regulation of synaptic structure and function by FMRP-associated microRNAs miR-125b and miR-132. *Neuron* **65**, 373-384 (2010).
149. Impey, S., *et al.* An activity-induced microRNA controls dendritic spine formation by regulating Rac1-PAK signaling. *Mol Cell Neurosci* **43**, 146-156 (2010).
150. Wayman, G.A., *et al.* An activity-regulated microRNA controls dendritic plasticity by down-regulating p250GAP. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 9093-9098 (2008).
151. Fiore, R., *et al.* Mef2-mediated transcription of the miR379-410 cluster regulates activity-dependent dendritogenesis by fine-tuning Pumilio2 protein levels. *EMBO J* **28**, 697-710 (2009).
152. Gao, J., *et al.* A novel pathway regulates memory and plasticity via SIRT1 and miR-134. *Nature* (2010).
153. Khudayberdiev, S., Fiore, R. & Schratt, G. MicroRNA as modulators of neuronal responses. *Commun Integr Biol* **2**, 411-413 (2009).
154. Nudelman, A.S., *et al.* Neuronal activity rapidly induces transcription of the CREB-regulated microRNA-132, in vivo. *Hippocampus* **20**, 492-498 (2010).
155. Gallagher, H.C., Murphy, K.J., Foley, A.G. & Regan, C.M. Protein kinase C delta regulates neural cell adhesion molecule polysialylation state in the rat brain. *J Neurochem* **77**, 425-434 (2001).
156. Graff, J. & Mansuy, I.M. Epigenetic dysregulation in cognitive disorders. *Eur J Neurosci* **30**, 1-8 (2009).
157. Tsankova, N., Renthal, W., Kumar, A. & Nestler, E.J. Epigenetic regulation in psychiatric disorders. *Nat Rev Neurosci* **8**, 355-367 (2007).
158. Silingardi, D., Scali, M., Belluomini, G. & Pizzorusso, T. Epigenetic treatments of adult rats promote recovery from visual acuity deficits induced by long-term monocular deprivation. *Eur J Neurosci* **31**, 2185-2192 (2010).
159. Borrelli, E., Nestler, E.J., Allis, C.D. & Sassone-Corsi, P. Decoding the epigenetic language of neuronal plasticity. *Neuron* **60**, 961-974 (2008).
160. Fagiolini, M., Jensen, C.L. & Champagne, F.A. Epigenetic influences on brain development and plasticity. *Curr Opin Neurobiol* **19**, 207-212 (2009).
161. Sweatt, J.D. Experience-dependent epigenetic modifications in the central nervous system. *Biol Psychiatry* **65**, 191-197 (2009).
162. Bouzioukh, F., Tell, F., Rougon, G. & Jean, A. Dual effects of NMDA receptor activation on polysialylated neural cell adhesion molecule expression during brainstem postnatal development. *Eur J Neurosci* **14**, 1194-1202 (2001).

ANNEXE

ANNEXE



A.1 L'expression de PSA diminue au cours du développement post-natal.

(a) L'expression de PSA diminue peu après l'ouverture des yeux dans le cortex visuel des souris. À gauche, l'analyse d'un western blot utilisant des anticorps contre PSA (haut) et β -actine (bas) démontre que l'expression de PSA diminue peu de temps après l'ouverture des yeux (P14). La bande de PSA est large puisque NCAM, la protéine sur laquelle PSA est attaché, possède de multiples isoformes, caractérisés par des masses moléculaires différentes. Les poids moléculaires sont indiqués en kilodaltons, à gauche de la figure. La figure de droite représente la quantification du western blot. Pour chaque échantillon, PSA a d'abord été normalisé avec la β -actine. Les graphiques illustrent la valeur de la moyenne \pm écart-type de PSA; chaque âge est normalisé à P8 ($n=3$ pour chaque point). Ad : adulte, 8-10 semaines.

(b) L'expression de PSA diminue au cours du développement *in vitro* dans les cultures organotypiques de cerveau de souris et corrèle avec l'expression observée *in vivo*. À gauche, l'analyse d'un western blot utilisant des anticorps contre PSA (haut) et β -actine (bas) démontre que l'expression de PSA diminue au cours du développement et est indétectable dès EP24. La figure de droite démontre la quantification du western blot. Pour chaque échantillon, PSA a d'abord été normalisé avec la β -actine. Chaque barre de l'histogramme représente la valeur moyenne de PSA d'un $n=1$ pour chaque point, lequel contient 5-6 tranches de cerveau/échantillon. Chaque âge a été normalisé avec EP8. (Reproduit et adapté avec l'accord du Dr Graziella Di Cristo. Di Cristo *et al*, *Nat Neurosci* (2007))³⁴.

