

Université de Montréal

Mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans le développement des synapses  
GABAergiques périsonmatiques et dans la plasticité corticale : rôle de l'activité neuronale et  
de proBDNF/p75NTR

par  
Elie Baho

Département de Sciences Biomédicales  
Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté de Médecine  
en vue de l'obtention du grade de Ph. D.  
en Sciences Biomédicales  
option Générale

Juin, 2015 du dépôt de l'ouvrage

©, Elie Baho, 2015

## Résumé

Dans le cortex visuel des mammifères, une cellule à panier (BC) qui représente un sous-type majoritaire d'interneurones GABAergiques, innerve une centaine de neurones par une multitude de synapses localisées sur le soma et sur les dendrites proximales de chacune de ses cibles. De plus, ces cellules sont importantes pour la génération des rythmes gammas, qui régulent de nombreuses fonctions cognitives, et pour la régulation de la plasticité corticale. Bien que la fonction des BC au sein des réseaux corticaux est à l'étude, les mécanismes qui contrôlent le développement de leur arborisation complexe ainsi que de leurs nombreux contacts synaptiques n'ont pas été entièrement déterminés.

En utilisant les récepteurs allatostatines couplés aux protéines G de la drosophile (AlstR), nous démontrons *in vitro* que la réduction de l'excitation ainsi que la réduction de la libération des neurotransmetteurs par les BCs corticales individuelles des souris, diminuent le nombre de cellules innervées sans modifier le patron d'innervation périsomatique, durant et après la phase de prolifération des synapses périsomatiques. Inversement, lors de la suppression complète de la libération des neurotransmetteurs par les BCs individuelles avec l'utilisation de la chaîne légère de la toxine tétanus, nous observons des effets contraires selon le stade de développement. Les BCs exprimant TeNT-Lc pendant la phase de prolifération sont caractérisées par des arborisations axonales plus denses et un nombre accru de petits boutons homogènes autour des somas innervés. Toutefois, les cellules transfectées avec TeNT-Lc après la phase de la prolifération forment une innervation périsomatique avec moins de branchements terminaux d'axones et un nombre réduit de boutons avec une taille irrégulière autour des somas innervés. Nos résultats révèlent le rôle spécifique des niveaux de l'activité neuronale et de la neurotransmission dans l'établissement du territoire synaptique des cellules GABAergiques corticales.

Le facteur neurotrophique dérivé du cerveau (BDNF) est un modulateur puissant de la maturation activité-dépendante des synapses GABAergiques. Grâce à l'activation et à la signalisation de son récepteur tyrosine kinase B (TrkB), la liaison de mBDNF module fortement la prolifération des synapses périsomatiques GABAergiques formés par les BCs. Par



contre, le rôle du récepteur neurotrophique de faible affinité, p75NTR, dans le développement du territoire synaptique des cellules reste encore inconnu. Dans ce projet, nous démontrons que la suppression de p75NTR au niveau des BCs individuelles *in vitro* provenant de souris *p75NTR<sup>lox</sup>* induit la formation d'une innervation périsonomatique exubérante. BDNF est synthétisé sous une forme précurseur, proBDNF, qui est par la suite clivée par des enzymes, y compris la plasmine activée par tPA, pour produire une forme mature de BDNF (m)BDNF. mBDNF et proBDNF se lie avec une forte affinité à TrkB et p75NTR, respectivement. Nos résultats démontrent qu'un traitement des cultures organotypiques avec la forme résistante au clivage de proBDNF (mut-proBDNF) réduit fortement le territoire synaptique des BCs. Les cultures traitées avec le peptide PPACK, qui inactive tPA, ou avec tPA altèrent et favorisent respectivement la maturation de l'innervation synaptique des BCs. Nous démontrons aussi que l'innervation exubérante formée par les BCs *p75NTR<sup>-/-</sup>* n'est pas affectée par un traitement avec mut-proBDNF. L'ensemble de ces résultats suggère que l'activation de p75NTR via proBDNF régule négativement le territoire synaptique des BCs corticaux.

Nous avons ensuite examiné si mut-proBDNF affecte l'innervation périsonomatique formée par les BCs *in vivo*, chez la souris adulte. Nous avons constaté que les boutons GABAergiques périsonomatiques sont significativement diminués dans le cortex infusé avec mut-proBDNF par rapport à l'hémisphère non-infusé ou traité avec de la saline. En outre, la plasticité de la dominance oculaire (OD) est rétablie par ce traitement chez la souris adulte. Enfin, en utilisant des souris qui ne possèdent pas le récepteur p75NTR dans leurs BCs spécifiquement, nous avons démontré que l'activation de p75NTR via proBDNF est nécessaire pour induire la plasticité de la OD chez les souris adultes. L'ensemble de ces résultats démontre un rôle critique de l'activation de p75NTR dans la régulation et le maintien de la connectivité des circuits GABAergiques, qui commencent lors du développement postnatal précoce jusqu'à l'âge adulte. De plus, nous suggérons que l'activation contrôlée de p75NTR pourrait être un outil utile pour restaurer la plasticité dans le cortex adulte.

Mots clés: interneurons corticaux, cellules à panier, synapses GABAergiques, activité neuronale, proBDNF, p75NTR, plasticité de la dominance oculaire

## Abstract

Cortical GABAergic basket cells (BC) innervate hundreds of postsynaptic targets with synapses clustered around the soma and proximal dendrites. They are important for gamma oscillation generation, which in turn regulate many cognitive functions, and for the regulation of developmental cortical plasticity. Although the function of BC within cortical networks is being explored, the mechanisms that control the development of their extensive arborisation and synaptic contacts have not been entirely resolved.

By using the *Drosophila* allatostatin G-protein-coupled receptors (AlstR), we show that reducing excitation, and thus neurotransmitter release, in mouse cortical single BC in slice cultures decreases the number of innervated cells without changing the pattern of perisomatic innervation, both at the peak and after the proliferation phase of perisomatic synapse formation. Conversely, suppressing neurotransmitter release in single BCs by using the tetanus toxin light-chain can have completely opposite effects depending on the developmental stage. Basket cells expressing TeNT-Lc during the peak of the proliferation were characterized by denser axonal arbors and an increased number of smaller, homogenous boutons around the innervated somatas compared with control cells. However, after the peak of the synapse proliferation, TeNT-Lc transfected BCs formed perisomatic innervation with fewer terminal axon branches and fewer irregular-sized boutons around innervated somatas. Our results reveal a remarkably specific and age-dependent role of neural activity and neurotransmission levels in the establishment of the synaptic territory of cortical GABAergic cells.

Brain derived neurotrophic factor (BDNF) has been shown to be a strong modulator of activity-dependent-maturation of GABAergic synapses. Through the activation and signaling of their receptor Tropomyosin-related kinase B (TrkB), mBDNF binding strongly modulates the proliferation of GABAergic perisomatic synapses formed by BCs. Whether the low-affinity neurotrophin-receptor p75NTR also play a role in the development of basket cell synaptic territory is unknown. Here, we show that single-cell deletion of p75NTR in BCs in cortical organotypic cultures from *p75NTR<sup>lox</sup>* mice induce the formation of exuberant perisomatic innervations by the mutant basket cells, in a cell-autonomous fashion. BDNF is

synthesized as a precursor, proBDNF, which is cleaved by enzymes, including tPA-activated plasmin, to produce mature (m)BDNF. mBDNF and proBDNF bind with high-affinity to TrkB and p75NTR, respectively. Our results show that treating organotypic cultures with cleavage-resistant proBDNF (mut-proBDNF) strongly reduces the synaptic territory of BCs. Treating cultures with the tPA-inactivating peptide PPACK or with tPA impairs and promotes the maturation of BC synaptic innervations, respectively. We further show that the exuberant innervations formed by p75NTR<sup>-/-</sup> basket cells are not affected by mut-proBDNF treatment. All together, these results suggest that proBDNF-mediated p75NTR activation negatively regulates the synaptic territory of BCs.

We next examined if mut-proBDNF affects perisomatic innervation formed by BCs *in vivo*, in the adult mouse. We found that perisomatic GABAergic boutons are significantly decreased in the cortex infused with mut-proBDNF as compared to non-infused or saline-treated hemispheres. Further, ocular dominance (OD) plasticity is restored by this treatment in adult mice. Finally, we found that proBDNF-mediated activation of p75NTR is necessary to induce OD plasticity in the adult mice, by using mice that lack p75NTR specifically in BCs. All together, these results demonstrate a critical role of p75NTR activation in regulating and maintaining GABAergic circuit connectivity from early postnatal development to adulthood. Further, we suggest that controlled activation of p75NTR could be a useful tool to restore plasticity in adult cortex.

Key words: cortical interneurons, basket cells, GABAergic synapses, neuronal activity, proBDNF, p75NTR, ocular dominance plasticity

# Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	iii
Table des matières.....	v
Liste des figures.....	vii
Liste des abréviations .....	ix
Remerciements .....	xv
<b>1 : Introduction Générale.....</b>	<b>1</b>
<b>1 Réseau GABAergique du cortex cérébral.....</b>	<b>1</b>
1.1 Les interneurons inhibiteurs.....	1
1.2 Développement des circuits corticaux GABAergiques .....	2
1.3 Le rôle des types d'inhibition dans le développement des circuits corticaux.....	7
1.3.1 Les INs somatostatine-positifs .....	7
1.3.2 Les INs exprimant 5-HT <sub>3A</sub> R .....	8
1.3.3 Les INs parvalbumine-positifs .....	9
1.4 Plasticité corticale de la dominance oculaire (OD) .....	11
1.5 Rôle des interneurons GABAergiques dans la plasticité de l'OD .....	13
1.5.1 La modulation des mécanismes des périodes critiques de plasticité de la OD .....	13
1.5.2 La modulation des mécanismes d'inhibition corticale et de la fermeture des périodes critiques .....	17
1.6 Les altérations des périodes critiques et leurs effets sur le développement du cerveau .....	19
<b>2 Facteur Neurotrophique Dérivé du Cerveau, BDNF.....</b>	<b>22</b>
2.1 Transcription activité-dépendante de BDNF .....	24
2.2 Rôle de BDNF sur les synapses glutamatergiques .....	25
2.3 Régulation de BDNF .....	26
2.4 p75NTR .....	28
2.4.1 Le récepteur p75NTR et ses cascades anti-apoptotiques .....	29
2.4.2 Les cascades pro-apoptotiques de p75NTR et BDNF.....	31
2.5 Rôle de BDNF sur les interneurons GABAergiques .....	36
2.6 Rôle de BDNF sur la plasticité .....	37
2.7 Rôle de BDNF dans les maladies neurodéveloppementale .....	38
2.7.1 Dépression majeure .....	39
2.7.2 Trouble bipolaire .....	40
2.7.3 Schizophrénie .....	40
2.7.4 Anxiété .....	40
<b>3 Objectifs de recherche .....</b>	<b>41</b>
3.1 Contexte .....	41
3.2 Objectifs principaux.....	42
3.3 Objectifs spécifiques.....	42
<b>2 : Méthodologie.....</b>	<b>43</b>
1.1 Culture organotypique et transfection biolistique.....	43
1.2 Immunohistochimie et quantification .....	44
1.3 Acquisition et analyse des images .....	45
1.4 Implantation de la mini-pompe.....	46
1.5 Privation monoculaire et enregistrements électrophysiologiques <i>in vivo</i> .....	46

<b>3 : Neural Activity and Neurotransmission Regulate the Maturation of the Innervation Field of Cortical GABAergic Interneurons in an Age-Dependent Manner .....</b>	<b>48</b>
1.1 Abstract.....	49
1.2 Introduction.....	49
1.3 Materials and Methods .....	51
1.3.1 Cortical organotypic culture and biolistic transfection. ....	51
1.3.2 Analysis of basket cell innervation. ....	51
1.3.3 Immunostaining and pCREB quantification. ....	52
1.4 Results.....	53
1.5 Discussion.....	57
1.6 Acknowledgements.....	61
1.7 Figures .....	62
1.8 References.....	69
<b>4. p75NTR Activation in Cortical Basket Cells Regulates the Maturation of their Synaptic Fields and Promotes Ocular Dominance Plasticity in Adult Visual Cortex.....</b>	<b>71</b>
1.1 Abstract.....	72
1.2 Introduction.....	72
1.3 Material and Methods .....	73
1.3.1 Cortical organotypic culture and biolistic transfection .....	73
1.3.2 Analysis of basket cell innervation .....	74
1.3.3 Western Blots .....	75
1.3.4 Minipump implants .....	75
1.3.5 Immunostaining and quantification.....	75
1.3.6 Monocular Deprivation (MD) and <i>In Vivo</i> Electrophysiology .....	76
1.4 Results.....	77
1.5 Discussion.....	84
1.6 Acknowledgments .....	87
1.7 Figures .....	88
1.8 References.....	110
<b>5 : Discussion Générale.....</b>	<b>114</b>
1.1 Rôle de l'activité neuronale et de la relâche de neurotransmetteurs sur la formation du territoire d'innervation des BCs.....	114
1.2 Rôle de l'activation de p75NTR dans la formation du territoire synaptique des BCs .....	117
1.3 L'activité neuronale et p75NTR .....	121
1.4 proBDNF et la restauration de la plasticité corticale.....	122
1.5 La controverse entourant la sécrétion de proBDNF <i>in vivo</i> .....	125
1.6 proBDNF et son effet local sur les synapses GABAergiques .....	127
1.7 L'interaction de mBDNF/TrkB et NCAM dans le développement du territoire synaptique GABAergique.....	130
1.8 La signalisation proBDNF/p75NTR dans des conditions pathologiques .....	132
<b>6 : Conclusion .....</b>	<b>134</b>
<b>7 : Bibliographie.....</b>	<b>135</b>

# Liste des figures

## Chapitre 1 : Introduction Générale

Figure 1. Schéma illustrant les différents types d'interneurones GABAergiques dans le cortex et leurs actions inhibitrices sur les neurones pyramidaux.....	2
Figure 2. Les principaux interneurones corticaux majeurs et leurs origines développementales. ....	3
Figure 3. Le contrôle transcriptionnel de la migration des interneurones. ....	5
Figure 4. La maturation de l'innervation synaptique GABAergique d'une BC corticale dans le cortex post-natal est reproduite dans les cultures organotypiques.....	15
Figure 5. Schéma illustrant l'interaction des neurotrophines et pro-neurotrophines avec les récepteurs Trk et p75NTR. ....	23
Figure 6. La synthèse et le traitement de BDNF dans le système nerveux central.....	27
Figure 7. Les principales voies de signalisation des récepteurs Trk et p75NTR menant à des réponses anti-apoptotiques et pro-apoptotiques respectivement.....	29

## Chapitre 2 : Méthodologie

Figure 1. Les cellules à panier individuelles peuvent être visualisées à une résolution synaptique dans des cultures organotypiques corticales.....	44
---	----

## Chapitre 3 : Neural Activity and Neurotransmission Regulate the Maturation of the Innervation Field of Cortical GABAergic Interneurons in an Age-Dependent Manner

Figure 1. Activation of AlstR reduces activity-dependent increase of pCREB expression.....	62
Figure 2. Reducing basket cell excitability and suppressing neurotransmitter release have opposite effects during the peak of perisomatic synapse maturation. ....	64
Figure 3. Basket cell axon analysis suggests the occurrence of pruning after the peak of perisomatic synapse proliferation. ....	66
Figure 4. Suppressing neurotransmitter release after the peak of perisomatic synapse maturation induces a more severe loss of perisomatic innervations than reducing neural excitability.....	68

## Chapitre 4 : P75NTR Activation in Cortical Basket Cells Regulates the Maturation of their Synaptic Fields and Promotes Ocular Dominance Plasticity in Adult Visual Cortex

Figure 1. Pharmacological blockade of p75NTR induces the formation of exuberant perisomatic innervation.....	89
Figure 2. Cre-mediated inactivation of p75NTR in single BCs induces the formation of exuberant perisomatic innervation.....	90
Figure 3. mut-proBDNF mediated activation of p75NTR in BCs strongly impairs the formation of their synaptic innervation fields.....	91
Figure 4. Modulation of tPA activity affect the formation of BCs synaptic innervation fields. ....	93

Figure 5. proBDNF-mediated p75NTR activation in cortical BCs reduce perisomatic GABAergic innervations and restores ocular dominance plasticity in the adult visual cortex <i>in vivo</i> .....	96
Suppl Figure 1. p75NTR is expressed in PV-positive BCs .....	97
Suppl Figure 2. Cre-mediated inactivation of a single p75NTR allele in BCs is sufficient to promote the formation of exuberant perisomatic innervation.....	98
Suppl Figure 3. WT-proBDNF but not mut-proBDNF treatment increases pERK levels in cortical organotypic cultures.....	99
Suppl Figure 4. Treatment with mut-proBDNF is able to reduce basket cell innervation after the synaptic territory of basket cells has reached maturity.....	101
Suppl Figure 5. Treatment with the tPA inhibitor PPACK reduced BC synaptic innervation fields in cortical organotypic cultures.....	103
Suppl Figure 6. The effects of mut-proBDNF and PPACK on the establishment of BCs synaptic innervation fields are not additive.....	104
Suppl Figure 7. Cre-mediated inactivation of p75NTR in single BCs induces the formation of exuberant perisomatic innervation independently on the presence of mut-proBNDNF or PPACK.....	105
Suppl Figure 8. Mut-proBDNF-mediated p75NTR activation in visual cortex <i>in vivo</i> reduces the number of vGAT positive perisomatic puncta.....	107
Suppl. Figure 9. proBNDNF-mediated p75NTR activation in cortical BCs restores ocular dominance plasticity in adult visual cortex <i>in vivo</i> .....	109

## Chapitre 5 : Discussion Générale

Figure 1. Expérience préliminaire démontrant la faisabilité de l'imagerie en temps réel des BCs.....	129
--	-----

## Liste des abréviations

$\alpha$ CAMKII : protéine kinase II dépendante de l' $\alpha$ -calcium-calmoduline

AAV : virus adéno-associé

AIS : segment initial de l'axone

Akt : protéine kinase B

Alst : allatostatine

AlstR : récepteur allatostatine de la drosophile couplé aux protéines G

AMPA :  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-méthylisozazol-4-propionate

ANOVA : analyse de la variance (uni- ou bidirectionnelle)

AP : potentiel d'action

APP : protéine précurseur de l'amyloïde

ARMS : protéine membranaire riche en ankyrine

ARNm : acide ribonucléique messenger

AVC : accident vasculaire cérébral

BC : cellules à panier

BDNF : facteur neurotrophique dérivé du cerveau

bV1 : région binoculaire du cortex visuel primaire

CB : calbindine

chABC : chondroitinase-ABC

ChC : cellule en Chandelier

CGE : éminence ganglionnaire caudale

Cl<sup>-</sup> : chlore



CR : calrétinine

CSPG : protéoglycans de chondroïtines sulphates

DAG : diacylglycérol

DLPFC : cortex préfrontal dorsolatéral

DR : dark rearing

DS : syndrome de Down

ECM : matrice extracellulaire

$E_{GABA}$  : potentiel d'équilibre de GABA

EP : jour équivalent post-natal

ER : réticulum endoplasmique

FAIM : molécule inhibitrice d'apoptose Fas

FAK : kinase d'adhésion focale

GABA : acide  $\gamma$ -aminobutyrique

GAD : décarboxylase glutamique

GAT : transporteur de GABA

GDNF : facteur neurotrophique dérivé de lignées de cellules gliales

GFP : protéine fluorescente verte

HA : hémagglutinine

HFS : stimulation à haute fréquence

Hz : hertz

INs : interneurones

IP<sub>3</sub> : inositol-1, 4, 5- triphosphate

IPSC : potentiel post-synaptique inhibiteur

IRMf : imagerie par résonance magnétique fonctionnelle

K<sup>+</sup> : potassium

KCC : co-transporteur de potassium/chlore

kDa : kilodalton

KO : knock-out

LGE : éminence ganglionnaire latérale

LTD : dépression à long terme

LTP : potentialisation à long terme

MAIF : facteur inhibiteur associé à la myéline

MAPK : protéine kinase activée par les mitogènes

mBDNF : forme mature de BDNF

MC : cellule de Martinotti

MD : privation monoculaire

MeCP<sub>2</sub> : methyl CpG binding protein 2

Met : methionine

MGE : éminence ganglionnaire médiane

MMP : métalloprotéase

MPA : acide 3-mercaptopropionique

mut-proBDNF : forme mutante de proBDNF

mV1 : région monoculaire du cortex visuel primaire

NAA : n-acétyl aspartate

nAChR : récepteurs nicotiques à l'acétylcholine

NCAM : molécule d'adhésion cellulaire neurale

NeuN : antigène nucléaire neuronal  
NF186 : neurofascine 186  
NgC : neurogliaforme  
NGF : facteur de croissance nerveux  
NGS : normal goat serum  
NKCC1 : co-transporteur Na-K-Cl  
NMDA : acide N-méthyl-D-aspartique  
NogoR : récepteur Nogo  
NRIF : neurotrophin receptor interacting factor  
NSL : signal de localisation nucléaire  
NT : neurotrophine  
NYP : neuropeptide Y  
OD : dominance oculaire  
OTX2 : orthodenticle homeobox 2  
p75NTR : récepteur neurotrophique de nécrose tumorale  
P : jour postnatal  
PC1 : protéine proconvertase 1  
PI3K : kinase PI3k  
PKC : protéine kinase C  
PLC $\gamma$  : phospholipase C $\gamma$   
POA : région préoptique  
PNN : réseaux périneuronaux  
PPACK : Phe-Pro-Arg-Chloromethylketone

proBDNF : forme précurseur de proBDNF

PSA : acide polysialique

PTX : picrotoxine

PV : parvalbumine

Py : pyramidal

RGC : cellules ganglionnaires de la rétine

Rho-GDI : inhibiteur de la dissociation de guanine Rho

RT-PCR : réaction en chaîne par polymérase

Séma : sémaphorine

Shh : sonic hedgehog

SNC : système nerveux central

SNP : polymorphisme d'un seul nucléotide

SST : somatostatine

TeNT-Lc : chaîne légère de la toxine tétanique

TGN : réseau trans Golgi

TNF $\alpha$  : facteur de nécrose tumoral alpha

tPA : activateur tissulaire du plasminogène

Trk : récepteur tyrosine kinase

TTX : tétanotoxine

V1 : cortex visuel primaire

Val : valine

vGAT : transporteurs de vésicules GABAergiques

VIP : polypeptide intestinal vasoactive

WT : wild-type (sauvage)

Wt-proBDNF : forme wild-type de proBDNF

Y : tyrosine

## Remerciements

Firstly, I would like to express my sincere gratitude to Dr Graziella Di Cristo for the continuous support throughout my post-graduate studies, for her patience, motivation and immense knowledge. Thank you for always identifying my strengths and skills and for always finding ways to motivate me in order to push myself further and to achieve more. I am proud to be her first PhD graduate and I foresee a lot of success and great accomplishments in her career.

I would also like to thank the rest of my thesis committee: Dr Di Polo, Dr Rossignol, Dr McKinney & Dr Samaha for their insightful constructive input and feedback.

To all my lab members who were part of this journey, I would like to thank you for all your support and for making the lab a fun and enjoyable place. After all these years, we truly became a family and I greatly value your friendship, it will never be forgotten.

To my family, thank you for constantly believing in me and for always encouraging me to follow my dreams.

To my dear wife, thank you for your valuable help, support and unconditional encouragement during this adventure. You were always there for me when I needed you the most. I am very proud to have you as my wife and you should be very proud of yourself because this PhD also belongs to you.

This thesis is only the beginning of my journey and I cannot wait to use my education and accomplish all my goals!

Elie Baho

*"If you're going through hell, keep going."  
"Never, never, never give up!"*

*- Winston Churchill*

# **1 : Introduction Générale**

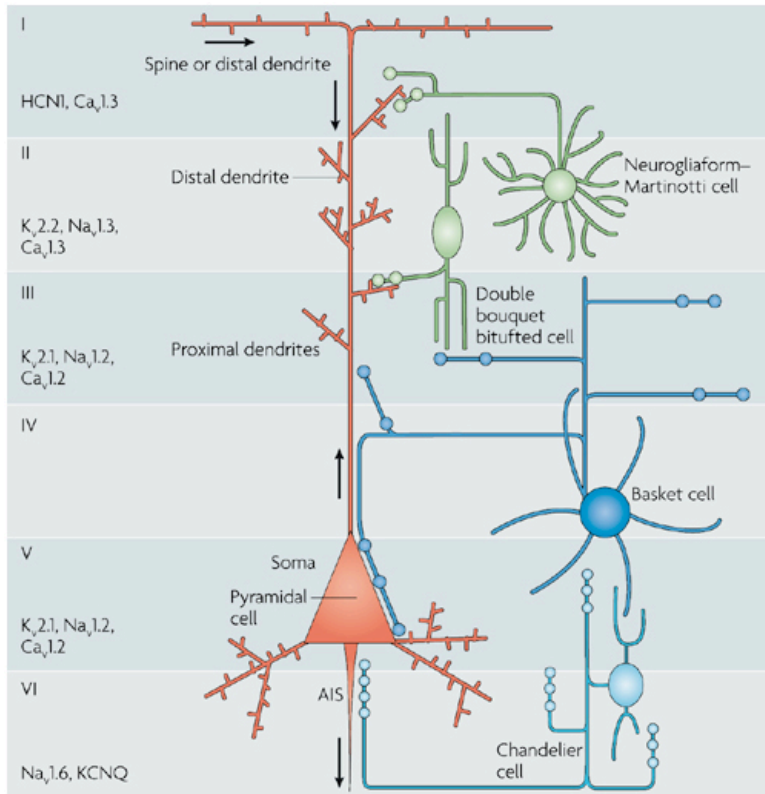
## **1 Réseau GABAergique du cortex cérébral**

### **1.1 Les interneurons inhibiteurs**

La maturation et le fonctionnement des réseaux corticaux dépendent de l'interaction complexe entre deux classes de neurones: soit les neurones excitateurs glutamatergiques et les interneurons (INs) inhibiteurs GABAergiques. Les INs coordonnent les communications intercellulaires et la modulation des fonctions corticales via la relâche de leur neurotransmetteur, l'acide  $\gamma$ -aminobutyrique (GABA), et des neuropeptides. Ils modulent les réponses des cellules pyramidales, raffinent les champs réceptifs corticaux et sont impliqués dans la génération ainsi que la synchronisation des rythmes exprimés en oscillations corticales<sup>1</sup>. Par conséquent, une perturbation des fonctions GABAergiques a été associée à plusieurs maladies neurodéveloppementales comme l'épilepsie, le retard mental, l'autisme et la schizophrénie<sup>2,3</sup>.

Le cortex du mammifère est une structure laminaire composée de six couches. Chaque couche contient des cellules pyramidales, qui représentent environ 75% de tous les neurones du cortex adulte, et des INs GABAergiques, qui représentent une population minoritaire de 20-30%. Ces cellules inhibitrices GABAergiques établissent des connections locales et, à leur stade mature, produisent des protéines qui se lient au calcium comme la parvalbumine (PV), la calbindine (CB) et la calrétinine (CR). Elles produisent aussi des neuropeptides incluant la somatostatine (SST), le polypeptide intestinale vasoactif (VIP) et le neuropeptide Y (NPY)<sup>4,5</sup>. Les INs GABAergiques sont vastement hétérogènes: ils se distinguent par leur morphologie axonale et dendritique, leurs marqueurs biochimiques, de même que par leur connectivité et leur physiologie. En utilisant les techniques suivantes, soit l'enregistrement intracellulaire, le RT-PCR de cellule individuelle et l'immunomarquage de neuropeptides et de protéines liantes au calcium, diverses études ont démontré que plusieurs groupes d'INs morphologiquement différents ont des patrons de décharge uniques et expriment des marqueurs distincts<sup>6</sup>. Afin de

bien comprendre leur diversité, il faut avant tout bien définir les cascades génétiques qui régulent leur développement cortical et leurs fonctions dans le développement de la circuiterie corticale.



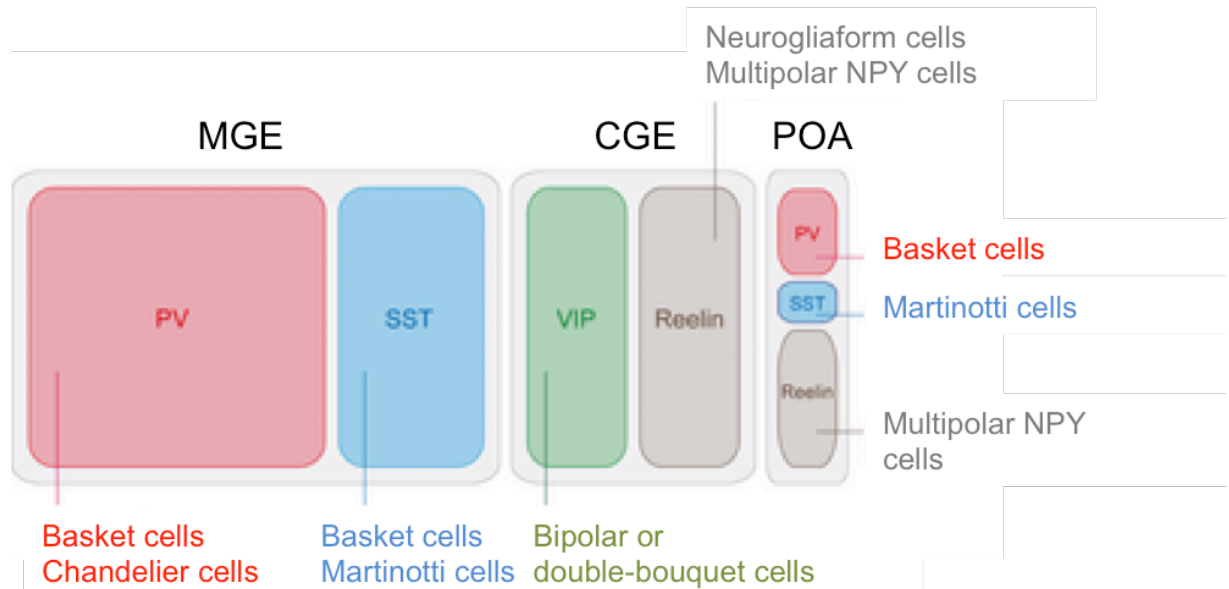
**Figure 1. Schéma illustrant les différents types d'interneurones GABAergiques dans le cortex et leurs actions inhibitrices sur les neurones pyramidaux (Tiré de Huang, Z.J. et al., 2007)<sup>7</sup>.**

## 1.2 Développement des circuits corticaux GABAergiques

La majorité des types d'INs inhibiteurs caractérisés naissent dans le télencéphale ventral, une région composée de zones morphologiques distinctes, soit les zones latérale (LGE), caudale (CGE) et médiane (MGE)<sup>8</sup>. Récemment, des études *in utero* ont démontré que des INs peuvent provenir de la région préoptique (POA) et migrer jusqu'au cortex et l'hippocampe<sup>9</sup>. Le MGE est la source primaire d'INs corticaux. Elle produit approximativement 70-80% des INs corticaux, incluant ceux exprimant la PV et ceux exprimant la SST, qui représentent respectivement environ 40% et 30% de tous les INs du cortex. Le CGE donne naissance à des



INs localisés dans les couches superficielles et ceux-ci représentent 30% des INs qui restent. Les INs du CGE expriment le récepteur ionotropique sérotoninergique 5-HT<sub>3A</sub><sup>10</sup>. Ce groupe contient des INs exprimant la rééline, la VIP et la CR.



**Figure 2. Les principaux interneurons corticaux majeurs et leurs origines développementales (Tiré de Marin, O, 2013)<sup>11</sup>.**

La plupart des interneurons PV et SST sont produits dans le MGE avec un petit pourcentage de ces interneurons qui sont générées dans la POA. Cependant, les INs exprimant la rééline, la VIP et la CR sont générés dans le CGE.

L'identification des INs à leur naissance est régulée par le chevauchement de l'expression des facteurs de transcription spécifiques, qui sont coordonnés de façon spatiale et temporelle. Le destin initial de la lignée GABAergique est déterminé par l'activité des facteurs de transcription *Dlx1/2* et *Dlx5/6*. Ces gènes homeobox *Dlx* sont essentiels pour la génération, la spécification et la migration de tous les INs corticaux<sup>12</sup>. De plus, l'expression de ces facteurs est contrôlé par le gène proneural *Mash1*<sup>13</sup>. Ces gènes sont largement exprimés dans les zones subventriculaires subpallial des éminences ganglionnaires. Des souris knock-out (KO) pour les gènes *Dlx1/2* ou *Mash1* possèdent des INs incapables de migrer hors des éminences ganglionnaires<sup>13,14</sup>. Cela cause une réduction significative d'interneurons corticaux et du bulbe olfactif ainsi qu'une différenciation striatal anormale<sup>15</sup>.

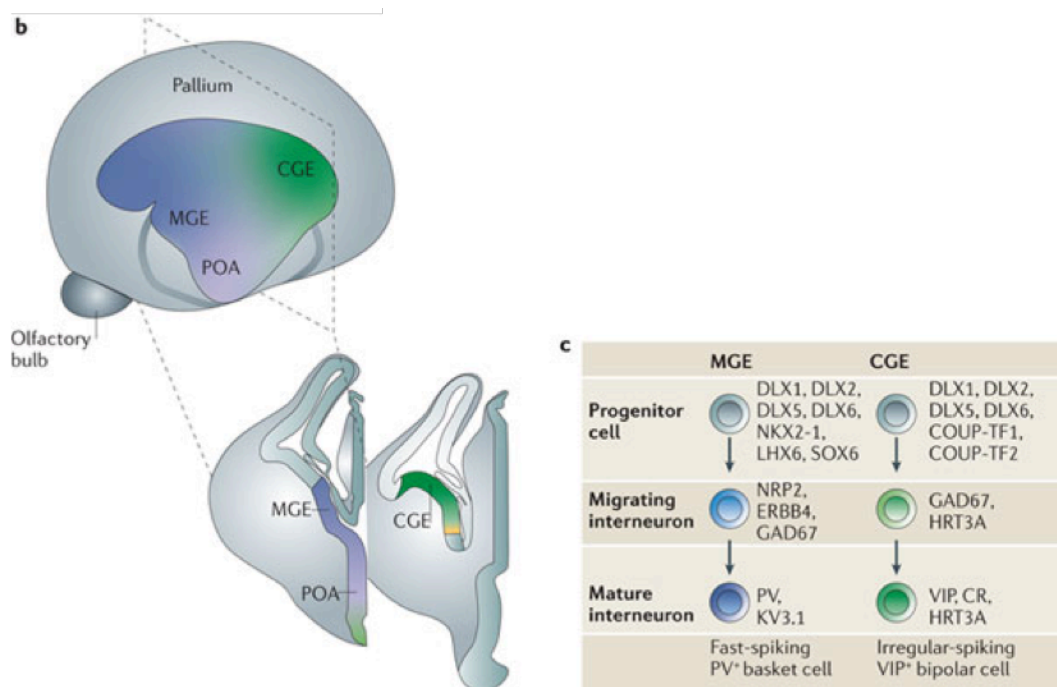
Les INs PV-positifs sont produits dans la région ventrale du MGE et leur développement

dépend de l'activité du facteur de transcription *Lhx6*, qui est contrôlé par *Nkx2.1* dans cette même région<sup>16</sup>. Des souris avec une perte de fonction du gène *Nkx2.1* ont des déficits de migration tangentielle et leur nombre de cellules GABAergiques, exprimant la PV et SST, est réduit d'environ 50% dans le néocortex prénatal<sup>17</sup>. Récemment, un facteur de transcription en aval de *Lhx6*, nommé *Sox6*, a été découvert. Ce dernier est requis pour une distribution laminaire adéquate et pour la maturation des INs dérivés du MGE<sup>18</sup>. Des études récentes ont démontré que la totalité ou la plupart des cellules en Chandeliers (ChC) sont aussi originaires du MGE. Ces cellules sont principalement générées par la région la plus ventrale du MGE et ce, durant les dernières étapes de la neurogenèse corticale<sup>19</sup>. Sous le contrôle de ces mêmes facteurs de transcription ainsi que de *Nkx6-2*, *Gli1* et *CoupTF1/2*, la région dorsale du MGE est spécialisée dans la génération des INs SST<sup>3</sup>. De plus, la prolifération des cellules provenant des régions ventrale et dorsale du MGE est régulée par la voie de signalisation Wnt, qui est dépendante de la  $\beta$ -caténine<sup>20</sup>. Leur prolifération est aussi influencée par le gradient d'expression du sonic hedgehog (Shh), qui présente une diminution graduelle de son expression de la partie dorsale du MGE vers la partie ventrale<sup>21</sup>. En revanche, les INs corticaux du CGE sont générés indépendamment de *Lhx6*, car ce dernier n'est pas exprimé dans le CGE<sup>22</sup>. Cette lignée d'interneurones est régulée par les facteurs de transcription *Gsx2*, *Nkx6.2* et *CoupTF1/2*, qui sont largement exprimés dans cette région<sup>23,24</sup>.

Comme mentionné précédemment, les interneurones corticaux et hippocampiques proviennent principalement des MGE et CGE. Cependant la 3<sup>ème</sup> région principale de l'éminence ganglionnaire, la LGE, est le générateur principal des interneurones GABAergiques du striatum et du prosencéphal basal<sup>23</sup>. Finalement, la région préoptique génère des INs contenant la NPY, incluant les cellules neurogliaformes (NgC), sous le contrôle du facteur de transcription *Nkx5.1*<sup>9,25</sup>. Bref, à travers les éminences ganglionnaires, le chevauchement fonctionnel et spatial des niveaux d'expression et du gradient des différents facteurs de transcriptions sembleraient jouer un rôle essentiel dans la détermination des lignées de différents types d'INs corticaux.

Suite à leur naissance dans les éminences ganglionnaires, les INs se rendent jusqu'à leur destination finale dans le cortex. Avec une précision remarquable, ils suivent des routes tangentielles tout au long des régions corticales marginales, subventriculaires ou intermédiaires. Par la suite, ils migrent dans la plaque corticale avec une direction radiale<sup>26</sup>.

Cette progression précise est régulée par un nombre de signaux qui, d'une manière coordonnée, attirent ou repoussent cette migration. Les sémaphorines (Sema 3A et 3F) représentent un groupe de signalisation, exprimés dans le LGE, qui inhibent l'entrée des INs en migration dans cette région<sup>27</sup>. Ainsi, un KO des protéines *Slit* et de leur récepteur *Robo*, exprimés dans les régions ventriculaires et subventriculaires, affecte la morphologie et la localisation des INs exprimant la CB<sup>28</sup>. De plus, les récepteurs d'éphrines, EphA5/A4, sont des facteurs chimio-répulsifs pour les neurones dérivés du MGE<sup>29</sup>. Par ailleurs, la migration est fortement renforcée par les neurotrophines (BDNF/NT-4) et les facteurs neurotrophiques dérivés des cellules gliales (GDNF)<sup>30,31</sup>. L'effet du glutamate sur les récepteurs AMPA influence aussi la migration, car les cellules les plus avancées lors de la migration tangentielle répondent à des concentrations d'agonistes plus faibles par rapport à celles qui se trouvent derrière elles<sup>32</sup>.



**Figure 3. Le contrôle transcriptionnel de la migration des interneurons (Tiré de Marin, O, 2012)<sup>33</sup>.**

Les INs sont bien décrits à l'état progéniteur ou peu après être devenus postmitotiques. Ce processus est contrôlé par un ensemble de facteurs de transcription qui régulent l'expression des protéines effectrices. Ces dernières caractérisent chaque classe d'interneurones. Le schéma

illustre certains de ces facteurs de transcription et des protéines effectrices, qui définissent l'identité des deux principales classes d'interneurones durant différents stades de différenciation.

L'entrée corticale des INs précurseurs du MGE est renforcée par l'activation des récepteurs GABA<sub>A</sub>. Ces cellules démontrent une sensibilité accrue envers GABA lorsqu'elles s'approchent du cortex. En parallèle, les niveaux d'expression des sous-unités  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 5$ ,  $\beta 2$  et  $\beta 3$  des récepteurs GABA<sub>A</sub> augmentent<sup>34</sup>. Une motilité amplifiée des INs dépend de la dépolarisation causée par GABA<sub>A</sub> et l'activation des canaux calciques de type-L<sup>35</sup>. Les récepteurs GABA sont aussi exprimés dans les nouveaux neurones pyramidaux, qui reçoivent des signaux GABAergiques avant de pouvoir former des synapses excitatrices. GABA est un excitateur dans les neurones immatures en raison du niveau élevé de l'expression du co-transporteur Na-K-Cl (NKCC1). NKCC1 augmente la concentration intracellulaire du chlore (Cl<sup>-</sup>). Le potentiel d'équilibre de GABA ( $E_{GABA}$ ) devient donc plus dépolarisé<sup>36</sup>. Ceci conduit à la sortie du Cl<sup>-</sup> lors de l'activation des récepteurs GABA<sub>A</sub> et la dépolarisation de la membrane cellulaire. L'homéostasie de l'ion Cl<sup>-</sup> est principalement contrôlée par deux co-transporteurs, soit NKCC1 et Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup> (KCC2)<sup>37</sup>. Avec le temps, l'augmentation de l'expression du KCC2 réduit la concentration du chlore intracellulaire et termine l'action dépolarisante<sup>35</sup>. Le changement développemental de  $E_{GABA}$  favorise maintenant un effet inhibiteur de GABA sur les neurones matures causant une hyperpolarisation du potentiel membranaire.

Ce changement développemental de  $E_{GABA}$  est important pour le contrôle de la migration, de la position finale et de la maturation morphologique des interneurones<sup>38</sup>. Les INs dérivés de la MGE atteignent leur couche finale plus tôt que les interneurones de la CGE<sup>39</sup>. Ceci peut être expliqué par l'expression plus précoce de KCC2 chez les INs dérivés de la MGE<sup>39</sup>. KCC2 pourrait donc potentiellement réguler les différences observées dans la distribution laminaire des INs avec des origines différentes. Malheureusement, la relation entre KCC2 et la formation de synapses GABAergiques n'est pas encore bien caractérisée. Pour une meilleure compréhension, il suffirait de bien définir le rôle de l'équilibre entre KCC2/NKCC1 dans la formation des synapses GABAergiques. De plus, une dépolarisation médiée par GABA peut promouvoir la formation de synapses excitatrices par l'activation des récepteurs NMDA des cellules pyramidales<sup>40</sup>. Un KO *in utero* ou un antagoniste de NKCC1

réduit le nombre de synapses excitatrices fonctionnelles et modifie la morphologie cellulaire des neurones excitateurs<sup>41</sup>. Ce phénotype altéré est aussi observé lorsque KCC2 est surexprimé prématurément dans les cellules pyramidales<sup>1</sup>.

En résumé, un grand nombre de facteurs peut affecter la migration et la fonction des INs GABAergiques corticaux. Ces facteurs influencent directement la diversité et l'inhibition que les INs apportent aux activités et aux réseaux corticaux en développement<sup>42</sup>. Lors du développement, une dysfonction des différents types d'INs GABAergiques pourrait donc affecter la synaptogenèse et les réseaux initiaux d'activités<sup>43-45</sup>. De plus, GABA joue un rôle fondamental au niveau des différents stages du développement neuronal, influençant la maturation, la migration des INs et la formation de synapses excitatrices et inhibitrices<sup>46</sup>. Cependant, plusieurs facteurs intrinsèques et extrinsèques affectent la grande diversité du GABA dans le néocortex et son fonctionnement dans la circuiterie corticale. De plus, des différentes classes d'INs GABAergiques peuvent modifier l'activité des réseaux corticaux via différents types d'inhibition, soit « feedforward » ou « feedback ».

### **1.3 Le rôle des types d'inhibition dans le développement des circuits corticaux**

L'inhibition GABAergique module la réponse des neurones corticaux et restreint l'excitation. Le contrôle de l'inhibition est effectué par des types d'interneurones qui influencent cette inhibition à travers des circuiteries « feedforward » et « feedback ». Ainsi, la compréhension de la diversité des INs corticaux est essentielle pour comprendre l'émergence et le fonctionnement des réseaux corticaux. Donc, pour déterminer les différents types d'inhibition dans le cortex, il faudrait caractériser les types d'INs GABAergiques inhibiteurs selon leurs propriétés électrophysiologiques de décharge et leur impact inhibiteur sur la circuiterie corticale.

#### **1.3.1 Les INs somatostatine-positifs**

Les cellules de Martinotti (MC) se retrouvent principalement dans les couches II-V, ainsi que dans la couche VI de façon moins abondante. Elles expriment la SOM et représentent environ 15% de la population d'INs. Parmi les INs, l'arborisation dendritique des

MC est la plus extensive et leurs axones sont projetés verticalement vers la couche I, où ils forment un regroupement d'axones collatéraux. La majorité de leurs synapses est localisée sur les dendrites des cellules pyramidales<sup>47</sup>. Fonctionnellement, les MC sont des neurones possédant une décharge régulière avec un seuil de potentiel d'action bas, un potentiel membranaire de repos élevé et une après-hyperpolarisation proéminente<sup>48</sup>. Les MC sont responsables d'une inhibition disynaptique entre les cellules pyramidales interconnectées ainsi que d'une inhibition « feedback » sur les cellules excitatrices de la couche V. Les cellules pyramidales de la couche V sont les efférences principales du néocortex, se projetant vers plusieurs régions du cerveau incluant le tectum, le striatum et la moelle épinière. Les portions distales de leurs dendrites apicales résident dans la couche I, et sont ciblées par des afférences thalamiques<sup>49</sup>. Une décharge à haute fréquence d'une cellule pyramidale présynaptique facilite l'activation des MC, qui projettent leurs axones vers une population de cellules pyramidales. Ceci se fait par l'inhibition préférentielle des dendrites apicales des cellules excitatrices dans la couche I. De plus, il est fort probable que les MC inhibent aussi les mêmes cellules présynaptiques qui ont initié leur activation<sup>50</sup>. Ces cellules sont donc importantes dans le contrôle de l'excitabilité excessive et récurrente des cellules pyramidales dans les circuits corticaux.

### **1.3.2 Les INs exprimant 5-HT-<sub>3A</sub>R**

Dans le cortex mature, les cellules exprimant le 5-HT-<sub>3A</sub>R sont denses dans les couches superficielles et constituent un groupe majeur d'INs. Les INs exprimant le VIP représentent 40% des cellules du CGE et ces cellules sont enrichies dans les couches II/III. Les cellules « bi-tufed », qui ont des dendrites primaires émergeant des pôles supérieurs et inférieurs du soma, expriment souvent la CR et sont les plus abondantes. Elles présentent un patron de décharge irrégulier et projettent ses axones verticalement vers les couches corticales voisines, qui sont plus profondes. De plus, elles ciblent et inhibent les dendrites des cellules cibles<sup>47,51</sup>. Par ailleurs, les cellules bipolaires étendent leurs projections vers les couches I et VI. Elles possèdent un patron de décharge d'adaptation rapide et elles contactent des dendrites et des somas de quelques cellules pyramidales<sup>52</sup>. Toutefois, plusieurs groupes ont démontré que ces cellules ciblent et contactent préférentiellement les INs. La fonction exacte des INs VIP dans

les réseaux corticaux n'est pas entièrement comprise. Récemment, le groupe de M.P. Stryker a ciblé et visualisé génétiquement les neurones GABAergiques VIP-positifs pour démontrer que dans le V1 de la souris, l'activité de ces derniers est fortement corrélée avec la locomotion, même en absence de stimulation visuelle<sup>53</sup>. Cette stimulation visuelle, qui active plusieurs autres types de neurones, n'a pas augmenté l'activation des neurones VIP durant la locomotion. Une approche similaire a aussi constaté que les neurones SST sont inhibés par la locomotion. Ceci suggère que le circuit, dans lequel les cellules VIP augmentent l'activité des cellules excitatrices voisines, inhibe leur afférence inhibitrice provenant des cellules SST<sup>54</sup>.

Les cellules neurogliaformes (NgC) sont des petites cellules qui expriment la réeline et elles sont abondantes dans la couche superficielle I. Les NgC ont une position précise parmi les INs, car elles établissent des synapses électriques non seulement entre elles, mais aussi avec d'autres classes d'INs comme les cellules à panier (BCs) et les ChC<sup>55</sup>. Ces cellules GABAergiques forment surtout des synapses inhibitrices sur les dendrites de leurs cellules cibles. Fonctionnellement, ce sont des cellules qui déchargent tardivement suite à des dépolarisations soutenues<sup>10</sup>. Elles peuvent causer des événements inhibiteurs de longues durées sur des cellules pyramidales et sur d'autres INs en activant les récepteurs GABA<sub>A</sub> et GABA<sub>B</sub><sup>56</sup>.

Finalement, quelques études ont démontré que des INs non-pyramidaux à décharge régulière reçoivent des contacts synaptiques directs provenant des neurones thalamiques. Le sous-type de ces cellules n'est pas caractérisé, mais il est fort probable qu'une portion des cellules 5-HT-<sub>3A</sub>R fait partie de ces INs. Malgré la faiblesse des entrées monosynaptiques provenant du thalamus jusqu'aux INs 5-HT-<sub>3A</sub>R, ces entrées peuvent causer une forte dépolarisation d'une partie de ces neurones, similaire aux BCs<sup>10</sup>. Les INs 5-HT-<sub>3A</sub>R peuvent donc contribuer à l'inhibition « feedforward ».

### **1.3.3 Les INs parvalbumine-positifs**

La majorité des cellules PV-positives est constituée de cellules à panier (BCs) avec une population moins abondante de cellules à Chandelier (ChC). Les ChC représentent un type d'INs sans épines avec un arrangement unique de terminaisons axonales. Elles sont retrouvées dans toutes les couches corticales, mais sont plus abondantes dans les couches II et III. Leurs

axones possèdent des branchements extensifs qui forment de courtes colonnes parsemées de boutons<sup>57</sup>. Bien que décrites à l'origine dans le néocortex, les ChCs sont également retrouvées dans différentes régions de l'hippocampe (CA3, CA3, gyrus denté) et de l'amygdale<sup>58,59</sup>. Ces boutons innervent précisément le segment initial de l'axone (axon initial segment; AIS) des cellules pyramidales sur lesquelles ils forment des synapses inhibitrices symétriques<sup>60</sup>. Tout comme les cellules PV, suite à une stimulation, les ChC génèrent de courts trains de potentiels d'action et ont la capacité de maintenir des taux de décharge à haute fréquence<sup>61</sup>. Plusieurs groupes de recherches ont constaté que la densité et la distribution des terminaisons axonales des ChCs ne sont pas homogènes dans les différentes régions du cortex<sup>19,62</sup>. La plus faible densité de ces cellules est retrouvée dans le cortex visuel alors qu'il y a une densité élevée dans le cortex frontal et le gyrus cingulaire. À cause de leur nature inhibitrice, de leur distribution dans la majorité des couches corticales et de leur contact avec l'AIS des cellules pyramidales, qui est une région stratégique où les potentiels d'action sont générés, les ChC sont considérées comme des neurones inhibiteurs efficaces dans le cortex.

Les BCs représentent 50% des cellules GABAergiques chez les rongeurs. Elles forment des synapses sur les corps cellulaires et les dendrites proximales des cellules glutamatergiques et d'autres cellules PV. Cette innervation sélective a été étudiée et observée dans le cervelet, où ces interneurons innervent l'AIS des cellules de Purkinje. Ceci démontre que dans le cervelet, les BCs ciblent exclusivement l'AIS et non les somas et les dendrites. Les axones des BCs sont les premiers à entrer en contact avec le corps cellulaire des cellules de Purkinje et se déplacent directement à l'AIS. Lorsqu'ils atteignent l'AIS, ces axones forment plusieurs branchements terminaux qui établissent des synapses spécialisées. La direction précise de la croissance axonale des BCs suggère la présence d'indices d'orientation sur la surface des cellules de Purkinje. De plus, l'implication particulière de la protéine du cytosquelette, l'ankirine G, et de la neurofascine 186 (NF186) ont été démontrées récemment. Dans le cortex et l'hippocampe, les BCs ciblent et innervent les somas et les dendrites proximales, mais les mécanismes moléculaires qui sous-tendent le ciblage cellulaire des signaux GABAergiques dans le néocortex sont encore mal compris. Plusieurs études suggèrent que la densité et la force de l'innervation GABAergique sont fortement régulées par l'expérience et l'activité neuronale. Bref, parmi plusieurs facteurs, BDNF, la molécule d'adhésion cellulaire (NCAM) et GABA sont tous critiques pour la maturation de l'innervation GABAergique corticale<sup>63-66</sup>.



Les BCs expriment typiquement la PV, la CB et plusieurs neuropeptides. La majorité des BCs appartient à la catégorie des cellules à haute décharge, ce qui signifie qu'elles peuvent décharger jusqu'à 200Hz<sup>6,67</sup>. Ces cellules sont mutuellement interconnectées par des synapses chimiques et électriques, et sont importantes dans la génération des oscillations gammas (~30-80Hz)<sup>68,69</sup>. Ces cellules manifestent une faible résistance d'entrée reflétant une faible ouverture des canaux membranaires. Elles génèrent des potentiels d'action de courte durée avec une grande hyperpolarisation. Elles sont donc capables de soutenir des taux de décharge de haute fréquence. L'utilisation des techniques optogénétiques a démontré que l'inhibition des BCs, exprimant la halorhodospine, supprime les oscillations gamma<sup>70</sup>. Aussi, une inhibition périsonotique par des BCs a un effet régulateur sur la synchronisation des neurones pyramidaux<sup>71</sup>.

Les BCs reçoivent directement des projections thalamocorticales excitatrices dans le cortex et forment des groupements de contacts synaptiques autour des somas pyramidaux, en contrôlant rapidement leur excitabilité. Ainsi, ces INs sont bien positionnés pour provoquer une inhibition directe « feedforward » forte et rapide des cellules excitatrices pyramidales. Par conséquent, les BCs modulent la réponse corticale en contrôlant l'excitation émise par les cellules pyramidales, qui reçoivent à leur tour des excitations thalamiques<sup>3,72</sup>. Le mécanisme qui contrôle l'activation neuronale sélective des BCs est basé sur les entrées thalamiques, qui sont plus puissantes et plus fréquentes sur les BCs comparativement aux cellules pyramidales<sup>73</sup>. Ce mécanisme déclenche cette inhibition « feedforward ».

#### **1.4 Plasticité corticale de la dominance oculaire (OD)**

La plasticité neuronale se caractérise par les changements qui se produisent dans l'organisation fonctionnelle et anatomique du cerveau suite à l'expérience. Chaque opération du système nerveux mature, comme la perception des afférences sensorielles et le contrôle des efférences motrices, dépend de l'activation et de l'interconnection de millions de neurones. Une telle connexion définie est largement contrôlée par des programmes moléculaires qui sont génétiquement déterminés. Cependant, le nombre final de synapses entre les neurones présynaptiques et leurs cibles post-synaptiques dépend de l'activité neuronale, soit spontanée ou évoquée par des expériences contrôlées par le système sensoriel. Au début de la vie post-

natale, il existe des périodes appelées critiques, durant lesquelles les circuits neuronaux possèdent une sensibilité accrue à des stimuli environnants. Ces circuits sont fortement modulés par l'expérience<sup>74</sup>. Les périodes critiques existent chez toutes les espèces étudiées et le niveau élevé de plasticité observée durant ces périodes critiques est essentiel pour le bon développement des systèmes sensoriels et cognitifs<sup>75</sup>.

Les périodes critiques de plasticité et l'efficacité de l'expérience dans l'induction des changements structuraux et fonctionnels durant cette période spécifique post-natale est un phénomène faisant l'objet d'études multiples. Depuis un certain temps, les facteurs déterminant l'ouverture et la fermeture de cette période critique sont recherchés. La compréhension complète des mécanismes qui limitent cette plasticité durant les phases initiales de la vie pourrait donner naissance à des voies thérapeutiques et de réhabilitation permettant le rétablissement suite à une blessure du système nerveux ou même à une amélioration de l'apprentissage et de la mémoire chez l'adulte.

Plusieurs études qui utilisent le système visuel comme modèle de plasticité ont clarifié ces questions en indiquant que le cerveau humain n'est pas composé de réseaux neuronaux rigides et qu'il possède la capacité d'être malléable. Des traitements spécifiques peuvent donc rétablir, à un certain niveau, la plasticité bien au-delà de la fermeture de la période critique dans le système visuel<sup>75,76</sup>. Les mécanismes cellulaires et moléculaires qui modulent l'ouverture et la fermeture des périodes critiques de plasticité démontreront l'effet essentiel de ces périodes lors du développement normal du cerveau.

Même si les périodes critiques sont observées dans les régions sensorielles, motrices et auditives du cerveau, une grande partie de notre connaissance sur les mécanismes cellulaires et moléculaires déterminant le début, le maintien et la fermeture de ces périodes provient des études effectuées sur le système visuel. Le cortex visuel primaire (V1) reçoit des signaux qui transmettent l'information des deux yeux. Les neurones V1 ont une préférence pour les signaux provenant d'un des deux yeux. Cette propriété est appelée la dominance oculaire (OD)<sup>77</sup>. La OD peut changer durant le développement lorsque le signal d'un œil est moins fiable que celui de l'autre. Ceci peut être causé par un mauvais alignement des yeux ou lorsqu'un œil est fermé lors des conditions expérimentales (privation monoculaire; MD)<sup>78</sup>. Durant la période critique post-natale, ce phénomène initie une cascade d'évènements qui mènent à une réorganisation synaptique des circuits neuronaux dans le V1. Ceci donne lieu à

une réduction irréversible de la capacité de l'œil fermé d'acheminer des réponses neuronales vers le cortex. De plus, il y a une augmentation rapide du nombre de neurones réactifs à des stimuli présentés à l'œil ouvert<sup>79,80</sup>. Durant la période critique, la MD cause une perte de l'acuité visuelle de l'œil fermé. Par ailleurs, la plasticité de la OD a une période de sensibilité bien définie et se produit durant la 4<sup>ème</sup> et 5<sup>ème</sup> semaine post-natale chez le rongeur<sup>81</sup>. Alors, chez la souris adulte, la fermeture d'un œil n'amène pas de changement dans la réponse des neurones V1. Cependant, plusieurs études ont démontré que le cortex visuel de la souris reste malléable même après la 5<sup>ème</sup> semaine post-natale (P35) lorsque la MD est prolongée.

## **1.5 Rôle des interneurons GABAergiques dans la plasticité de l'OD**

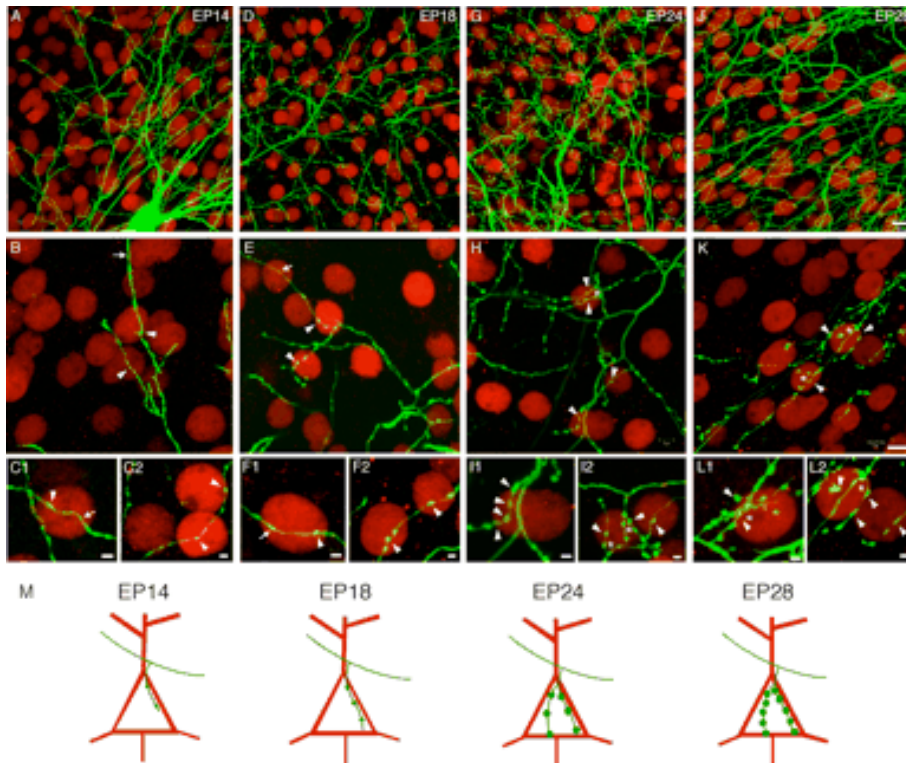
### **1.5.1 La modulation des mécanismes des périodes critiques de plasticité de la OD**

Un phénomène clé impliqué dans la période critique de plasticité est le développement de la circuiterie inhibitrice. L'étude initiale démontrant l'implication du système inhibiteur dans la période critique révéla l'abolition de la plasticité de la OD chez les souris transgéniques *GAD65<sup>-/-</sup>*. Ces dernières n'avaient pas l'isoforme de l'acide décarboxylase glutamique (GAD65), qui est responsable de la synthèse d'environ 10% de GABA basal et de la synthèse de GABA lors des activités à hautes fréquences. Cependant, cette plasticité était rétabli lorsque les souris étaient traitées avec la benzodiazépine, soit l'agoniste du récepteur GABA<sub>A</sub>, à P25<sup>46</sup>. Ceci démontre qu'une diminution de l'inhibition abolit la période critique et les mécanismes de plasticité. De plus, la benzodiazépine infusée quotidiennement chez la souris pendant une courte MD (P15-20) a induit une période critique précoce<sup>76</sup>. Ainsi, l'induction du développement des réseaux inhibiteurs précoces par la benzodiazépine déclenche cette plasticité de la OD.

Afin de comprendre les mécanismes par lesquels l'inhibition initie cette période critique de plasticité, il est important de connaître les types d'interneurones impliqués. Tel que mentionné ci-dessus, les interneurons corticaux GABAergiques forment des groupes hétérogènes de cellules qui diffèrent au niveau de leur morphologie, de leurs propriétés physiologiques et des protéines exprimées. La plupart des trouvailles concernant les sous-

types d'INs impliqués dans la régulation de la OD mettent l'emphase sur l'implication des cellules parvalbumine (PV) à haute décharge. La transmission GABAergique, activant spécifiquement la sous-unité  $\alpha 1$  des récepteurs post-synaptiques GABA<sub>A</sub>, est requise pour l'induction de la période critique de plasticité de la OD<sup>82</sup>. D'autres études démontrent que l'optimisation du nombre de récepteurs GABA<sub>A</sub> sur le soma et sur la dendrite proximale des cellules pyramidales est aussi importante pour la plasticité<sup>83</sup>. Étant donné que les cellules PV contactent spécifiquement ces régions, ces résultats suggèrent qu'elles sont impliquées dans la maturation de la période critique de plasticité.

La formation et la maturation de synapses GABAergiques inhibitrices sur les somas des neurones excitateurs sont fortement modulées par l'activité neuronale durant le début de la période critique<sup>65,84</sup>. Ce développement de l'innervation inhibitrice périsonomatique peut aussi être reproduit dans une culture organotypique en absence des afférences thalamiques, puisque même dans ces conditions, les interneurons à panier développent une arborisation axonale élaborée, ressemblant à celles reconstruites dans le cortex visuel mature *in vivo*<sup>85,86</sup>. Ces BCs en culture forment aussi des boutons synaptiques sur les corps cellulaires de leurs cibles post-synaptiques durant les différentes phases du développement, très similaires à ceux observés *in vivo*<sup>65</sup>. Ces boutons présynaptiques se co-localisent avec GAD65 et possèdent des composantes présynaptiques de synapses symétriques, tel que visualisé en microscopie électronique, confirmant que ces boutons représentent des synapses GABAergiques.



**Figure 4. La maturation de l'innervation synaptique GABAergique d'une BC corticale dans le cortex post-natal est reproduite dans les cultures organotypiques (Tiré de Chattopadhyaya, B et al., 2004)<sup>65</sup>.**

La BC est ciblée par transfection biolistique avec la protéine fluorescente verte (GFP) conduite par un promoteur spécifique aux interneurons PV. L'innervation périsonatiforme formée par l'axone de la BC (vert) autour des corps cellulaires des neurones pyramidaux (rouge; NeuN) est simple à EP14 avec peu de boutons synaptiques qui innervent les somas pyramidaux. À EP28, les branchements axonaux sont beaucoup plus nombreux avec un nombre de boutons synaptiques (flèche) significativement plus élevé.

Un traitement de tétranotoxine (TTX), un bloqueur des canaux sodiques et de l'activité neuronale, dans les cultures organotypiques réduit significativement le nombre de boutons synaptiques et le nombre de branchements axonaux autour des somas durant la phase de prolifération des synapses GABAergiques (EP16-24; jours post-nataux équivalents)<sup>65</sup>. Similairement, lorsque la TTX est injectée dans l'œil entre P20 et P24 (jours post-nataux), l'innervation des corps cellulaires pyramidaux par les cellules PV est réduite, menant à une diminution du nombre de terminaux GAD65-positifs. Cette expérience a été effectuée avec des souris *G42*, où GFP est exprimée sélectivement dans les cellules PV<sup>+</sup>. Cependant, cette innervation est conservée lorsque la TTX est injectée avant ou après cette période critique,

suggérant la présence d'une période critique entre les 3<sup>ème</sup> et 4<sup>ème</sup> semaines post-natales, durant lesquelles l'innervation périsonomatique GABAergique dans le cortex visuel peut être significativement modifiée par l'expérience sensorielle<sup>65</sup>.

Une autre étude propose que la transmission inhibitrice stimule la formation de synapses inhibitrices. Le gène *Gad1* code pour l'isoforme GAD67, responsable de 90% de la synthèse de GABA<sup>87</sup>. Un knock-out conditionnel de ce gène, spécifiquement dans des BCs individuelles du cortex visuel, induit une diminution du nombre de synapses GABAergiques et de branchements périsonomatiques ainsi que du champ d'innervation totale des INs BCs<sup>66</sup>. Ceci génère donc des BCs qui ciblent et contactent un nombre réduit de cellules pyramidales, formant une faible innervation périsonomatique. Cependant, cette réduction est complètement rétablie par l'inhibition de la protéine de recapture de GABA, GAT-1, qui augmente les niveaux extracellulaires de GABA. Aussi, ce phénotype est partiellement rétabli par des agonistes de GABA<sub>A</sub> et GABA<sub>B</sub>. Par contre, une surexpression de GAD67 augmente le nombre de synapses périsonomatiques. Il est intéressant de noter que durant la période critique, un knock-out conditionnel de *Gad2*, le gène qui code pour GAD65, n'aie pas affecté l'innervation périsonomatique des BCs PV, tandis qu'un knock-out constitutif GAD65 abolit la plasticité de la OD<sup>66</sup>. Ces expériences démontrent la sensibilité de la période critique à l'inhibition, car une diminution de 10% de GABA a la capacité d'abolir son ouverture, et l'effet temporel de cette inhibition à des moments précis du développement cortical.

Plusieurs études ont démontré certains des mécanismes inhibiteurs qui déterminent l'évolution développementale de l'innervation GABAergique et le début de la période critique de plasticité. L'acide polysialique (PSA), liée à la molécule d'adhésion cellulaire neurale (NCAM), agit comme un signal négatif qui supprime la formation des synapses inhibitrices et le début de la plasticité de la OD dans le cortex visuel en développement<sup>88</sup>. Ainsi, la dégradation précoce de PSA par l'enzyme EndoN favorise la maturation des synapses GABAergiques en culture et *in vivo*<sup>88</sup>. La réduction prématurée de l'expression de PSA induit aussi une ouverture précoce de la plasticité de la OD. Enfin, l'induction précoce de la période critique avec des benzodiazépines cause une réduction spontanée de PSA.

Un mécanisme expliquant le couplage de la stimulation visuelle à l'ouverture de la plasticité de la OD a été proposé par Sugiyama et al. Cette étude décrit des trouvailles additionnelles soutenant l'implication des cellules à panier PV dans l'initiation de la période

critique. Le facteur de transcription, OTX2, transcrit et traduit dans la rétine, est transporté vers le V1, où il est utilisé par les cellules à panier pour la stimulation de leur développement. Ainsi, une infusion précoce d'OTX2 accélère la maturation des cellules à panier et l'ouverture de la période critique<sup>89</sup>. En absence d'OTX2 dans la rétine, la période critique est absente, mais est rétablie avec l'addition exogène directe d'OTX2 dans le cortex visuel. Bref, ces études démontrent l'implication des cellules GABAergiques dans l'initiation des périodes critiques de plasticité de la OD.

### **1.5.2 La modulation des mécanismes d'inhibition corticale et de la fermeture des périodes critiques**

Les études discutées ci-dessus démontrent que la circuiterie inhibitrice joue un rôle central dans l'ouverture de la période critique de plasticité de la OD. Cependant, il n'est pas clair si une maturation continue de l'innervation inhibitrice est responsable de la fermeture des périodes critiques. En effet, quelques études suggèrent des mécanismes impliqués dans la fermeture de cette période. La compréhension de ces mécanismes cellulaires et moléculaires est également essentielle, car ils pourraient devenir une cible thérapeutique potentielle pour développer des traitements innovateurs pour diverses maladies comme l'amblyopie. L'amblyopie est une maladie neurodéveloppementale du cortex visuel qui affecte entre 1% et 4% de la population générale et qui est causée par des expériences visuelles anormales tôt dans la vie. L'amblyopie apparaît dans les 3 premières années de vie et reflète des modifications dans les propriétés des neurones dans les zones visuelles primaires et secondaires (V1 et V2). Par conséquent, cette condition se manifeste par des déficits sensoriels incluant une perte de l'acuité visuelle ainsi que de la vision stéréoscopique, de la position spatiale et de la sensibilité au contraste<sup>90,91</sup>.

Nous détaillerons ici les mécanismes impliqués dans la régulation de la fermeture de la plasticité cérébrale au niveau visuel. Premièrement, la régulation épigénétique de la transcription de gènes est un mécanisme qui ferme la période critique de la OD. Ainsi, lorsque les animaux sont traités avec un inhibiteur des déacétylases d'histones (Trichostatine), on favorise l'ouverture de la plasticité de la OD chez la souris adulte<sup>92</sup>. De plus, la dégradation de la matrice extracellulaire (ECM) rétablit la plasticité corticale. Les protéoglycans de

chondroïtines sulphates (CSPG) sont des composantes de la ECM qui inhibent la croissance axonale. Les patrons d'expression adultes des CSPG sont atteints vers la fin du développement du cortex visuel, soit lorsqu'ils sont condensés autour des somas et des dendrites des cellules PV et forment les réseaux périneuronaux (PNN). Après la fin de la période critique de plasticité, la dégradation des PNN avec la chondroïtinase-ABC (chABC) favorise un décalage de la OD vers l'œil ipsilatéral non-obstrué<sup>93</sup>. Ceci suggère que la dégradation des CSPG restaure la plasticité de la OD dans le cortex visuel adulte, confirmant que l'ECM est un facteur important dans la régulation de la plasticité activité-dépendante. Cette étude suggère aussi qu'une diminution de l'inhibition dans le cortex adulte est nécessaire pour la réouverture de la période critique.

Pour vérifier cette hypothèse, le groupe de Maffei et al. a implanté une mini-pompe dans le cortex visuel controlatéral de l'œil obstrué et ont réduit la synthèse de GABA avec l'acide 3-mercaptopropionique (MPA), un inhibiteur spécifique de GAD67. En parallèle, ils ont répété la même expérience avec la picROTOXINE (PTX), un antagoniste des récepteurs GABA<sub>A</sub>. Dans les deux cas, une MD a induit un décalage significatif de la OD chez les animaux adultes, accompagné d'une augmentation de la taille des champs réceptifs<sup>94</sup>. Il est aussi important de noter qu'aucun signe d'activité épileptique n'a été observé chez ces animaux traités versus les animaux sauvages. D'autre part, ce groupe a aussi observé une réduction de l'expression des CSPG suite à l'inhibition de GABA, ce qui pourrait avoir favorisé la plasticité de la OD adulte.

Lynx1 est aussi une molécule ayant la capacité de favoriser la réouverture de la plasticité synaptique. Cet inhibiteur des récepteurs nicotiques à l'acétylcholine (nAChR) est un bon candidat, car son expression augmente suite à la fermeture de la période critique. De plus, les souris KO pour *Lynx1* démontrent effectivement une augmentation de la plasticité corticale adulte via une majoration de la signalisation des nAChR<sup>95</sup>. Dans cette étude, les auteurs ont également évalué le rétablissement des fonctions visuelles chez les animaux adultes amblyopiques après avoir induit l'amblyopie chez les souris par une MD prolongée jusqu'à l'âge adulte. Par la suite, l'œil fermé est rouvert et l'œil ouvert est fermé. Les souris KO pour *Lynx1* ont spontanément rétabli leur acuité visuelle alors que les souris sauvages n'en étaient pas capables. De plus, ces mêmes résultats sont observés avec l'antidépresseur fluoxétine, qui est un inhibiteur sélectif de la recapture de la sérotonine. Le groupe de rats traité avec cet



antidépresseur s'est également rétabli de l'amblyopie adulte avec un traitement de fluoxétine suite à une MD à long-terme, en réduisant l'inhibition GABAergique<sup>96</sup>. Ces résultats suggèrent que la transmission sérotonergique, renforcée par un traitement chronique de fluoxétine, favorise des mécanismes structurels et fonctionnels qui changent l'équilibre exciteur-inhibiteur intracortical, déclenchant la plasticité dans le cortex visuel adulte. De nouvelles études démontrent aussi que lorsque des rongeurs amblyopiques habitent dans un environnement enrichi, augmentant leur comportement d'exploration et leurs stimulations sensorielles et motrices, l'acuité visuelle de l'œil obstrué est complètement rétablie en comparaison avec des souris sauvages qui habitaient dans un environnement standard<sup>97</sup>. Des analyses histologiques et moléculaires du cortex visuel démontrent une réduction des PNN et du niveau de GABA intracortical. Dans les études mentionnées ci-dessus, les auteurs observent une réduction de GABA et cet effet est bloqué par la benzodiazépine.

Bref, ces études démontrent que la modulation de l'inhibition corticale influence la réouverture des périodes critiques de plasticité chez le rongeur adulte.

## **1.6 Les altérations des périodes critiques et leurs effets sur le développement du cerveau**

Tel que détaillé plus haut, plusieurs études ont démontré le rôle critique de l'inhibition corticale dans la régulation de la plasticité cérébrale à divers stades développementaux. De plus, des altérations de l'inhibition corticales ont été associées à divers troubles neurodéveloppementales et psychiatriques<sup>98</sup>. Un niveau d'inhibition anormal durant la maturation du cerveau peut alors causer des déficits de la plasticité synaptique et du développement neuronal<sup>99</sup>.

La dysfonction des circuits GABAergiques est impliquée dans l'autisme<sup>100</sup>. L'analyse des tissus post-mortems des patients autistes a démontré une réduction de GAD65 et GAD67 dans le cortex pariétal et le cervelet<sup>101,102</sup>. Plusieurs études ont également trouvé que les récepteurs GABA<sub>A</sub> et GABA<sub>B</sub> sont moins nombreux chez les autistes<sup>103,104</sup>. En outre, on observe une diminution significative du nombre de cellules PV corticales dans de multiples modèles de souris autistes<sup>105,106</sup>. Au niveau cellulaire, ce dysfonctionnement GABAergique peut être le résultat de processus anormaux durant la maturation des réseaux neuronaux. Des

déficits de la synaptogenèse et du raffinement synaptique ont été proposés comme causes principales de l'autisme<sup>107</sup>. De ce fait, les mutations des gènes qui contrôlent normalement le patron de maturation synaptique des populations neuronales spécifiques pourraient être impliquées dans cette maladie. Parmi ces gènes, *Dlx1* et *Dlx2* se situent dans une région chromosomale associée à une susceptibilité accrue à l'autisme<sup>108</sup>. Ces gènes codent pour des facteurs de transcription exerçant des rôles essentiels dans la génération des neurones GABAergiques.

Des analyses électrophysiologiques ont aussi démontré une augmentation du ratio excitation/inhibition chez les animaux portant une délétion totale du MeCP<sub>2</sub> (methyl CpG binding protein 2), qui cause la maladie de Rett chez les humains<sup>109</sup>. Le syndrome de Rett est caractérisé par un développement précoce qui semble normal, suivi d'une régression développementale, comprenant la perte de compétences linguistiques, des anomalies motrices, des déficits cognitifs, des troubles respiratoires et des convulsions conduisant parfois à une mort prématurée<sup>98</sup>. Pour découvrir les changements moléculaires qui sous-tendent le syndrome de Rett, plusieurs modèles de souris avec différentes mutations de MeCP<sub>2</sub> ont été générés.

Des analyses de la structure et du fonctionnement du circuit synaptique dans ces lignées de souris ont démontré plusieurs altérations dans la formation et la maturation de la connectivité neuronale GABAergique. De façon générale chez les souris WT, les neurones GABAergiques expriment 50% plus de MeCP<sub>2</sub> comparés aux cellules non-GABAergiques. Un KO sélectif de MeCP<sub>2</sub> dans les neurones GABAergiques réduit les niveaux de *Gad1*, *Gad2* et GABA et reproduit la plupart des caractéristiques comportementales du syndrome de Rett<sup>110</sup>. Ceci suggère donc qu'une perturbation de MeCP<sub>2</sub>, exclusivement dans les neurones inhibiteurs, est suffisante pour provoquer le syndrome de Rett chez la souris. Cependant, il faut noter qu'avec un KO total de MeCP<sub>2</sub>, Durand et al ont remarqué une augmentation d'inhibition avec des niveaux de PV augmentés<sup>111</sup>. Cette dernière observation contredit la diminution de *Gad1*, *Gad2* et GABA observée chez les souris KO de MeCP<sub>2</sub> spécifiquement dans les neurones GABAergiques. L'étude effectuée avec un KO total de MeCP<sub>2</sub> n'a pas examiné et étudié les propriétés synaptiques des BCs. Ainsi, il n'est pas clair que l'augmentation de PV observée correspond à une augmentation de l'inhibition. Ceci pourrait résoudre la controverse retrouvée entre les deux études ci-dessus. Finalement, chez des souris mutantes de MeCP<sub>2</sub>, la période critique de plasticité de la OD est aussi altérée. Une MD chez

ces souris adultes cause un décalage significatif de la OD, qui est aboli par un traitement de facteur de croissance « insuline-like » (1-3)IGF-1<sup>112</sup>.

En étudiant les souris transgéniques *Ts65Dn*, qui représentent le modèle principal du syndrome de Down (DS), Fernandez et al. ont démontré que la déficience cognitive présentée par ces souris est essentiellement reliée à des niveaux excessifs de l'inhibition dans la circuiterie du lobe temporal<sup>113</sup>. Chez ces souris *Ts65Dn*, ils ont observé une augmentation significative du nombre de neurones GABAergiques incluant des cellules exprimant la PV ou la somatostatine, générées dans l'éminence ganglionnaire médiane<sup>114</sup>. Cet excès d'inhibition a induit une augmentation des marqueurs synaptiques inhibiteurs et une déficience de la plasticité synaptique à long-terme (LTP) dans l'hippocampe. Le rôle principal de la surinhibition a été confirmé par l'administration des antagonistes de GABA<sub>A</sub>, qui ont renversés les déficits d'apprentissage et de LTP chez les souris *Ts65Dn*<sup>113</sup>. De plus, une nouvelle étude a démontré que la signalisation de GABA est excitatrice plutôt qu'inhibitrice chez les souris *Ts65Dn*<sup>115</sup>. Cette activité excitatrice est accompagnée d'une augmentation de l'expression de NKCC1 dans l'hippocampe chez les souris *Ts65Dn* et les individus avec le DS. Dans cette étude, ils ont démontré qu'un traitement avec le bumétanide, un inhibiteur du NKCC1, chez les souris *Ts65Dn* rétablit la LTP et les déficits mnésiques. Leurs résultats démontrent donc que GABA est un excitateur chez les souris DS adultes. Cela permet d'identifier une nouvelle approche thérapeutique pour potentiellement rétablir des déficiences cognitives chez les personnes atteintes du DS.

La synthèse et la signalisation de GABA régulent la maturation des innervations GABAergiques dans le cortex visuel et l'ouverture de la période critique. Ceci suggère qu'une altération de la synthèse et de la signalisation de GABA peut potentiellement affecter les étapes de formation des circuits corticaux, menant ainsi à un développement déficient du cerveau. Les études post-mortems de cerveaux de patients atteints de schizophrénie révèlent des anomalies d'interneurones GABAergiques, et ce, de façon constante<sup>116</sup>. Le polymorphisme d'un seul nucléotide (SNP) dans la région régulatrice 5' de *Gad1* est associé avec la schizophrénie pédiatrique<sup>117</sup>. Aussi, une diminution de l'ARNm et des niveaux de protéine de GAD67, et non de GAD65, est constamment observée dans le cortex préfrontal dorsolatéral (DLPFC) des patients schizophrènes<sup>118,119</sup>. Ceci suggère que l'altération de la synthèse de GABA est fortement liée à cette maladie. Bien que d'autres types de cellules GABAergiques

peuvent être affectés, GAD67 est significativement plus faible dans les neurones PV des patients schizophrènes, spécifiquement dans les terminaisons axonales des BCs. Cependant, la densité des cellules PV n'est pas affectée dans le DLPFC des patients schizophrènes, indiquant que la contribution des neurones PV à cette pathologie corticale est due à des altérations de leur activité et non à leur absence<sup>120,121</sup>. Il serait donc important de caractériser le rôle de l'activité neuronale dans le développement des circuits d'interneurones GABAergiques corticaux en l'altérant, soit en la réduisant ou en la supprimant, dans les cellules PV individuelles. Aussi, les niveaux inférieurs de GAD67 dans les terminaux des BCs sont susceptibles de diminuer la force des afférences inhibitrices des BCs sur les neurones pyramidaux. Cela pourrait expliquer la diminution de la puissance des oscillations gammas observée dans la schizophrénie<sup>122-124</sup>.

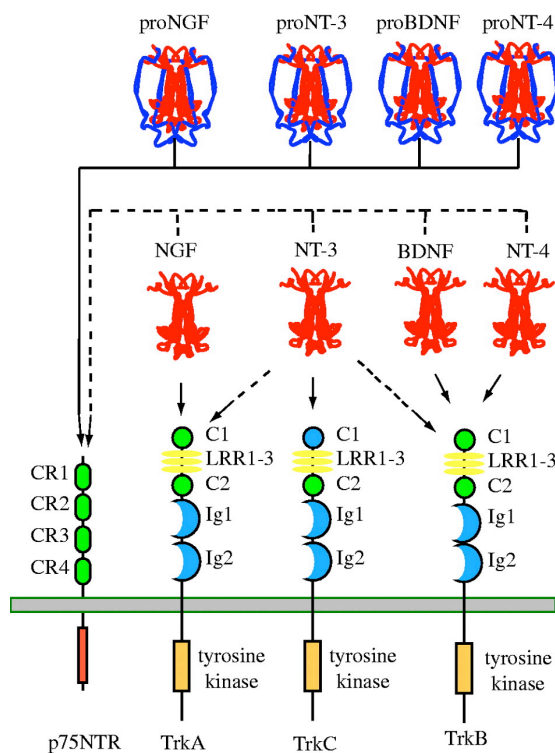
Bref, la compréhension des mécanismes qui contrôlent la formation et la plasticité des circuits GABAergiques et des substrats moléculaires et cellulaires qui peuvent être altérés dans ces processus nous informe sur les mécanismes pathophysiologiques de plusieurs maladies neurodéveloppementales. Les efforts investis dans l'exploration de ces mécanismes ont révélé plusieurs facteurs qui modulent la plasticité des périodes critiques lors du développement du cerveau.

## **2 Facteur Neurotrophique Dérivé du Cerveau, BDNF**

Les neurotrophines constituent une famille de facteurs de croissance incluant le facteur de croissance nerveux (NGF), le facteur neurotrophique dérivé du cerveau (BDNF), la neurotrophine 3 (NT-3) et la neurotrophine 4 (NT-4)<sup>125</sup>. Ces derniers sont classiquement définis comme des facteurs de survie pour des populations neuronales en développement. Leurs rôles incluent leur capacité de guider les cônes de croissance, la modulation synaptique, la neuroprotection et l'influence sur la plasticité synaptique<sup>126</sup>.

Chaque neurotrophine, traduit par un seul exon codant, est synthétisé comme un large précurseur (pro-neurotrophine) de 30-34kDa<sup>127</sup>. Ces pro-neurotrophines peuvent être clivées par des enzymes intracellulaires, comme la furine et les proconvertases, dans le réticulum endoplasmique (ER) ou l'appareil de Golgi (TGN). Ils peuvent aussi être clivés par des

enzymes extracellulaires, comme la plasmine et la MMP7, pour produire une forme mature de la neurotrophine (13kDa). Des études récentes démontrent que la forme mature ainsi que que la forme précurseur de BDNF sont sécrétées par les neurones<sup>128,129</sup>. Au niveau moléculaire, les neurotrophines interagissent avec deux récepteurs distincts : les récepteurs de tyrosines kinases, Trk (TrkA, TrkB, TrkC), et p75NTR, un membre de la famille des récepteurs de nécrose tumorale<sup>130,131</sup>. Bien que toutes les neurotrophines se lient avec une affinité équivalente au récepteur Trk, NGF se lie préférentiellement avec TrkA, BDNF et NT-4 avec TrkB, et NT-3 avec TrkC. Il faut cependant noter que les neurotrophines matures se lient avec une faible affinité aux récepteurs p75NTR<sup>132</sup>.



**Figure 5. Schéma illustrant l'interaction des neurotrophines et pro-neurotrophines avec les récepteurs Trk et p75NTR (Tiré de Lu, Y., et al., 2008)<sup>131</sup>.**

Les pro-neurotrophines se lient à p75NTR avec une forte affinité. En parallèle, les neurotrophines se lient à TrkB avec une forte affinité et se lient à p75NTR avec une faible affinité.

Il a été démontré que les domaines précurseurs des neurotrophines jouent un rôle unique dans le repliement adéquat et la dimérisation des molécules précurseuses. Cependant, les domaines matures sont traditionnellement considérés comme des ligands sécrétés, responsables de divers effets biologiques. De plus, la majorité des effets neurotrophiques sur la différenciation et la survie neuronale peut être attribué à un système de co-récepteurs, incluant Trk et p75NTR. Récemment, la découverte des formes précurseurs de NGF et BDNF, qui se lient sélectivement à p75NTR et induisent l'apoptose, a élucidé un nouveau mécanisme par lequel différentes formes de neurotrophines peuvent initier diverses actions. De plus, une troisième protéine, la sortiline, reconnaît de façon spécifique les domaines précurseurs des pro-neurotrophines, et assemble un complexe majeur de co-récepteurs ayant une haute affinité pour p75NTR. Ceci permet la transmission d'une signalisation pro-apoptotique.

Ainsi, les effets contraires des neurotrophines sur la survie ou la mort neuronale dépendent fortement de la relâche des neurotrophines précurseurs ou matures, de leur liaison avec les récepteurs Trk ou p75NTR, de la formation des différents complexes et du recrutement des protéines en aval impliquées dans les différentes voies de signalisation.

## **2.1 Transcription activité-dépendante de BDNF**

Les neurotrophines sont à la base de nombreuses facettes du fonctionnement du système nerveux central. Elles ont des rôles essentiels dans la différenciation cellulaire, la survie neuronale, la migration, l'arborisation dendritique, la synaptogenèse et les différentes formes de plasticité synaptique, dépendantes de l'activité<sup>131,133-135</sup>. Parmi les quatre neurotrophines, les actions du BDNF sur les neurones ont été les mieux caractérisées. En effet, des changements discrets du niveau de BDNF induits par un simple polymorphisme nucléotique fréquent dans le gène *BDNF* est en corrélation avec des différences neuroanatomiques et des changements de comportements chez les humains et chez les modèles de souris<sup>136-138</sup>.

Le gène *BDNF* possède au moins huit promoteurs distincts qui initient la transcription de multiples transcrits d'ARNm distincts. Chaque ARNm comporte un exon 5' épissé et un exon 3' commun qui contient la totalité du cadre ouvert de lecture pour la protéine BDNF<sup>139</sup>. Grâce à l'utilisation de promoteurs alternatifs, à l'épissage et à la polyadénylation des sites, au

moins 18 transcrits peuvent être produits, chacun codant pour la même protéine BDNF. Bien que l'importance de cette organisation transcriptionnelle complexe est cryptique, une hypothèse suggère que cette organisation offre plusieurs couches de régulation, soit l'usage de promoteurs alternatifs, une stabilité différentielle d'ARNm ou une localisation subcellulaire différentielle d'ARNm ou de protéine.

En plus de l'utilisation de différents promoteurs, les transcrits de BDNF peuvent être polyadénylés à deux sites alternatifs, conduisant à deux populations d'ARNm différentes, soit celle avec une courte 3'UTR et celle avec une longue 3'UTR<sup>140,141</sup>. Ces bassins d'ARNm sont localisés dans des compartiments cellulaires distincts des neurones. Les ARNm ayant de longs 3'UTR sont enrichis principalement dans les dendrites des neurones corticaux. En utilisant un modèle de souris dans lequel le long 3'UTR a été perturbé (*Bdnf*<sup>klox/klox</sup>), une faible quantité d'ARNm de BDNF est présente dans les dendrites des neurones corticaux et hippocampiques. Ces résultats indiquent que l'ARNm avec un court 3'UTR est limité au soma, tandis que l'ARNm avec un long 3'UTR de BDNF est destiné et ciblé aux dendrites pour la traduction locale<sup>142</sup>. Malgré l'abolition des ARNm à du long 3'UTR, les souris mutantes produisent un niveau normal d'ARNm et de protéine BDNF dans le cerveau. Ceci est expliqué par une augmentation de BDNF dans le corps cellulaire<sup>142</sup>.

## 2.2 Rôle de BDNF sur les synapses glutamatergiques

Des épines dendritiques sont des excroissances de la membrane des dendrites neuronales recevant les contacts synaptiques des axones neuronaux présynaptiques. Le développement de ces épines implique la surproduction, la croissance et l'élagage, l'augmentation de la densité des épines avec l'âge durant le développement précoce, suivie d'une réduction de celle-ci afin d'atteindre des niveaux appropriés chez les animaux adultes et matures. Chez l'homme, la densité des épines dendritiques augmente de façon significative au cours des premiers mois de vie postnatale. Cependant, environ 40% des synapses sont ensuite sélectivement éliminées. La maturation et l'élagage dépendent de l'expérience sensorielle<sup>143-145</sup>. Une surexpression de BDNF et de sa voie de signalisation via le récepteur TrkB favorisent la croissance dendritique et affectent la morphologie des épines, en diminuant les épines immatures 'stubby' et en augmentant la portion des épines matures de

types champignons<sup>146</sup>. Cependant, le modèle de souris *BDNF*+/- démontre un effet sur l'arborisation dendritique des cellules excitatrices uniquement, sans altération de la densité des épines dendritiques<sup>147</sup>. Ces résultats ont aussi été confirmés lorsque le groupe de Tsumoto a occasionné un knock-out de BDNF spécifiquement dans les cellules pyramidales individuelles<sup>64</sup>. Ces cellules excitatrices avaient un phénotype identique aux cellules contrôles. Cependant, les souris *Bdnf*<sup>klox/klox</sup> possèdent des épines dendritiques plus denses et plus minces comparées aux souris contrôles. Cette morphologie anormale observée chez ces souris est probablement causée par un déficit d'élagage<sup>142</sup>. Ces études suggèrent que les 3'UTRs spécifiques dans le gène de BDNF sont utilisés pour diriger la transcription de BDNF au niveau des dendrites, où BDNF serait traduit localement pour promouvoir le remodelage des épines dendritiques dans le développement postnatal.

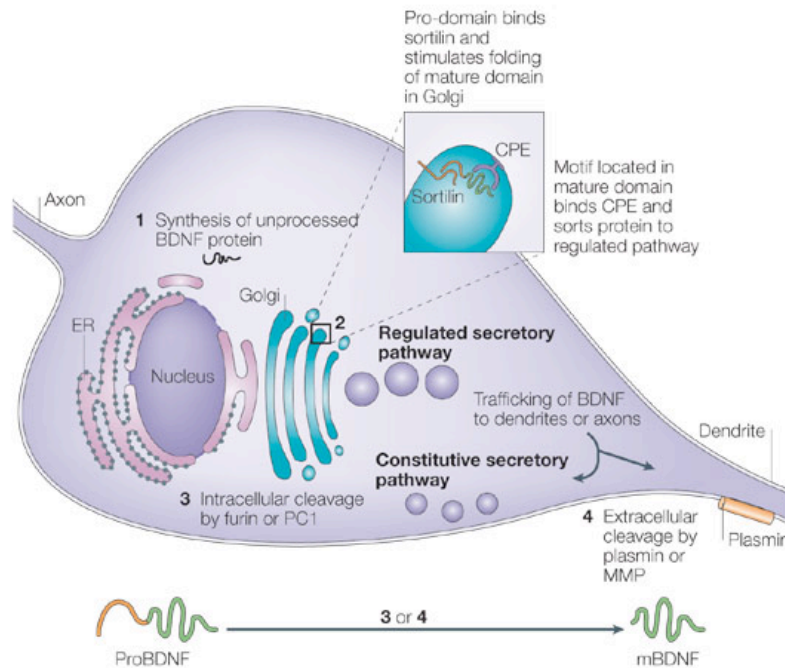
Le rôle de proBDNF a aussi été étudié dans l'hippocampe. Koshimizu et al. ont démontré que la forme de proBDNF résistante au clivage réduit la densité des épines sans affecter leur longueur<sup>148</sup>. De façon contraire, la forme mature de BDNF augmente le nombre d'épines dans les cellules pyramidales. De plus, une nouvelle étude a aussi examiné le rôle de la signalisation de proBDNF, via son récepteur p75NTR, dans la régulation de la transmission synaptique. Cette étude a été effectuée en utilisant des souris knock-in qui surexpriment proBDNF dans l'hippocampe. Ils ont observé que proBDNF réduit la complexité et l'arborisation dendritique *in vivo* dans les cellules pyramidales, tout en régulant négativement la densité de leurs épines dendritiques<sup>147</sup>.

### 2.3 Régulation de BDNF

Comme d'autres neurotrophines, BDNF est synthétisé en tant que précurseur (pré-proBDNF) et après son clivage, il devient une protéine, proBDNF, de 32 kDa. proBDNF peut être clivé au niveau intracellulaire par des enzymes, comme la furine ou les pro-convertases. Par la suite, il est sécrété : soit sous forme mature BDNF (mBDNF; 14 kDa) ou bien sous forme de proBDNF pour ensuite être clivé de manière extracellulaire par l'activation de la plasmine. Cette activation est médiée par l'activateur tissulaire du plasminogène (tPA) ou par des métalloprotéases (MMP7)<sup>126</sup>. Ce traitement intracellulaire vs extracellulaire de proBDNF est un sujet complexe qui est couramment débattu. Matsumoto et al. ont suggéré que



proBDNF est seulement présent sous de très faibles concentrations dans le SNC et n'est donc pas sécrété<sup>149</sup>. Cependant, d'autres études démontrent que proBDNF peut être libéré par les neurones<sup>128,129</sup>. Ainsi, proBDNF a été quantifié avec une souris knock-in dans laquelle l'exon codant pour BDNF endogène a été remplacé par une séquence murine de BDNF ayant une étiquette hémagglutinine (HA) au niveau du C-terminal<sup>128</sup>.



**Figure 6. La synthèse et le traitement de BDNF dans le système nerveux central (Tiré de Heymach, J.V. et al., 1995)<sup>126</sup>.**

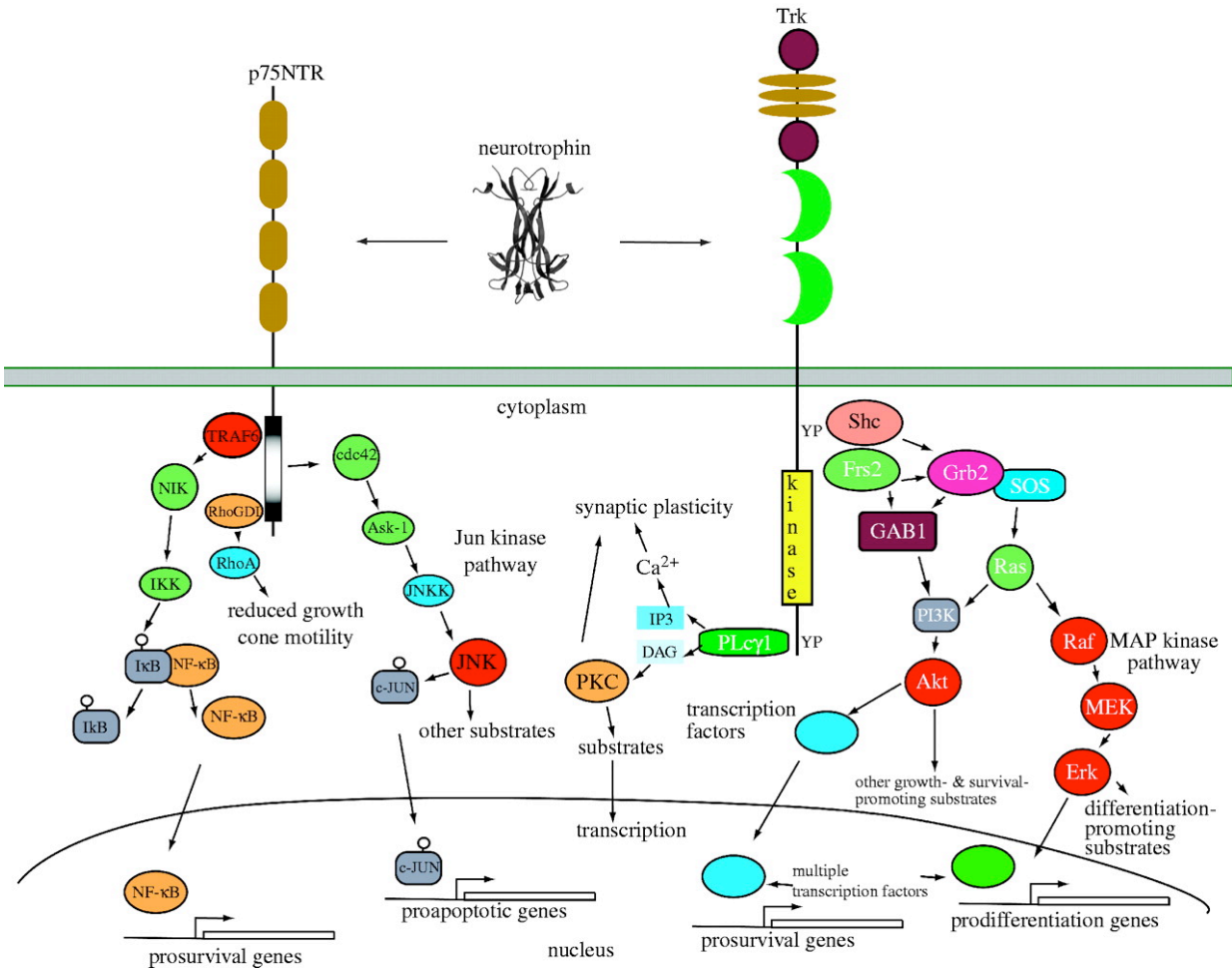
proBDNF devient mBDNF par plusieurs mécanismes cellulaires. (1) Synthétisé dans le réticulum endoplasmique (ER), proBDNF se lie à la sortiline intracellulaire dans l'appareil de Golgi pour faciliter le repliement adéquat du domaine mature (2). Par la suite, proBDNF peut être clivé dans les vésicules sécrétoires régulées par les enzymes proconvertases (PC1) ou dans le réticulum endoplasmique par la furine (3). Si proBDNF atteint le milieu extracellulaire, il peut être traité par la plasmine ou les MMP (4).

De plus, Nagappan et al. ont démontré qu'en culture, la stimulation électrique des neurones hippocampiques à des fréquences différentes peut modifier les proportions de ces deux protéines<sup>129</sup>. Une stimulation à haute fréquence (HFS) provoque la sécrétion de tPA et l'augmentation des niveaux de mBDNF, alors qu'une stimulation à basse fréquence produit

une proportion plus élevée de proBDNF. Cette étude a abouti à des conclusions différentes parce qu'elles ont utilisées des conditions expérimentales différentes, telles que la présence ou l'absence de cellules gliales dans les conditions de culture. Ces dernières peuvent influencer le traitement ou la recapture de proBDNF. Ces expériences ont été réalisées dans des cultures neuronales dissociées. Elles ont mesuré la génération de BDNF au niveau de la cellule entière. En considérant toutes les données disponibles, il est raisonnable de supposer que la concentration, la transformation et/ou la sécrétion de proBDNF vs mBDNF peuvent être modulées localement et dépendent donc du stade de développement et du type neuronal.

## **2.4 p75NTR**

Les neurotrophines interagissent avec deux classes de récepteurs différents. Le récepteur neurotrophique p75NTR possède un seul domaine extracellulaire avec un domaine transmembranaire et un domaine cytosolique qui inclue le domaine de « mort ». Le domaine extracellulaire du récepteur p75NTR comprend quatre domaines riches en cystéine, importants pour la liaison des neurotrophines<sup>131</sup>. Le récepteur p75NTR peut se lier à chacune des neurotrophines, soit NGF, NT3, NT4 et BDNF, pour activer plusieurs voies de signalisation. p75NTR peut aussi agir comme un co-récepteur pour les récepteurs Trk. Cette interaction entre p75NTR et Trk forme un complexe qui modifie l'affinité de liaison des neurotrophines<sup>150-153</sup>. Même si p75NTR est considéré comme un récepteur de faible affinité, il se lie aux pro-neurotrophines avec une forte affinité.



**Figure 7. Les principales voies de signalisation des récepteurs Trk et p75NTR menant à des réponses anti-apoptotiques et pro-apoptotiques respectivement (Tiré de Lu, Y. et al., 2008)<sup>131</sup>.**

### 2.4.1 Le récepteur p75NTR et ses cascades anti-apoptotiques

L'interaction de p75NTR avec ses domaines cytosoliques et transmembranaires de Trk favorise la signalisation via ce récepteur. Donc, p75NTR joue le rôle d'un co-récepteur et augmente l'affinité et la spécificité des neurotrophines. Par exemple, p75NTR augmente l'affinité de TrkA pour NGF en diminuant son affinité pour NT-3. L'importance de ce mécanisme est révélée pendant les différents stades du développement durant lesquels les récepteurs Trk sont activés par diverses neurotrophines de façon dépendante du p75NTR. On observe ce phénomène lorsque l'induction de l'expression de p75NTR dans la maturation des

neurones sympathétiques cause un décalage de la réponse des récepteurs TrkA. Ceci réduit la croissance axonale dépendante du NT-3 et favorise la différenciation et la survie neuronale induite par NGF<sup>154</sup>. De plus, le rôle de NT-3 augmente significativement au niveau de la croissance axonale chez les souris knock-out de p75NTR.

Les Trk sont des récepteurs de tyrosines kinases qui sont activés par une dimérisation et une transphosphorylation suite à la liaison de la neurotrophine. Lorsque les résidus de tyrosines sont phosphorylés, ils forment des régions fondamentales pour les protéines d'échafaudage et pour les enzymes qui activent les cascades intracellulaires<sup>132</sup>. Les voies majeures de ces récepteurs sont Ras, la kinase PI3 (PI3K) et PLC- $\gamma$ 1<sup>155</sup>. La phosphorylation de la tyrosine 490 (Y490) fournit des sites de recrutement pour Shc et Frs2, qui procurent ensuite des liaisons pour Ras et la PI3K. Lorsque Ras est stimulé, les cascades de la kinase MAP (MAPK) et de PI3K activent ERK et Akt respectivement. Les récepteurs p75NTR ont aussi la capacité d'influencer les voies de signalisation induites par l'activation de Trk. Par exemple, p75NTR se lie à Src après la phosphorylation de Trk et augmente donc sa signalisation. De plus, la phosphorylation de Y785 recrute l'enzyme PLC- $\gamma$ 1 et génère IP3 et DAG. Ceci mobilise le calcium et la protéine kinase C (PKC) qui sont impliqués dans la plasticité synaptique<sup>131</sup>.

Finalement, le complexe Trk-p75NTR peut posséder des capacités de signalisation différentes du dimère Trk seul. L'activation de TrkA en absence de p75NTR favorise l'activation de la voie Ras-MAPK. Cependant, les deux récepteurs sont nécessaires pour l'activation robuste de la cascade de la kinase PI3 et de la protéine kinase B (Akt). La protéine membranaire riche en ankyrine (ARMS), un partenaire moléculaire de ces deux récepteurs, peut être responsable de la capacité de NGF à activer ces voies de signalisation distinctes, dépendamment du contexte cellulaire. Donc, ARMS peut s'associer simultanément à TrkA et à p75NTR. Une augmentation de son expression cause une diminution significative de la formation du complexe Trk-p75NTR<sup>156</sup>. La liaison du NGF sur TrkA isolé stimule la phosphorylation d'ARMS et active sélectivement la voie de signalisation prolongée de la MAPK<sup>157</sup>. La phosphorylation d'ARMS recrute Crk qui active Rap1. Ensuite, Rap1 active la cascade de MAPK par la stimulation de la protéine kinase B-Raf. Ceci pourrait expliquer pourquoi les dimères TrkA sont suffisants pour soutenir la croissance de neurites via la

MAPK, alors que le complexe hétérodimérique TrkA-p75NTR est nécessaire pour une croissance complète et une survie à long-terme via la voie de PI3K-Akt<sup>158</sup>.

Des études récentes ont trouvé une nouvelle protéine adaptatrice, la molécule inhibitrice d'apoptose (FAIM), qui se lie à TrkA et p75NTR et favorise la croissance chez les neurones sympathétiques, suite à la liaison de NGF<sup>159</sup>. Le mécanisme exact expliquant l'intégration de FAIM au niveau de ces deux récepteurs n'est pas clair, mais Sole et al. ont démontré l'implication des voies de signalisation de Ras-MAPK et NF- $\kappa$ B dans la croissance neuronale<sup>160</sup>.

En plus de moduler les fonctions des récepteurs de Trk, p75NTR peut aussi contrôler et transmettre des activités indépendamment de Trk. Plusieurs études ont démontrées que p75NTR, dépendamment de son contexte cellulaire, peut activer des cascades de signalisation qui régulent la migration des cellules de Schwann, la myélination, la croissance axonale et la régénérescence<sup>161,162</sup>. En effet, le domaine intracellulaire de p75NTR contient des motifs d'interactions permettant la liaison des molécules de signalisation en aval. Ces investigations ont montré la capacité de p75NTR à activer la voie de signalisation de NF $\kappa$ B. Les neurotrophines matures promeuvent l'association de TRAF6 avec le domaine cytoplasmique de p75NTR, qui recrute et active les kinases IRAK et I $\kappa$ B. La phosphorylation d'I $\kappa$ B relâche le facteur de transcription de NF- $\kappa$ B<sup>131,163</sup>. Donc, de façon autonome, p75NTR peut favoriser la survie neuronale via NF- $\kappa$ B.

Bref, les récepteurs p75NTR peuvent, de façon indépendante ou en liaison avec les récepteurs Trk, causer des effets anti-apoptotiques qui favorisent la survie et la croissance des neurones.

#### **2.4.2 Les cascades pro-apoptotiques de p75NTR et BDNF**

Une autre fonction bien établie des récepteurs p75NTR est leur capacité de promouvoir la mort cellulaire. Celle-ci a été illustrée de façon convaincante dans des modèles d'animaux transgéniques, où p75NTR est supprimé<sup>164,165</sup>. Les souris adultes knock-out au niveau de l'exon III, qui code pour le domaine de liaison du p75NTR, manifestent une réduction massive du volume du prosencéphale basal.<sup>166,167</sup> Aussi, chez ces mêmes souris nouveau-nés, il y a une

augmentation des neurones sympathiques et sensoriels, suggérant que p75NTR contrôle l'apoptose et non la survie durant le début du développement<sup>168,169</sup>.

Les voies de signalisation de l'apoptose, via les récepteurs p75NTR, ne sont pas entièrement comprises. Une voie majeure est l'activation de la kinase Jun. L'activation de p75NTR induit l'activation de Rac, une protéine de liaison de la GTP. Bien que Rac ne se lie pas directement avec p75NTR, plusieurs protéines adaptatrices, comme NRIF, NADE, NRAGE et TRAF, le font<sup>131</sup>. Par la suite, cette voie phosphoryle c-jun qui active p53, Bad et Bim. La translocation mitochondriale de Bax et la relâche du cytochrome c des mitochondries avec l'activation des caspases 9, 6 et 3 mènent à l'apoptose cellulaire<sup>159,170</sup>. Une étude élégante avec des neurones granulaires du cervelet *in vitro* démontrent la voie de signalisation proBDNF-p75NTR-Rac-GTPase-JNK-caspase 3 qui favorise la mort cellulaire. Cette réponse biologique est abolie avec des inhibiteurs de JNK et de caspase 3<sup>171</sup>.

Plusieurs études suggèrent que l'accumulation de A $\beta$  a un rôle central dans la maladie d'Alzheimer. Ce peptide neurotoxique est généré suite au clivage de la protéine précurseur de l'amyloïde (APP) par les sécrétases  $\beta$  et  $\gamma$ . A $\beta$  est un autre partenaire moléculaire de p75NTR qui active la cascade de JNK. Ce  $\beta$ -amyloïde se lie sélectivement à p75NTR et active la voie de signalisation de JNK, qui induit la transcription de c-jun et des caspases, induisant la mort cellulaire<sup>172,173</sup>.

La capacité d'une pro-neurotrophine à activer préférentiellement les récepteurs p75NTR et non Trk est expliquée par son affinité différente pour ces deux récepteurs. La confirmation de ce phénomène est venue avec l'identification de la sortiline. La sortiline, un membre de la famille des récepteurs neuronaux Vps10p, a été identifiée comme un récepteur des pro-neurotrophines et un co-récepteur de p75NTR<sup>174</sup>. Structurellement, la sortiline est constituée d'un domaine extracellulaire Vps10p unique, d'une région transmembranaire et d'une courte queue cytoplasmique contenant plusieurs motifs d'internalisation et de triage. La partie N-terminale du domaine Vps10p se plie en hélice et représente le site de liaison pour les pro-neurotrophines. La sortiline se lie au proNGF avec une faible affinité, mais cette affinité augmente d'un facteur 20 lorsque les cellules co-expriment p75NTR. Ceci dépend de l'association spontanée du pro-neurotrophine avec la sortiline et p75NTR. Simultanément, le domaine précurseur de la pro-neurotrophine se lie à la sortiline et son domaine mature se lie à p75NTR créant un complexe tertiaire<sup>161,174</sup>.

Le rôle de la pro-neurotrophine NGF sur l'apoptose des cellules ganglionnaires de la rétine (RGC) a été étudié *in vivo*. Les auteurs ont démontrés que la liaison du proNGF sur le complexe formé par p75NTR et la sortiline est essentielle dans la mort cellulaire<sup>175</sup>. Avec des souris knockout de la sortiline, ils ont observé que la mort cellulaire des RGC via proNGF était abolie. Afin de mieux caractériser cette voie de signalisation, ils ont vérifié l'implication de la protéine adaptatrice NRAGE, qui est impliquée dans d'autres cascades, et l'activation du facteur de nécrose tumoral alpha (TNF $\alpha$ ), qui est déjà identifié dans la mort cellulaire au niveau de la rétine. Ils concluent que proNGF active le complexe p75NTR-sortiline-NRAGE sur les cellules gliales Muller. Ceci libère le TNF $\alpha$  via la voie NF- $\kappa$ B, et cause la mort des RGC. Par ailleurs, la caspase 8 n'était pas impliquée dans la mort cellulaire<sup>175</sup>. Cette voie de signalisation montre un effet apoptotique non-autonome, car les RGC n'expriment pas le récepteur p75NTR. Un phénomène non-autonome est aussi observé dans l'aire corticale fronto-basale, où le nombre de cellules GABAergiques est régulé par l'activation des p75NTR, exprimés uniquement par les neurones cholinergiques<sup>176</sup>.

Une nouvelle étude a aussi démontré que proNGF, qui se lie au complexe p75NTR-sortiline, induit l'activation de l'enzyme PTEN, qui empêche l'activation de Akt en présence de BDNF<sup>177</sup>. L'activation de la cascade JNK conduit donc à la mort cellulaire des cellules cholinergiques dans le prosencéphale basale. Bref, ces expériences démontrent que la sortiline joue activement un rôle essentiel en tant que co-récepteur pour l'induction de l'apoptose neuronale.

La sortiline joue aussi un rôle important comme protéine chaperonne. Une étude démontre que la sortiline se lie à proBDNF et régule sa localisation intracellulaire dans les neurones. L'interaction entre la sortiline et les pro-neurotrophines est importante, car l'expression de la forme dominante négative de la sortiline, en absence de son domaine intracellulaire, réoriente BDNF vers une voie sécrétrice constitutive plutôt qu'une voie de sécrétion régulée<sup>178</sup>. Ce modèle de souris permet l'analyse des différents rôles de la sortiline et d'autres protéines chaperonnes dans la régulation du transport intracellulaire des proBDNF et mBDNF vers les axones et les dendrites.

Par ailleurs, la sortiline se lie aussi à de différents ligands des pro-neurotrophines et interagit avec des récepteurs autres que le p75NTR. De plus, la sortiline, en plus d'être un récepteur de mort cellulaire, peut aussi se lier et transporter des récepteurs Trk de façon

antérograde dans les membranes synaptiques. La sortiline peut favoriser la signalisation pour la survie des neurones ganglionnaires via les récepteurs TrkA, car l'ajout du NGF réduit l'activation de ERK1/2 chez les souris *Sort1*<sup>-/-179</sup>. Bref, les nouvelles trouvailles fonctionnelles des interactions entre les récepteurs p75NTR et Trk deviennent plus élaborées.

La capacité des facteurs inhibiteurs associés à la myéline (MAIF), comme Nogo, MAG et OMgp, de causer l'effondrement des cônes de croissance axonale et d'agir comme des signaux répulsifs pour le guide axonal est régulée par l'activation des petites protéines G, RhoA<sup>180</sup>. L'activation de RhoA dépend de la liaison des MAIF au récepteur Nogo (NogoR)<sup>181</sup>. NogoR, sans domaine cytoplasmique, se couple avec le récepteur p75NTR et forme un complexe fonctionnel qui régule l'activité de RhoA<sup>182</sup>. Cet effet nécessite aussi la co-expression d'une troisième protéine transmembranaire LINGO-1. Donc, lorsqu'une pro-neurotrophine se lie à p75NTR, le domaine intracellulaire de p75NTR se lie à l'inhibiteur de la dissociation de guanine Rho (Rho-GDI), ce qui libère RhoA de son inhibition et cause son activation<sup>183</sup>.

La voie de signalisation de RhoA a été étudiée dans des publications récentes. Le laboratoire de Dr. D. Kaplan et al. a démontré que la dégénérescence des axones cholinergiques et sympathiques médiée par la myéline est induite via la cascade de p75NTR-Rho-GDI-RhoA-ROCK-caspase 6. La dégénérescence est abolie chez des souris knock-out de p75NTR (*Ngfr*<sup>-/-</sup>), ou par l'usage d'anticorps anti-BDNF ou d'inhibiteurs de RhoA et de caspase 6<sup>184</sup>.

Le même groupe de recherche a observé l'implication du récepteur p75NTR dans des mécanismes d'actions avec d'autres facteurs de guides répulsifs du système nerveux central et périphérique, soit les sémaphorines 3A et les éphrines B2. Les Sema 3A régulent négativement la migration cellulaire, la croissance et la guidance axonale ainsi que l'élagage des axones<sup>185</sup>. Les éphrines de type B, à leur tour, influencent négativement la migration cellulaire et la guidance axonale.<sup>186</sup> Dr. Kaplan et al. ont démontré que p75NTR, lié à BDNF, est nécessaire pour l'effondrement des cônes de croissance des neurones sympathétiques causé par les Sema 3A et les éphrines B2. En effet, un knock-out de p75NTR abolit partiellement l'effet de Sema 3A et de Eph2B sur les cônes de croissance. Ils ont aussi remarqué que la voie de signalisation nécessaire pour l'activation de cette réponse est via RhoA et ROCK, un effecteur de RhoA. Cependant, une inhibition de cette voie de signalisation, avec un peptide



qui bloque la liaison entre p75NTR et Rho-GDI ainsi qu'un inhibiteur spécifique de ROCK, démontre que cette voie est seulement responsable pour la moitié de l'effet observé sur l'effondrement du cône de croissance<sup>162</sup>. Il serait intéressant d'étudier les autres voies de signalisation de p75NTR comme la cascade de JNK, qui pourraient être responsables de l'effondrement indépendant de RhoA. En somme, ceci démontre que p75NTR peut aussi avoir plusieurs partenaires pour activer des voies pro-apoptotiques, soit les NogoR et LINGO-1.

Les deux études ci-dessus effectuées par Dr. Kaplan et al. n'ont pas mentionné si ces effets de dégénérescence et d'effondrement des cônes de croissance des neurones sympathétiques étaient dus à l'activation de p75NTR par la forme précurseur ou mature de BDNF. Récemment, il a été démontré que l'activation de p75NTR par la forme précurseur de BDNF inhibe la croissance de neurites et cause l'effondrement des cônes de croissance des neurones des ganglions spinaux par la cascade de RhoA-ROCK<sup>187</sup>.

Une étude a aussi vérifié l'effet des récepteurs p75NTR sur l'élagage des neurones sympathétiques du ganglion cervical supérieur<sup>188</sup>. À P20, 78% de ces neurones projettent vers les portions antérieures et postérieures de l'œil. À P50, uniquement 20% de ces neurones se dirigent vers ces deux régions. Ce phénomène d'élagage requière la synthèse activité-dépendante de BDNF. BDNF se lie à p75NTR et cause l'élimination des axones en favorisant leur dégénérescence. Cette dernière est occasionnée par l'inhibition de la voie de signalisation médiée par TrkA, aussi présent sur les neurones sympathétiques et essentiel pour le maintien des axones. En utilisant des souris ayant un KO de p75NTR<sup>-/-</sup> (*Ngfr*<sup>-/-</sup>) ainsi que des souris ayant l'exon IV du promoteur BDNF muté (*BdnfpIV*<sup>-/-</sup>), de même qu'une surexpression de Gab1, une protéine adaptatrice recrutée par TrkA, ce phénotype étaient complètement corrigé<sup>188</sup>.

Des études récentes ont démontré qu'une apoptose induite par une pro-neurotrophine, via l'activation de p75NTR, favorise un clivage des récepteurs p75NTR par des  $\gamma$ -sécrétases, qui relâchent leur domaine intracellulaire et causent l'apoptose. Ce processus permet la translocation nucléaire de NRIF, une protéine se liant à l'ADN<sup>189</sup>. Ce mécanisme dépend aussi de TRAF, une autre protéine adaptatrice de p75NTR<sup>190</sup>. La façon dont la translocation nucléaire de NRIF cause l'apoptose reste encore inconnue. Il serait intéressant de vérifier si NRIF active la transcription des gènes pro-apoptotiques lors de la translocation nucléaire.

Bref, les neurotrophines et pro-neurotrophines se lient au récepteur p75, qui peut agir de façon indépendante ou bien former des complexes avec des partenaires moléculaires, pour activer des voies de signalisation spécifiques. Ces dernières favorisent l'apoptose et la mort cellulaire ou la survie et la croissance neuronale.

## 2.5 Rôle de BDNF sur les interneurons GABAergiques

Les neurotrophines jouent un rôle essentiel dans le développement et la plasticité corticale, ainsi que dans la régulation des interneurons inhibiteurs GABAergiques. Plusieurs études démontrent que des surexpressions génétiques et pharmacologiques de BDNF stimulent et accélèrent la maturation des neurones GABAergiques. Ceci se manifeste par une augmentation précoce de l'expression de PV et du marqueur GABAergique présynaptique, GAD65, dans des souris transgéniques dans lesquels BDNF est surexprimé sous le promoteur CaMKII<sup>191</sup>. Cette maturation accélérée de l'inhibition GABAergique est aussi observée par une augmentation de l'amplitude des potentiels post-synaptiques inhibiteurs (IPSC) maximal chez ces animaux, mesurés dans les cellules pyramidales.

Dans le cortex, la transcription de BDNF dépendante du promoteur IV représente la majorité de l'expression de BDNF induite par l'activité neuronale<sup>140,192</sup>. Afin de déterminer les fonctions physiologiques de BDNF spécifiquement contrôlées par la composante de son expression régulée par l'activité neuronale dans le système nerveux, une mutation knock-in a été introduite dans le promoteur IV de BDNF<sup>193</sup>. Cette mutation est exprimée dans le cortex. Les mutants *CremKI* démontrent une induction diminuée de l'expression de BDNF qui dépend de l'expérience sensorielle. De plus, les neurones GABAergiques de ces animaux forment moins de synapses inhibitrices sur les cellules pyramidales. De manière significative, ces animaux présentent une expression réduite des marqueurs présynaptiques inhibiteurs (GAD65 et GABA<sub>A</sub>R<sub>γ2</sub>) dans le cortex. Ceci indique une exigence spécifique de l'expression activité-dépendante de BDNF dans le développement de l'inhibition corticale. Par ailleurs, cette mutation n'a aucun effet sur la différenciation et la survie des neurones GABAergiques et n'altère pas les synapses glutamatergiques. Ceci suggère que le BDNF induit par l'activité est sélectif et spécifique aux cellules inhibitrices.

Tsumoto et al ont aussi développé une technique permettant de générer un knock-out de BDNF endogène dans des cellules pyramidales individuelles<sup>64</sup>. Cette étude nous a démontré que la formation et la prolifération des synapses GABAergiques étaient significativement réduites sur les cellules pyramidales n'ayant pas de BDNF. Cet effet n'a pas été observé chez les neurones voisins qui possédaient BDNF. Ceci suggère que BDNF endogène, via son récepteur TrkB, agit de façon locale sur les synapses GABAergiques. Ces dernières contactent des cellules produisant BDNF. De façon surprenante, ce knock-out de BDNF n'avait aucun effet sur les cellules pyramidales, car leur morphologie n'était pas affectée. Ces études renforcent et confirment le rôle spécifique de BDNF sur les interneurons GABAergiques.

Ces études confirment aussi les rôles promoteurs de BDNF et TrkB sur la maturation des cellules GABAergiques. Cependant, l'implication de proBDNF au niveau de la maturation des circuits GABAergiques n'est pas encore complètement définie. Récemment, le groupe de Porcher a démontré que l'activation de p75NTR, via proBDNF, diminue la transmission GABAergique en agissant sur la sous-unité  $\beta_{2/3}$  de GABA<sub>A</sub>R<sup>194</sup>. Plus précisément, l'activation de la voie RhoA-ROCK-PTEN augmente l'internalisation de GABA<sub>A</sub>R  $\beta_{2/3}$  et la voie JAK2-STAT3-ICER diminue sa synthèse.

## **2.6 Rôle de BDNF sur la plasticité**

Tel que mentionné, un facteur distinct qui module la maturation GABAergique est le facteur neurotrophique dérivé du cerveau BDNF, qui est essentiel dans la régulation des interneurons inhibiteurs GABAergiques. Il promeut la croissance des neurites des interneurons, stimule l'expression de GABA et des protéines liantes au calcium et régule l'inhibition synaptique. De plus, BDNF est synthétisé par les cellules pyramidales et est régulé par l'activité neuronale<sup>195</sup>. Les souris maintenues dans le noir durant le jour et la nuit (dark-rearing) ont une expression réduite de BDNF dans le cortex visuel et leur période critique est retardée<sup>196,197</sup>. Cependant, des souris transgéniques qui surexpriment BDNF, mises dans les mêmes conditions sombres, ne démontrent aucun retard de la période critique de plasticité. De ce fait, la surexpression de BDNF accélère la maturation des cellules GABAergiques. Cela se manifeste par l'augmentation de leur niveau d'expression de GAD65, un marqueur

présynaptique inhibiteur, et de PV. Cette surexpression cause aussi une ouverture et une terminaison précoce de la période critique de plasticité de la OD ainsi qu'un développement prématuré de l'acuité visuelle<sup>191</sup>. Bref, BDNF est un des facteurs principaux qui ouvrent la période critique de plasticité par la maturation précoce des cellules inhibitrices GABAergiques. D'autre part, le groupe de Dr. Lamberto Maffei a aussi vérifié l'implication de la voie de signalisation de la kinase MAP, activée par divers facteurs incluant BDNF, dans l'activation de la plasticité de la OD<sup>198</sup>. En utilisant des inhibiteurs spécifiques de ERK, ils ont conclu que l'activation de ce dernier est essentielle pour la plasticité corticale, car ces inhibiteurs ont bloqué le décalage de la OD induit par la MD durant la période critique.

D'autres études ont démontré que le clivage de proBDNF par tPA est essentiel pour la plasticité hippocampique. La potentialisation à long terme requière la synthèse de nouvelles protéines et implique la croissance synaptique. La sécrétion de BDNF est un élément clé dans ce processus. Les souris *BDNF*<sup>+/-</sup> et l'inhibition de la signalisation de BDNF bloquent la LTP<sup>199</sup>. De plus, l'activation de la plasmine par tPA est essentielle pour la LTP, car elle permet le clivage de proBDNF en mBDNF. Par conséquent, les souris *tPA*<sup>-/-</sup> ont une augmentation de proBDNF et ne peuvent induire la LTP<sup>200</sup>. De son côté, proBDNF, via son récepteur p75NTR, facilite sélectivement la dépression à long terme (LTD) via la sous-unité NR2B des récepteurs glutamatergiques NMDA. Avec l'utilisation des souris *p75NTR*<sup>-/-</sup> et de l'anticorps REX qui bloque ce récepteur, le groupe de Dr. Bai Lu a démontré que la LTD, dépendante des récepteurs NMDA, était abolie sans affecter toute autre forme de plasticité synaptique<sup>201</sup>. De plus, l'ajout d'une forme de proBDNF résistante au clivage a facilité la LTD dépendante des récepteurs NMDA.

En tenant compte des nouvelles trouvailles reliant les actions de la forme précurseur de BDNF à l'inhibition GABAergique, il serait important de caractériser le rôle de proBDNF et de son récepteur p75NTR sur l'ensemble des processus régulant le développement synaptique, l'arborisation, le territoire et le maintien des synapses des BCs dans le cortex cérébral.

## **2.7 Rôle de BDNF dans les maladies neurodéveloppementale**

Le polymorphisme commun d'un seul nucléotide (SNP), Val66Met, convertit une valine pour une methionine, dans le prodomaine de l'exon codant le gène BDNF<sup>202</sup>. Ce SNP se

produit à une fréquence relativement élevée mais a aussi été associé spécifiquement aux troubles dépressifs et à la schizophrénie. De façon remarquable, les humains porteurs de cet allèle BDNFmet ont une activation hippocampique et une mémoire altérée<sup>202-204</sup>. Les niveaux de n-acétyl aspartate (NAA), qui représentent un reflet de l'intégrité neuronale, sont plus faibles dans l'hippocampe des sujets BDNFmet<sup>205</sup>. L'imagerie par résonance magnétique fonctionnelle (IRMf) a également révélé une activation anormale hippocampique pendant les exercices de mémoire de ces sujets<sup>206</sup>. De plus, dans une cohorte de 641 sujets, ceux qui avaient le génotype met/met démontraient une mémoire épisodique altérée<sup>206</sup>. Ce polymorphisme Val66Met impacte considérablement la morphologie du cerveau, en réduisant le volume des différentes structures, y compris de l'hippocampe, du gyrus parahippocampique et du cortex préfrontal<sup>207,208</sup>.

Au niveau cellulaire, le remplacement de Val66 par Met66 perturbe le traitement cellulaire, le trafic et la sécrétion activité-dépendante de BDNF<sup>204,209</sup>. Avec ses fonctions polyvalentes impliquées dans le développement neuronal et la neurotransmission, le gène *BDNF* est considéré comme un candidat intéressant pour étudier le fonctionnement du cerveau et le comportement chez des personnes atteintes de divers troubles mentaux.

### **2.7.1 Dépression majeure**

Plusieurs études sur les animaux et des études cliniques confirment le rôle important de BDNF dans la dépression et l'action antidépressive des médicaments. L'administration à long terme des antidépresseurs chez les animaux augmente la production de BDNF dans le cerveau. De même, une perfusion de BDNF a un effet antidépresseur chez les modèles d'animaux de dépression<sup>210</sup>. Dans une étude clinique, Karege et al. ont observé des niveaux de BDNF significativement plus bas chez des patients qui souffraient de la dépression<sup>211</sup>. De plus, un excès de l'allèle Met66 est retrouvé chez des patients qui souffrent de la dépression. Ces patients ayant le génotype Met66/Met66 pourraient avoir une activité de BDNF diminuée. L'augmentation de la fréquence Met66/Met66 chez ces derniers supporterait l'hypothèse que la dépression est associée à une activité réduite de BDNF dans le cerveau<sup>212-214</sup>. Zhou L et al. ont aussi démontré que les niveaux d'ARNm et des protéines de proBDNF, de p75NTR et de sortiline sont plus élevés dans le sang périphérique chez les patients souffrant de la

dépression<sup>215</sup>. Cependant, les niveaux de mBDNF et de TrkB étaient plus faibles, indiquant que la régulation entre les voies de signalisation de proBDNF/p7NTR et de mBDNF/TrkB est altérée dans une dépression majeure. L'ensemble de ces études indique que le gène *BDNF* est un bon candidat pour des études génétiques et pharmacogénétiques de la dépression majeure.

### **2.7.2 Trouble bipolaire**

L'administration chronique des stabilisateurs de l'humeur, soit le lithium ou le valproate, dans le traitement du trouble bipolaire augmente l'expression de BDNF dans l'hippocampe du rat<sup>216</sup>. Ceci supporte la notion que BDNF pourrait jouer un rôle dans la pathophysiologie du trouble bipolaire. En outre, la protéine BDNF est réduite dans le cerveau post-mortem des patients bipolaires<sup>217</sup>. De ce fait, de nombreuses études ont vérifié la relation entre le polymorphisme du BDNF Val66Met et cette maladie<sup>218-220</sup>. Il a été observé que ce SNP augmente le risque de développer un trouble bipolaire.

### **2.7.3 Schizophrénie**

Des études indiquent qu'une altération du développement du cerveau est impliquée dans la pathogenèse de la schizophrénie<sup>221,222</sup>. BDNF joue un rôle important dans la croissance et le maintien neuronal durant le développement et la différenciation du système nerveux. Cette protéine est donc un candidat important dans l'étude de la schizophrénie. Issa et al. ont démontré pour la première fois que les niveaux de BDNF sont plus faibles dans le cerveau post-mortem des patients schizophrènes, en particulier dans le cortex préfrontal et dans le liquide céphalo-rachidien<sup>223</sup>. De plus, plusieurs études démontrent que le polymorphisme Val66Met est associé à plusieurs manifestations de la schizophrénie, tels que les comportements agressifs et les altérations volumétriques du cerveau<sup>224-227</sup>.

### **2.7.4 Anxiété**

Une panoplie d'études chez les animaux suggèrent que BDNF peut être important dans la physiopathologie des troubles d'anxiété<sup>221,228</sup>. La délétion conditionnelle de BDNF dans le

cerveau postnatal cause une hyperactivité suite à l'exposition à des facteurs de stress, comparativement aux souris WT<sup>229</sup>. Chen et al. ont aussi généré un modèle de souris (*BDNF(Met/Met)*) qui démontre une augmentation de comportements liés à l'anxiété après avoir été placé dans un environnement stressant<sup>138</sup>. Ceci démontre l'impact de cette mutation sur ces comportements anxieux.

Avec leurs rôles critiques dans le développement du cerveau, dans la plasticité neuronale et dans la modulation de la neurotransmission, BDNF et son polymorphisme fonctionnel (Val66Met) ont été les objets d'études génétiques dans divers troubles mentaux et comportementaux humains. Bien que la plupart des études initiales ont observé des associations positives, certaines études plus récentes aboutissent à des résultats contraires. Compte tenu de la diversité des conclusions trouvées, des expériences supplémentaires seraient nécessaires pour clarifier la fonction biologique de BDNF.

### **3 Objectifs de recherche**

#### **3.1 Contexte**

- Nos connaissances des mécanismes moléculaires impliqués dans la prolifération activité-dépendante des synapses GABAergiques se sont grandement améliorées. Cependant, les études mentionnées ci-dessus mettent l'emphase sur les mécanismes qui régulent le nombre de synapses GABAergiques formés par une BC autour de leurs cibles post-synaptiques. Il reste donc à clarifier comment une BC détermine le nombre de cellules cibles à innover, ce qui n'est pas encore bien compris.
- Récemment, plusieurs études ont démontré que la synthèse activité-dépendante de BDNF et sa signalisation via TrkB favorisent la maturation des circuits GABAergiques dans le cortex post-natal. Cependant, l'implication de proBDNF et p75NTR reste encore inconnu dans ce processus.

### **3.2 Objectifs principaux**

- Caractériser le rôle de l'activité neuronale dans le développement des territoires d'innervations des BCs corticaux
- Déterminer comment la forme précurseur de BDNF et son récepteur p75NTR régulent la maturation du territoire synaptique des BCs dans le cortex cérébral
- Étudier comment proBDNF affecte la connectivité des BCs et la plasticité corticale chez l'adulte

### **3.3 Objectifs spécifiques**

- Examiner le développement des BCs ainsi que leur champs d'innervation lorsque leur excitabilité est réduite et la relâche des neurotransmetteurs est bloquée
- Investiguer si proBDNF joue un rôle dans l'établissement du territoire synaptique corticale des BCs dans le cerveau post-natal
- Déterminer le rôle de p75NTR dans l'établissement du territoire synaptique corticale des BCs
- Découvrir si proBDNF peut favoriser la plasticité corticale dans le cerveau adulte



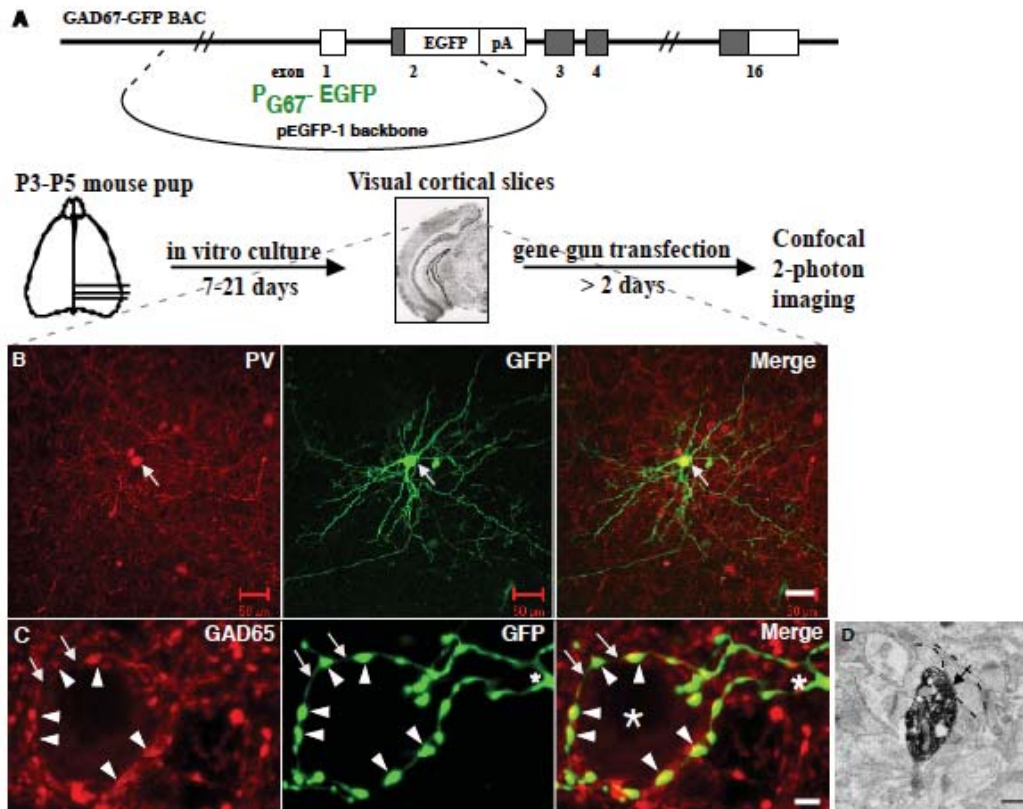
## 2 : Méthodologie

### 1.1 Culture organotypique et transfection biolistique

La préparation des cultures *in vitro* a été réalisée en utilisant des souriceaux à P4-5 tel que décrit dans Chattopadhyaya et al. (2004). Le milieu a été changé trois fois par semaine et toutes les procédures ont été effectuées dans des conditions stériles.

Afin d'identifier et de transfecter exclusivement les cellules à panier (BCs) corticales, la transfection biolistique a été effectuée tel que décrit par Chattopadhyaya et al (2004). Des différents plasmides ont été incorporés dans les «bullets». Ces derniers ont été créés en utilisant des particules d'or (1,6  $\mu\text{m}$ ) enrobées de 50  $\mu\text{g}$  de l'ADN d'intérêt. Par la suite, ces «bullets» ont été utilisés pour la transfection biolistique des tranches corticales par Gene Gun (Bio-Rad, Hercules, CA) à haute pression (180  $\psi$ ). Ainsi, les tranches transfectées ont été incubées dans les mêmes conditions que celles décrites dans Chattopadhyaya et al. (2004), avant l'imagerie confocale.

Les BCs ont été transfectées avec  $P_{G67}$ -AlstR et  $P_{G67}$ -TeNT-Lc-EGFP pour exprimer les récepteurs Alst et la chaîne légère de la toxine tétanique (TeNT-Lc), respectivement.  $P_{G67}$ -GFP-ires-Cre a aussi été transfecté dans les tranches provenant des souris  $p75NTR^{\text{flx/flx}}$  pour causer une délétion spécifique de p75NTR dans les BCs individuelles. Pour traiter nos cultures pharmacologiquement, l'allatostatine (10nM Phoenix Pharmaceutical), le wt-proBDNF (10 ng/ml, Alomone Laboratories), le mut-proBDNF (10 ng/ml, Alomone Laboratories), le REX (50  $\mu\text{g/ml}$ , Dr. Louis Reichardt, USF), le PPACK (50  $\mu\text{M}$ , Molecular Innovations) et le recombinant actif de tPA (2 mg/ml, Molecular Innovations) ont tous été directement ajoutés au milieu de culture pendant un temps précis.



**Figure 1. Les cellules à panier individuelles peuvent être visualisées à une résolution synaptique dans des cultures organotypiques corticales (Tiré de Chattopadhyaya, B et al., 2004)<sup>65</sup>.**

A) Approche expérimentale permettant de visualiser les BCs par transfection biolistique avec la protéine fluorescente verte (GFP) contrôlée par un promoteur spécifique aux interneurons PV<sup>+</sup> (P<sub>G67</sub>). Ce promoteur est un segment d'ADN qui contient une région de 10kb provenant du promoteur de GAD67 (P<sub>G67</sub>). B) Une transfection biolistique de P<sub>G67</sub>-GFP dirige l'expression de la GFP (vert) dans les cellules GABAergiques parvalbumines (rouge). Celles-ci sont observées dans des cultures organotypiques corticales. Barre d'échelle, 50 µm. C) Les terminaisons axonales d'une BC (étoiles, panneau du milieu) forment des boutons synaptiques autour des corps cellulaires (astérisque, panneau de droite) et sont co-localisées avec le marqueur GABAergique présynaptique GAD65 (rouge, flèches). Barre d'échelle, 2 µm. D) Une analyse par microscopie électronique (EM) confirme que les boutons des BCs, exprimant la GFP, sont des terminaisons présynaptiques de synapses symétriques GABAergiques (flèche). Barre d'échelle, 0,7 µm.

## 1.2 Immunohistochimie et quantification

L'immunohistochimie des cultures organotypiques a été réalisée tel que décrit dans Chattopadhyaya et al., (2004). Les anticorps primaires suivants ont été utilisés: NeuN (monoclonal, 1: 400, Millipore), GAD65 (monoclonal, 1 :1000, Millipore), pCREB (Ser133)

(lapin, 1 :400, Cell Signaling Technology), p75NTR (REX, lapin, 1: 500, Dr Louis Reichardt (USF) et G3231, 1: 400, Promega), PV (monoclonal, 1: 1000, Millipore) et vGAT (lapin, 1: 400, Cell Signaling). Des anticorps secondaires chèvre anti-souris/lapin-Alexa488 (1:400, Invitrogen) -Alexa555 (1:400, Invitrogen) ou -Alexa 633 (1:400, Invitrogen) ont été utilisés par la suite. Les lames ont finalement été couvertes avec des lamelles en utilisant le "Vectashield" (Vector).

L'immunohistochimie de NeuN, PV, vGAT et PNN a été effectué sur des tranches corticales *ex vivo* infusées ou non avec les mini-pompes osmotiques. Toutes les images ont été prises durant la même journée en utilisant les mêmes paramètres d'imagerie. Pour chaque pile d'images, les anneaux de PV, vGAT et PNN ont été délimités et leurs niveaux de densités intégrées ont été mesurés avec ImageJ. Finalement, le ratio des densités intégrées provenant des hémisphères infusés et non-infusés a été calculé (3-5 animaux par groupe, 3 tranches de cerveau par animal, 4 piles par section, 7-10 anneaux par pile).

### **1.3 Acquisition et analyse des images**

Pour chaque groupe expérimental, nous avons utilisé un nombre égal de BCs corticales localisées dans les couches 2/3 et 5/6 provenant d'au moins 4-5 animaux différents. Des images confocales non-chevauchantes de l'arborisation axonale des BCs ont été prises avec un microscope confocal (Leica TCS SPE). Les images confocales des arborisations axonales des BCs ont été prises dans les premiers 150µm à partir du soma des BCs en utilisant un objectif 63x de glycérol (NA 1.4, Leica). Nous avons acquis les piles-Z avec des paliers de 1µm et ces piles d'images ont une profondeur moyenne de 40-70µm. Toutes les images ont été obtenues en utilisant ces mêmes paramètres d'acquisition. Ces images ont été exportées en format TIFF et tracées/quantifiées en utilisant les logiciels *NeuroLucida* et *NeuroLucida Explorer*. Les corps cellulaires des cellules pyramidales ont été identifiés par l'immunofluorescence anti-NeuN, et les axones des BCs ont été tracés en trois-dimension. L'analyse de l'innervation périsomatique et globale d'une BC a été réalisée tel que décrit par Chattopadhyaya et al. (2007). Pour chaque BC, les paramètres suivants ont été analysés: la densité des synapses périsomatiques, le nombre d'intersections entre les axones et les sphères de Sholl et le pourcentage de somas pyramidaux innervés par les axones des BCs. Environ 5 à 10 BCs et environ 10 à 15 somas

innervés pour chaque BC ont été analysés pour chacune des expériences. Seulement les cellules innervées ont été incluses dans cette analyse.

#### **1.4 Implantation de la mini-pompe**

Des souris à P90 ont été utilisées pour l'implantation des mini-pompes osmotiques sous anesthésie (isoflurane). Chaque mini-pompe (modèle 1007D; débit de 0,5  $\mu\text{l/h}$ ; Alzet) a été remplie avec de la saline ou du mut-proBDNF (1  $\mu\text{g/ml}$  dans PBS filtrée, Alomone Laboratories) et connectée à une canule (gauge 30) implantée directement dans le cortex visuel primaire (2,5mm latéral de la ligne médiane, 2,5 mm antérieur au lambda). Les animaux ont porté la mini-pompe pendant 5-6 jours et ont été perfusés après la fin du traitement.

#### **1.5 Privation monoculaire et enregistrements électrophysiologiques *in vivo***

La privation monoculaire (MD) a été réalisée par la suture de la paupière. Les souris ayant une réouverture spontanée de la suture, même de façon minimale, ont été exclues de l'étude.

Après 3 jours de MD, les animaux ont été mis sous sédation avec l'isoflurane (Forane, Abbott) et anesthésiés avec l'uréthane (injection ip; 1,5g/kg; Sigma, St. Louis, MO, USA). Ils ont ensuite été placés dans un cadre stéréotaxique. Leur température corporelle a été maintenue à 37 °C. Un trou a été percé dans le crâne, qui correspond à la partie binoculaire du cortex visuel primaire, controlatéral à l'œil obstrué. Les yeux ont été recouverts d'une fine couche d'huile de silicone pour éviter les opacités cornéennes. Les enregistrements ont été réalisés en utilisant des microsondes de silicium (16 canaux, NeuroNexus Technologies a2x2-tet-3mm-150-121) insérées dans le cortex 3,0-3,2 mm à partir du point  $\lambda$  (Porciatti et al., 1999). Les signaux ont été acquis avec Cheetah 5 (Neuralynx) et analysés avec un logiciel personnalisé dans Matlab (MathWorks).

La stimulation visuelle a été générée dans Matlab (Pelli 1997, Brainard 1997). Nous avons mesuré le ratio controlatéral/ipsilatéral de l'amplitude des VEPs afin de mesurer la plasticité de la dominance oculaire (Putignano et al., 2007). Nous avons également effectué

des enregistrements unitaires et vérifié les propriétés des réponses physiologiques des neurones corticaux visuels traitées avec proBDNF.

### **3 : Neural Activity and Neurotransmission Regulate the Maturation of the Innervation Field of Cortical GABAergic Interneurons in an Age-Dependent Manner**

Elie Baho and Graziella Di Cristo\*

*Affiliations:*

Centre Hospitalier Universitaire Sainte-Justine and Université de Montréal, Montréal, Québec H3C 1C5, Canada.

\*Corresponding author

Graziella Di Cristo,

Research Center, CHU Ste-Justine

3175, Côte-Sainte-Catherine, Montréal, QC H3T 1C5, Canada.

## **1.1 Abstract**

Neural activity guides the patterning of neuron synaptic territory in the developing nervous system. Evidence supporting this hypothesis comes from numerous studies on projection neurons in neuromuscular and visual systems. It is unknown whether the innervation field of GABAergic interneurons, which forms local dense innervations, follows similar rules.

Thanks to this connectivity pattern, they can tightly control neural excitability and synchronization. Here we show that reducing excitation, and thus neurotransmitter release, in mouse cortical single basket cells in slice cultures decreases the number of innervated cells without changing the pattern of perisomatic innervation, both at the peak and after the proliferation phase of perisomatic synapse formation. Conversely, suppressing neurotransmitter release in single basket cells can have completely opposite effects depending on the developmental stage. Our results reveal a remarkably specific and age-dependent role of neural activity and neurotransmission levels in the establishment of the synaptic territory of cortical GABAergic cells.

## **1.2 Introduction**

Basket cells, a subtype of GABAergic interneurons, innervate hundreds of postsynaptic targets with multiple synapses clustered around the cell body and proximal dendrites. Their proper functioning is essential for neural network activity, and their dysfunction has been linked to the occurrence of cognitive dysfunctions (Huang et al., 2007; Rossignol, 2011).

The establishment of mature innervation by a single basket cell requires several steps, from finding the right cell target and selecting the appropriate subcellular location for synapse localization to terminal branch formation and synapse proliferation. Recent studies have started to elucidate the mechanisms regulating the maturation of GABAergic innervation. For example, it has been shown that target selection is mainly regulated by molecular cues (Ango et al., 2004, 2008), while synapse proliferation is dependent on neural activity levels and

GABAergic neurotransmission (Chattopadhyaya et al., 2004, 2007). Our knowledge of the molecular mechanisms mediating activity-dependent GABAergic synapse proliferation has also improved; indeed, recent studies identified several factors that either stimulate (e.g., BDNF, GAD67, NCAM; for review, see Huang et al., 2007) or inhibit (polysialated-NCAM; Di Cristo et al., 2007) the formation of perisomatic GABAergic innervation. The interplay among these factors most likely determines the appropriate number of GABAergic synapses and the time course of their maturation. All of these studies focus on the mechanisms regulating the number of GABAergic synapses formed by a basket cell around single postsynaptic somata; however, how a basket cell decides the number of target cells to innervate is not well understood.

After decades of study, researchers have shown that neural activity plays an essential role in transforming immature circuits into the organized connections that subserve adult brain function. The essential role of neural activity in the establishment of the neural innervation field has been best studied in the visual system (Huberman et al., 2008), the neuromuscular junction (Buffelli et al., 2003), and the cerebellum (Bosman and Konnerth, 2009). Cortical GABAergic basket cells differ from retinal ganglion cells (RGCs), motoneurons, and climbing fibers in two fundamental aspects. First, they form a dense local axonal arbor, as opposed to long-distance projections to separate targets, and second, they use GABA, which is an inhibitory neurotransmitter. How neural activity levels influence the establishment of a mature basket axonal arbor territory is unclear.

As key mediators of neural activity, neurotransmitters are particularly well suited to couple functional neurotransmission with synaptic morphogenesis and refinement. By using a single-cell genetic approach to either reduce spiking activity, which in turn reduces neurotransmitter release, or suppress neurotransmitter release in single basket cells in mouse cortex, we found that neurotransmission effects are critically dependent on the maturation state of the basket cell innervation.



## **1.3 Materials and Methods**

### **1.3.1 Cortical organotypic culture and biolistic transfection.**

Slice culture preparation was performed as described by Chattopadhyaya et al. (2004) using mice pups of either sex. To activate the allatostatin receptor (AlstR), allatostatin peptide (10 nM, Phoenix Pharmaceuticals) was added with the culture medium during the specified time window. Gene gun transfection was performed as described by Chattopadhyaya et al. (2004). To transfect both GFP/AlstR (green)-expressing and tdTomato (red)-expressing basket cells in the same cortical slice, a set of gold particles was coated with P<sub>G67</sub>-AlstR (30 µg) and P<sub>G67</sub>-GFP (30 µg) constructs and another set was coated with P<sub>G67</sub>-tdTomato construct (30 µg). After two washes with 100% EtOH, the two sets of gold particles were mixed and used to prepare bullets. In a parallel set of experiments, we transfected separate cortical slices with either P<sub>G67</sub>-AlstR together with P<sub>G67</sub>-GFP or with P<sub>G67</sub>-GFP alone, to control that labeling resolution and bouton size were not dependent on the fluorophore used. The results obtained with the two labeling strategies were not statistically different and were pooled together.

Tetanus toxin light-chain (TeNT-Lc)::GFP was a kind gift from Dr. M. Meyer (King's College London, UK) and was then cloned into the P<sub>G67</sub>-vector (Chattopadhyaya et al., 2004). TeNT-Lc-EGFP is a fusion protein whose interaction with proteins in the presynaptic terminals could promote a more compact localization of the fusion protein. EGFP labeling, therefore, might not faithfully represent bouton area. To control for this point, we did two sets of experiments. In one set, we transfected slices with either P<sub>G67</sub>-TeNT-Lc-EGFP together with P<sub>G67</sub>-tdTomato or P<sub>G67</sub>-EGFP alone. In a second set of experiments, different cortical slices were transfected with either P<sub>G67</sub>-TeNT-Lc-GFP or P<sub>G67</sub>-EGFP. The results obtained with these two labeling strategies were not statistically different and were pooled together.

### **1.3.2 Analysis of basket cell innervation.**

For each experimental group, we took care to acquire an equal number of basket cells

localized in layers 2/3 and 5/6. Confocal images of the basket cell axon arbors were taken in the first 150  $\mu\text{m}$  from the basket cell soma using a 63x glycerol objective (NA 1.4, Leica) and a Leica TCS SPE. Confocal stack size was 116.4 x 116.4  $\mu\text{m}$  with an average depth of 40–70  $\mu\text{m}$ . Analysis of basket cell perisomatic innervation and bouton size was performed as described by Chattopadhyaya et al. (2007). Only innervated cells were included in this analysis.

To quantify the fraction of pyramidal cell somata potentially innervated by a basket cell axon, we divided the number of NeuN-positive neurons contacted by at least one GFP-positive-bouton by the total number of NeuN-positive cells, in a confocal stack taken in the first 150  $\mu\text{m}$  from the basket cell soma (at least 3 stacks per basket cell). This measure critically depends from the pyramidal cell density in a confocal stack. We measured pyramidal cells density and found it to be invariant with respect to the different manipulations. In addition, to control for bias versus denser zones of the axonal field, 3–5 basket cells per experimental group were fully reconstructed and the fraction of innervated neurons was quantified as described above. On average, between 6 and 9 confocal stacks, with a volume of 174.6 x 174.6 x 70–150  $\mu\text{m}$ , were necessary to reconstruct a basket cell.

All data were first averaged per basket cell; thus, statistical analysis was done using the number of basket cells as  $n$ .

### **1.3.3 Immunostaining and pCREB quantification.**

Immunohistochemistry was performed as described by Chattopadhyaya et al. (2004). The following antibodies were used: NeuN (monoclonal, 1:400, Millipore), GAD65 (monoclonal, 1:1000, Millipore), and pCREB (Ser133) (rabbit, 1:400, Cell Signaling Technology). For pCREB, experiments were run in duplicate and images were all acquired the same day using the identical confocal parameters and a 20x water-immersion objective (Leica). Z-stacks were acquired with a 5  $\mu\text{m}$  step, exported as TIFF files, and analyzed using ImageJ (NIH) software. For each transfected basket cell, pCREB-positive nuclei were outlined and the intensity levels were measured, after background subtraction, for both the transfected

basket cell and 5 neighboring cells in the same confocal plane. The ratio of pCREB intensity levels in the transfected versus untransfected neighboring cells was then calculated and compared across different experimental conditions.

## 1.4 Results

To explore the role of a basket cell's neural activity and neurotransmission on the establishment of its innervation field, we employed two methods: (1) we reduced neuron excitability in single basket cells using allatostatin-mediated activation of the G-protein-coupled *Drosophila* allatostatin receptor (AlstR), and (2) we suppressed presynaptic release of the neurotransmitter using a targeted expression of TeNT-Lc in single basket cells in mouse cortical organotypic cultures. The basic features of perisomatic innervation of pyramidal cells by basket interneurons develop in organotypic culture (Chattopadhyaya et al., 2004). In particular, perisomatic innervation matures significantly after the second postnatal week in culture and is influenced by alterations in neural activity (Chattopadhyaya et al., 2004).

The activation of AlstRs has been shown to activate endogenous mammalian G-protein-coupled inwardly rectifying K<sup>+</sup> (GIRK) channels. Upon binding to its ligand (allatostatin), AlstR/GIRK complexes cause membrane hyperpolarization and consequently a decrease in neural excitability and action potential firing, which in turn reduces neurotransmitter release (Birgöl et al., 1999). In acute brain preparations and *in vivo*, acute application of allatostatin has been shown to reversibly abolish action potential firing in cells expressing AlstRs (Zhou et al., 2009; Marina et al., 2010).

To reduce neural excitability and simultaneously label single basket cell axons and synapses at high resolution, we used a previously characterized promoter region (P<sub>G67</sub>; Chattopadhyaya et al., 2004) to express by biolistic transfection either EGFP together with AlstR, or tdTomato alone, in basket interneurons (Fig. 1 A1). We then added allatostatin (10 nM) in the culture medium for 7 d, which activated AlstR in GFP-expressing basket cells (green) but not in the neighboring tdTomato-expressing ones (red), in organotypic cultures (Figure 1A2,A3). Like other G-protein-coupled receptors, AlstR might be desensitized or

internalized with prolonged exposure to its ligand. To check whether long-term application of allatostatin in our culture conditions was still effective in reducing basket cell excitability 7 d after the onset of exposure to allatostatin, we used pCREB immunofluorescence as an indicator of neural activity. Basket cells expressing AlstR and treated with allatostatin from equivalent postnatal day 17 (EP17; P4 + 13 d *in vitro*) to EP24, during the peak of GABAergic synapse proliferation (Chattopadhyaya et al., 2004) and well after GABA action has become inhibitory, showed reduced pCREB expression in their nuclei as compared with neighboring, untransfected cells (Figure 1 B, C; mean pCREB expression in transfected cell/neighboring untransfected cells,  $0.91 \pm 0.09$  for control basket cells;  $0.63 \pm 0.07$  for AlstR-expressing basket cells;  $n = 9$  basket cells for ctrl and  $n = 12$  for allatostatin-treated basket cells, from at least 6 different slices; Mann–Whitney on ranks,  $p < 0.05$ ).

Following neural activity and neurotransmission manipulations in single basket cells, we quantified two aspects of basket cell axon innervation, the extent of perisomatic innervation around single somata (terminal branching, perisomatic synapse density and size) and the fraction of innervated somata. We have previously shown (Chattopadhyaya et al., 2004, 2007) that the vast majority of GFP-labeled boutons in our experimental condition most likely represent presynaptic terminals. Allatostatin-mediated reduction of basket cell firing from EP17–24, during the peak of perisomatic synapse proliferation, did not affect perisomatic bouton maturation. AlstR-expressing basket cells (Fig. 2B, green) treated with allatostatin from EP17–24 formed perisomatic innervation characterized by multiple terminal axon branches and clustered boutons that were indistinguishable from allatostatin-treated control cells (Fig. 2 A, red; Fig. 2 E, F, H; boutons/soma  $\pm$  SEM =  $9.4 \pm 0.2$  for control versus  $9.4 \pm 0.4$  for AlstR-cells, one-way ANOVA, Tukey’s test,  $p > 0.05$ ; bouton size  $\pm$  SEM =  $0.98 \pm 0.03 \mu\text{m}$  for control cells versus  $1.00 \pm 0.04 \mu\text{m}$  for AlstR-expressing cells, one-way ANOVA, Holm-Sidak’s test,  $p > 0.05$ ). However, when comparing the fraction of innervated cells over the total number of potential targets in a confocal stack, we found a significant reduction of the percentage of innervated cells by each basket cell expressing AlstR as compared with controls in the same allatostatin-treated slice (Fig. 2G;  $51 \pm 3\%$  and  $69 \pm 3\%$ , respectively, one-way ANOVA, Holm-Sidak’s test,  $p < 0.05$ ). To quantify perisomatic innervation, we imaged the basket cell axon in the first 150  $\mu\text{m}$  from the parent soma, because in this region

we found that the characteristics of the innervation are reproducible across basket cells. By quantifying innervation percentage in these axonal fields, however, we might have introduced a bias toward highly innervated regions. Therefore, we next fully reconstructed basket axon arbors along with all the pyramidal cell somata, and we found similar results (Fig. 3;  $50 \pm 3\%$  for AlstR-cells vs  $67 \pm 1\%$  for controls, *t* test,  $p < 0.001$ ). Because basket cell axons also innervate the proximal dendrites of pyramidal cells, which were not detected in our analysis, the fraction of innervated pyramidal cells might be somewhat underestimated. On the other hand, such underestimation, if it exists, should equally affect control and AlstR-expressing cells. Few cells were transfected in each cortical slice (2–10/slice), thus alterations of global neural activity cannot be responsible for the observed effects. Together, these results suggest that reduction of basket cell excitability may affect the number of potential targets contacted by basket cells without affecting the extent of perisomatic innervation occurring on contacted cells.

To suppress neurotransmitter release, we used TeNT-Lc fused with EGFP, which has been shown to efficiently block both evoked and spontaneous neurotransmitter release in dissociated hippocampal neurons (Ben Fredj et al., 2010). This manipulation induced completely different effects from those observed with AlstR. Basket cells expressing TeNT-Lc from EP17–24 were characterized by denser axonal arbors and an increased number of smaller, homogenous boutons around the innervated somata compared with control cells (Fig. 2 *A, C*). Quantitative analysis showed that terminal branching and perisomatic bouton density were indeed significantly increased (Fig. 2 *E, F*; boutons/soma  $\pm$  SEM =  $9.4 \pm 0.2$  for controls versus  $15.0 \pm 1.6$  for TeNT-Lc-expressing cells, one-way ANOVA, Tukey's test,  $p < 0.05$ ) and bouton size reduced (Fig. 2 *H*; bouton size  $\pm$  SEM =  $0.98 \pm 0.03 \mu\text{m}$  for controls versus  $0.60 \pm 0.03 \mu\text{m}$  for TeNT-Lc-cells, one-way ANOVA, Holm-Sidak's test,  $p < 0.001$ ). Axon density was also significantly increased in TeNT-Lc-cells compared with control basket cells (axon length ( $\mu\text{m}$ )/volume ( $\mu\text{m}^3$ )( $\times 10^{-3}$ )  $\pm$  SEM =  $9 \pm 2$  for TeNT-Lc-cells vs  $5.7 \pm 0.4$  and  $4.7 \pm 0.6$  for AlstR and control cells, respectively,  $n = 5$  for control and  $n = 3$  for TeNT-Lc and AlstR cells, one-way ANOVA  $p < 0.05$ ). On the other hand, the average total bouton density per field was not statistically different in TeNT-Lc-expressing basket cells compared with AlstR-expressing and control cells (bouton/10  $\mu\text{m}$  axon length  $\pm$  SEM =  $4.1 \pm 0.2$  for controls

vs  $4.4 \pm 0.2$  and  $4.5 \pm 0.6$  for AlstR and TeNT-Lc cells, one-way ANOVA  $p > 0.05$ ). The vast majority of GFP-labeled boutons in basket cells expressing TeNT-Lc colocalized with GAD65, a presynaptic GABAergic marker (Fig. 2 D), thus suggesting a size reduction of synaptic contacts caused by the suppression of neurotransmission. Conversely, the percentage of innervated somata was not significantly affected (Fig. 2G), suggesting that the complete blockade of GABA release might affect local synapse and branches dynamics (the balance between elimination and addition of new synapses and branches) without changing the number of target cells contacted by the basket cell.

Next, we investigated whether these two manipulations could affect basket cell innervation after the peak of perisomatic bouton formation, from EP26 to EP32. Similar to what we observed during the maturation phase, reducing neural excitability in single basket interneurons by allatostatin-mediated AlstR activation did not affect bouton density, terminal branching, or bouton size (Fig. 4 A, B, D, E, G; boutons/soma  $\pm$  SEM =  $11.1 \pm 0.8$  for controls vs  $11.0 \pm 0.3$  for AlstR-cells; bouton size  $\pm$  SEM =  $1.02 \pm 0.02$   $\mu\text{m}$  for control vs  $1.01 \pm 0.01$  for AlstR-cells; one-way ANOVA, Holm-Sidak's test,  $p > 0.05$ ), while it significantly reduced the percentage of targeted neural somata (quantified in axonal fields  $<150$   $\mu\text{m}$  from the basket cell soma) as compared with controls (Fig. 4F;  $70 \pm 3\%$  for controls vs  $50 \pm 3\%$  for AlstR-cells; one-way ANOVA, Holm-Sidak's test,  $p < 0.001$ ). Surprisingly, suppressing neurotransmitter release in this time window caused completely different effects as compared with the earlier phase. TeNT-Lc transfected basket cells formed perisomatic innervation with fewer terminal axon branches and fewer, irregular-sized boutons around innervated somata compared with control cells (Fig. 4 A, C). Quantitative analysis showed significantly reduced axonal branching, bouton density (Fig. 4 D–E; boutons/soma  $\pm$  SEM =  $11.1 \pm 0.8$  for control vs  $5.11 \pm 0.4$  for TeNT-Lc cells; one-way ANOVA, Holm-Sidak's test,  $p < 0.05$ ), and perisomatic bouton sizes (Fig. 4G, mean bouton size  $\pm$  SEM =  $1.02 \pm 0.02$   $\mu\text{m}$  for controls vs  $0.76 \pm 0.05$   $\mu\text{m}$  for TeNT-Lc cells; one-way ANOVA, Holm-Sidak's test,  $p < 0.05$ ). In addition, suppressing neurotransmitter release caused an even more drastic reduction in percentage of innervated cells as compared with allatostatin treatment (Fig. 4 F;  $70 \pm 3\%$  for controls,  $50 \pm 3\%$  for AlstR cells, and  $39 \pm 4\%$  for TeNT-Lc cells; one-way ANOVA, Holm-Sidak's test,  $p < 0.001$ ). Axon density was significantly decreased in both TeNT-Lc- and

AlstR-expressing cells compared with control basket cells (axon length ( $\mu\text{m}$ )/volume ( $\mu\text{m}^3$ )( $\cdot 10^{-3}$ )  $\pm$  SEM =  $9.6 \pm 0.6$  for controls vs  $6 \pm 2$  and  $4.5 \pm 0.5$  for AlstR and TeNT-Lc cells, respectively;  $n = 5$  for control,  $n = 4$  for AlstR, and  $n = 3$  for TeNT-Lc cells, one-way ANOVA,  $p < 0.05$ ), while average total bouton density per field was invariant (bouton/ $10 \mu\text{m}$  axon length  $\pm$  SEM =  $2.7 \pm 0.5$  for controls vs  $2.6 \pm 0.6$  and  $3.7 \pm 0.6$  for AlstR- and TeNT-Lc-expressing cells, one-way ANOVA,  $p > 0.05$ ). After EP26, the number of perisomatic boutons and the extent of terminal branching are stable overall (Chattopadhyaya et al., 2004, 2007). By analyzing completely reconstructed basket cell axon arbors, however, we found that the percentage of contacted cells decreased slightly but significantly from EP26 to EP32 (Fig. 3,  $67 \pm 1\%$  for EP24 and  $61 \pm 1\%$  for EP32 basket cells,  $t$  test,  $p < 0.05$ ), suggesting an ongoing pruning process occurring during this period.

All together, these results indicate that basket cell excitability and neurotransmitter release play distinct and specific roles during the different stages of the establishment of the basket cell's innervation field.

## 1.5 Discussion

Activity guides the patterning of synaptic connections in the developing nervous system. Specifically, differences in the activity of converging inputs are thought to cause elimination of synapses from less active inputs and increase connectivity with more active inputs. This is supported by numerous studies in the visual and neuromuscular systems (Buffelli et al., 2003; Ruthazer et al., 2003; Huberman et al., 2008). However, recent results have challenged this notion. Studies of RGC axons in the zebrafish tectum showed that activity could regulate branch addition and stability rather than retraction (Hua et al., 2005; Ben Fredj et al., 2010). A second study (Kerschensteiner et al., 2009) showed that rather than engaging in competition, the axons of ON and OFF bipolar cells refine their connectivity with RGCs independent of one another even when they converge stably onto a single postsynaptic cell. Therefore, even for excitatory synapses, there appears to be different mechanisms for the role of activity in circuit refinement. This makes it even harder to predict how neural activity

might modulate GABAergic innervation, which is characterized by a dense, local axon arbor, as opposed to projecting inputs, and involves an inhibitory neurotransmitter.

As key mediators of neural activity, neurotransmitters are particularly well placed to couple the activation state of a cell with synaptic morphogenesis and refinement. A previous study from Chattopadhyaya et al. (2007) showed that single basket cell knockdown of *Gad1*, which encodes for GAD67, the enzyme responsible for the majority of GABA synthesis (~90%; Pinal and Tobin, 1998) during the maturation of perisomatic innervation, reduced both perisomatic bouton density and the number of cells innervated by the affected basket cell. *Gad1* knock-out strongly reduces but does not completely eliminate GABA synthesis, as GAD65, the other GABA-synthesizing enzyme, is still expressed in the basket cell. In this study, we used two different approaches to modulate neurotransmission: allatostatin-mediated activation of *AlstR* to reduce neuron excitability and action potential firing, which in turn reduces neurotransmitter release (Birgül et al., 1999), and *TeNT-Lc* expression to suppress both stimulus-evoked and spontaneous release of synaptic vesicles (Ben Fredj et al., 2010). Our results show that reducing levels of neurotransmission decreased the number of targeted postsynaptic cells by a single basket cell in both of the developmental time windows studied, namely, during and after the maturation of perisomatic innervation, while suppressing neural transmission had opposing effects depending on the developmental stage of the basket cell.

During the maturation phase of perisomatic GABAergic innervation, a minimal level of GABA release seems to be necessary to engage the mechanisms that select nascent contacts, based most likely on the correctness of the postsynaptic target or on the relative synaptic strength compared with neighboring synaptic contacts. The idea that neurotransmitters inhibit synapse formation has a precedent in neuromuscular junction formation, where evidence shows that ACh destabilizes nascent postsynaptic sites by dispersing postsynaptic receptors, and that one major physiological role of agrin is to counteract this antisynaptogenic influence (Misgeld et al., 2005). *TeNT-Lc*-expressing basket cells from EP17–24 show a normal innervation pattern in terms of the number of innervated cells, however, they form more synapses and terminal branches around each innervated neuron. This result is consistent with the hypothesis that GABAergic transmission is not



necessary for targeted selection (Huang et al., 2007) but plays a role in synapse validation and stabilization.

It has been suggested that in the hippocampus, a single pyramidal cell may receive perisomatic inputs from 5 to 7 basket cells. It is possible that different basket cells compete for the control of a target cell, with neurotransmission serving as a natural indicator of the activity of the basket cells and of the stronger/more efficient synapses. A basket interneuron that is less capable of eliciting a response from the target than the neighbor basket cells, as in the case of AlstR- expressing basket cells, may start to lose targets but will still form normal perisomatic innervation on the targets that are retained. If GABA transmission is even more drastically reduced, as in *Gad1* knock-out cells, the basket cell will start to lose territory and form only smaller and fewer synapses on the pyramidal cells that it still innervates. Our observations are consistent with what has been shown for the neuromuscular junction, where interaxonal differences in the ability of an axon to activate a muscle fiber can account for the outcome of synaptic competition (Buffelli et al., 2003; Kasthuri and Lichtman, 2003), therefore suggesting that local cortical interneurons might follow similar rules for the control of the axonal arbor territory as projection neurons.

One caveat is that AlstR activation induces hyperpolarization of the entire neuron while TeNT-Lc does not, which could differentially affect gene expression by the basket cell and in turn its ability to form or eliminate synapses. Basket cells transfected with both AlstR and TeNT-Lc and treated with allatostatin from EP17 to EP24 form perisomatic innervations indistinguishable from those formed by basket cells transfected with TeNT-Lc only (our unpublished observation), suggesting that reduced cell excitability does not influence the ability of a basket cell to form supranumerary synapses following the suppression of neurotransmitter release. However, we cannot rule out that presynaptic factors other than neurotransmitter release levels play a role on the effects observed following AlstR activation.

Further, Ben Fredj et al. (2010) showed that TeNT-Lc expression completely suppressed evoked neurotransmitter release and reduced, but did not completely suppress, spontaneous fusion of synaptic vesicles; thus, a low level of spontaneous release of GABA may still occur. It is also possible that TeNT-Lc might block fusion of vesicles carrying

signals other than neurotransmitters. In a recent study, Huang and collaborators (Wu et al., 2012) completely blocked GABA release in single basket cells during the peak of perisomatic synapse proliferation, either by simultaneously removing GAD67 and GAD65 or by removing the GABA vesicular transporter vGAT, and found increased density and reduction in size of the boutons formed by basket cell axons, consistent with our results. Thus, it is likely that the majority, if not all, of the effects we observed in TeNT-Lc-expressing cells are mainly due to the suppression of GABA release.

In summary, we found that the establishment of a mature basket axonal arbor territory occurs in two phases. During the peak of perisomatic synapse proliferation, neurotransmitter release plays the dual role of promoting both synapse elimination and synapse maturation. It is possible that GABAergic synaptic transmission produces two signals, a “protective/rewarding” signal and an “elimination/punishing” signal. A less active synapse would have reduced production of these signals, and thus, in the absence of protection, would be susceptible to the elimination signal from neighboring, more active synaptic sites. On the other hand, suppression of neurotransmission would also eliminate the punishing signal and explain the supranumerary synapses formed by basket cells expressing TeNT-Lc. A similar model has been suggested to take place during the process of activity-dependent axon elimination at the neuromuscular junction (Lichtman and Colman, 2000). It is interesting to note that GABA release from neighboring, untransfected basket cells seems unable to rescue the effects of TeNT-Lc expression, suggesting that the punishing signal might have a direct paracrine effect on the basket cell axon. Conversely, the production of and/or ability to respond to the reward signal might depend on the relative activity levels of neighboring basket cells. Identifying the molecular identities of the rewarding and punishing signals activated by GABA release is the key step to shed light on the cellular mechanisms involved during this developmental phase.

After this phase, and in a relatively short time, basket cell response to suppressed neurotransmission changes, and the maintenance of its innervation field becomes exquisitely dependent on neurotransmission levels, as supported by the fact that TeNT-Lc-expressing cells show a more severe phenotype as compared with AlstR-transfected ones. The molecular

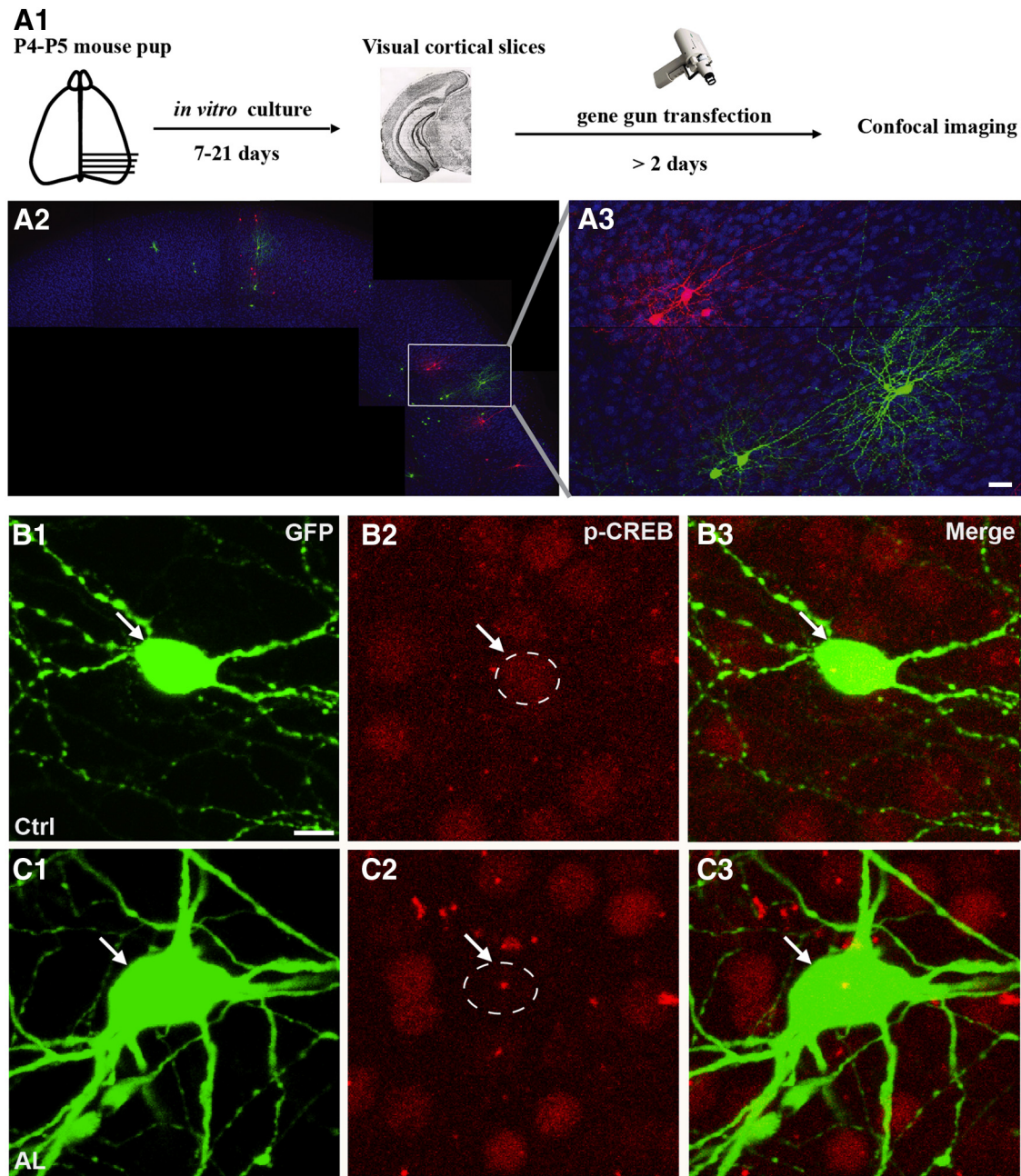
mechanisms underlying this switch are currently unknown, but it could involve either presynaptic changes (for example, in the transcriptional profile of the basket cells) and/or changes in pyramidal cells and glia-derived factors, which could retrogradely modulate GABAergic axons.

Taken together, our results show for the first time that neural activity and neurotransmission function in the refinement of GABAergic basket cell innervation follows different rules at different developmental stages. Selective modulation of inhibitory networks is currently being investigated as a tool to reintroduce plasticity, and, therefore, facilitate the restoration of normal function to the diseased brain (Southwell et al., 2010). A better comprehension of the molecular mechanisms regulating GABAergic innervation might aid these efforts.

## **1.6 Acknowledgements**

We thank Drs. Bidisha Chattopadhyaya, Edward S. Ruthazer, Elsa Rossignol, Z. Josh Huang, and Xiaoyun Wu for critical reviewing of this manuscript. TeNT-Lc::GFP was a kind gift of Dr. Martin P. Meyer (King's College London, UK). AlstR was a kind gift of Drs. Keith K. Murai and Sabrina Chierzi (McGill University, Canada).

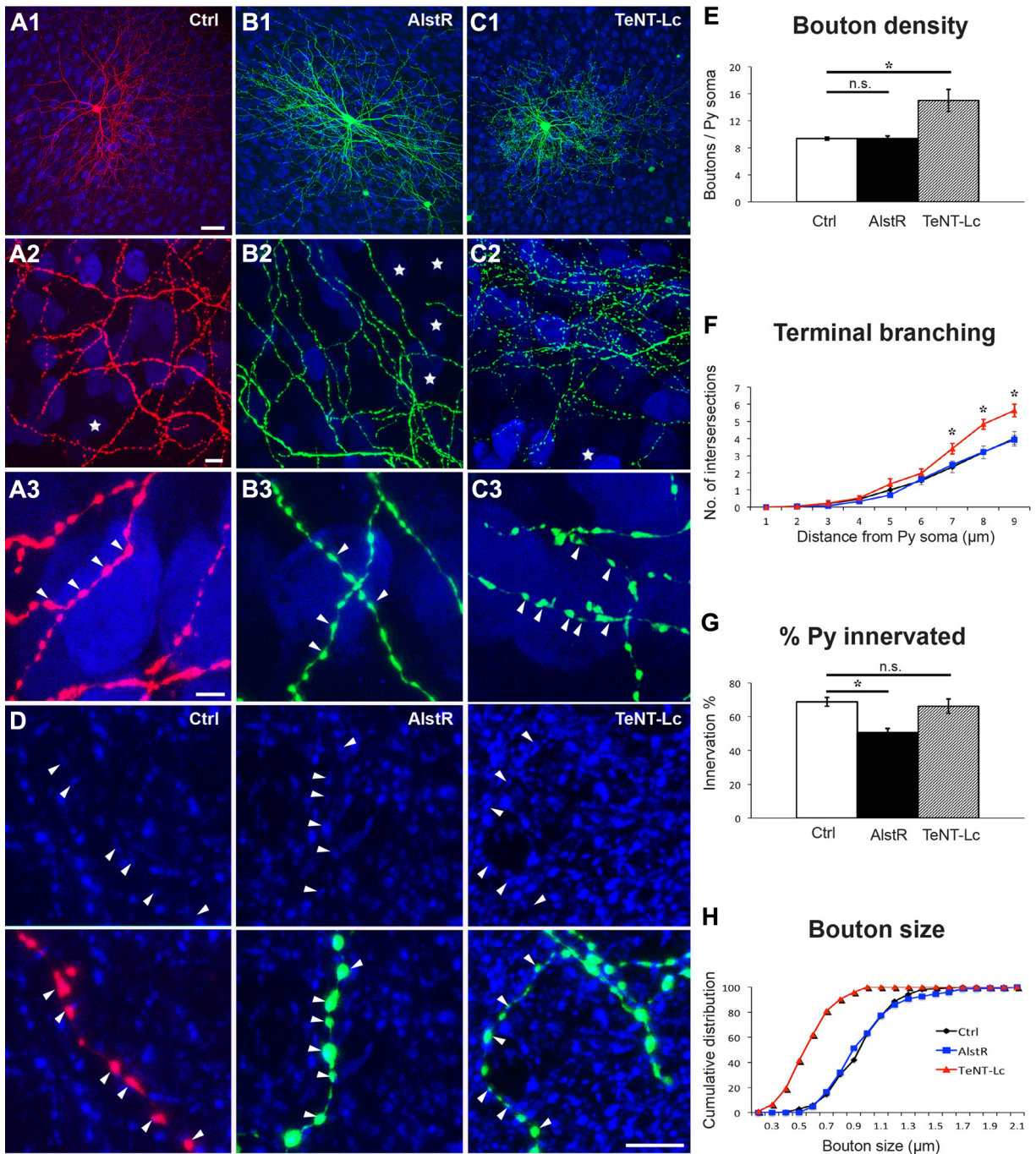
## 1.7 Figures



**Figure 1. Activation of AlstR reduces activity-dependent increase of pCREB expression.**  
*A*, Schematics of experimental procedure. Cortical organotypic cultures were biolistically transfected with  $P_{G67}$ -GFP/ $P_{G67}$ -AlstR and  $P_{G67}$ -tdTomato to colabel allatostatin-expressing cells in green and control basket cells in red in the same organotypic slice. *B*, *C*,  $P_{G67}$ -GFP/ $P_{G67}$ -AlstR transfected basket cells treated with allatostatin (*C*) show decreased nuclear pCREB immunoreactivity (*C2*, arrow) compared with untransfected neighboring cells,

whereas pCREB levels in untreated, AlstR-transfected basket cells (*B*) do not differ from neighboring cells (*B2*, arrow). Scale bar, 10  $\mu$ m.

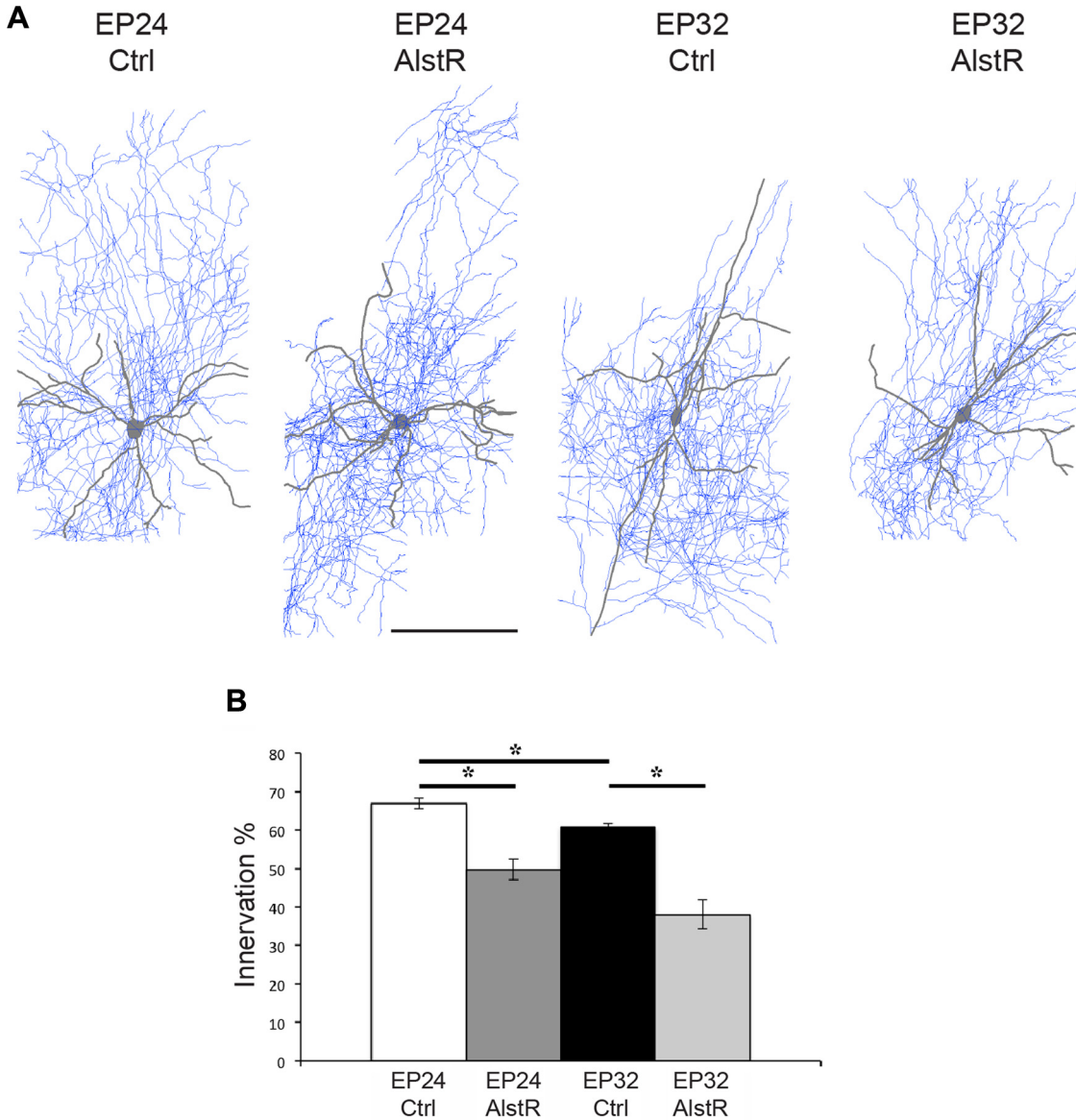




**Figure 2. Reducing basket cell excitability and suppressing neurotransmitter release have opposite effects during the peak of perisomatic synapse maturation.**

*A*, Control basket cell (Ctrl, red) at EP24 with exuberant innervation field characterized by extensive branching contacting the majority of potential targets, dense boutons along axons (*A2*), and terminal branches with prominent and clustered boutons (*A3*, arrowheads) around pyramidal cell somata (NeuN immunostaining, blue). Stars indicate pyramidal cell somata that are not innervated in the projected confocal stack. *B*, AlstR-expressing basket cell (green) treated with allatostatin from EP17–24 shows overall similar axon size and morphology (*B1*),

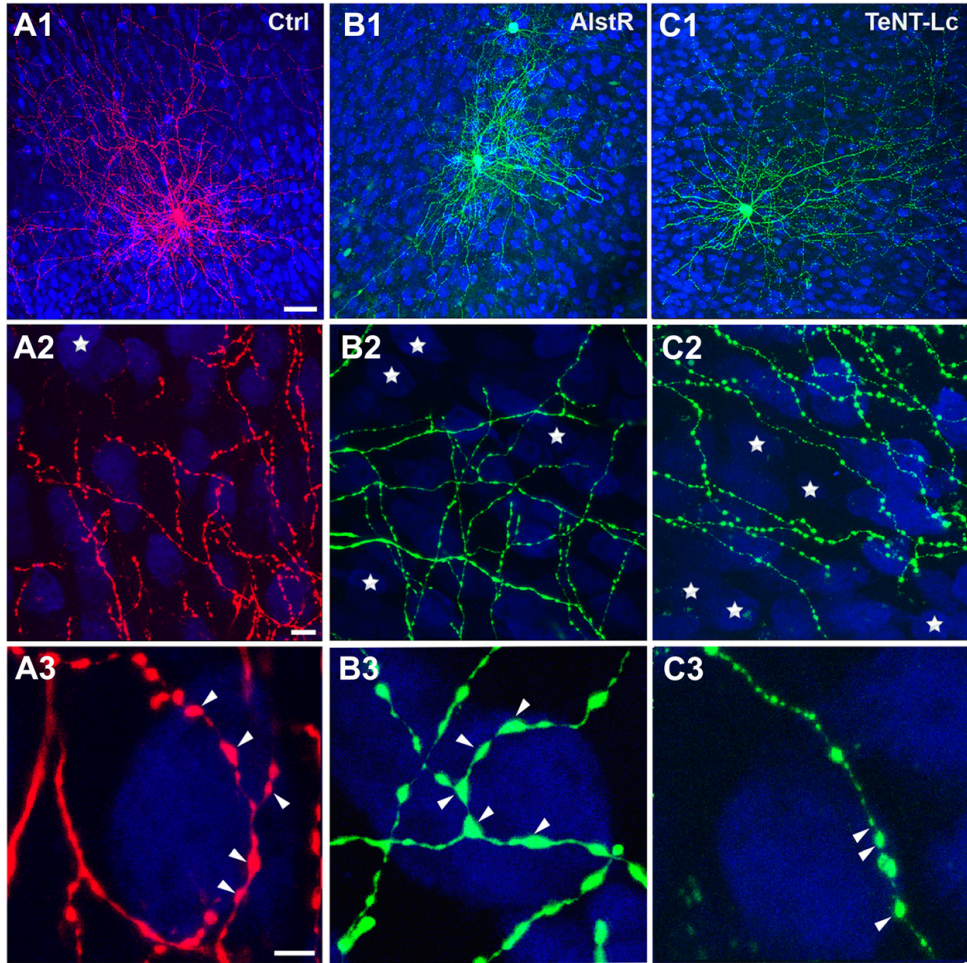
however, it is easier to find noninnervated targets in the axonal arbor territory (**B2**, stars). Terminal branching, bouton size, and density (**B3**) around innervated pyramidal cell somata appear similar to those from control cells. **C**, TeNT-Lc-expressing basket cell (green) shows overall similar axon size (**C1**). The fraction of innervated targets does not appear affected (**C2**), however, perisomatic innervations are characterized by more numerous, smaller-looking boutons (**C3**, arrowheads) compared with Ctrl cells. **A3**, **B3**, and **C3** are from regions in **A2**, **B2**, and **C2**. Scale bars (in **A1**) **A1–C1**, 50  $\mu\text{m}$ ; (in **A2**) **A2–C2**, 10  $\mu\text{m}$ ; (in **A3**) **A3–C3**, 5  $\mu\text{m}$ . **D**, GFP or RFP-positive boutons colocalize with GAD65 (blue) in controls, AlstR or TeNT-Lc basket cells, suggesting that even the smaller boutons in TeNT-Lc-transfected cells express GABAergic synaptic markers. Scale bar, 5  $\mu\text{m}$ . **E**, **F**, AlstR-expressing cells show no differences in bouton density (**E**) and terminal branching (**F**) compared with aged-matched controls ( $p > 0.05$ , n.s.), whereas TeNT-Lc-expressing cells show a statistically significant increase of both parameters ( $*p < 0.05$ );  $n = 67$  perisomatic innervations from 6 control basket cells for controls, 58 innervations from 6 AlstR basket cells, and 60 perisomatic innervations from 6 TeNT-Lc basket cells. **G**, At EP24, the fraction of potentially innervated targeted neurons is not affected for TeNT-Lc-expressing cells, but it is significantly reduced for AlstR-transfected cells ( $*p < 0.05$ );  $n = 6$  basket cells for all experimental groups. **H**, Bouton size is significantly reduced in TeNT-Lc-transfected cells compared with controls and AlstR-expressing cells (Kolmogorov-Smirnov (K-S) test,  $p < 0.001$ );  $n = 150$  boutons from 6 basket cells for each group. Values in **D–F** represent mean  $\pm$  SEM.



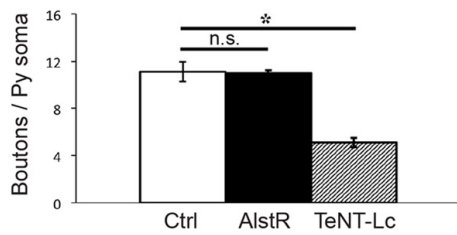
**Figure 3. Basket cell axon analysis suggests the occurrence of pruning after the peak of perisomatic synapse proliferation.**

**A**, Examples of fully reconstructed basket cells. Scale bar, 150  $\mu\text{m}$ . **B**, Full axon reconstruction of control basket cells at EP24 and EP32 show that the percentage of potentially innervated cells is significantly smaller at EP32 compared with EP24 ( $*p < 0.05$ ,  $n = 5$  for both ages). In addition, AlstR activation from EP17–24 ( $n = 3$ ) and from EP26–32 ( $n = 3$ ) significantly reduces the fraction of innervated cells ( $*p < 0.05$ ), consistent with what was shown by quantifying the innervation percentage in confocal stacks acquired in the first 150  $\mu\text{m}$  from the basket cell soma (Fig. 2G).

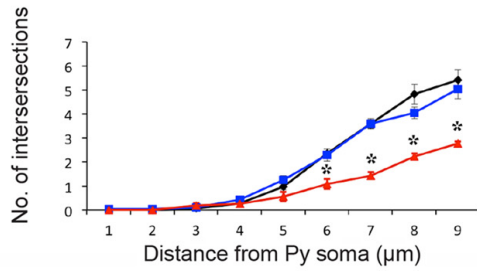




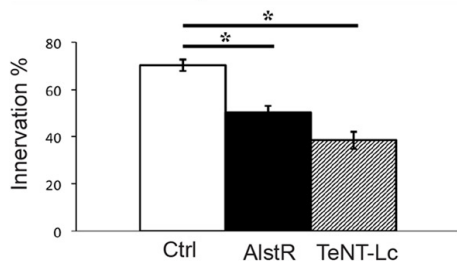
**D Bouton density**



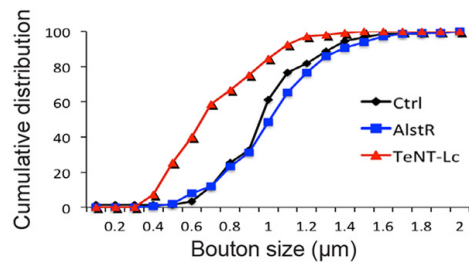
**E Terminal branching**



**F % Py innervated**



**G Bouton size**



**Figure 4. Suppressing neurotransmitter release after the peak of perisomatic synapse maturation induces a more severe loss of perisomatic innervations than reducing neural excitability.**

*A–C*, Activation of AlstR from EP26 –32 does not affect terminal branching or perisomatic boutons formed by AlstR-expressing cells (*B3*, arrowheads) compared with controls (*A3*), but it diminishes the number of potentially innervated postsynaptic cells (*A2*, *B2*; stars represent noninnervated pyramidal somata in the projected confocal stack). On the other hand, TeNT-Lc-expressing cells show a reduction both in percentage of innervated cells (*C2*) and perisomatic innervation (*C3*). Boutons appear more irregular with some large and many smaller ones (arrowheads). *A3*, *B3*, and *C3* are from regions in *A2*, *B2*, and *C2*. Scale bars: (in *A1*) *A1–C1*, 50  $\mu\text{m}$ ; (in *A2*) *A2–C2*, 10  $\mu\text{m}$ ; (in *A3*) *A3–C3*, 5  $\mu\text{m}$ . *D*, *E*, Quantification shows that terminal branching and perisomatic bouton density is significantly affected only in TeNT-Lc-transfected cells, but not by AlstR activation ( $*p < 0.001$ );  $n = 60$  perisomatic innervations from 6 basket cells for each experimental group. *F*, At EP32, both AlstR- and TeNT-Lc-expressing cells show reduced innervation of pyramidal somata compared with control ( $*p < 0.001$ );  $n = 6$  basket cells for each group. *G*, AlstR-expressing cells have normal-sized boutons compared with controls, but TeNT-Lc-expressing cells show a significant reduction in bouton size (K-S test,  $p < 0.001$ );  $n = 6$  basket cells and 150 boutons. Values in *D–F* represent mean  $\pm$  SEM.

## 1.8 References

- Ango F, di Cristo G, Higashiyama H, Bennett V, Wu P, Huang ZJ (2004) Ankyrin-based subcellular gradient of neurofascin, an immunoglobulin family protein, directs GABAergic innervation at Purkinje axon initial segment. *Cell* 119:257–272.
- Ango F, Wu C, Van der Want JJ, Wu P, Schachner M, Huang ZJ (2008) Bergmann glia and the recognition molecule CHL1 organize GABAergic axons and direct innervation of Purkinje cell dendrites. *PLoS Biol* 6(4):e103.
- Ben Fredj N, Hammond S, Otsuna H, Chien CB, Burrone J, Meyer MP (2010) Synaptic activity and activity-dependent competition regulates axon arbor maturation, growth arrest, and territory in the retinotectal projection. *J Neurosci* 30:10939–10951.
- Birgül N, Weise C, Kreienkamp HJ, Richter D (1999) Reverse physiology in *drosophila*: identification of a novel allatostatin-like neuropeptide and its cognate receptor structurally related to the mammalian somatostatin/galanin/opioid receptor family. *EMBO J* 18:5892–5900.
- Bosman LW, Konnerth A (2009) Activity-dependent plasticity of developing climbing fiber-Purkinje cell synapses. *Neuroscience* 162:612–623.
- Buffelli M, Burgess RW, Feng G, Lobe CG, Lichtman JW, Sanes JR (2003) Genetic evidence that relative synaptic efficacy biases the outcome of synaptic competition. *Nature* 424:430–434.
- Chattopadhyaya B, Di Cristo G, Higashiyama H, Knott GW, Kuhlman SJ, Welker E, Huang ZJ (2004) Experience and activity-dependent maturation of perisomatic GABAergic innervation in primary visual cortex during a postnatal critical period. *J Neurosci* 24:9598–9611.
- Chattopadhyaya B, Di Cristo G, Wu CZ, Knott G, Kuhlman S, Fu Y, Palmiter RD, Huang ZJ (2007) GAD67-mediated GABA synthesis and signaling regulate inhibitory synaptic innervation in the visual cortex. *Neuron* 54:889–903.
- Di Cristo G, Chattopadhyaya B, Kuhlman SJ, Fu Y, Bélanger MC, Wu CZ, Rutishauser U, Maffei L, Huang ZJ (2007) Activity-dependent PSA expression promotes the maturation of GABA inhibition and the onset of critical period plasticity. *Nat Neurosci* 10:1569–1577.
- Hua JY, Smear MC, Baier H, Smith SJ (2005) Regulation of axon growth in vivo by activity-based competition. *Nature* 434:1022–1026.
- Huang ZJ, Di Cristo G, Ango F (2007) Development of GABA innervation in cerebral and cerebellar cortex. *Nat Rev Neurosci* 8:673–686.
- Huberman AD, Feller MB, Chapman B (2008) Mechanisms underlying development of visual maps and receptive fields. *Annu Rev Neurosci* 31:479–509.

Kasthuri N, Lichtman JW (2003) The role of neural identity in synaptic competition. *Nature* 424:426 – 430.

Kerschensteiner D, Morgan JL, Parker ED, Lewis RM, Wong RO (2009) Neurotransmission selectively regulates synapse formation in parallel circuits in vivo. *Nature* 460:1016 –1020.

Lichtman JW, Colman H (2000) Synapse elimination and indelible memory. *Neuron* 25:269 – 278.

Marina N, Abdala AP, Trapp S, Li A, Nattie EE, Hewinson J, Smith JC, Paton JF, Gourine AV (2010) Essential role of Phox2b-expressing ventrolateral brainstem neurons in the chemosensory control of inspiration and expiration. *J Neurosci* 30:12466 –12473.

Misgeld T, Kummer TT, Lichtman JW, Sanes JR (2005) Agrin promotes synaptic differentiation by counteracting an inhibitory effect of neurotransmitter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:11088 –11093.

Pinal CS, Tobin AJ (1998) Uniqueness and redundancy in GABA production. *Perspect Dev Neurobiol* 5:109 –118.

Rossignol E (2011) Genetics and function of neocortical GABAergic interneurons in neurodevelopmental disorders. *Neural Plast* 2011, 2011:649325.

Ruthazer ES, Akerman CJ, Cline HT (2003) Control of axon branch dynamics by correlated activity. *Science* 301:66 –70.

Southwell DG, Froemke RC, Alvarez-Buylla A, Stryker MP, Gandhi SP (2010) Cortical plasticity induced by inhibitory neuron transplantation. *Science* 327:1145–1148.

Wu X, Fu Y, Knott G, Lu J, Di Cristo G, Huang ZJ (2012) GABA signaling promotes synapse elimination and axon pruning in developing cortical inhibitory interneurons. *J Neurosci* 32:331-43.

Zhou Y, Won J, Karlsson MG, Zhou M, Rogerson T, Balaji J, Neve R, Poirazi P, Silva AJ (2009) CREB regulates excitability and the allocation of memory to subsets of neurons in the amygdala. *Nat Neurosci* 12:1438 – 1443.

#### **4. p75NTR Activation in Cortical Basket Cells Regulates the Maturation of their Synaptic Fields and Promotes Ocular Dominance Plasticity in Adult Visual Cortex.**

Elie Baho<sup>1,2</sup>, Bidisha Chattopadhyaya<sup>1,2</sup>, Mariol Lavertu-Jolin<sup>1,2</sup>, Raffaele Mazziotti<sup>3</sup>, Patricia N.Awad<sup>1,2</sup>, Tommaso Pizzorusso<sup>3,4</sup>, Laura Baroncelli<sup>3</sup>, Graziella Di Cristo<sup>1,2,\*</sup>.

*Affiliations:*

1. Neurosciences Department - Université de Montréal, Montréal, Québec H3C 3J7, Canada.

2. CHU Sainte-Justine Research Center, Montréal, Québec, H3T 1C5, Canada.

3. Institute of Neuroscience CNR, Pisa, Italy.

4. Department of Neuroscience, Psychology, Drug Research and Child Health  
NEUROFARBA, University of Florence, Firenze, Italy.

\*Corresponding author

Graziella Di Cristo,

Research Center, CHU Ste-Justine

3175, Côte-Sainte-Catherine, Montréal, QC H3T 1C5, Canada.

## 1.1 Abstract

Cortical GABAergic basket cells (BCs) strongly regulate gamma oscillation generation and the timing of critical period plasticity during brain development. Although the function of BCs within cortical networks is being explored, the mechanisms that control the development of their extensive arborisation and synaptic contacts have not been entirely resolved. Tropomyosin-related kinase B (TrkB) receptor signalling activated by Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) binding strongly modulates the maturation of GABAergic synapses, including synapses formed by BCs. BDNF is synthesized as a precursor, proBDNF which is cleaved to produce mature (m)BDNF. mBDNF and proBDNF bind with high-affinity TrkB and p75NTR, respectively. Whether proBDNF-mediated p75NTR activation plays a role in the development of BC innervation fields is unknown. By using a single-cell genetic deletion approach in mouse cortical organotypic cultures, we found that proBDNF negatively modulates BC innervation fields in a cell-autonomous fashion, through activation of p75NTR expressed by BCs. We further found that proBDNF-mediated activation of p75NTR onto BCs in adult visual cortex *in vivo* is sufficient to destabilize GABAergic connectivity and to re-introduce juvenile-like cortical plasticity following monocular deprivation. All together, these data suggest that modulation of BC p75NTR activation dynamically regulates GABAergic connectivity, and may be a novel tool to foster brain plasticity in the adult.

## 1.2 Introduction

Within the forebrain, GABAergic ( $\gamma$ -aminobutyric acid producing) interneurons possess the largest diversity in morphology, connectivity, and physiological properties. A fascinating hypothesis is that different interneurons may play partially distinct roles in neural circuit function and behavior. Cortical parvalbumin (PV)-positive basket cells (BC) specifically target the soma and proximal dendrites of pyramidal cells. BC can adjust the gain of the integrated synaptic responses and have been implicated in synchronizing the firing of neuronal populations and the generation of gamma oscillations<sup>1,2</sup>, which are important for the maintenance of attention, working memory and for the refinement of executive functions in humans and rodents<sup>3-5</sup>. Importantly, BCs have also been involved in experience-dependent

development of cortical circuits. Indeed, many studies on the visual cortex have proposed that the timing of the critical period of heightened plasticity is set by BC maturation<sup>6-9</sup>.

BC function is reflected by their pattern of connectivity: they innervate hundreds of postsynaptic targets with multiple synapses clustered around the cell body and proximal dendrites. How do BCs decide the number of target cells to innervate and how many synaptic connections to form around each postsynaptic target? Recent studies suggest that while subcellular target selection is most likely regulated by molecular cues<sup>10,11</sup>, synapse proliferation is dependent upon neural activity levels and sensory experience<sup>12-15</sup>. Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF) is a potent regulator of the latter process<sup>16</sup>. In particular, activity-dependent transcription of BDNF is required specifically for GABAergic, but not glutamatergic, synapse development and plasticity<sup>17,18</sup>. BDNF is synthesized as a precursor (pre-proBDNF) resulting in a 32-kDa proBDNF protein after cleavage<sup>19,21</sup>. Recent studies have shattered the traditional view that proBDNF is functionally inactive. First, it has been shown that proBDNF binds with high affinity to the p75 neurotrophin receptor (p75NTR), which for years was considered a 'low-affinity' neurotrophin receptor. In contrast, mBDNF binds preferentially to TrkB receptor. Second, proBDNF is able to modulate different developmental processes<sup>20-27</sup>. For example, proBDNF promotes long-term depression (LTD) and reduce hippocampal dendritic complexity and spine density through activation of p75NTR<sup>24-26</sup>; while mBDNF promotes long-term potentiation (LTP) and increased dendritic and spine complexity through activation of TrkB receptor<sup>27</sup>. Here, we investigate whether proBDNF-mediated p75NTR signaling plays a role in the establishment of BC synaptic field.

### **1.3 Material and Methods**

#### **1.3.1 Cortical organotypic culture and biolistic transfection**

Slice culture preparation was performed as in (Chattopadhyaya et al, 2013) using mice pups of either sex. To exogenously overexpress the wild-type and cleavage-resistant forms of proBDNF, wt-proBDNF and mut-proBDNF (10 ng/ml, Alomone Labs) were respectively added with the

culture medium during a specified time window. Moreover to block p75NTR, to disrupt tPA-induced endogenous proBDNF cleavage and to overexpress tPA, REX antibody (50 µg/ml, Dr. Louis Reichardt, USF), PPACK peptide (50 µM, Molecular Innovations) and active tPA recombinant (2 mg/ml, Molecular Innovations) were respectively added with the culture medium. Gene gun transfection was performed as in (Chattopadhyaya et al, 2004; Baho, Di Cristo, 2012);Chattopadhyaya et al, 2013). p75NTR<sup>flx/flx</sup> mice were kindly gifted by Dr. Kaartinen (University of Michigan). In this mouse, exons 4-6 of p75NTR are flanked by two loxp sites (Bogenmann et al, 2011). To knock-out p75NTR in single basket cells, cortical slices from p75NTR-flx mice were transfected with P<sub>G67</sub>-Cre and P<sub>G67</sub>-GFP.

### 1.3.2 Analysis of basket cell innervation

Previous studies have shown that the basic features of maturation of perisomatic innervation by BCs onto pyramidal cells are retained in visual cortical organotypic cultures<sup>65,84</sup>. In organotypic cultures, basket interneurons start out with very sparse and simple axons, which develop into complex, highly branched arbors in the subsequent 4 weeks with a time course similar to that observed *in vivo*<sup>65</sup>. We focused our study in the third and fourth week during which a significant and stereotyped maturation of perisomatic innervation occurs<sup>65,66,88</sup>. For each experimental group, we took care to acquire an equal number of basket cells localized in layer 2/3 and 5/6. Confocal images of the basket cell axon arbors were taken in the first 150 µm from the basket cell soma using a SPE confocal microscope (Leica) and a 63X glycerol objective (NA 1.4). Confocal stack size was 116.4x116.4 µm with an average depth of 35-50 µm. Analysis of basket cell perisomatic innervation was performed as in (Chattopadhyaya et al, 2013). Only innervated target cells were included in this analysis.

To quantify the fraction of pyramidal cell somata potentially innervated by a basket cell axon, we divided the number of NeuN-positive neurons contacted by at least one GFP positive-bouton by the total number of NeuN-positive cells, in a confocal stack taken in the first 150 µm from the basket cell soma (at least 2 stacks per basket cell). We measured pyramidal cells density and found it to be invariant with respect to the different manipulations.



All data were first averaged per basket cells, thus statistical analysis was done using the number of basket cells as “n”.

### **1.3.3 Western Blots**

Western Blots were performed as in (Putignano et al, 2007). Bands corresponding to phosphorylated ERK (42kD and 44kD) were analyzed separately using ImageJ software 1.46r (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA, <http://imagej.nih.gov/ij>) and expressed as integrated density. Background integrated density was subtracted and the values were normalized to GAPDH integrated density. The average of normalized integrated density of control experiments was calculated and assigned a value of 1. The normalized values of the wt-proBDNF and mut-proBDNF treatments were then expressed as the relative of the control experiments.

### **1.3.4 Minipump implants**

Postnatal day 100 (P100) mice were implanted with Osmotic mini-pump under isoflurane anesthesia. Minipumps (model 1007D; flow rate 0.5  $\mu$ l/h; Alzet) were filled with mut-proBDNF (1  $\mu$ g/ml in filtered PBS, Alomone Laboratories) or vehicle and connected to a cannula (gauge 30) implanted directly in the primary visual cortex (2.5 mm lateral to the midline, 2.5 mm anterior to lambda). For immunohistochemistry analysis, animals were perfused 5 days after minipump implant.

### **1.3.5 Immunostaining and quantification**

Immunohistochemistry in organotypic cultures and mouse perfusion was performed as in (Chattopadhyaya et al., 2013). The following antibodies were used: NeuN (monoclonal, 1:400, Millipore), p75NTR (REX, 1:500, Dr. Louis Reichardt (USF) and G3231, 1:400, Promega), PV (monoclonal, 1:1000, Millipore), VGAT (Rabbit, 1:400, Cell Signaling). PNN staining was performed as in Pizzorusso et al. (2002). For *ex vivo* analysis, images were all acquired the same day using the identical confocal parameters and either 20x water immersion

objective (for analysis of the percentage of PV+ cells surrounded by PNN) or a 63x glycerol objective (for the analysis of PV, VGAT or PNN perisomatic rings). For each animal, two stacks were imaged in the layer 5 of the binocular visual cortex (V1) of each hemisphere (infused vs non-infused; 3 slices per animal). Z-stacks were acquired with a 1  $\mu$ m step, exported as TIFF files, and analyzed using ImageJ software. For each stack, PV, VGAT or PNN perisomatic rings were outlined and the integrated density levels were measured, after background subtraction, for both infused and non-infused hemispheres. The ratio of PV, VGAT or PNN intensity levels in the infused and non-infused hemispheres were then calculated.

### **1.3.6 Monocular Deprivation (MD) and *In Vivo* Electrophysiology**

MD was performed through eyelid suturing, as in Pizzorusso et al (2002). Subjects with even minimal spontaneous re-opening were excluded from the study. After 3 days of MD, animals were sedated with Isoflurane (Forane, Abbott) and anesthetized with urethane (i.p. injection; 1.5 g/kg; 20% solution in saline; Sigma, St. Louis, MO, USA), then placed in a stereotaxic frame. Body temperature was maintained at 37°C. A hole was drilled in the skull, corresponding to the binocular portion of the primary visual cortex (binocular area Oc1B), contralateral to the deprived eye. Dexamethasone (2 mg/kg) was administered subcutaneously to reduce secretions and edema and saline was periodically infused to prevent dehydration. Eyes were covered with a thin layer of silicone oil to avoid corneal opacities. Recordings were made using silicon microprobes (16 channels, NeuroNexus Technologies a2x2-tet-3mm-150-121) inserted into the cortex 3.0-3.2 mm from the  $\lambda$  point (Porciatti et al., 1999). Signals were acquired using Cheetah 5 (Neuralynx) and analyzed with custom software in Matlab (MathWorks).

#### Visual Stimulation

Stimuli were generated in Matlab using the Psychophysics Toolbox extensions (Pelli 1997, Brainard 1997) and displayed with gamma correction on a monitor (Sony Trinitron G500, 60 Hz refresh rate, 32 cd/m<sup>2</sup> mean luminance) placed 20 cm from the mouse, subtending 60-75° of visual space.

#### Visual evoked potentials (VEPs)

We measured contralateral to ipsilateral ratio of VEP amplitude to measure ocular dominance plasticity (Putignano et al., 2007). Extracellular signal was filtered from 1 to 275 Hz. VEPs in response to square wave patterns with a spatial frequency of 0.06 cpd and abrupt phase inversion (1 Hz temporal period), were evaluated in the time domain by measuring the P1 peak-to-baseline amplitude and latency. Computer controlled mechanical shutters were used to collect data from each eye.

### Single-Units

For single-unit recording extracellular signal was filtered from 0.6 to 6 kHz. Sampling rate: 33 kHz. Spiking events were detected on-line by voltage threshold crossing and waveforms of 1 ms were acquired around the time of threshold crossing. To improve isolation of units, recordings from groups of four neighboring sites (tetrode) were linked, so that each spike was composed by 4 waveforms. Then waveforms were processed using the OffLine Sorter software (Plexon). Drifting sinusoidal gratings were used as visual stimuli (1.5 s duration, temporal frequency of 2 Hz, 12 directions, 6 spatial frequency: 0.01, 0.02, 0.04, 0.08, 0.16, 0.32 cpd). Stimulation was repeated five times per eye, with stimulus conditions randomly interleaved, and two gray blank conditions (mean luminance) were included in all stimulus sets to estimate the spontaneous firing rate.

The average spontaneous rate for each unit was calculated by averaging the rate over all blank condition presentations. Responses at each orientation and spatial frequency were calculated by averaging the spike rate during the 1.5 s presentation and subtracting the spontaneous rate. The preferred stimulus was determined by finding the combination of spatial frequency and orientation that maximize the response, independently for each eye. Ocular Dominance Index (ODI) was calculated as follows:  $ODI = (\text{respContra} - \text{respIpsi}) / (\text{respContra} + \text{respIpsi})$ , where 'resp' is the response evoked by the preferred stimulus, 'Contra' and 'Ipsi' are respectively: contralateral and ipsilateral eye.

## **1.4 Results**

As a first step, we asked whether BCs express p75NTR during the period of basket cell synapse proliferation, which starts around the beginning of the 2<sup>nd</sup> postnatal week<sup>12</sup>. Using two different antibodies, we showed that BCs, identified by PV expression, expressed p75NTR

(Figure 1a, Suppl Figure 1). To address the role of p75NTR in the establishment of basket cell synaptic territory, we labeled isolated BCs in cortical organotypic cultures by driving GFP expression with a previously characterized PV promoter region (PG<sub>67</sub>)<sup>12-14,28</sup>. In this system, BCs start out with very sparse and simple axons, which develop into complex, highly branched arbors in the subsequent 4 weeks with a time course similar to that observed *in vivo*<sup>12,28</sup>. We treated organotypic cultures with a p75NTR-blocking antibody (REX, 50ug/ml) and quantified two aspects of BC innervation, the extent of perisomatic innervation around single somata (terminal branching, perisomatic synapse density) and the fraction of innervated somata (Figure 1b, c). REX-treated BCs from Equivalent Postnatal day (EP)10-18, before the peak of perisomatic synapse proliferation, were characterized by denser axonal arbors and increased number of boutons around the innervated somata as compared to control cells (Figure 1b, c). Quantitative analysis showed that perisomatic bouton density and terminal branching were indeed significantly increased (Figure 1d, E; boutons/soma  $\pm$  SEM = 5.5 $\pm$ 0.1 for ctrl versus 16.3 $\pm$ 2.6 for REX cells, t-test, p<0.05). REX treatment also increased the percentage of targeted neural somata as compared to controls (Figure 1f; 52 $\pm$ 5% for ctrl cells vs 81 $\pm$ 2% for REX, t-test, p<0.05). Similarly, REX-treatment from EP16 to EP24, during the peak of perisomatic bouton maturation, significantly increased bouton density and terminal branching without affecting the percentage of innervated cells (Figure 1d, e; boutons/soma  $\pm$  SEM = 9.6 $\pm$ 0.3 for ctrl versus 15.4 $\pm$ 1.3 for REX-cells, t-test, p < 0.05; 67 $\pm$ 3% and 74 $\pm$ 2% respectively, t-test, p > 0.05). The number of cells potentially contacted by BCs increases between EP18 and EP24, after which it reaches a plateau<sup>14</sup>.

In the cortex, pyramidal cells also express p75NTR<sup>29</sup>, thus the effects we observed on BC innervation field could be due to blocking p75NTR signaling in the BCs directly or indirectly through its activation on pyramidal neuron. To address this issue, we knocked-down p75NTR expression in BCs by transfecting PG67-CRE/GFP at EP10 in organotypic cultures from *p75NTR<sup>flx/flx</sup>* mice<sup>30</sup> to generate *p75NTR<sup>-/-</sup>* BCs in an otherwise wild-type background. Similarly to REX-treated BCs, EP18 *p75NTR<sup>-/-</sup>* BCs contacted more pyramidal cells and formed more axonal branching and perisomatic boutons compared to control *p75NTR<sup>flx/flx</sup>* BCs, which were transfected with PG67-GFP (Figure 2; boutons/soma  $\pm$  SEM = 5.7 $\pm$ 0.5 for *p75<sup>flx/flx</sup>* versus 14.0 $\pm$ 0.9 for *p75<sup>-/-</sup>* BCs; percentage of innervation, 48 $\pm$ 2% and 73 $\pm$ 2% for *p75<sup>flx/flx</sup>* *p75<sup>-/-</sup>* BCs, respectively, t-test, p<0.05). *p75NTR* deletion in single BCs during the

peak of perisomatic boutons proliferation (EP16-24) also increased bouton density and terminal branching without increasing the percentage of contacted cells (Figure 2d-e; boutons/soma  $\pm$  SEM =  $9.6 \pm 0.3$  vs  $13.5 \pm 0.7$  for  $p75^{\text{flx/flx}}$  and  $p75\text{NTR}^{-/-}$  BCs, respectively, t-test,  $p < 0.05$ ; percentage of innervation  $68 \pm 2\%$  and  $75 \pm 1\%$  for  $p75^{\text{flx/flx}}$  and  $p75^{-/-}$  BCs, respectively, t-test,  $p > 0.05$ ). Finally, we asked whether removing a single copy of  $p75\text{NTR}$  in single BCs proved to be enough to accelerate perisomatic BC synapses proliferation, by transfecting PG67-CRE/GFP at EP10-18 in cortical organotypic cultures from  $p75\text{NTR}^{+/flx}$  mice. Notably,  $p75\text{NTR}^{+/-}$  BCs showed complex synaptic field innervations that were indistinguishable from those formed by  $p75\text{NTR}^{-/-}$  BCs (Suppl Figure 2; boutons/soma  $\pm$  SEM =  $5.5 \pm 0.1$  for Ctrl BCs versus  $13.9 \pm 0.3$  for  $p75^{+/-}$  cells;  $52 \pm 5\%$  and  $74 \pm 2\%$  respectively, t-test,  $p < 0.05$ ). All together, these data show for the first time that  $p75\text{NTR}$  activation in cortical BCs constrains the extent of their synaptic innervation fields.

$p75\text{NTR}$  has been reported to bind proBDNF with high affinity. To investigate whether proBDNF regulate the development of BC synaptic territory, we treated organotypic cultures either with a wild-type form of proBDNF (wt-proBDNF, 10ng/ml, Alomone labs) or a cleavage-resistant mutant form of proBDNF (mut-proBDNF; 10ng/ml, Alomone labs) during the peak of BC synapse proliferation (EP16-24). We used wt-proBDNF in place of mBDNF because we reasoned that wt-proBDNF would be cleaved by endogenous mechanisms, therefore providing a more physiological increase of mBDNF levels in the tissue. Western blot analysis showed that pERK expression levels were increased following treatment with wt-proBDNF, but not mut-proBDNF (Suppl. Figure 3), therefore supporting the hypothesis that wt-proBDNF was indeed cleaved into mBDNF, which is a strong activator of the ERK pathway. wt-proBDNF treatment caused an increase in the number of perisomatic boutons and terminal branching, without affecting global innervation, a result consistent with increased mBDNF levels<sup>16</sup> (Figure 3a,b, e-g; boutons/soma  $\pm$  SEM =  $9.5 \pm 0.3$  for ctrl versus  $18 \pm 2$  for wt-proBDNF treated BCs; percentage of innervation:  $68 \pm 2\%$  for ctrl vs  $75 \pm 1\%$  for wt-proBDNF treated cells, one-way ANOVA  $p > 0.05$ ). On the other hand, BCs treated with mut-proBDNF contacted less than half the pyramidal cells compared to age-matched controls onto which they formed fewer boutons and terminal axonal branching (Figure 3c, e-g; boutons/soma  $\pm$  SEM =  $9.5 \pm 0.3$  for ctrl versus  $5.3 \pm 0.3$  mut-proBDNF treated cells, one-way ANOVA  $p < 0.05$ ; percentage of innervation:  $68 \pm 2\%$  for ctrl vs  $33 \pm 1\%$  for mut-proBDNF

treated BCs, one-way ANOVA  $p < 0.05$ ). This effect was not due to pyramidal cell death caused by an excess of proBDNF because neuron density (identified by NeuN immunostaining) was not altered compared to control or wt-proBDNF treated slices even after 6 days of treatment (data not shown). Next, we wondered whether increases in proBDNF levels may affect the maintenance of BC synaptic territory after it reached maturity (around EP28<sup>12-14,28</sup>). BCs treated with mut-proBDNF from EP26-32 showed a dramatic loss in both potential synaptic target and complexity of perisomatic innervation as compared to age-matched control BCs (Suppl. Figure 4; boutons/soma  $\pm$  SEM =  $10.2 \pm 0.7$  for ctrl versus  $5.0 \pm 0.2$  mut-proBDNF treated cells, one-way ANOVA  $p < 0.05$ ; percentage of innervation:  $69 \pm 2\%$  for ctrl vs  $36 \pm 4\%$  for mut-proBDNF treated BCs, one-way ANOVA  $p < 0.05$ ), to the point that morphologically they resembled EP18 BCs (before the synaptic proliferation phase; Compare Suppl. Fig.4c and Fig.1b). On the other hand, treatment with wt-proBDNF did not affect any of the analyzed parameters (Suppl. Figure 4; boutons/soma  $\pm$  SEM =  $10.2 \pm 0.7$  for ctrl vs  $10.6 \pm 0.4$  wt-proBDNF treated cells, one-way ANOVA  $p > 0.05$ ; percentage of innervation:  $69 \pm 2\%$  for ctrl vs  $65 \pm 3\%$  for wt-proBDNF treated BCs, one-way ANOVA  $p > 0.05$ ), suggesting that once BC synaptic field reached maturity it is more difficult to promote the axonal growth and bouton formation.

To investigate whether proBDNF effect on BC synapse innervation was specifically mediated by p75NTR activation, we knocked-out p75NTR from single BC in organotypic cultures prepared from *p75NTR<sup>flx</sup>* mice (as shown in Figure 2) and simultaneously treated them with mut-proBDNF. mut-proBDNF-treated *p75NTR<sup>-/-</sup>* cells still formed more complex synaptic innervations compared to control *p75NTR<sup>+/+</sup>* or *p75NTR<sup>flx/flx</sup>* BCs (Figure 3c, e-g; boutons/soma  $\pm$  SEM =  $9.5 \pm 0.3$  for ctrl vs  $14.2 \pm 0.5$  for *p75NTR<sup>-/-</sup>* + mut-proBDNF BCs; one-way ANOVA,  $p < 0.05$ ). All together, these data suggest that proBDNF-mediated activation of p75NTR onto BCs promote axonal remodeling and bouton loss, an effect that is not limited to early developmental phases.

Bath application of mut-proBDNF might engage signaling mechanisms that do not normally occur under physiological conditions; therefore we next asked whether endogenous levels of proBDNF affect the establishment of basket cell innervation. proBDNF can be cleaved in response to LTP inducing stimuli extracellularly through tissue plasminogen activator (tPA) mediated activation of plasmin<sup>25,27</sup>. To investigate whether endogenous levels

of proBDNF affect basket cell synaptic territory, we first treated organotypic cultures with PPACK, a tPA-inactivating peptide. PPACK treatment from EP16-24 and EP26-32 induced a loss of BC synaptic innervation field, in fact treated BCs showed simpler axonal arborisation, targeted less potential postsynaptic targets (Suppl. Figure 5a-d, g; EP16-24:  $68\pm 2\%$  for ctrl vs  $32\pm 3\%$  for PPACK-treated BCs; EP26-32:  $69\pm 2\%$  for control cells vs  $33\pm 4\%$  for PPACK-treated BCs; one-way ANOVA, Holm-Sidak's test,  $p < 0.05$ ) and formed few synapses around NeuN-positive neurons (Suppl. Figure 5a-f, E16-24: boutons/soma  $\pm$  SEM,  $9.5\pm 0.3$  for ctrl vs  $5.5\pm 0.1$  for PPACK treated BCs; E26-32: boutons/soma  $\pm$  SEM =  $10.2\pm 0.7$  for ctrl vs  $4.7\pm 0.2$  for PPACK treated BCs; one-way ANOVA, Holm-Sidak's test,  $p > 0.05$ ). Culture treated with PPACK from EP10-18 formed perisomatic innervation characterized by simple terminal axon branches and boutons that were not significantly different from controls cells (Figure 4e, f; boutons/soma  $\pm$  SEM,  $5.6\pm 0.3$  for ctrl versus  $5.2\pm 0.5$  for PPACK treated BCs, one-way ANOVA; Holm-Sidak's test,  $p > 0.05$ ). However, when comparing the fraction of innervated cells over the total number of potential targets in a confocal stack, we found a significant decrease of the percentage of innervated cells by each basket cell treated with PPACK (Figure 4g;  $46\pm 4\%$  for control cells vs  $25\pm 3\%$  for PPACK, one-way ANOVA, Holm-Sidak's test,  $p > 0.05$ ). Finally, similarly to what we observed following the treatment with exogenous mut-proBDNF, the effects of PPACK on BC synaptic innervation were dependent upon the expression of p75NTR by BCs. In fact, EP18 p75NTR<sup>-/-</sup> BCs showed richer terminal branchings and more numerous perisomatic boutons compared to age-matched p75NTR<sup>+/+</sup> BCs even in presence of PPACK (Suppl. Fig.7).

In addition to cleave proBDNF into mBDNF, plasmin may act on other molecules, including neural cell adhesion molecule<sup>31</sup>. Further, tPA has been shown to cleave NR2B in a plasmin-independent manner<sup>32</sup>. To investigate whether the observed PPACK effects are mainly due to increased proBDNF/mBDNF ratio, we treated cultures simultaneously with PPACK and mut-proBDNF and asked whether the affect on BC territory were similar to treating with either mut-proBDNF or PPACK (non-additive) or more severe (additive). We found that the effects of PPACK and mut-proBDNF were not-additive (Suppl. Fig.6); therefore it is likely that the effects of PPACK treatment on BC synaptic territory were due to an increase proBDNF/mBDNF ratio and not to other proteolytic events. All together, these data show that blocking tPA activation promote axonal remodeling and bouton loss, an effect

that is not limited to early developmental phases.

A crucial issue is whether secreted levels of proBDNF have a physiological function. To tackle this question in our system, namely whether secreted proBDNF modulates basket cell innervation, we treated organotypic cultures from EP10-18 with tissue plasminogen activator, tPA. tPA drastically increased the complexity of basket cell innervation compared to control age-matched basket cells by increasing bouton density, terminal branching and total innervation (Figure 4e-g; boutons/soma  $\pm$  SEM =  $5.6 \pm 0.3$  for control versus  $14.6 \pm 0.7$  for tPA treated cells,  $46 \pm 4\%$  and  $74 \pm 3\%$  respectively one-way ANOVA, Holm-Sidak's test,  $p > 0.05$ ). If the effects of tPA application were mediated by a decrease in endogenous proBDNF/mBDNF ratio, we predicted that treatment with mut-proBDNF would counterbalance them. In fact, we found that simultaneously treating organotypic cultures from EP10-18 with tPA and mut-proBDNF rescued completely the effect of tPA-only application (Figure 4e-g; boutons/soma  $\pm$  SEM =  $5.6 \pm 0.3$  for control versus  $5.7 \pm 0.3$  for tPA+mut-proBDNF treated cells,  $46 \pm 4\%$  and  $37 \pm 2\%$  respectively one-way ANOVA, Holm-Sidak's test,  $p > 0.05$ ). In summary, these results suggest that regulation of endogenous proBDNF/p75NTR signaling in BCs through tPA-action plays a role in the formation of their synaptic territory.

Interestingly, we found that mut-proBDNF treatment is able to destabilize BC synaptic innervations after they have reached maturity in organotypic cultures (Suppl. Figs. 4, 5). Recent studies suggest that modulation of inhibition in the adult brain can re-activate juvenile-like cortical plasticity mechanisms, by using ocular dominance plasticity in visual cortex as experimental model<sup>33,34</sup>. Thus, we asked whether treatment with mut-proBDNF could destabilize BC synaptic connections in the adult brain *in vivo* and if this could in turn promote cortical plasticity. To address this question, we implanted osmotic minipumps releasing either mut-proBDNF (concentration) or saline in primary visual cortex in adult (<P100) mice for 5 days (Fig.5a, left panel). We found that in the cortex infused with mut-proBDNF (ipsilateral to the minipump), the number of perisomatic puncta immunopositive for the vesicular GABA transporter (vGAT) or for PV (which labels BC) per pyramidal soma was reduced as compared to those in the vehicle infused cortex (contralateral to the minipump) (Fig.5b, d; Suppl. Fig.8; ~ 40% reduction for both PV+ and VGAT+ puncta in ipsi compared to contra cortex). To study whether mut-proBDNF action was mediated by p75NTR activation in BCs, we knocked out p75NTR selectively in PV-positive (PV+) neurons by crossing  $p75NTR^{flx/flx}$



mice to animals expressing Cre recombinase under the control of the PV promoter<sup>35</sup>. *p75NTR<sup>lox</sup>* and *p75NTR<sup>+/+</sup>* animals were analyzed separately; however, as we did not find any difference between these two genotypes, we pooled them together and indicated as *p75NTR<sup>Ctrl</sup>*. In adult mice, p75NTR expression levels are too low to be reliably quantified by immunohistochemistry (data not shown and<sup>29</sup>). To monitor CRE expression in PV+ cells, we thus introduced the RCE<sup>EGFP</sup> allele, which drives expression of EGFP in presence of CRE. By ~P60, we found that more than 85% of PV+ cells co-expressed GFP (87±3%; n=5 mice). In *PV-CRE;p75NTR<sup>lox/lox</sup>* mice, we found that mut-proBDNF infusion did not significantly change perisomatic VGAT and PV puncta density (Fig.5b, d), indicating that the effect of mut-proBDNF on perisomatic GABAergic boutons was mediated by p75NTR expressed by BCs, consistently to what we observed in organotypic cultures.

Perineuronal nets (PNN) normally enwrap mature BCs to limit adult plasticity<sup>8,9,36</sup>. In *p75NTR<sup>Ctrl</sup>* mice, mut-proBDNF infusion significantly reduced both the number of PV+ cells that were encircled by PNN, as revealed by WFA staining (Fig.5c1,f; 85% and 50% colocalization in contralateral- and ipsilateral- mut-proBDNF infused cortex, respectively) and PNN immunofluorescence intensity around single PV+ cells (Fig.5c2,e; ~ 55% reduction in ipsi vs contra cortex). This effect of mut-proBDNF treatment on PNN was completely abolished in *PV-CRE;p75NTR<sup>lox/lox</sup>* mice (Fig. 5c, e, f).

To directly test whether mut-proBDNF can reopen a window of plasticity in adult visual cortex, we performed electrophysiological recordings in binocular regions of the primary visual cortex following a brief (3 days) monocular deprivation (MD) in adult (<P100) mice. During the critical period for ocular dominance plasticity, the ratio of the amplitude of VEPs evoked by stimulation of the eye contralateral and ipsilateral to the recorded cortex shifts in favor of the nondeprived, ipsilateral, eye (OD shift). However no significant shift can be observed when three days of monocular deprivation (MD) are administered after P100<sup>37,38</sup>. Consistently, we found that MD did not affect the contralateral/ipsilateral (C/I) VEP ratio in vehicle-treated animals with respect to *p75NTR<sup>Ctrl</sup>* non-deprived mice, while in *p75NTR<sup>Ctrl</sup>* mice treated with mut-proBDNF we observed a marked OD shift in favor of the non-deprived eye, reflected by a significant decrease of the C/I VEP ratio (Fig. 5g; Suppl Fig.9a; One Way ANOVA, post-hoc Holm-Sidak test, p<0.01). p75NTR deletion in PV+ neurons completely

prevented the OD shift induced by mut-proBDNF treatment (Fig. 5g, Suppl Fig.9a; One Way ANOVA, post-hoc Holm-Sidak test,  $p > 0.05$ ). To further analyze this point, we performed single-unit recordings. OD of cortical neurons was assessed by quantitative evaluation of responsiveness to optimal visual stimulation of either eye and an OD index (ODI) was assigned to every single cell recorded. ODI of vehicle-infused MD  $p75NTR^{Ctrl}$  displayed the typical bias towards the contralateral eye input as shown by non-deprived control mice, while mut-proBDNF infused MD  $p75NTR^{Ctrl}$  mice showed a prominent OD shift in favor of the open eye (Fig.5h, Suppl Fig.9b; Kruskal-Wallis One Way ANOVA vs control, post hoc Dunn's test,  $p < 0.05$ ), which was abolished in  $PV-CRE;p75NTR^{flx/flx}$  mice (Fig.5h, Suppl Fig.9b; Kruskal-Wallis One Way ANOVA vs. control, post hoc Dunn's test,  $p > 0.05$ ). ODI values were significantly lower in mut-proBDNF-infused MD  $p75NTR^{Ctrl}$  mice as compared with vehicle-infused MD  $p75NTR^{Ctrl}$  mice and  $PV-CRE;p75NTR^{flx/flx}$  mice (Fig.5h, Suppl Fig.9b; Kruskal-Wallis One Way ANOVA, post hoc Dunn's test,  $p < 0.05$ ). Consistently, the ODI cumulative distribution did not differ between no-MD and vehicle-treated, MD  $p75NTR^{Ctrl}$  mice (Suppl. Fig. 9c1; K-S test,  $p = 0.541$ ), whereas both groups differed from  $p75NTR^{Ctrl}$  mice treated with mut-proBDNF (Suppl. Fig. 9c; K-S test,  $p < 0.05$ ). ODI distribution of mut-proBDNF-treated MD  $PV-CRE;p75NTR^{flx/flx}$  was indistinguishable to that of no-MD mice (Suppl. Fig. 9c2; K-S test,  $p = 0.633$ ), whereas it was statistically different for  $p75NTR^{flx}$  or  $p75NTR^{+/+}$  mice treated with mut-proBDNF (Suppl. Fig. 9c; K-S test,  $p < 0.05$ ), further proving that proBDNF was able to induce susceptibility to MD only in mice carrying intact p75NTR expression in BC cells. Interestingly, we found that spontaneous discharges of visual cortical neurons were increased by mut-proBDNF treatment only in  $p75NTR^{Ctrl}$  mice (Fig.5i; Kruskal-Wallis One Way ANOVA, post hoc Dunn's test,  $p < 0.05$ ), which indicates a reduction of intracortical inhibition.

## 1.5 Discussion

It has been postulated that BDNF acts as a mediator between pyramidal cell activity and the maturation of GABAergic synapses, thus guaranteeing the balance between excitation and inhibition in cortical networks. Several studies have indeed showed that activity-dependent BDNF synthesis specifically modulates GABAergic synapse maturation<sup>17,18</sup>. One

caveat of these studies is that manipulations of *bdnf* affected both mBDNF and proBDNF; therefore, whether proBDNF is a biologically active player in the maturation of BC synaptic territory could not be resolved. Our data showed that increasing proBDNF levels, either by exogenous application of mut-proBDNF or by blocking tPA-mediated extracellular conversion of proBDNF to mBDNF, induces a destabilization of BC boutons, which is reflected in an increase of spontaneous discharge by cortical neurons *in vivo*. Further, we showed that proBDNF effects are mediated by p75NTR activation directly onto BCs. In the hippocampus, the expression levels of proBDNF and p75NTR are highest during the first weeks of postnatal development, suggesting that p75NTR activation by proBDNF plays an important role in modulating hippocampal circuits during this critical developmental time frame<sup>26</sup>. Similarly in mouse visual cortex, p75NTR mRNA is downregulated after eye opening<sup>29</sup>, when BCs start to develop complex, highly branched axonal arbors that contact an increasingly higher number of potential postsynaptic targets<sup>12-15,28</sup>. Further, p75NTR but not TrkB, mRNA is regulated by visual experience *in vivo*<sup>29</sup>. An interesting possibility is that levels of activity in individual BC regulate their p75NTR expression, which in turn determines to what extent they respond to local changes in proBDNF levels. Considering that tPA activity is also regulated by neuronal activity<sup>25</sup>, we can envision a scenario where increased neuronal activity may promote BC axonal growth and synapse formation by increasing proBDNF cleavage and synergistically decreasing p75NTR levels.

p75NTR activation may inhibit the formation of BC innervation fields by promoting growth cone collapse, via activation of RhoA<sup>39,40</sup> and/or inactivation of Rac signaling, which lead to destabilization of actin filaments and collapse of neurite outgrowth<sup>41</sup>. Further, it has been suggested that p75NTR activation may broadly sensitizes neurons to inhibitory, growth cone collapsing cues such as Nogo<sup>42,43</sup>, ephrins and semaphorins<sup>39,44</sup>. It will be interesting to study whether proBDNF-mediated p75NTR signaling alters BC axon response to such inhibitory cues. In addition, proBDNF may act directly on the postsynaptic site of GABAergic synapses by two distinct pathways: (1) a RhoA-Rock-PTEN pathway that decreases the phosphorylation levels of GABA-A receptors, thus affecting receptor function and triggering endocytosis and degradation of internalized receptors, and (2) a JAK-STAT-ICER pathway leading to the repression of GABA-A receptors synthesis<sup>45</sup>. Whether GABA-A receptor

regulation by proBDNF-p75NTR occurs mainly in pyramidal cells or/and in BCs too remains to be elucidated.

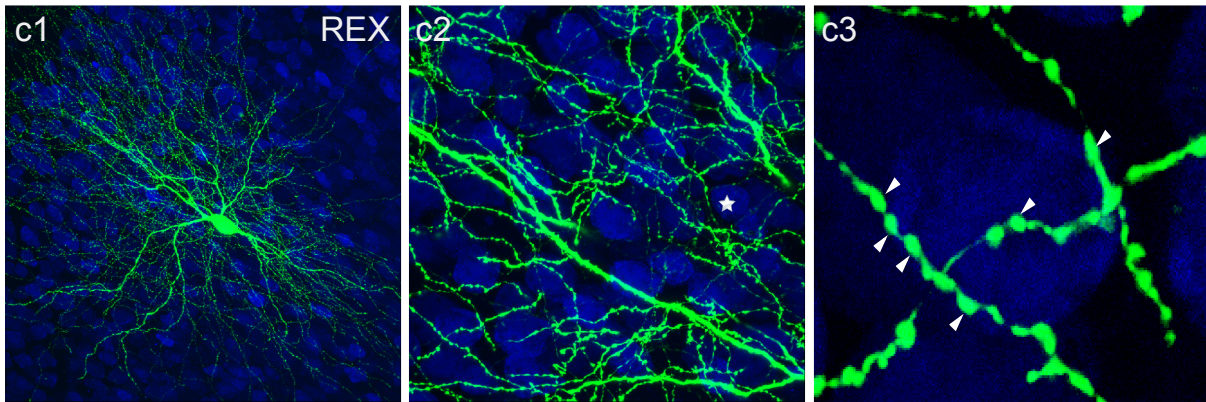
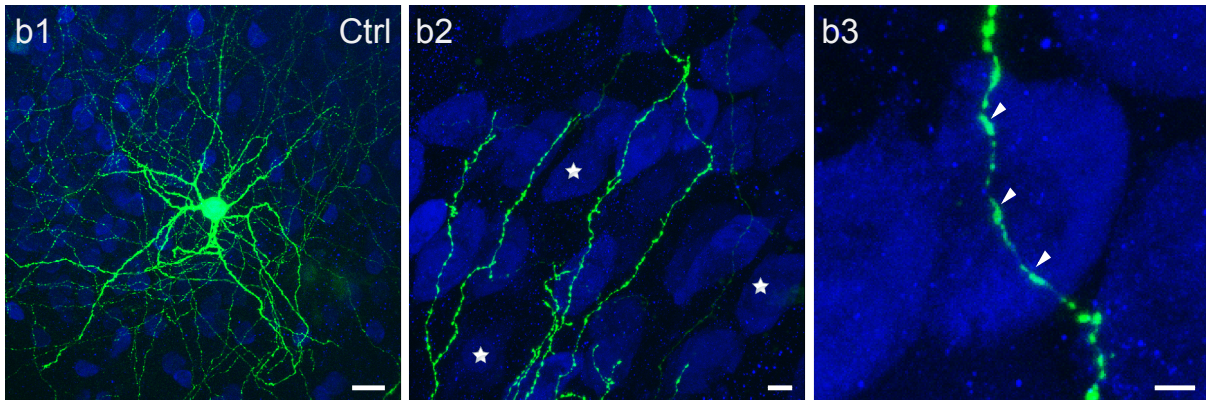
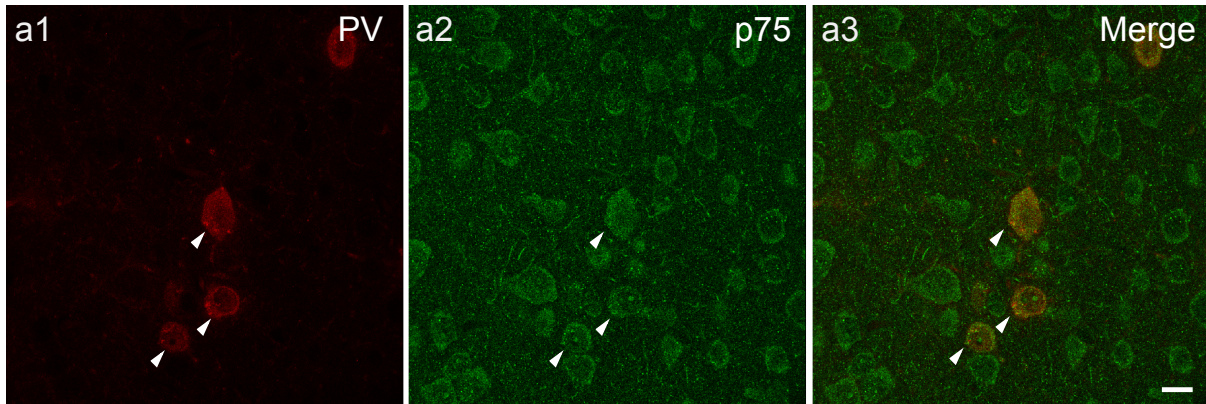
During development, the brain's intrinsic potential for plasticity is actively dampened, by the increase in intracortical inhibition<sup>33</sup> and the simultaneous expression of brake-like factors, which limit experience-dependent circuit rewiring beyond a critical period<sup>9,36,46,47</sup>. Interestingly, many of these plasticity breaks seem to converge onto BC function<sup>8,36,48-50</sup>. Here, we showed that proBDNF-mediated activation of p75NTR specifically in PV cells is sufficient to destabilize perisomatic GABAergic boutons, reduce PNN condensation around PV cells and restore ocular dominance plasticity in the adult visual cortex. To our knowledge, this is the first direct evidence showing that reducing PV cell connectivity is sufficient to promote juvenile-like levels of ocular dominance plasticity in the adult cortex. How do PNN disappearance and GABAergic boutons reduction relate temporally and mechanistically to each other? One possibility is that p75NTR activation may directly affect the stability of PV+-BC axonal branching and synapses, by affecting local cytoskeleton dynamics<sup>40,41</sup>. Another possibility is that p75NTR activation by proBDNF may affect the synthesis of specific proteins, including those required for PNN condensation around PV cells<sup>51</sup>. Intact PNNs may structurally limit synaptic rearrangements of inputs onto PV cells, which may in turn regulate their excitability and synaptic release. In fact, reduction of BC excitability leads to a reduction of their synaptic territory even after the peak of BC synapse proliferation<sup>14</sup>. Further, PNN disruption may prevent the persistent uptake of the homeoprotein Otx2 into PV cells, which is required by the BCs for the maintenance of an adult phenotype<sup>8,49,50</sup>.

Interestingly, it has been shown that p75NTR is upregulated by pathological events, including seizures and cerebral ischemia<sup>52</sup>. Based on our data, we hypothesize that pathology-induced upregulation of p75NTR levels occurring during early brain development may impair the maturation of PV+-BC circuits. Altered PV+-BC circuit maturation may in turn affect the expression and/or timing of critical period plasticity, thus contributing to long-term cognitive and behavioral impairments.

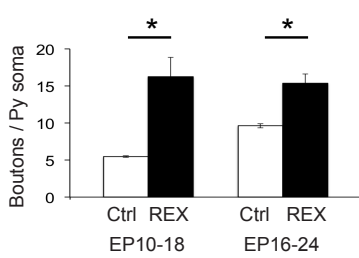
## **1.6 Acknowledgments**

We thank Dr. Edward Ruthazer (Montreal Neurological Institute, Montreal, Canada) for his insightful suggestions, Dr. Louis Reichardt (USF) for providing REX antibody and Dr. Vesa Kartineen (UMichigan) for the p75NTRlox mouse. We would like to thank Josianne Nunes Carrico for her technical assistance as well as the Comité Institutionnel de Bonne Pratiques Animales en Recherche (CIBPAR) and all the personnel of the animal facility of the Research Center of CHU Sainte-Justine (Université de Montreal) for their instrumental technical support.

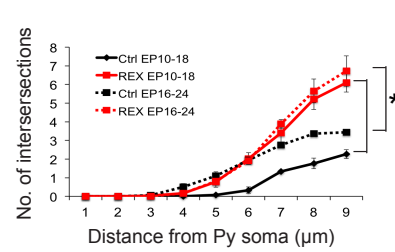
## 1.7 Figures



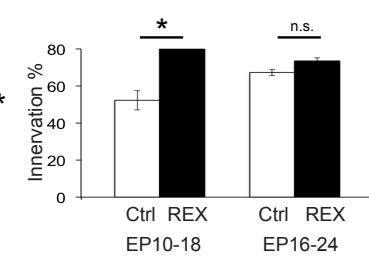
**d** Bouton density



**e** Terminal branching



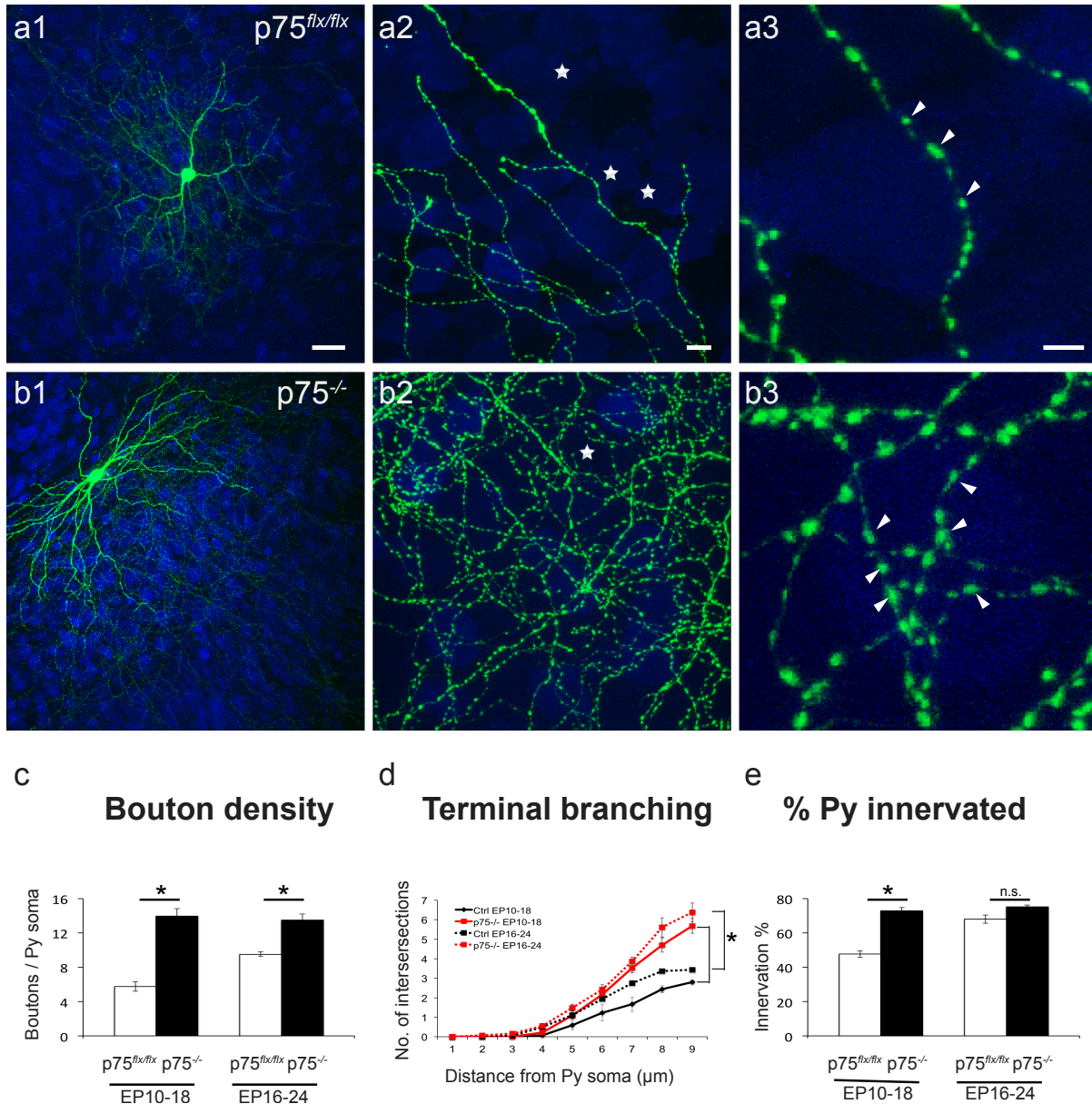
**f** % Py innervated



**Figure 1. Pharmacological blockade of p75NTR induces the formation of exuberant perisomatic innervation.**

(a) Cortical slices from P18 mice immunostained with parvalbumin (PV) to label BCs (a1; red) and p75NTR (a2; green, henceforth indicated in figures as p75; REX antibody). (b) Control BC transfected with P<sub>g67</sub>-GFP (Ctrl, green) at EP18. (c) BC treated with the p75NTR functional blocking antibody REX from EP10-18 shows more complex perisomatic innervations characterized by denser axonal branches (compare c2 with b2) bearing numerous clustered boutons (compared c3 and b3; arrowheads) around pyramidal cells somata (NeuN immunostaining, blue). Stars indicate pyramidal cells somata that are not innervated in the projected confocal stack. (b3) and (c3) are from regions in (b2) and (c2). Scale bar, b1, c1: 50  $\mu$ m; b2, c2: 10  $\mu$ m; b3, c3: 5  $\mu$ m. Perisomatic boutons density (d), terminal branching (e) and percentage of innervated cells (f) of BCs untreated or treated with REX between EP10-18 or EP16-24 (t-test, \* $p < 0.05$ ). EP10-18: n = 5 REX-treated BCs, n = 6 ctrl BCs. EP16-24: n = 6 REX treated BCs, n = 6 ctrl BCs.

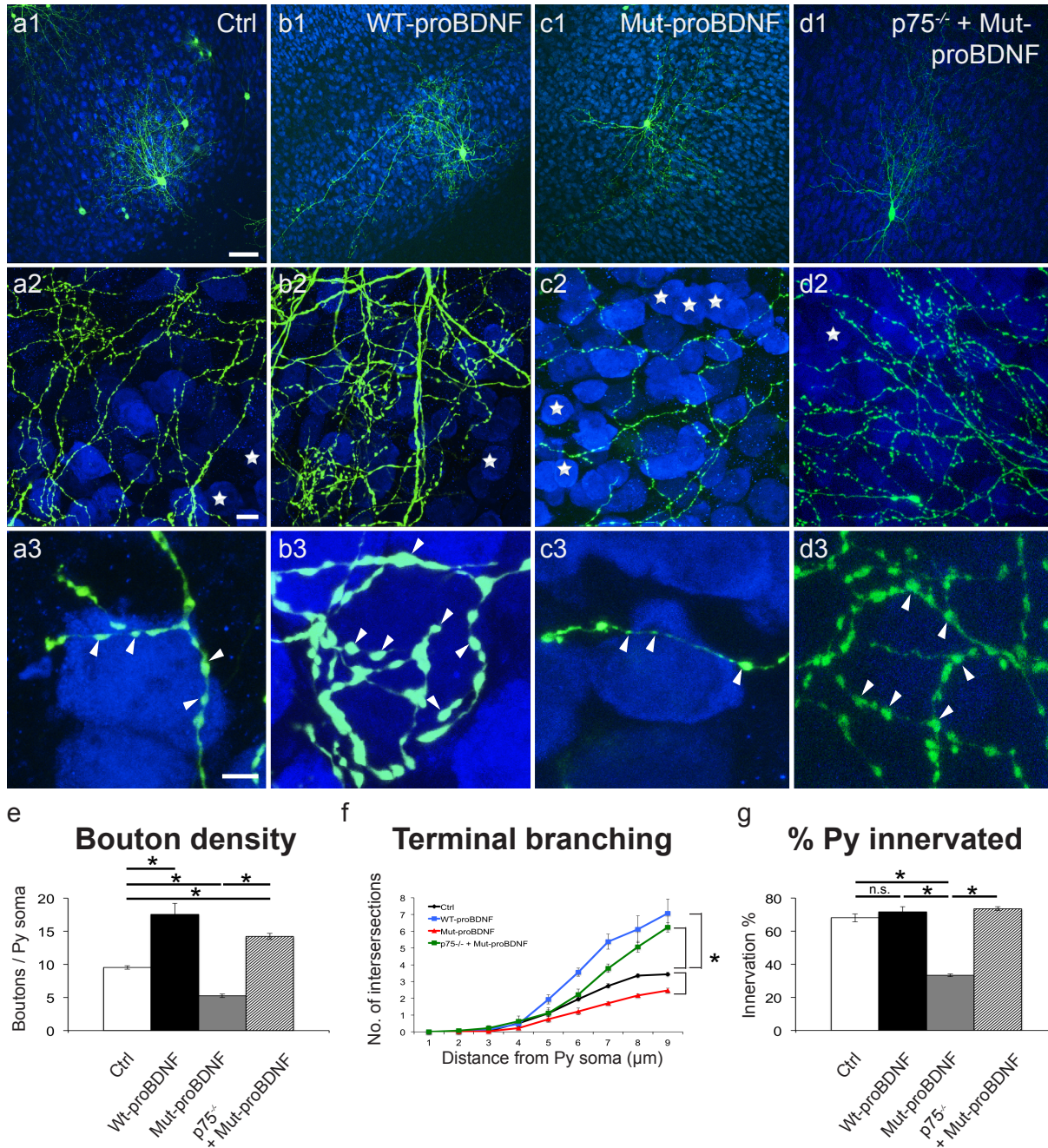




**Figure 2. Cre-mediated inactivation of p75NTR in single BCs induces the formation of exuberant perisomatic innervation.**

(a) Control BC transfected with P<sub>G67</sub>-GFP (Ctrl, green) in EP18 organotypic cultures from  $p75^{flx/flx}$  mice. (b)  $p75^{-/-}$  BCs transfected with P<sub>G67</sub>-Cre/GFP from EP10-18 shows perisomatic innervations characterized by multiple terminal axonal branches (b2) bearing numerous clustered boutons (b3; arrowheads) around pyramidal cell somata (NeuN immunostaining, blue), a phenotype similar to REX-treated BCs (Figure 1). Stars indicate pyramidal cells somata that are not innervated in the projected confocal stack. (a3) and (b3) are from regions in (a2) and (b2). Scale bar, a1, b1: 50  $\mu$ m; a2, b2: 10  $\mu$ m; a3, b3: 5  $\mu$ m. Perisomatic bouton density (c), terminal branching (d) and percentage of innervated cells (e) of  $p75^{flx/flx}$  and  $p75^{-/-}$  BCs transfected at EP10-18 or EP16-24 (t-test, \* $p < 0.05$ ). EP10-18; n = 8  $p75^{-/-}$ , n = 7  $p75^{flx/flx}$  BCs. EP16-24; n = 6  $p75^{-/-}$ , n = 6  $p75^{flx/flx}$  BCs.



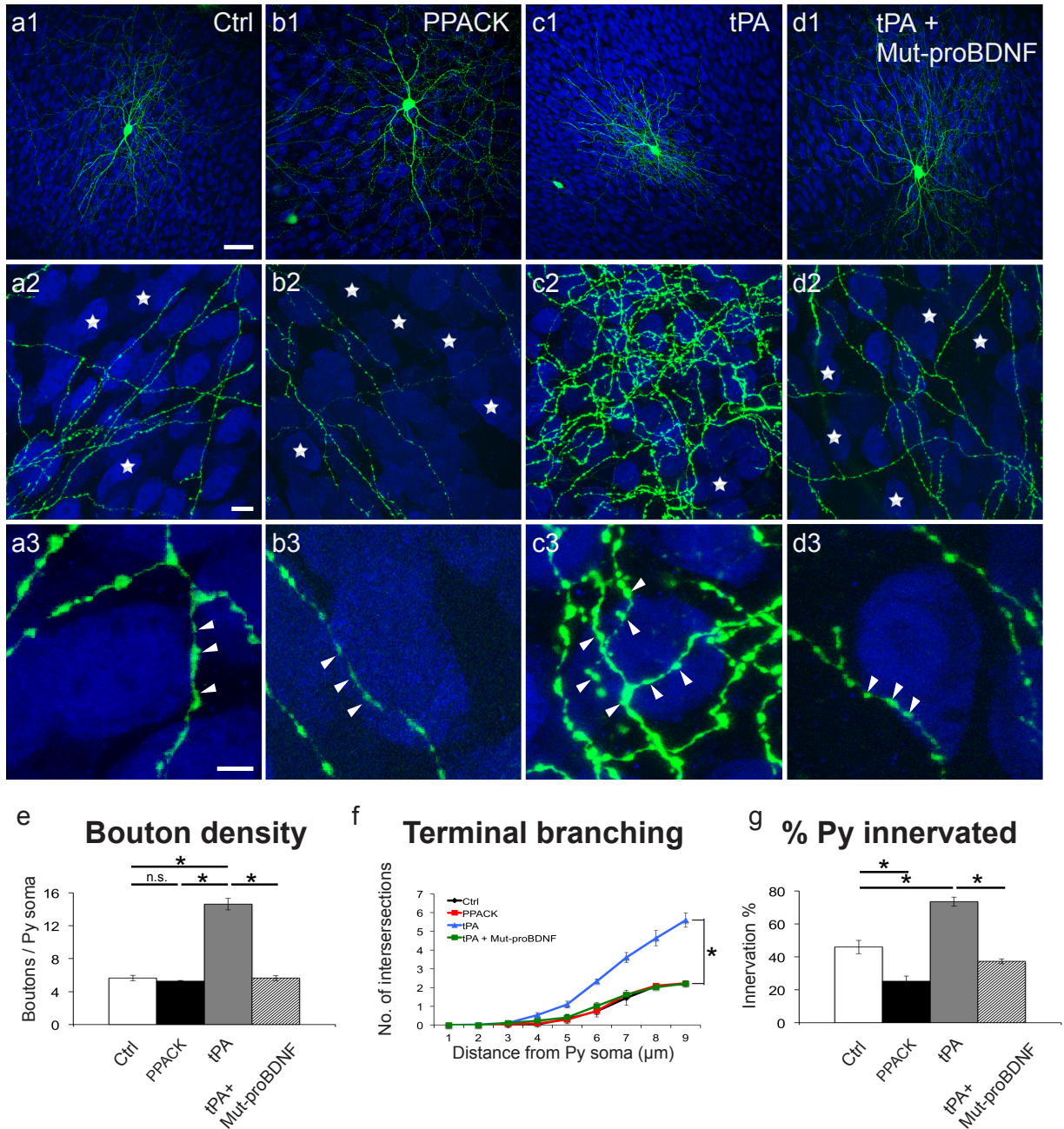


**Figure 3. mut-proBDNF mediated activation of p75NTR in BCs strongly impairs the formation of their synaptic innervation fields.**

(a) Control BC (a1, Ctrl, green) at EP24 with exuberant innervation field characterized by extensive branching contacting the majority of potential targets, dense boutons along axons (a2), and terminal branches with prominent and clustered boutons (a3; arrowheads) around pyramidal cell somata (NeuN immunostaining, blue). (b) BC treated with wt-proBDNF from EP16-24 shows overall similar axon size (b1). The fraction of innervated targets does not appear affected (b2), however perisomatic innervations are characterized by more numerous

boutons (b3; arrowheads). (c) BC treated with mut-proBDNF shows a reduction both in percentage of innervated cells (c2) and perisomatic innervation (c3). Boutons appear more irregular with some large and many smaller ones (arrowheads). (d) p75NTR<sup>-/-</sup> BCs treated with mut-proBDNF are undistinguishable from untreated p75NTR<sup>-/-</sup> BCs. Stars indicate pyramidal cells somata that are not innervated in the projected confocal stack. Scale bar, a1, b1, c1, d1: 50  $\mu$ m; a2, b2, c3, d2: 10  $\mu$ m; a3, b3, c3, d3: 5  $\mu$ m. (e) Perisomatic boutons density, (f) terminal branching and (g) percentage of innervated cells of the four experimental groups (1-way Anova, \*p <0.05). n = 6 ctrl BCs; n = 6 wt-proBDNF treated BCs, n = 8 mut-proBDNF treated BCs; n = 7 mut-proBDNF treated p75<sup>-/-</sup> BCs.

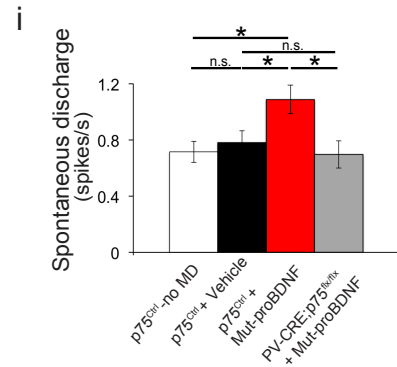
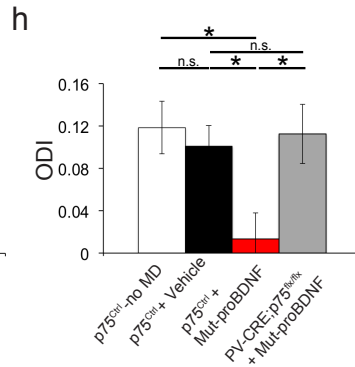
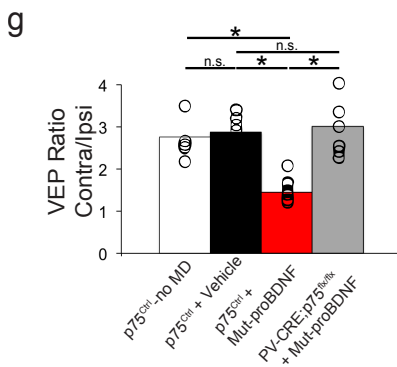
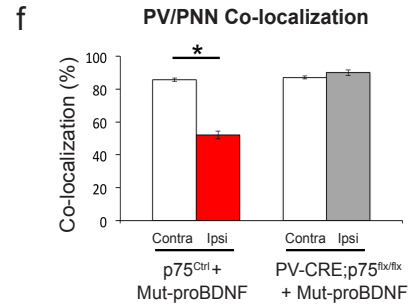
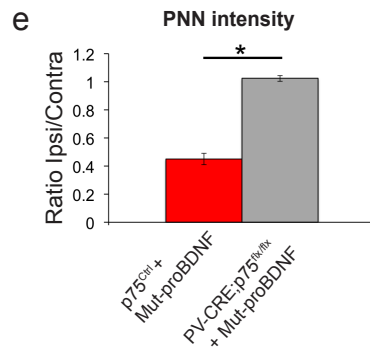
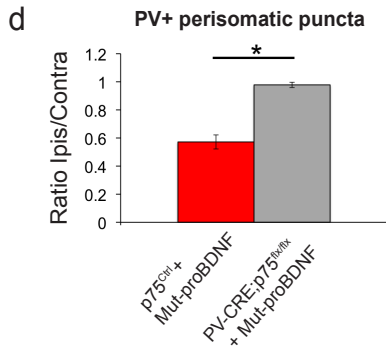
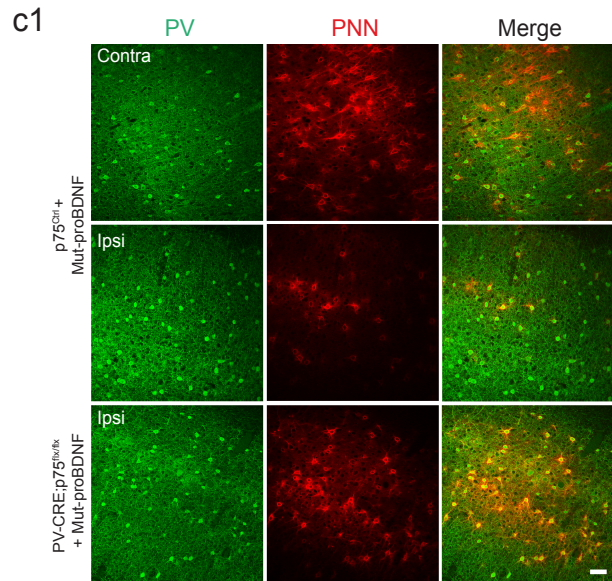
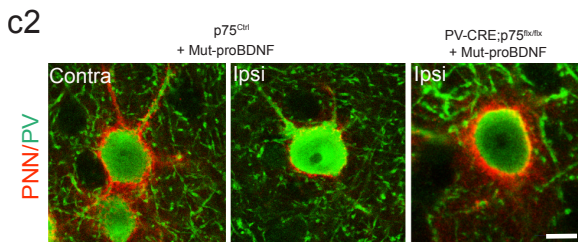
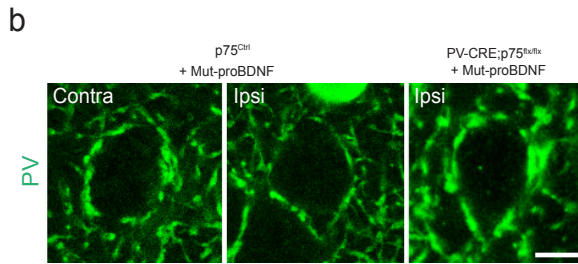
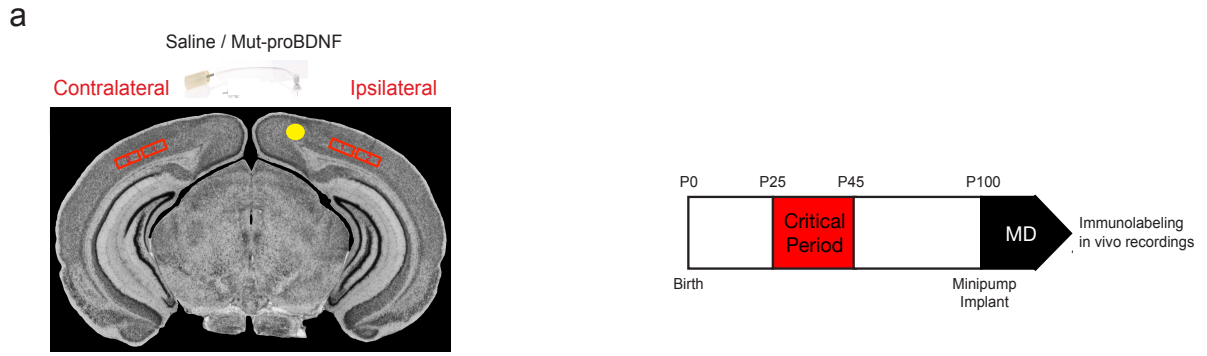




**Figure 4. Modulation of tPA activity affect the formation of BCs synaptic innervation fields.**

(a) Control EP18 BC (a1, Ctrl, green). (b) BC treated with the tPA inhibitor PPACK, from EP10-18 shows simpler axonal arborisation, contacting less potential targets (b2, NeuN positive neuronal somata in blue). (c) BC treated with tPA in the same time window shows a very complex axonal arbour (c2) and an increase in both terminal branching and perisomatic boutons (c3, arrowheads) compared to control cells (a2, a3). (d) BC treated simultaneously with tPA and mut-proBDNF shows axonal branching and perisomatic innervation more similar to those formed by control BC, suggesting that effects of tPA application may be

mediated by a decrease in endogenous proBDNF/mBDNF ratio (a). Scale bar, a1-d1: 50  $\mu\text{m}$ ; a2-d2: 10  $\mu\text{m}$ ; a3-d3: 5  $\mu\text{m}$ . (e) Perisomatic boutons density, (f) terminal branching and (g) percentage of innervated cells of the four experimental groups (\*1-way Anova,  $p < 0.05$ ).  $n = 6$  BCs for all experimental groups.



**Figure 5. proBDNF-mediated p75NTR activation in cortical BCs reduce perisomatic GABAergic innervations and restores ocular dominance plasticity in the adult visual cortex *in vivo*.**

(a) Experimental approach. (b) The number of immunolabeled PV-positive puncta (green) surrounding NeuN-positive neuronal somata (red) is reduced in the binocular visual cortex ipsilateral to the minipump (Ipsi) compared to the contralateral cortex (Contra) in the same animal. On the other hand, the number of PV-positive puncta per NeuN-positive profile in the ipsilateral cortex of *PV-CRE;p75<sup>flx/flx</sup>* mice is similar to what observed in the contralateral, untreated cortex. (c) Low (c1) and high (c2) magnification of PNN (red, WFA staining) enwrapping PV-positive neurons (red) show a dramatic reduction in both PNN density and intensity in the visual cortex infused with mut-proBDNF. This effects is abolished in *PV-CRE;p75<sup>flx/flx</sup>* mice. Scale bar, c1: 100  $\mu$ m; b, c2:10  $\mu$ m.

(d) Quantification of the mean number of PV-positive puncta per NeuN-positive profile in ipsilateral compared to contralateral cortex. Ipsi/Contra ratio is obtained for each animal, and then averaged between different animals. Mean Ipsi/Contra ratio is reduced in Mut-proBDNF infused *p75<sup>Ctrl</sup>* but not in *PV-CRE;p75<sup>flx/flx</sup>* mice significantly (t-test, \*p<0.01).

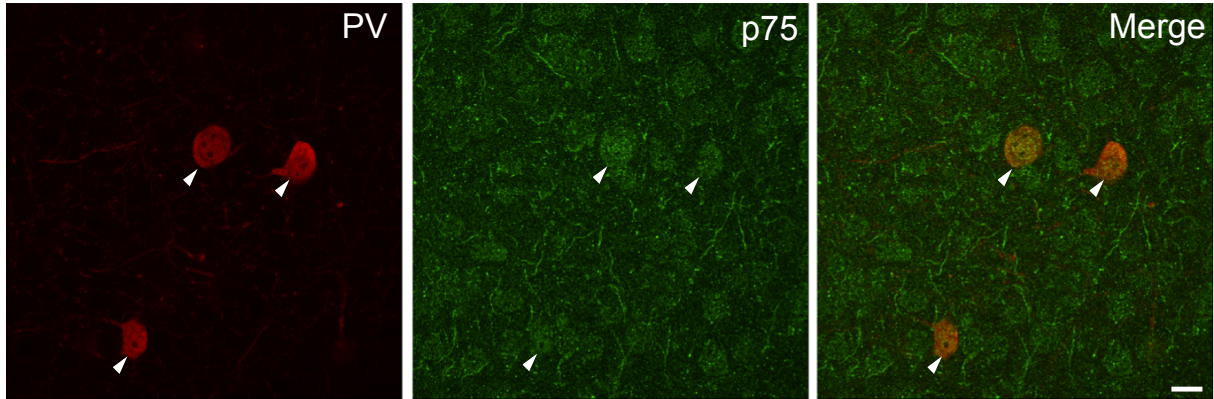
(e) Mean PNN intensity around PV-positive neurons is significantly lower in the ipsilateral cortex of *p75<sup>Ctrl</sup>* but not *PV-CRE;p75<sup>flx/flx</sup>* mice infused with mut-proBDNF (t-test, \*p<0.01).

(f) The percentage of PV-positive neurons colocalizing with PNN is significantly reduced in the cortex infused with mut-proBDNF (Ipsi) compared to the untreated cortex (Contra) in *p75<sup>Ctrl</sup>* but not *PV-CRE;p75<sup>flx/flx</sup>* (t-test, \*p<0.01). n= 5 *p75<sup>Ctrl</sup>* mice; n=3 *PV-CRE;p75<sup>flx/flx</sup>* mice.

(g) Contralateral to ipsilateral eye (C/I) VEP ratio mean values. VEP recordings revealed that 3 days of MD did not affect the C/I VEP ratio in adult mice, whereas it led to a significant decrease in the C/I VEP ratio of animals treated with proBDNF, which was however abolished in *PV-CRE;p75<sup>flx/flx</sup>* mice (1-Way ANOVA vs. control, post-hoc Holm-Sidak, \*p<0.01 ). *p75NTR<sup>Ctrl</sup>* + saline: n = 9, *p75NTR<sup>Ctrl</sup>* + mut-proBDNF: n=8, *PV-CRE;p75<sup>flx/flx</sup>* +mut-proBDNF: n=7 *PV-CRE;p75<sup>flx/flx</sup>; p75NTR<sup>Ctrl</sup>*.

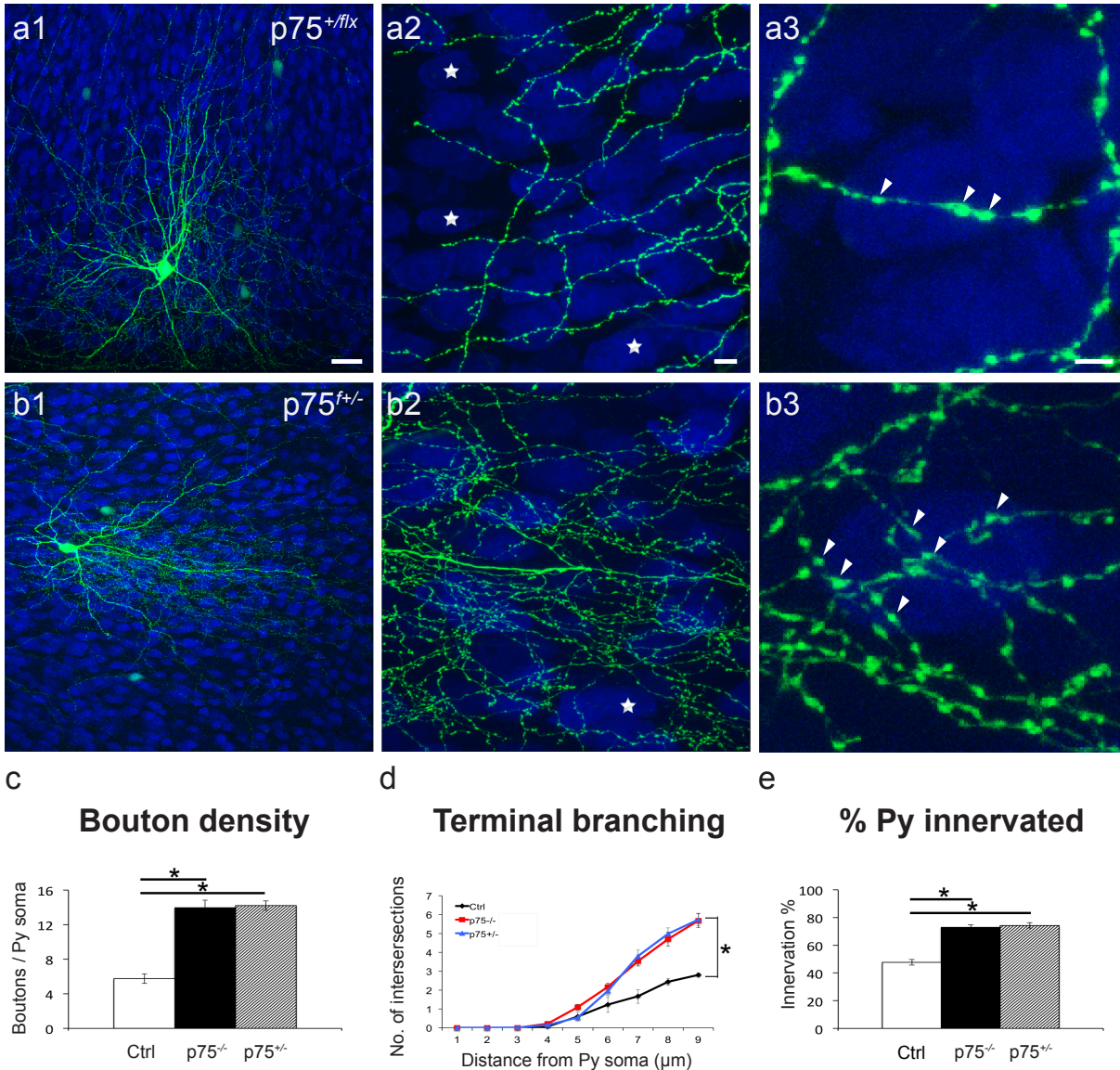
(h) Histograms represent the average ODI  $\pm$  SEM for each experimental group. ODIs of *p75NTR<sup>Ctrl</sup>* mice infused with vehicle solution and *PV-CRE;p75<sup>flx/flx</sup>* mice infused with mut-proBDNF are not significantly different from that of undeprived (no-MD) animals, while ODIs in *p75<sup>Ctrl</sup>* treated with mut-proBDNF is significantly shifted towards the open eye (Kruskal-Wallis 1-Way ANOVA, post hoc Dunn's test, \*p<0.05). *p75NTR<sup>Ctrl</sup>* + saline: n = 9, 174 cells; *p75NTR<sup>Ctrl</sup>* + mut-proBDNF: n=7, 147 cell; *PV-CRE;p75<sup>flx/flx</sup>* + mut-proBDNF: n=6, 125 cells. (i) Mean spontaneous discharge is significantly increased only in *p75<sup>Ctrl</sup>* mice treated with mut-proBDNF (Kruskal-Wallis 1-Way ANOVA, post hoc Dunn's test, \*p<0.05)





**Suppl Figure 1. p75NTR is expressed in PV-positive BCs**

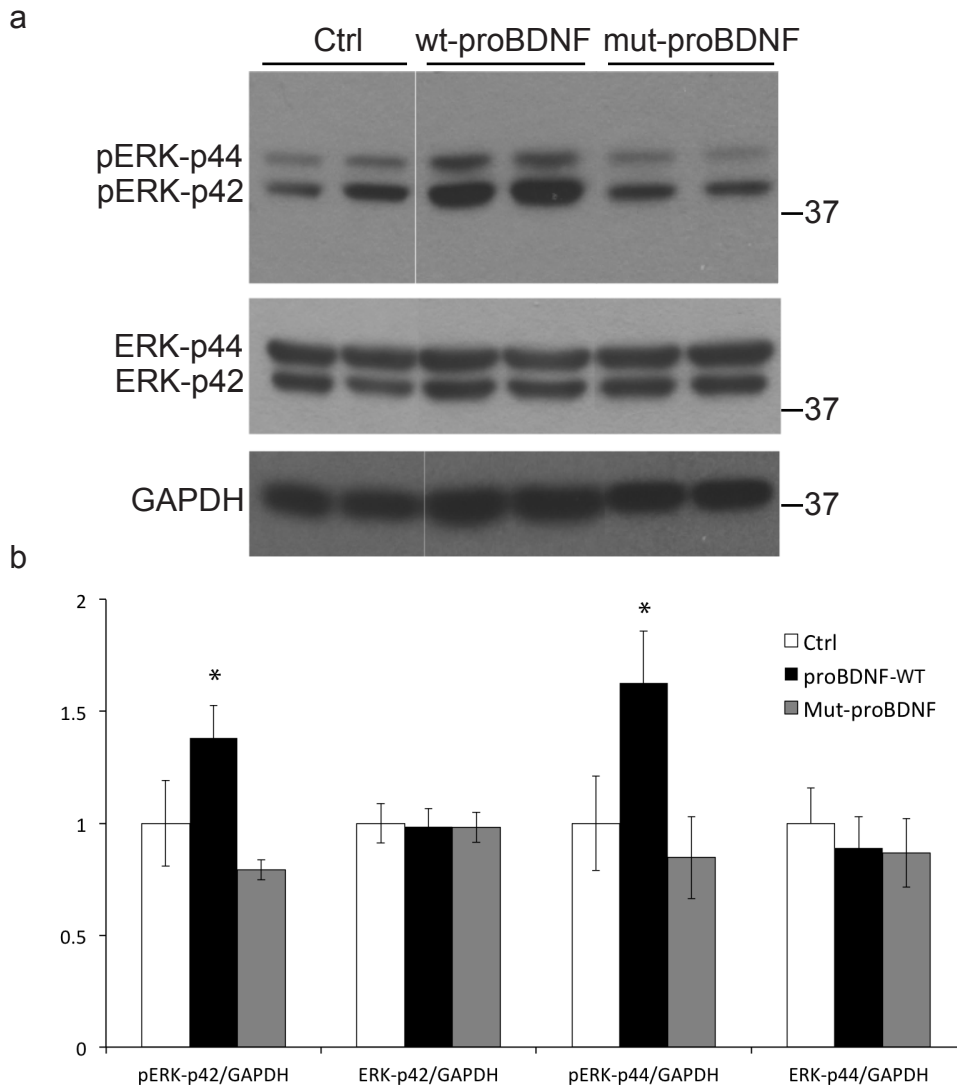
Cortical slices from P18 mice immunostained with parvalbumin (PV) to label basket neurons (red) and p75NTR (green; Promega antibody).



**Suppl Figure 2. Cre-mediated inactivation of a single p75NTR allele in BCs is sufficient to promote the formation of exuberant perisomatic innervation.**

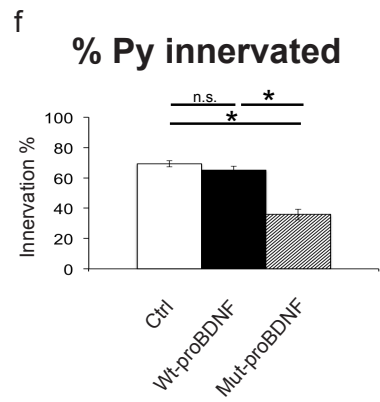
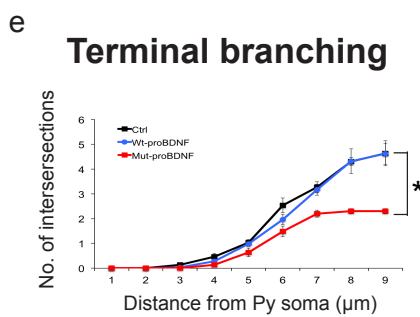
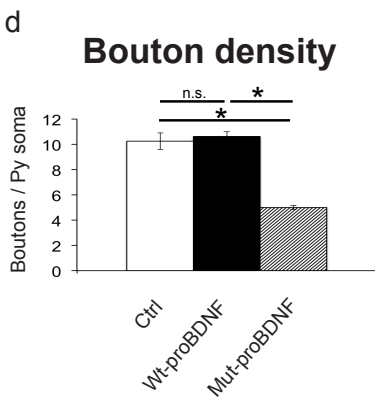
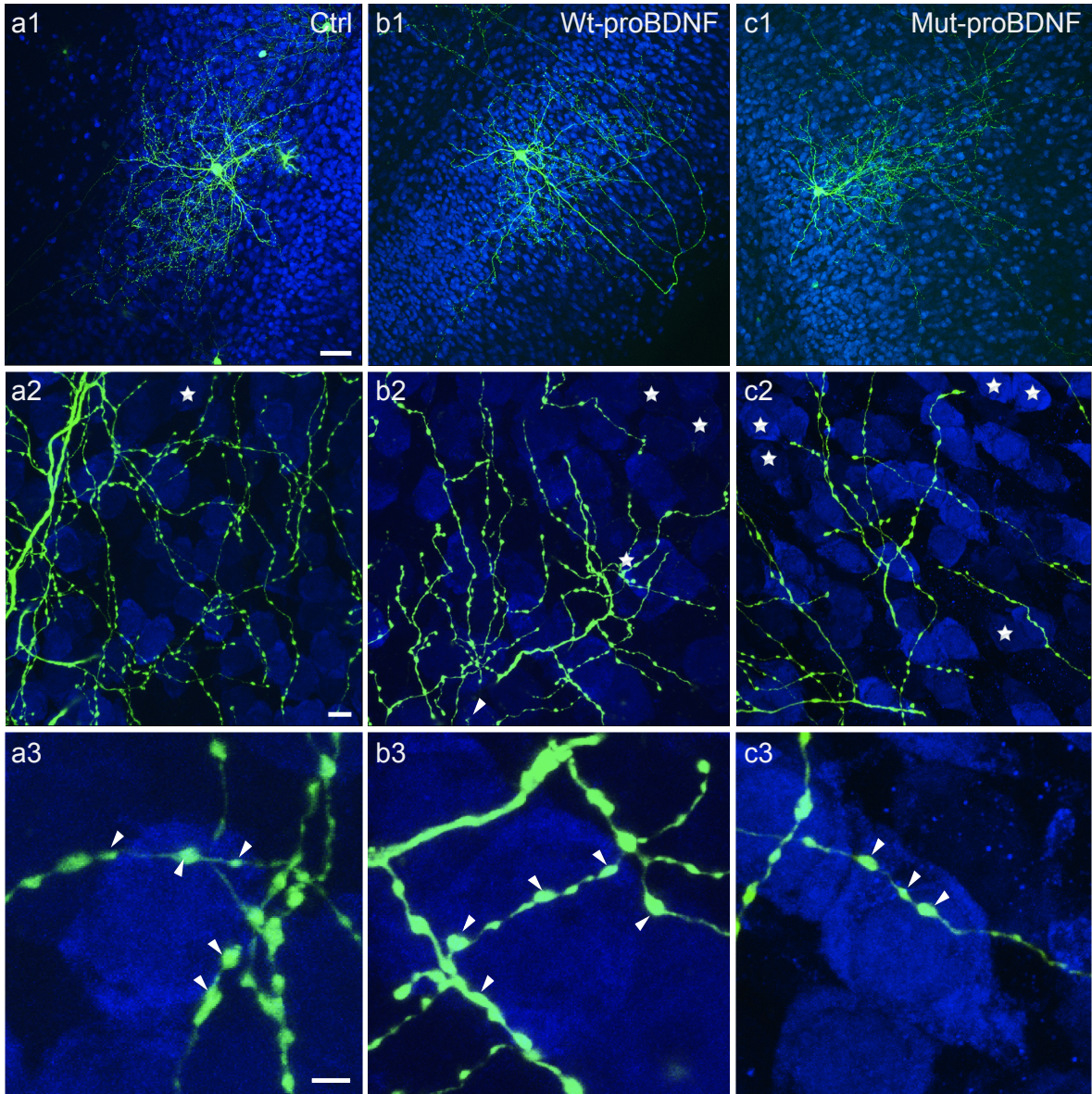
(a) Control BC transfected with P<sub>g67</sub>-GFP (Ctrl, green) in EP18 organotypic cultures from *p75NTR<sup>+flx</sup>* mice. (b) p75<sup>+/-</sup> BCs transfected with P<sub>G67</sub>-Cre/GFP from EP10-18 shows richer perisomatic innervations characterized by numerous terminal axonal branches (b2) bearing boutons (b3; arrowheads) around pyramidal cell somata (NeuN immunostaining, blue), a phenotype similar to p75<sup>-/-</sup> BCs (compare with Figure 2). Stars indicate pyramidal cells somata that are not innervated in the projected confocal stack. Scale bar, a1, b1: 50 μm; a2, b2: 10 μm; a3, b3: 5 μm. (c) Perisomatic boutons density, (d) terminal branching (e) and percentage of innervated cells of control, p75<sup>+/-</sup> and p75<sup>-/-</sup> BCs. Ctrl refer to BCs from organotypic cultures from *p75NTR<sup>+flx</sup>* or *p75NTR<sup>flx/flx</sup>* mice, transfected with P<sub>g67</sub>-GFP (1-way Anova, \*p < 0.05). n = 6 p75<sup>+flx</sup>, n = 6 p75<sup>+/-</sup>, n = 8 p75<sup>-/-</sup> BCs.





**Suppl Figure 3. WT-proBDNF but not mut-proBDNF treatment increases pERK levels in cortical organotypic cultures.**

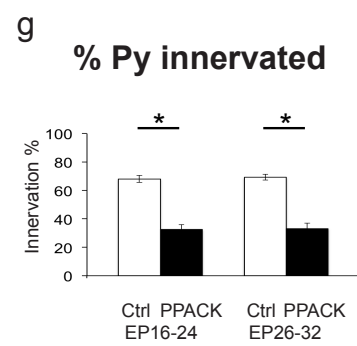
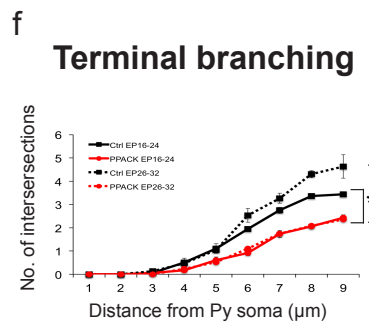
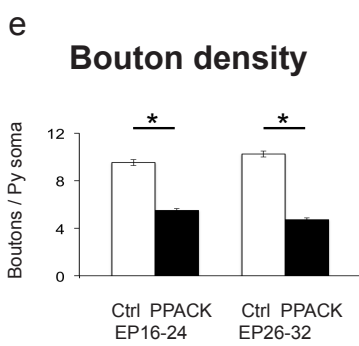
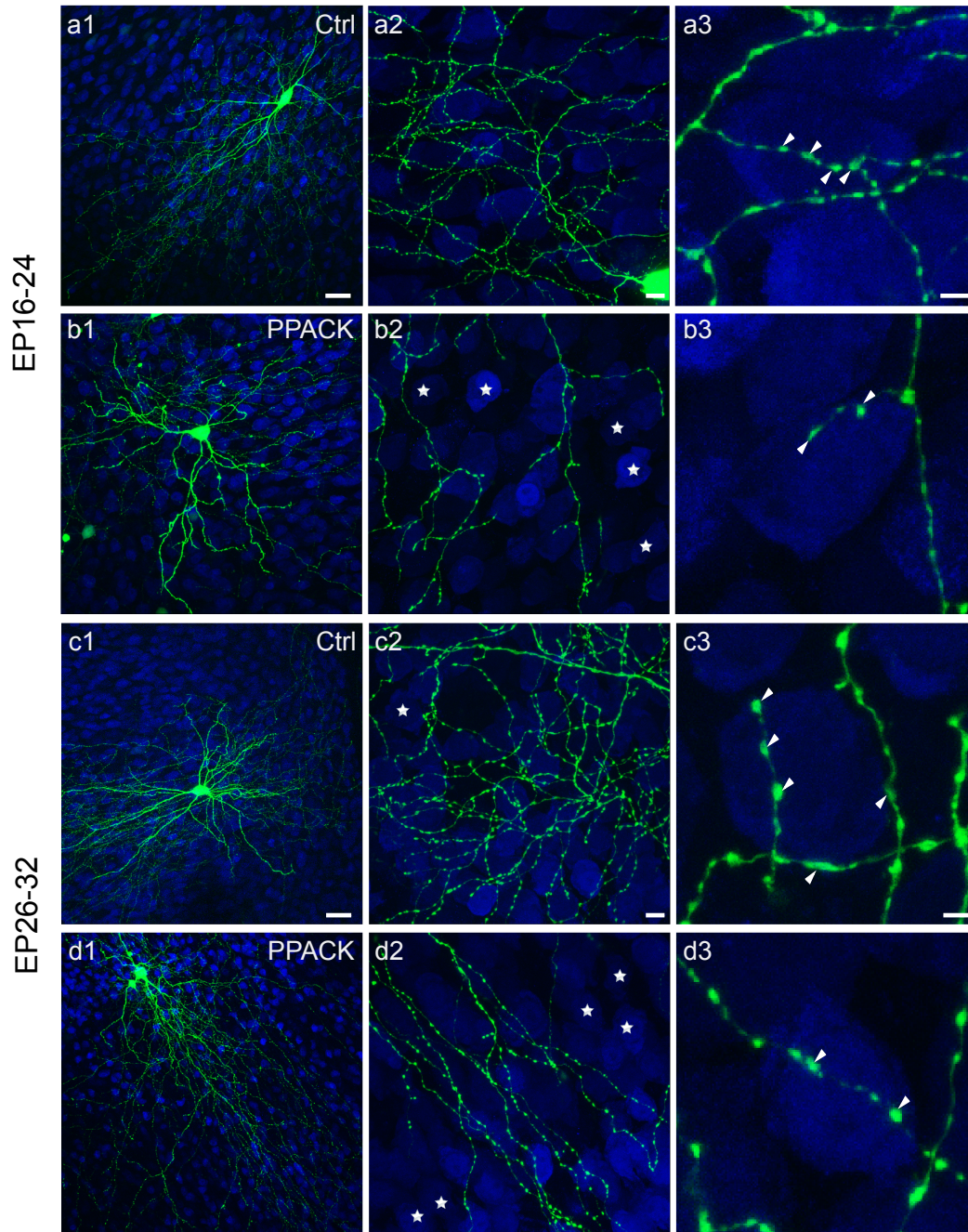
a) Western blot of pERK (p42 and p44 isoforms) over total ERK in organotypic cultures treated with wt-proBDNF and mut-proBDNF for 4 hours. Each lane corresponds to a single sample, which is constituted by 6 organotypic cultures. b) wt-proBDNF but not mut-proBDNF treatment increases pERK expression levels, suggesting that wt-proBDNF is cleaved in mBDNF by endogenous mechanisms (1-way Anova, \* $p < 0.05$ ). pERK and ERK were normalized to GAPDH.  $n=9$  Ctr,  $n=7$  wt-proBDNF and  $n=7$  mut-proBDNF samples.



**Suppl Figure 4. Treatment with mut-proBDNF is able to reduce basket cell innervation after the synaptic territory of basket cells has reached maturity.**

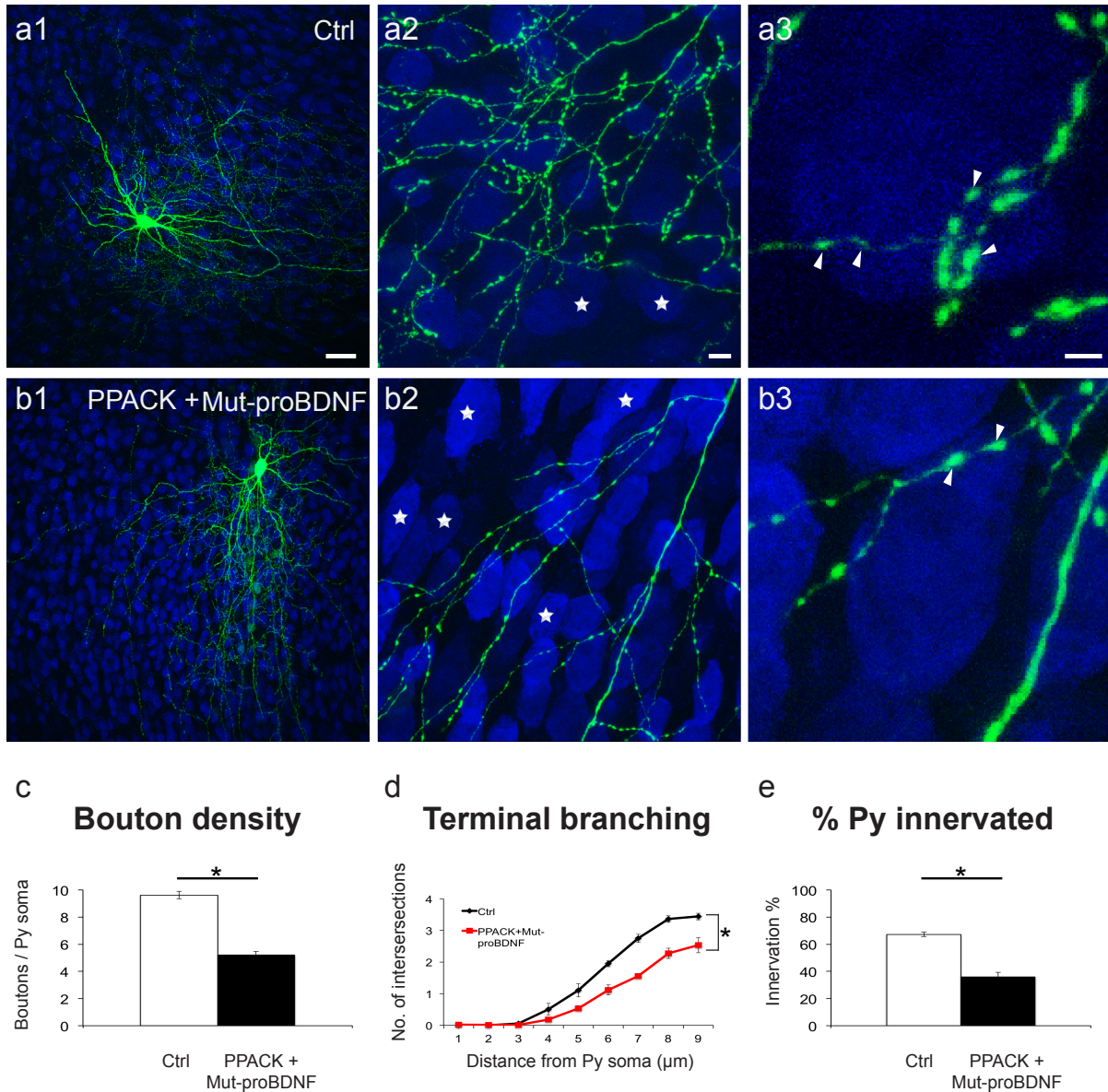
(a) Control BC (a1, Ctrl, green) at EP32 with exuberant innervation field characterized by extensive branching contacting the majority of potential targets, dense boutons along axons (a2), and terminal branches with prominent and clustered boutons (a3; arrowheads) around pyramidal cell somata (NeuN immunostaining, blue). (b) BC treated with wt-proBDNF from EP26-32 shows overall similar axon size (b1), percentage of potentially targeted neurons b2) and perisomatic innervations (b3) as control, untreated BC. (c) BC treated with mut-proBDNF from EP26-32 shows a drastic reduction both in percentage of innervated cells (c2) and perisomatic innervation (c3). Stars indicate pyramidal cells somata that are not innervated in the projected confocal stack. Scale bar, a1, b1, c1: 50  $\mu\text{m}$ ; a2, b2, c3: 10  $\mu\text{m}$ ; a3, b3, c3: 5  $\mu\text{m}$ . (d) Perisomatic boutons density, (e) terminal branching and (f) percentage of innervated cells of the three experimental groups (1-way Anova, \* $p < 0.05$ ).  $n = 6$  ctrl BCs;  $n = 6$  wt-proBDNF treated BCs,  $n = 6$  mut-proBDNF treated BCs.





**Suppl Figure 5. Treatment with the tPA inhibitor PPACK reduced BC synaptic innervation fields in cortical organotypic cultures.**

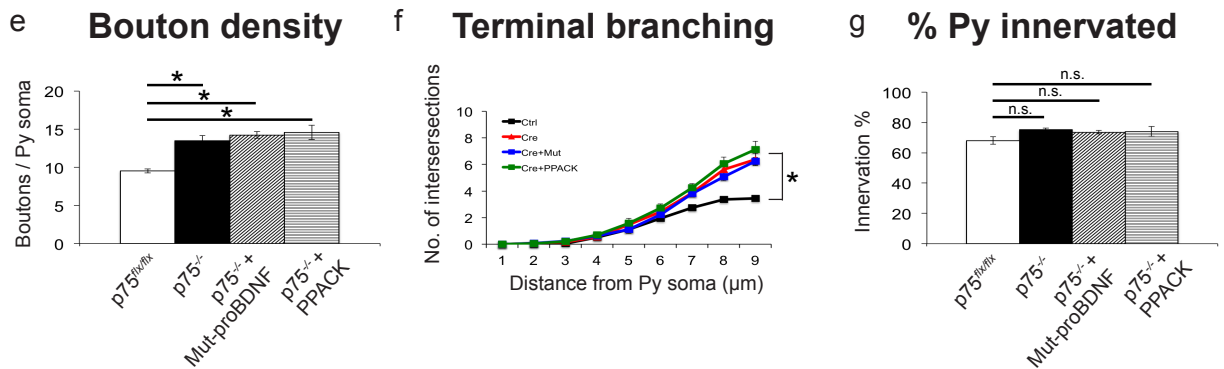
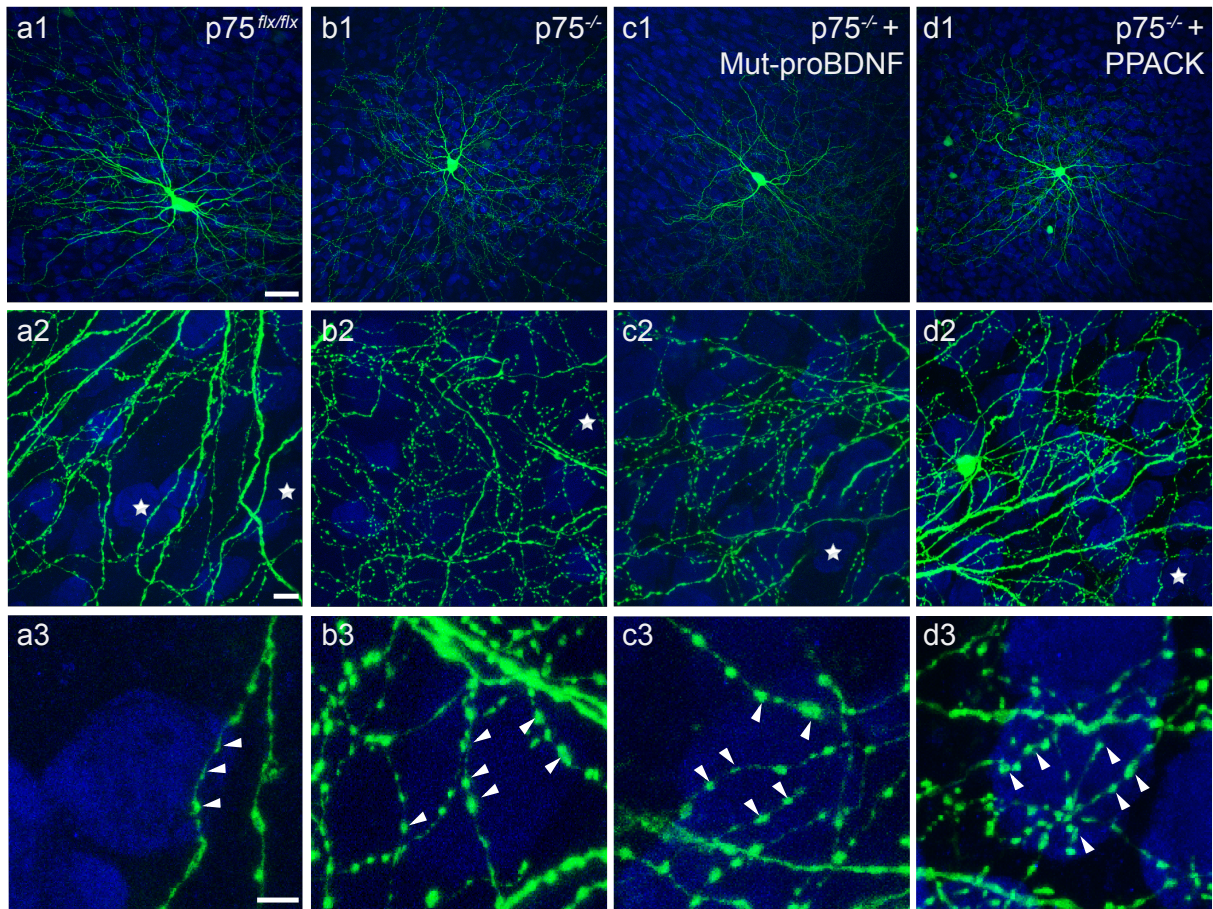
(a) Control EP24 BC. (b) BC treated with PPACK from EP16-24 showing less branched axons contacting fewer potential targets (b2) and perisomatic boutons around pyramidal cell somata (b3, NeuN immunostaining, blue; arrowheads). (c) Control EP32 BC. (d) PPACK treatment from EP26-32 reduces BC innervation fields, similarly to what occurs following mut-proBDNF treatment (compare with Fig.3 and Suppl. Fig.4). Stars indicate pyramidal cells somata that are not innervated in the projected confocal stack. Scale bar, a1, b1, c1, d1: 50  $\mu\text{m}$ ; a2, b2, c3, d2: 10  $\mu\text{m}$ ; a3, b3, c3, d3: 5  $\mu\text{m}$ . (e) Perisomatic boutons density, (f) terminal branching and (g) percentage of innervated cells. PPACK treatment (t-test, \* $p < 0.05$ ). EP16-24:  $n = 6$  ctrl BCs;  $n = 7$  PPACK treated BCs, EP26-32:  $n = 9$  ctrl BCs;  $n = 6$  PPACK treated BCs.



**Suppl Figure 6. The effects of mut-proBDNF and PPACK on the establishment of BCs synaptic innervation fields are not additive.**

(a) Control EP24 BC. (b) BC treated with mut-proBDNF+PPACK from EP16-24 showing less branched axons contacting fewer potential targets (b2) and perisomatic boutons around pyramidal cell somata (b3, NeuN immunostaining, blue; arrowheads). Stars indicate pyramidal cells somata that are not innervated in the projected confocal stack. Scale bar, a1, b1: 50 μm; a2, b2: 10 μm; a3, b3: 5 μm. (e) Perisomatic boutons density, (f) terminal branching and (g) percentage of innervated cells. (t-test, \*p < 0.05). Note that the characteristics of the innervation fields of BC treated with both mut-proBDNF and PPACK are not significantly different from the one treated with either mut-proBDNF (Fig.3c) or PPACK (Suppl. Figure 5b). n = 6 BCs for both experimental groups.





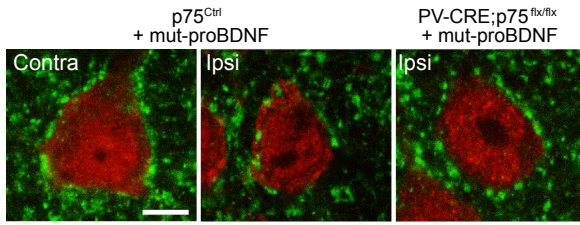
**Suppl Figure 7. Cre-mediated inactivation of p75NTR in single BCs induces the formation of exuberant perisomatic innervation independently of the presence of mut-proBDNF or PPACK.**

(a) Control BC transfected with  $P_{g67}$ -GFP (Ctrl, green) in EP18 organotypic cultures from  $p75^{flx/flx}$  mice. (b)  $p75^{-/-}$  BCs transfected with  $P_{G67}$ -Cre/GFP from EP10-18 shows perisomatic innervations characterized by multiple terminal axonal branches (b2) bearing numerous clustered boutons (b3; arrowheads) around pyramidal cell somata (NeuN immunostaining, blue). (c-d)  $p75^{-/-}$  BCs treated with either mut-proBDNF (c) or PPACK (d) show exuberant innervations resembling those formed by untreated  $p75^{-/-}$  BCs. Stars indicate pyramidal cells

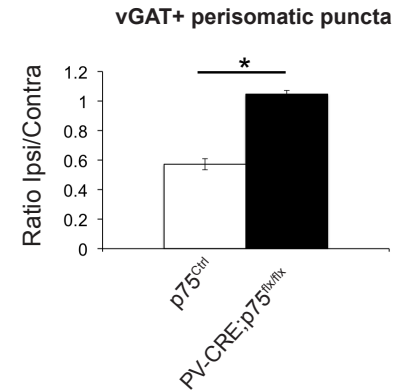
somata that are not innervated in the projected confocal stack. Scale bar, a1-d1: 50  $\mu\text{m}$ ; a2-d2: 10  $\mu\text{m}$ ; a3-d3: 5  $\mu\text{m}$ . Perisomatic boutons density (c), terminal branching (d) and percentage of innervated cells (e) of the 4 experimental groups (1-way ANOVA,  $*p < 0.05$ ).  $n = 6$   $p75^{+/+}$  BCs,  $n = 8$   $p75^{-/-}$  BCs,  $n = 7$   $p75^{-/-}$  mut-proBDNF-treated BCs,  $n = 8$   $p75^{-/-}$  PPACK-treated BCs.



a

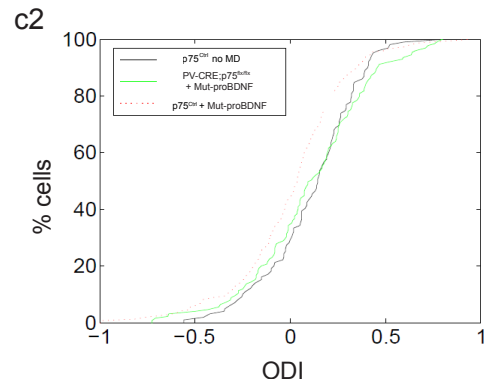
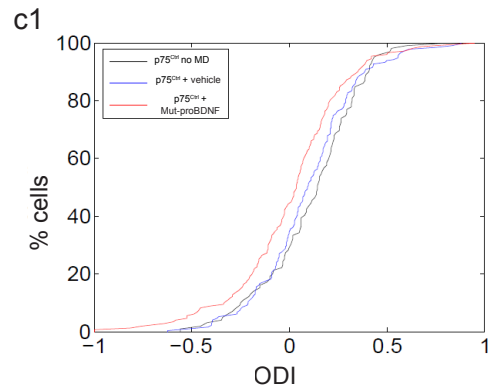
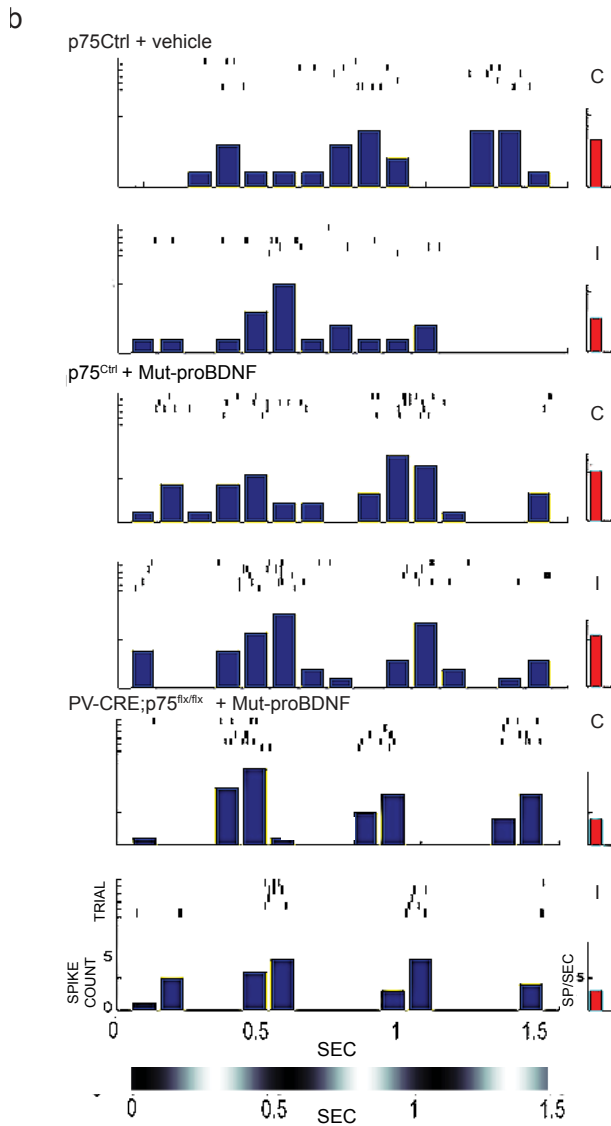
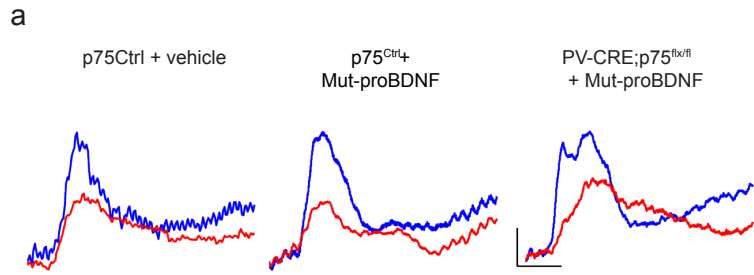


b



**Suppl Figure 8. Mut-proBDNF-mediated p75NTR activation in visual cortex *in vivo* reduces the number of vGAT positive perisomatic puncta.**

(a) The number of immunolabeled vGAT-positive puncta (green) surrounding NeuN-positive neuronal somata (red) is reduced in the binocular visual cortex ipsilateral to the minipump (Ipsi) compared to the contralateral cortex (Contra) in the same animal. On the other hand, the number of vGAT-positive puncta per NeuN-positive profile in the ipsilateral cortex of  $PV-CRE;p75^{flx/flx}$  mice is similar to what observed in the contralateral, untreated cortex. (b) Quantification of the mean number of vGAT-positive puncta per NeuN-positive profile in ipsilateral compared to contralateral cortex. Ipsi/Contra ratio is obtained for each animal, and then averaged between different animals. Mean Ipsi/Contra ratio is reduced in Mut-proBDNF infused  $p75^{Ctrl}$  but not in  $PV-CRE;p75^{flx/flx}$  mice significantly (t-test,  $*p < 0.05$ ).  $n = 5$   $p75^{Ctrl}$  mice;  $n = 3$   $PV-CRE;p75^{flx/flx}$  mice.



**Suppl. Figure 9. proBDNF-mediated p75NTR activation in cortical BCs restores ocular dominance plasticity in adult visual cortex *in vivo*.**

(a) Typical VEP responses to the stimulation of either contralateral (blue) or ipsilateral (red) eye to the cortex in which the recording was performed in  $p75NTR^{Ctrl}$  mice infused with either vehicle or mut-proBDNF and  $PV-CRE;p75NTR^{flx/flx}$  mice infused with mut-proBDNF. Calibration bars: 50  $\mu$ V, 100 ms.

(b) Spike rasters (top) and peri-stimulus time histograms (PSTHs, bottom) of representative unit phase-locked response to preferred drifting sine gratings (drawn below x axis) for each group and for the eye contralateral (C) and ipsilateral (I) to the recording site, respectively. Red bars in PSTHs represent mean spike rate (spikes/s) during the 1.5 s stimulus presentation.

(c1) ODI score distribution for non-deprived (no MD)  $p75^{Ctrl}$  and monocularly deprived  $p75^{Ctrl}$  + vehicle animals did not significantly differ between each other (K-S test,  $p = 0.541$ ), whereas ODI distribution for monocularly deprived  $p75^{Ctrl}$  + mut-proBDNF mice was shifted in favor of the non-deprived eye (K-S test,  $p < 0.05$ ). (c2) ODI score distribution for  $p75^{Ctrl}$ -no MD and  $PV-CRE;p75^{flx/flx}$  mice treated with mut-proBDNF did not significantly differ between each other (K-S test,  $p = 0.633$ ). The dashed line represents the ODI distribution for  $p75^{Ctrl}$  + mut-proBDNF group, which is statistically different from those of the other two groups (K-S test,  $p < 0.05$ ).

## 1.8 References

1. Cardin JA, Carlen M, Meletis K, Knoblich U, Zhang F, Deisseroth K, Tsai LH, Moore CI (2009). Driving fast-spiking cells induces gamma rhythm and controls sensory responses. *Nature* 459:663-667.
2. Sohal VS, Zhang F, Yizhar O, Deisseroth K (2009). Parvalbumin neurons and gamma rhythms enhance cortical circuit performance. *Nature* 459 : 698–702.
3. Fries P, Reynolds JH, Rorie AE, Desimone R (2001). Modulation of oscillatory neuronal synchronization by selective visual attention. *Science* 291:1560-63.
4. Howard MW, Rizzuto DS, Caplan JB et al (2003). Gamma oscillations correlate with working memory load in humans. *Cerebral Cortex* 13 : 1369-74.
5. Spencer KM, Nestor PG, Niznikiewicz MA, Salisbury DF, Shenton ME, McCarley RW (2003). Abnormal neural synchrony in schizophrenia. *J Neurosci* 23:7407–11.
6. Fagiolini M, and Hensch TK (2000). Inhibitory threshold for critical-period activation in primary visual cortex. *Nature* 404: 183-6.
7. Di Cristo G, Chattopadhyaya B, Kuhlman SJ, Fu Y, Bélanger MC, Wu CZ, Rutishauser U, Maffei L, Huang ZJ (2007). Activity-dependent PSA expression regulates inhibitory maturation and onset of critical period plasticity. *Nat Neurosci.* 10:1569-77.
8. Sugiyama S, Di Nardo AA, Aizawa S, Matsuo I, Volovitch M, Prochiantz A, Hensch TK (2008). Experience-dependent transfer of Otx2 homeoprotein into the visual cortex activates postnatal plasticity. *Cell.* 134:508-20.
9. Morishita H, Cabungcal JH, Chen Y, Do KQ, Hensch TK (2015). Prolonged Period of Cortical Plasticity upon Redox Dysregulation in Fast-Spiking Interneurons. *Biol Psychiatry.* pii: S0006-3223(15)00043-8.
10. Huang ZJ, Di Cristo G, Ango F (2007). Development of GABA innervation in cerebral and cerebellar cortex. *Nature Review Neuroscience* 8: 673-86.
11. Di Cristo G, Wu C, Chattopadhyaya B, Ango F, Knott G, Welker E, Svoboda K, Huang ZJ (2004). Subcellular domain-restricted GABAergic innervation in primary visual cortex in the absence of sensory and thalamic inputs. *Nat Neurosci* 7:1184-6.
12. Chattopadhyaya B, DiCristo G, Higashiyama H, et al (2004). Experience and activity-dependent maturation of perisomatic GABAergic innervation in primary visual cortex during a postnatal critical period. *J Neurosci* 24:9598-611.
13. Chattopadhyaya B, Di Cristo G, Wu CZ, et al (2007). Regulation of GABAergic axon branching and synaptic innervation by GAD67-mediated GABA synthesis and signaling. *Neuron* 54: 889-903.
14. Baho, Di Cristo G (2012). Neurotransmission regulates the innervation field of basket cells in an age dependent manner. *J Neurosci* 32 :911-8
15. Wu X, Fu Y, Knott G, Lu J, Di Cristo G, Huang ZJ (2012). GABA signaling promotes synapse elimination and axon pruning in developing cortical inhibitory interneurons. *J Neurosci* 32:331-43.
16. Huang ZJ, Kirkwood A, Pizzorusso T, et al (1999). BDNF regulates the maturation of inhibition and the critical period of plasticity in mouse visual cortex. *Cell* 98:739-55.

17. Hong EJ, McCord AE, Greenberg ME (2008). A biological function for the neuronal activity-dependent component of Bdnf transcription in the development of cortical inhibition. *Neuron* 60:610-24.
18. Jiao Y, Zhang Z, Zhang C, Wang X, Sakata K, Lu B, Sun QQ (2011). A key mechanism underlying sensory experience-dependent maturation of neocortical GABAergic circuits in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.*108:12131-6.
19. Mowla SJ, Farhadi HF, Pareek S, Atwal JK, Morris SJ, Seidah NG, Murphy RA (2001). Biosynthesis and post-translational processing of the precursor to brain-derived neurotrophic factor. *J Biol Chem* 276:12660-6.
20. Lu B, Pang PT, Woo NH (2005) The yin and yang of neurotrophin action. *NatRev Neurosci.*6:603-14.
21. Yang J, Siao CJ, Nagappan G, Marinic T, Jing D, McGrath K, Chen ZY, Mark W, Tessarollo L, Lee FS, Lu B, Hempstead BL (2009). Neuronal release of proBDNF. *Nat Neurosci* 12:113-5.
22. Nagappan G, Zaitsev E, Senatorov VV Jr, Yang J, Hempstead BL, Lu B (2009). Control of extracellular cleavage of ProBDNF by high frequency neuronal activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106:1267-72.
23. Teng HK, Teng KK, Lee R, Wright S, Tevar S, Almeida RD, Kermani P, Torkin R, Chen ZY, Lee FS, Kraemer RT, Nykjaer A, Hempstead BL (2005). ProBDNF induces neuronal apoptosis via activation of a receptor complex of p75NTR and sortilin. *J Neurosci* 25:5455-63.
24. Woo NH, Teng HK, Siao CJ, Chiaruttini C, Pang PT, Milner TA, Hempstead BL, Lu B (2005). Activation of p75NTR by proBDNF facilitates hippocampal long-term depression. *Nat Neurosci* 8:1069-77.
25. Pang PT, Teng HK, Zaitsev E, Woo NT, Sakata K, Zhen S, Teng KK, Yung WH, Hempstead BL, Lu B (2004). Cleavage of proBDNF by tPA/plasmin is essential for long-term hippocampal plasticity. *Science* 1306:487-91.
26. Yang J, Harte-Hargrove LC, Siao CJ, Marinic T, Clarke R, Ma Q, Jing D, Lafrancois JJ, Bath KG, Mark W, Ballon D, Lee FS, Scharfman HE, Hempstead BL (2014). proBDNF negatively regulates neuronal remodeling, synaptic transmission, and synaptic plasticity in hippocampus. *Cell Rep.* 7:796-806.
27. Schwartz N, Schohl A, Ruthazer ES (2011). Activity-dependent transcription of BDNF enhances visual acuity during development. *Neuron* 70:455-67.
28. Chattopadhyaya B, Baho E, Schachner M, Di Cristo G (2013) NCAM-mediated Fyn signaling promotes perisomatic GABAergic synapse maturation in adolescent cortex. *J Neurosci,* 33:5957-68.
29. Bracken BK, Turrigiano GG (2009). Experience-dependent regulation of TrkB isoforms in rodent visual cortex. *Dev Neurobiol.* 69:267-78.
30. Bogenmann E, Thomas PS, Li Q, Kim J, Yang LT, Pierchala B, Kaartinen V (2011). Generation of mice with a conditional allele for the p75(NTR) neurotrophin receptor gene. *Genesis.* 49:862-9. doi: 10.1002/dvg.20747.
31. Mataga N, Nagai N, Hensch TK (2002). Permissive proteolytic activity for visual cortical plasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99:7717-21.
32. Echeverry R, Wu J, Haile WB, Guzman J, Yepes M (2010). Tissue-type plasminogen activator is a neuroprotectant in the mouse hippocampus. *J Clin Invest.* 120:2194-205.

33. Harauzov A, Spolidoro M, DiCristo G, De Pasquale R, Cancedda L, Pizzorusso T, Viegi A, Berardi N, Maffei L (2010). Reducing intracortical inhibition in the adult visual cortex promotes ocular dominance plasticity. *J Neurosci.* 30:361-71.
34. Baroncelli L, Sale A, Viegi A, Maya Vetencourt JF, De Pasquale R, Baldini S, Maffei L (2010). Experience-dependent reactivation of ocular dominance plasticity in the adult visual cortex. *Exp Neurol*, 226:100-9.
35. Hippenmeyer S, Vrieseling E, Sigrist M, Portmann T, Laengle C, Ladle DR, Arber S (2005). A developmental switch in the response of DRG neurons to ETS transcription factor signaling. *PLoS Biol.* 3:e159.
36. Pizzorusso T, Medini P, Berardi N, Chierzi S, Fawcett JW, Maffei L (2002). Reactivation of ocular dominance plasticity in the adult visual cortex. *Science.* 8; 298:1248-51.
37. Tognini P, Putignano E, Coatti A, Pizzorusso T (2011). Experience-dependent expression of miR-132 regulates ocular dominance plasticity. *Nat Neurosci*, 14:1237-9.
38. Lehmann K, Löwel S (2008). Age-dependent ocular dominance plasticity in adult mice. *PLoS One*, 3:e3120.
39. Naska S, Lin DC, Miller FD, Kaplan DR (2010). p75NTR is an obligate signaling receptor required for cues that cause sympathetic neuron growth cone collapse. *Mol Cell Neurosci.* 45:108-20.
40. Sun Y, Lim Y, Li F, Liu S, Lu JJ, Haberberger R, Zhong JH, Zhou XF (2012). ProBDNF collapses neurite outgrowth of primary neurons by activating RhoA. *PLoS One.* 7:e35883.
41. Deinhardt K, Kim T, Spellman DS, Mains RE, Eipper BA, Neubert TA, Chao MV, Hempstead BL (2011). Neuronal growth cone retraction relies on proneurotrophin receptor signaling through Rac. *Sci Signal.* 4(202):ra82.
42. Yamashita T, Tohyama M (2003). The p75 receptor acts as a displacement factor that releases Rho from Rho-GDI. *Nat Neurosci.* 6:461-7.
43. Yamashita T, Fujitani M, Yamagishi S, Hata K, Mimura F (2005). Multiple signals regulate axon regeneration through the Nogo receptor complex. *Mol Neurobiol.* 32:105-11.
44. Lim YS, McLaughlin T, Sung TC, Santiago A, Lee KF, O'Leary DD (2008). p75(NTR) mediates ephrin-A reverse signaling required for axon repulsion and mapping. *Neuron*, 59:746-58.
45. Riffault B, Medina I, Dumon C, Thalman C, Ferrand N, Friedel P, Gaiarsa JL, Porcher C (2014). Pro-brain-derived neurotrophic factor inhibits GABAergic neurotransmission by activating endocytosis and repression of GABAA receptors. *J.Neurosci*, 34:13516-34.
46. McGee AW, Yang Y, Fischer QS, Daw NW, Strittmatter SM (2005). Experience-driven plasticity of visual cortex limited by myelin and Nogo receptor. *Science*, 309:2222-6.
47. Syken J, Grandpre T, Kanold PO, Shatz CJ (2006). PirB restricts ocular-dominance plasticity in visual cortex. *Science*, 313(5794):1795-800.
48. Morishita H, Miwa JM, Heintz N, Hensch TK (2010). Lynx1, a cholinergic brake, limits plasticity in adult visual cortex. *Science*, 330:1238-40.

49. Beurdeley M, Spatazza J, Lee HH, Sugiyama S, Bernard C, Di Nardo AA, Hensch TK, Prochiantz A (2012). Otx2 binding to perineuronal nets persistently regulates plasticity in the mature visual cortex. *J Neurosci*, 32:9429-37.
50. Miyata S, Komatsu Y, Yoshimura Y, Taya C, Kitagawa H (2012). Persistent cortical plasticity by upregulation of chondroitin 6-sulfation. *Nat Neurosci*, 15:414-22, S1-2.
51. Carulli D, Pizzorusso T, Kwok JC, Putignano E, Poli A, Forostyak S, Andrews MR, Deepa SS, Glant TT, Fawcett JW (2010). Animals lacking link protein have attenuated perineuronal nets and persistent plasticity. *Brain*.133:2331-47.
52. Irmady K, Jackman KA, Padow VA, Shahani N, Martin LA, Cerchietti L, Unsicker K, Iadecola C, Hempstead BL (2014). Mir-592 regulates the induction and cell death-promoting activity of p75NTR in neuronal ischemic injury. *J Neurosci* 34:3419-28.

## **5 : Discussion Générale**

### **1.1 Rôle de l'activité neuronale et de la relâche de neurotransmetteurs sur la formation du territoire d'innervation des BCs**

Des altérations de l'activité et de la connectivité neuronale dans le cerveau sont associées à plusieurs maladies neurologiques. De récentes études ont démontré qu'un mauvais fonctionnement des récepteurs activité-dépendants NMDA dans les interneurons GABAergiques génère une désinhibition généralisée dans le cortex cérébral<sup>230,231</sup>. De plus, des modifications au niveau des interneurons GABAergiques qui reçoivent de puissantes afférences des neurones glutamatergiques se retrouvent dans plusieurs maladies, y compris dans la schizophrénie et l'épilepsie<sup>33,232-234</sup>. À ce jour, les mécanismes moléculaires et cellulaires qui sous-tendent l'implication de l'activité neuronale dans le développement des synapses GABAergiques, des arborisations axonales et des patrons d'innervation des INs GABAergiques dans le cerveau en développement sont mal compris. Il est donc important de bien caractériser le rôle de l'activité neuronale dans le développement des circuits d'interneurones GABAergiques et de leurs patrons d'innervation dans le néocortex car ceci aura un impact sur notre compréhension de plusieurs maladies neurologiques et psychiatriques.

Le système nerveux des mammifères est composé d'innombrables neurones différents, chacun connecté à des milliers de neurones distincts. La communication entre ces neurones dépend considérablement de la relâche de neurotransmetteurs, déclenchée par des potentiels d'action qui dépolarisent la membrane cellulaire. Par conséquent, nous avons décidé d'inactiver partiellement ou complètement un type de neurone spécifique en empêchant son potentiel membranaire de se dépolariser<sup>235</sup>. Nos résultats démontrent que l'activité neuronale joue un rôle essentiel durant les phases de maturation (EP16-24) et de maintien (EP26-32) des synapses périsonmatiques, car son inactivation par les récepteurs allatostatine de la drosophile couplés aux protéines G (AlstR) cause une réduction dans le pourcentage de somas pyramidaux innervés par les BCs. Cette réduction n'affecte pas la densité synaptique et le branchement axonal durant ses deux phases développementales.



Étant donné que l'activation de l'AlstR n'aboli pas complètement l'activité neuronale des BCs, mais qu'elle réduit la capacité de la cellule à atteindre son seuil de potentiel d'action, la prochaine étape était de comparer nos résultats avec ceux où les activités spontanée et évoquée sont complètement non-existantes. Pour complètement supprimer la fonction synaptique<sup>236</sup>, nous utilisons la chaîne légère de la toxine tétanique (TeNT-Lc) qui, contrairement aux récepteurs Alst, cause une augmentation significative du nombre de boutons GABAergiques et de branchements axonaux durant la phase de prolifération (EP16-24). Finalement, nous observons un phénotype altéré des BCs exprimant TeNT-Lc durant la phase de maintien (EP26-32). Ces cellules TeNT-Lc ont un nombre de boutons, un branchement axonal, une innervation et une taille globale de boutons sévèrement réduits comparés aux cellules contrôles.

L'activation des AlstR réduit l'excitabilité des BCs dans le cortex postnatal. Cependant, suite à leur activation, la réduction du niveau d'activité n'est pas connu. Pour répondre à cette question, il faudra effectuer un enregistrement patch-clamp sur les BCs transfectées par AlstR avant et durant l'activation de ces récepteurs. Tel qu'il a été effectué dans Baho, E et al. 2012, nous proposons de transfecter des cellules contrôles rouges ( $P_{G67}$ -*tdTomato*) et des cellules vertes exprimant les AlstR ( $P_{G67}$ -AlstR/ $P_{G67}$ /*tdTomato*) en même temps. De ce fait, nous pourrions enregistrer ces deux types de cellules pour étudier et comparer leurs propriétés biophysiques intrinsèques. Il faudrait d'abord mesurer le potentiel membranaire à l'état de repos avec et sans la présence d'allostatine pour démontrer le degré d'hyperpolarisation des cellules suite à l'activation des AlstR. Par la suite, l'étude de la réponse dynamique de ces cellules à la stimulation nous permettra de mesurer leur excitabilité. En utilisant le protocole d'analyse des potentiels d'actions (AP) évoqués, nous injecterons un courant dans ces BCs lorsque les AlstR sont inactivés et, par la suite, lorsqu'ils sont activés par le peptide. En présence du peptide allostatine, notre hypothèse suggère que les cellules vertes AlstR<sup>+</sup> auront un patron de décharge réduit comparé aux cellules contrôles rouges ou aux cellules exprimant l'AlstR non-activé. Ces cellules AlstR<sup>+</sup> nécessiteront donc un taux de courant significativement plus élevé pour générer un AP. En comparant la fréquence des APs évoqués observée chez les cellules AlstRs vs les cellules contrôles, nous pourrions quantifier le niveau de réduction de l'activité chez ces cellules.

Pour confirmer *in vivo* nos résultats obtenus *in vitro* avec AlstR, nous proposons d'utiliser l'optogénétique et les halorhodospines pour inactiver les BCs en les hyperpolarisant. Le virus adéno-associé (AAV) contenant la protéine de fusion NpHReGFP (halorhodospine) dépendante de la Cre recombinase sera injecté directement à P10 dans le cortex visuel des souris exprimant la Cre recombinase sous le contrôle du promoteur du gène de la parvalbumine (PV-Cre)<sup>237,238</sup>. Durant leur phase de prolifération, les cellules PV<sup>+</sup> du cortex visuel exprimeront les canaux halorhodospines qui seront activés par une photostimulation *in vivo* (561 nm, 100 mW). Avant de commencer cette expérience et d'activer les halorhodospines *in vivo*, il faudrait premièrement valider en tranche que la stimulation lumineuse induit l'hyperpolarisation souhaitée dans nos cellules BCs. Une fois confirmé, nous évaluerons la dynamique de croissance des axones des BCs à l'aide de l'imagerie en temps réel. En utilisant des souris en situation de contrainte anesthésiée, la microscopie 2-photon (488 nm) nous permettra de prendre une ou deux piles d'images par BC à chaque 10 minutes pour 3 heures consécutives<sup>239</sup>. Les cellules BCs seront simultanément stimulées tout au long de l'imagerie avec une différente longueur d'onde (561 nm) pour activer les canaux halorhodospines. Lors de l'imagerie *in vivo*, nous présumons que les BCs moins actives exprimant les halorhodopsines auront une réduction de boutons synaptiques et de branchements axonales comparées aux cellules contrôles. Ensuite, nous effectuerons un immunomarquage post-fixation de ces tissus pour identifier les boutons GABAergiques avec vGAT.

Notre hypothèse est aussi supportée par le groupe de Dr. Z.J. Huang qui a bloqué la transmission de GABA pour étudier son rôle dans le développement des synapses inhibitrices<sup>239</sup>. Ce groupe a adopté une stratégie génétique afin de complètement bloquer la synthèse de GABA ou sa libération par des neurones GABAergiques individuels. Pour bloquer la synthèse de GABA, ils ont utilisé des souris *GAD*<sup>-/-</sup> dans lesquelles les enzymes de GAD67 et GAD65, responsables de synthétiser le GABA, sont supprimées. De plus, GABA est chargé dans les vésicules synaptiques par un seul transporteur vésiculaire, vGAT. Pour bloquer la libération de GABA, ils ont donc aussi utilisé des souris *vGAT*<sup>-/-</sup>. Le système Cre/loxP, qui permet d'induire un KO spécifiquement dans les BCs, leur a permis de démontrer que les BCs provenant des souris *GAD*<sup>-/-</sup> et *vGAT*<sup>-/-</sup> ont une augmentation significative de leur densité axonale et du nombre de leurs boutons périsonomatiques durant la phase de prolifération

(EP24)<sup>239</sup>. Cette étude démontre que GABA favorise l'élimination et l'élagage des synapses dans les interneurons corticaux en développement.

L'administration d'un antagoniste des récepteurs NMDAR augmente la décharge de cellules pyramidales dans le cortex en diminuant l'activité des interneurons GABAergiques, ce qui produit donc une désinhibition<sup>230</sup>. Une hypofonction des NMDAR mène à un dysfonctionnement des neurones PV, car certaines études démontrent que les antagonistes de NMDAR produisent une réduction spécifique de l'expression de PV et de GAD67 dans les BCs. Ceci imite les altérations retrouvées dans la schizophrénie<sup>231</sup>. Une possibilité intéressante serait qu'une hypofonction de ces récepteurs produise une désinhibition dans la schizophrénie, principalement par la réduction de l'activité neuronale des cellules PV. Puisque nous réduisons uniquement l'activité neuronale dans les BCs avec AlstR, il serait intéressant de vérifier si les niveaux des NMDARs et des marqueurs GABAergiques (PV, GAD67) sont aussi diminués puisque l'hypofonction de NMDAR semble être un facteur important dans la schizophrénie.

En somme, ces expériences nous permettront de clarifier le rôle précis de l'activité neuronale dans le développement des synapses GABAergiques et de mieux comprendre le rôle des différentes classes spécifiques de neurones GABAergiques dans le cerveau.

## **1.2 Rôle de l'activation de p75NTR dans la formation du territoire synaptique des BCs**

L'établissement du territoire synaptique d'une BC corticale est activité-dépendante<sup>65,66</sup>. Les médiateurs moléculaires potentiels de ce processus doivent pouvoir répondre aux différents niveaux d'activité et être en mesure d'induire des changements selon l'activité. Parmi ces médiateurs, le facteur neurotrophique dérivé du cerveau, BDNF, est particulièrement important, car il joue un rôle essentiel dans de nombreuses facettes du fonctionnement du système nerveux central, y compris dans les différentes formes de plasticité synaptique induite par l'activité<sup>126,240</sup>. Un aspect essentiel de la régulation de BDNF est sa synthèse, qui est dépendante du niveau d'activité et de l'expérience sensorielle. Dans le cortex, la transcription de BDNF, dépendante de son promoteur IV, représente la majorité de son expression qui est induite par l'activité neuronale<sup>193</sup>. Même s'il est bien établi que BDNF favorise le développement synaptique GABAergique, ses mécanismes moléculaires et cellulaires sont

plus complexes que nous le pensions. Alors que plusieurs études démontrent que la signalisation et la synthèse activité-dépendante de BDNF favorisent la maturation des circuits GABAergiques dans le cortex post-natal, le grand défi de ces études constitue les manipulations de BDNF, qui affectent à la fois mBDNF et proBDNF. Ainsi, l'implication de proBDNF et p75NTR reste encore inconnue dans ce processus. Nos travaux nous permettent maintenant d'affirmer que proBDNF, via son activation du récepteur p75NTR, joue un rôle critique dans l'élagage des synapses GABAergiques.

Pour commencer, nous avons dû déterminer la localisation et le patron d'expression de p75NTR, plus précisément dans le cortex visuel où nos expériences sont effectuées. Contrairement aux isoformes du récepteur TrkB, qui sont exprimés dans la plupart des interneurons PV<sup>+</sup>, le récepteur p75NTR est exprimé uniquement dans un sous-ensemble d'interneurons PV<sup>+</sup> dans le cortex visuel<sup>241</sup>. Bracken et Turrigiano ont également observé l'expression de p75NTR dans les neurones pyramidaux putatifs, mais non dans les astrocytes. En mesurant l'expression de l'ARNm de p75NTR durant le développement normal et en condition de privation visuelle, l'expression de p75NTR diminue subitement et reste faible suite à l'ouverture des yeux (à P14) dans les régions monoculaire (mV1) et binoculaire (bV1) du cortex visuel. Ce même patron d'expression est aussi observé dans l'hippocampe lorsque p75NTR atteint son plus haut niveau d'expression durant la première semaine post-natale et diminue considérablement après 4 semaines. Lorsque les animaux sont soumis à une privation monoculaire, aucun changement significatif de l'expression de p75NTR n'a été observé. En revanche, les souris complètement privées de la lumière (DR; 'dark-rearing') entre P10 et P21 ont une augmentation significative de l'expression de p75NTR dans le bV1. Chez les animaux qui subissent un DR, l'expression de p75NTR à P21 est comparable à celle de P10, ce qui suggère que le DR empêche la baisse de l'expression développementale de p75NTR dans le cortex visuel<sup>241</sup>. Ces données démontrent que l'expérience visuelle produit des changements très sélectifs dans l'expression de p75NTR, et que ces changements dépendent des stades développementaux, de la région corticale et du niveau de privation visuelle.

La première étape de notre étude nous a permis d'établir le patron d'expression de p75NTR dans nos modèles *in vitro* et *in vivo*. Dans nos tissus *in vivo*, nous avons pu détecter un marquage de p75NTR dans les cellules PV<sup>+</sup> à P18 (Baho et al. 2015; Fig1). Par contre,

après avoir essayé plusieurs anticorps différents contre le récepteur p75NTR, nous avons conclu que ces derniers ne sont pas suffisamment efficaces pour détecter p75NTR dans les tissus plus âgés (>P24) par immunohistochimie. Une différente stratégie serait de développer et d'utiliser l'hybridation *in situ* afin de détecter l'ARNm de p75NTR dans nos tranches corticales. Bref, pour confirmer la spécificité de la sonde marquée pour la détection de p75NTR par hybridation *in situ*, nous allons comparer la détection de p75NTR dans des souris wild-type et *Ngfr*<sup>-/-</sup>. Nous croyons observer p75NTR dans les cellules corticales provenant des souris WT, et non dans les souris *Ngfr*<sup>-/-</sup>. Comme deuxième contrôle, il serait intéressant de détecter l'expression de p75NTR dans les cellules PV des tissus contrôles vs celles des tissus provenant des souris *PV-Cre:p75NTR*<sup>flx/flx</sup>. Ces dernières ont un KO de p75NTR uniquement dans les cellules PV. Encore une fois, nous devrions détecter p75NTR dans les cellules PV des tissus contrôles et non dans les tissus des souris *PV-Cre:p75NTR*<sup>flx/flx</sup>.

Nos résultats démontrent que la suppression de p75NTR dans des BCs corticales individuelles induit le développement d'une innervation périsonomatique exubérante par ces BCs mutantes. De plus, un traitement des cultures organotypiques avec une forme de proBDNF résistante au clivage (mut-proBDNF) réduit fortement le territoire synaptique de ces cellules. De même, l'ajout de tPA et du peptide PPACK, qui inactive tPA, réduit et favorise la maturation des innervations synaptiques GABAergiques respectivement. Nous démontrons également que l'innervation exubérante, formée par les BCs p75NTR<sup>-/-</sup>, n'est pas affectée par un traitement de mut-proBDNF. Ceci suggère que l'activation de p75NTR par proBDNF régule négativement le territoire synaptique des BCs dans le cortex post-natal.

Le groupe de Dr. David Kaplan et ses collaborateurs ont aussi démontré que l'élagage axonale dans les neurones sympathiques nécessite à la fois p75NTR et la synthèse activité-dépendante de BDNF. Leurs études démontrent que les axones sympathiques qui subissent une dépolarisation se développent plus que ceux qui sont non-stimulés et en concurrence. En parallèle, les axones provenant des souris *Ngfr*<sup>-/-</sup> étaient capables de se développer de façon similaire avec ou sans stimulation<sup>188</sup>. Cela indique que l'activation de p75NTR est essentielle pour la concurrence activité-dépendante des axones sympathiques. De plus, il a été démontré que la myéline inhibe la croissance des axones cholinergiques, en partie par la voie de

p75NTR-Rho-GDI-Rho-caspase6<sup>184</sup>. Ceci indique donc que la signalisation de p75NTR peut limiter la croissance des axones dans des différents types de cellules.

Comment peut-on expliquer ce phénotype et l'action de proBDNF/p75NTR sur le développement des cellules GABAergiques? L'activation de p75NTR peut inhiber la formation des territoires d'innervation des BCs en favorisant l'effondrement des cônes de croissance via l'activation de RhoA et/ou par l'inactivation de la signalisation de Rac<sup>187,242</sup>. Ceci mène à une déstabilisation des filaments d'actine et à l'effondrement de la croissance des neurites. En outre, il a été suggéré que l'activation de p75NTR peut sensibiliser les neurones aux signaux moléculaires inhibiteurs du cône de croissance, tels que l'inhibiteur de la croissance des neurites Nogo, les éphrines et les sémaphorines<sup>162,183,243,244</sup>. Il serait donc intéressant d'étudier si la signalisation de p75NTR, médiée par proBDNF, modifie la réponse axonale des BCs à ces signaux inhibiteurs. Aussi, proBDNF peut agir directement sur le site post-synaptique des synapses GABAergiques par deux voies distinctes: 1) la voie RhoA-Rock-PTEN, qui diminue les niveaux de phosphorylation des récepteurs GABA<sub>A</sub>, affectant ainsi le fonctionnement du récepteur et déclenchant l'endocytose et la dégradation des récepteurs internalisés et 2) la voie JAK-STAT-ICER menant à la réduction de la synthèse des récepteurs GABA<sub>A</sub><sup>194</sup>. Il reste encore à démontrer si la régulation des récepteurs GABA<sub>A</sub>, par proBDNF-p75NTR, se produit principalement dans les cellules pyramidales et/ou dans les BCs.

Afin d'étudier si la diminution des récepteurs GABA<sub>A</sub> est impliquée dans la réduction de l'innervation synaptique induite par proBDNF/p75NTR, nous proposons de traiter nos cultures organotypiques avec mut-proBDNF et de quantifier l'expression de GABA<sub>A</sub>Rβ<sub>2/3</sub> par immunohistochimie. Un traitement de mut-proBDNF devrait causer une diminution de GABA<sub>A</sub>Rβ<sub>2/3</sub> dans les BCs. Ce phénomène ne devrait pas avoir lieu lorsque nous ajouterons l'inhibiteur de p75NTR, TAT-pep5, ou lorsque p75NTR est spécifiquement supprimé dans les BCs par la recombinaison Cre. Cette dernière expérience est essentielle, car elle nous démontrera si les effets observés avec proBDNF sont médiés par une action directe de p75NTR sur les BCs. Par la suite, il faudrait investiguer la contribution de la voie de signalisation de RhoA, activée potentiellement par proBDNF/p75NTR, dans la régulation de

GABA<sub>A</sub>R $\beta_{2/3}$ . Si l'inhibiteur spécifique de RhoA (ROCKi) prévient la diminution de GABA<sub>A</sub>R $\beta_{2/3}$  dans les BCs, nous pourrions supposer que proBDNF active la voie de signalisation de RhoA en promulguant la déphosphorylation de GABA<sub>A</sub>R $\beta_{2/3}$ . Étant donné que le traitement de mut-proBDNF affecte toute la tranche du tissu, et non spécifiquement les cellules PV, nous proposons de générer un KO spécifique de p75NTR dans les BCs afin de vérifier les niveaux GABA<sub>A</sub>R $\beta_{2/3}$ . Contrairement au traitement de mut-proBDNF, le manque de p75NTR causerait une augmentation de GABA<sub>A</sub>R $\beta_{2/3}$  dans les BCs, ce qui pourrait expliquer l'augmentation d'innervation GABAergique observé chez les cellules p75NTR<sup>-/-</sup>.

### 1.3 L'activité neuronale et p75NTR

L'établissement du territoire synaptique d'une BC peut être régulé non seulement par BDNF, mais aussi par le niveau des récepteurs p75NTR et TrkB exprimés par ces cellules. Des études *in vivo* ont démontrées que l'expression de p75NTR, et non celle de TrkB, est modulée par l'expérience visuelle<sup>241</sup>. Il serait donc important d'explorer si les différents niveaux d'activité dans les BCs individuelles régulent l'expression de p75NTR.

Les résultats que nous avons obtenus ont démontré que les différents niveaux d'activité d'une BC peuvent moduler le nombre de cellules ciblées et contactées, de même que le nombre de boutons périsonomatique formés par cette cellule. Pour explorer le rôle de l'activité neuronale d'une BC au niveau de l'établissement de son propre champ d'innervation, nous réduirons son excitabilité en activant les récepteurs Alst couplés aux protéines G. Une réduction de l'excitabilité des BCs individuelles diminue considérablement le nombre de cellules contactées par ces cellules pendant la phase de prolifération des synapses périsonomatique. Ces résultats suggèrent que le niveau d'activité d'une BC pourrait déterminer sa réponse aux neurotrophines. Il faudrait donc déterminer comment les niveaux d'activité d'une BC modulent l'expression de son récepteur p75NTR.

Pour répondre à cette question initiale, les récepteurs Alst seront exprimés par transfection biolistique pour réduire l'excitabilité cellulaire. Suite à l'activation de ces récepteurs, les tranches de cultures seront immunocolorées avec les anticorps contre p75NTR ou TrkB. Par la suite, les niveaux d'expression de ces deux récepteurs dans les cellules

exprimant AlstR seront comparés aux cellules voisines, qui n'expriment pas le récepteur AlstR. Nous prévoyons que les cellules moins actives exprimant AlstR exprimeront des niveaux plus élevés de p75NTR par rapport aux cellules contrôles dans une même tranche de culture. Cependant, comme il a été rapporté chez les neurones sympathiques, l'expression de TrkB ne devrait pas être affectée. Malheureusement, les anticorps anti-p75NTR et anti-TrkB ne sont pas assez efficaces et ils ne nous permettront pas d'observer et de quantifier des petites différences au niveau de leur expression respective. Nous utiliserons donc l'hybridation *in situ* pour identifier l'ARNm de ces deux récepteurs. Avec cette technique, il serait intéressant d'étudier les différents niveaux d'activité qui affecteraient la réponse des BCs à des traitements de proBDNF ou mBDNF. De plus, en traitant nos cultures organotypiques avec wt-proBDNF, mut-proBDNF ou PPACK, nous pourrions respectivement augmenter mBDNF ou proBDNF. En effet, si l'expression de p75NTR est augmentée dans les cellules moins actives, nous prévoyons que l'augmentation de proBDNF et de mBDNF devrait avoir des effets plus dramatiques sur les BCs moins actives exprimant AlstR, comparativement aux cellules voisines contrôles.

Bref, notre hypothèse suggère que les niveaux d'activité d'une BC individuelle régulent l'expression de p75NTR. À son tour, ce dernier détermine la façon dont ils répondront aux changements locaux de proBDNF. En considérant que l'activité et la sécrétion de tPA sont également régulées par l'activité neuronale, nous pouvons envisager une situation où une augmentation de l'activité neuronale pourrait favoriser la croissance axonale et la formation des synapses d'une BC en augmentant le clivage de proBDNF et en diminuant les niveaux des récepteurs p75NTR.

#### **1.4 proBDNF et la restauration de la plasticité corticale**

Puisqu'un traitement de mut-proBDNF régule négativement le territoire synaptique d'une BC durant sa phase de maintien, la prochaine étape est d'examiner si mut-proBDNF affecte l'innervation périsonmatique formée par les BCs *in vivo* chez la souris adulte. En utilisant les marqueurs présynaptiques GABAergiques vGAT et PV, nous avons conclu que le nombre de boutons périsonmatiques GABAergiques a été diminué significativement dans le



cortex infusé avec mut-proBDNF par rapport à l'hémisphère controlatéral non-infusé ou traité avec de la saline.

Au cours du développement, le potentiel intrinsèque de la plasticité cérébrale est activement freiné par une augmentation de l'inhibition intracorticale et par l'expression simultanée de plusieurs facteurs agissant comme des 'freins'<sup>94</sup>. Ces derniers limitent les changements de circuiterie cérébrale qui dépendent de l'expérience au-delà d'une période critique<sup>75,76</sup>. Plusieurs de ces facteurs freinant la plasticité semblent affecter la fonction des BCs directement<sup>88,89,93</sup>. Étant donné que la maturation de l'inhibition GABAergique corticale est cruciale pour la fermeture de la période critique de plasticité de la dominance oculaire (OD) et que l'activation de p75NTR, via proBDNF dans les cellules PVs spécifiquement, est suffisante pour déstabiliser les boutons GABAergiques périsonomatiques, nos données suggèrent qu'une réduction de la connectivité de cellules PV pourrait être suffisante pour promouvoir la plasticité de dominance oculaire dans le cortex adulte.

Divers études supportent cette hypothèse parce que des traitements avec l'inhibiteur de déacétylase d'histones (Trichostatine), l'inhibiteur spécifique de GAD67 (3-mercaptopropionique), l'antagoniste des récepteurs GABA<sub>A</sub> (picrotoxin), l'inhibiteur sélectif de la recapture de la sérotonine (Fluoxétine) et des souris KO de *Lynx1* (inhibiteur des récepteurs d'acétylcholines nicotiques), engendrent tous une diminution de l'inhibition GABAergique dans le cortex adulte<sup>92,94-96</sup>. Ceci suggère une forte corrélation avec une réouverture de la période critique de la OD. Ces études démontrent une réduction des synapses périsonomatiques formés par les cellules PV. En concordance avec ces données, nos résultats démontrent que mut-proBDNF régule négativement le territoire synaptique des BC. Ils démontrent aussi que l'inactivation de p75NTR, spécifiquement et exclusivement dans les BCs, est suffisante pour bloquer les effets de mut-proBDNF dans le cortex adulte.

Plusieurs études ont démontré que le cortex visuel de la souris reste malléable après la 5<sup>ème</sup> semaine post-natale<sup>79</sup>. La perte des signaux d'un oeil, privé brièvement de la vision dans la zone binoculaire du V1, est généralement limitée avant P100 grâce à cette plasticité cérébrale préservée. Nous avons donc décidé d'effectuer nos expériences de plasticité de la OD *in vivo* après cet âge en provoquant une privation monoculaire (MD) de 3 jours. En plus

de nos résultats prometteurs, les résultats obtenus, suite à notre collaboration avec Dr. Tommaso Pizzorusso, démontrent clairement que la plasticité de dominance oculaire est complètement rétablie par mut-proBDNF chez la souris adulte. Pour mieux caractériser ce mécanisme, nous avons aussi utilisé des souris KO pour p75NTR spécifiquement dans les cellules PV pour conclure que l'activation de p75NTR, observée dans les BCs par l'entremise de proBDNF, est nécessaire pour induire cette plasticité de la OD chez les souris adultes. Ces résultats démontrent le rôle critique de l'activation de p75NTR dans la régulation et le maintien de la connectivité du circuit GABAergique à partir du développement postnatal précoce jusqu'à l'âge adulte.

Le rôle des PNN sur les cellules GABAergiques a premièrement été observé par Dr. Pizzorusso et al. Ils ont démontré que la dégradation des protéoglycans de chondroïtine-sulfate (CSPGs), qui forment les PNNs avec la chondroitinase-ABC, induit une réactivation de la plasticité de la OD dans le cortex visuel adulte<sup>93</sup>. Récemment, le groupe de Dr. Takao K. Hensch a démontré qu'en supprimant l'enzyme qui produit le glutathione, une perturbation de l'équilibre redox dans les interneurons PV prolonge la période critique chez l'adulte<sup>245</sup>. Ce phénomène s'explique principalement par une diminution dramatique des réseaux périneuronaux enveloppés autour des BCs. Dans ce contexte, nous avons donc vérifié le deuxième critère associé à la restauration de la plasticité chez l'adulte en examinant si les PNNs, formés autour de ces cellules PV, étaient aussi affectées suite à un traitement avec mut-proBDNF. Nous concluons en effet qu'un traitement avec proBDNF réduit significativement l'intensité des PNN. Ceci suggère que proBDNF pourrait potentiellement ré-ouvrir la plasticité corticale chez l'adulte, partiellement par la régulation négative des PNNs autour des cellules BCs.

Comment peut-on expliquer la relation entre l'activation de p75NTR, la disparition des PNN et la réduction des boutons GABAergiques? Il est possible que l'activation de p75NTR puisse directement affecter la stabilité des synapses et des branchements axonaux des BCs, en affectant la dynamique du cytosquelette localement<sup>187,242</sup>. Une autre possibilité est que l'activation de p75NTR, par proBDNF, puisse affecter la synthèse des protéines spécifiques, y compris celles requises pour la condensation des PNN des cellules PVs<sup>246</sup>. Une structure intacte des PNN pourrait limiter structurellement tous les réarrangements synaptiques des

afférences sur les cellules PVs, ce qui pourrait ensuite réguler leur excitabilité et leur relâche synaptique. En effet, nous avons déjà démontré qu'une réduction de l'excitabilité des BCs conduit à une réduction de leur territoire synaptique, même après la phase de prolifération de synapses<sup>247</sup>. De plus, la perturbation des PNN peut empêcher la recapture de l'homéoprotéine Otx2 dans les cellules PVs. Celle-ci est requise pour que les BCs maintiennent leur phénotype adulte<sup>89</sup>. Il serait donc important de vérifier si le pourcentage de cellules PV<sup>+</sup>/Otx2<sup>+</sup> est diminué chez la souris *PV-Cre:p75NTR<sup>flx/flx</sup>* ou lorsque le cortex visuel WT est traité avec mut-proBDNF. Finalement, nos études suggèrent que l'activation contrôlée de p75NTR pourrait être un outil utile qui permettrait la restauration de la plasticité corticale chez l'adulte.

### 1.5 La controverse entourant la sécrétion de proBDNF *in vivo*

Le précurseur de BDNF se lie avec une grande affinité avec le récepteur p75NTR<sup>248</sup>. Cependant, la forme mature de BDNF se lie avec une grande affinité au récepteur TrkB et avec une faible affinité au p75NTR<sup>131</sup>. L'expression de TrkB est relativement stable au cours des premiers mois après la naissance. Cela a été observé dans des études *in vivo* et *in vitro*<sup>241,249</sup>. Par ailleurs, le niveau d'expression de p75NTR diminue avec le temps, mais reste toujours détectable après l'ouverture des yeux (environ à P13) dans le cortex visuel et dans l'hippocampe *in vivo*<sup>128,147,201,241</sup>.

La quantification des niveaux des formes précurseur et mature de BDNF *in vivo* est techniquement difficile à cause de la concentration subnanomolaire des isoformes BDNF et des limitations au niveau de la spécificité ainsi que de la sensibilité des anticorps. La relâche neuronale du proBDNF endogène reste encore controversée. Les études antérieures démontrent en effet des résultats contradictoires concernant le rapport de proBDNF/mBDNF pendant le développement et à l'âge adulte. Pour tenter de résoudre ce problème, Dr. Yang et ses collaborateurs ont utilisé des souris *BDNF-HA/+* exprimant deux allèles de BDNF avec une étiquette HA pour détecter les isoformes de BDNF avec des anticorps spécifiques contre HA<sup>128</sup>. En utilisant cette technique, ils ont constaté que les niveaux de proBDNF dans l'hippocampe atteignent leur seuil après 2 semaines et sont par la suite réduits, tout en restant détectables dans l'hippocampe mature. À l'inverse, la forme mature de BDNF est faiblement exprimée à la naissance (jour postnatal 0; P0) et elle augmente rapidement après l'ouverture

des yeux, tout en restant facilement détectable jusqu'à l'âge adulte, où elle représente l'isoforme le plus abondant.

Même si plusieurs études ont constaté que proBDNF et mBDNF sont tous les deux sécrétés par les neurones, le groupe de Matsumoto a, à son tour, démontré que mBDNF est la forme prédominante détectée dans les lyses cellulaires. De plus, la sécrétion de proBDNF n'a pas été observée. Il faut noter que les différences expérimentales suivantes auraient pu altérer la détection de proBDNF : soit l'utilisation de cultures mixtes de neurones et de cellules gliales, l'omission d'inhibiteurs de la plasmine ainsi que le traitement prolongé de bicuculine (50uM; 24hr), qui aurait pu causer une excitotoxicité.

Pour expliquer ces résultats et pour clarifier cette controverse, Yang et al. ont directement comparé leurs conditions de culture avec celles utilisées par Matsumoto<sup>149</sup>. Ils ont utilisé des neurones hippocampiques WT et BDNF-HA/+ avec un traitement de KCl (90 min) pour induire la sécrétion des isoformes de BDNF. Dans les cultures neuronales/gliales mixtes, qui ne possèdent pas d'inhibiteur de la plasmine, proBDNF était détectable dans les lyses cellulaires et dans le milieu, mais son niveau de sécrétion était réduit par rapport à celui retrouvé dans des cultures neuronales en absence de cellules gliales. Ces résultats suggèrent que les cellules gliales peuvent moduler les niveaux extracellulaires de proBDNF. Cette observation est compatible avec les niveaux élevés de protéases, y compris tPA, synthétisées par les cellules gliales. En outre, la génération et l'utilisation d'une souris BDNF, étiquetée avec un épitope HA, ont sensiblement amélioré la détection des isoformes de BDNF comparé à leur détection avec des anticorps ciblant le domaine mature de BDNF.

Ces résultats ont aussi été répétés et confirmés par le groupe de Dr. B.L. Hempstead, suggérant fortement que la forme précurseur de BDNF est libérée par des neurones<sup>147</sup>. Ce groupe a généré des souris knockin *proBDNF-HA/+* en remplaçant un allèle de *bdnf* avec un allèle de *probdnf-HA*, qui contient une mutation au site de clivage des proconvertases/furines. Cette souris contient donc un allèle endogène pour assurer sa survie. Un tag HA a aussi été ajouté au C-terminal pour faciliter la détection de l'allèle introduit, *probdnf-HA*. La génération de ces souris leur a permis d'évaluer les fonctions physiologiques de proBDNF *in vivo*. Chez ces souris, une augmentation de proBDNF et une réduction de mBDNF dans l'hippocampe sont observées. De plus, cette substitution d'acides aminés, qui altère le clivage de proBDNF, n'a pas modifié le triage et le trafic intracellulaire de la forme précurseur de BDNF. De plus,

les niveaux de p75NTR chez ces souris ne sont pas modifiés. Ceci suggère que les changements compensatoires en réponse à une accumulation de proBDNF ne sont pas suffisamment significatifs.

Afin de mieux comprendre la relâche neuronale totale du proBDNF endogène dans nos modèles d'étude, nous proposons d'utiliser ces mêmes souris *BDNF-HA/+* pour nos cultures organotypiques *in vitro* et pour nos expériences *in vivo*. Dans nos cultures organotypiques, nous pourrions générer des WB anti-HA durant les différents stades de développement d'une BC (EP10, 16, 24, 32, 40) afin de mieux caractériser les niveaux d'expression de proBDNF. Notre hypothèse suggère qu'il y aura un niveau élevé de proBDNF à la naissance, suivi d'une diminution rapide à EP16. Il serait aussi intéressant de confirmer ces résultats *in vivo* car cela nous permettrait de caractériser l'expression de proBDNF chez les souris adultes plus âgées (P100). Après avoir mieux compris et établi le patron d'expression de proBDNF dans nos deux modèles, nous effectuerons ces mêmes expériences en parallèle avec l'ajout exogène de mut-proBDNF, wt-proBDNF, PPACK et/ou tPA. Finalement, ces expériences nous permettront de définir davantage l'effet de nos traitements sur le niveau de proBDNF. Nos hypothèses suggèrent qu'il y aura une augmentation de proBDNF avec un traitement de mut-proBDNF et PPACK, sans affecter les niveaux de mBDNF.

## 1.6 proBDNF et son effet local sur les synapses GABAergiques

Il serait intéressant de vérifier si proBDNF contrôle le nombre de synapses périsonotiques GABAergiques formées sur les cellules pyramidales de façon locale. En tenant compte du fait que BDNF est principalement synthétisé par les cellules pyramidales, nous pouvons générer un knock-out conditionnel de l'expression de BDNF dans ces cellules individuelles en utilisant des souris transgéniques BDNF ayant l'exon 5 floxé, qui code la protéine de BDNF mature<sup>64</sup>. Après une transfection de CRE comprenant le signal de localisation nucléaire (Cre-NSL-GFP), qui causera un KO de BDNF dans les cellules pyramidales, nous évaluerons l'innervation GABAergique autour des cellules pyramidales transfectées par immunofluorescence avec des marqueurs synaptiques GABAergiques et par enregistrement des mIPSC. Nous supposons que les cellules pyramidales *BDNF<sup>-/-</sup>* auront une déficience d'afférences GABAergiques fonctionnelles, comparé aux cellules voisines

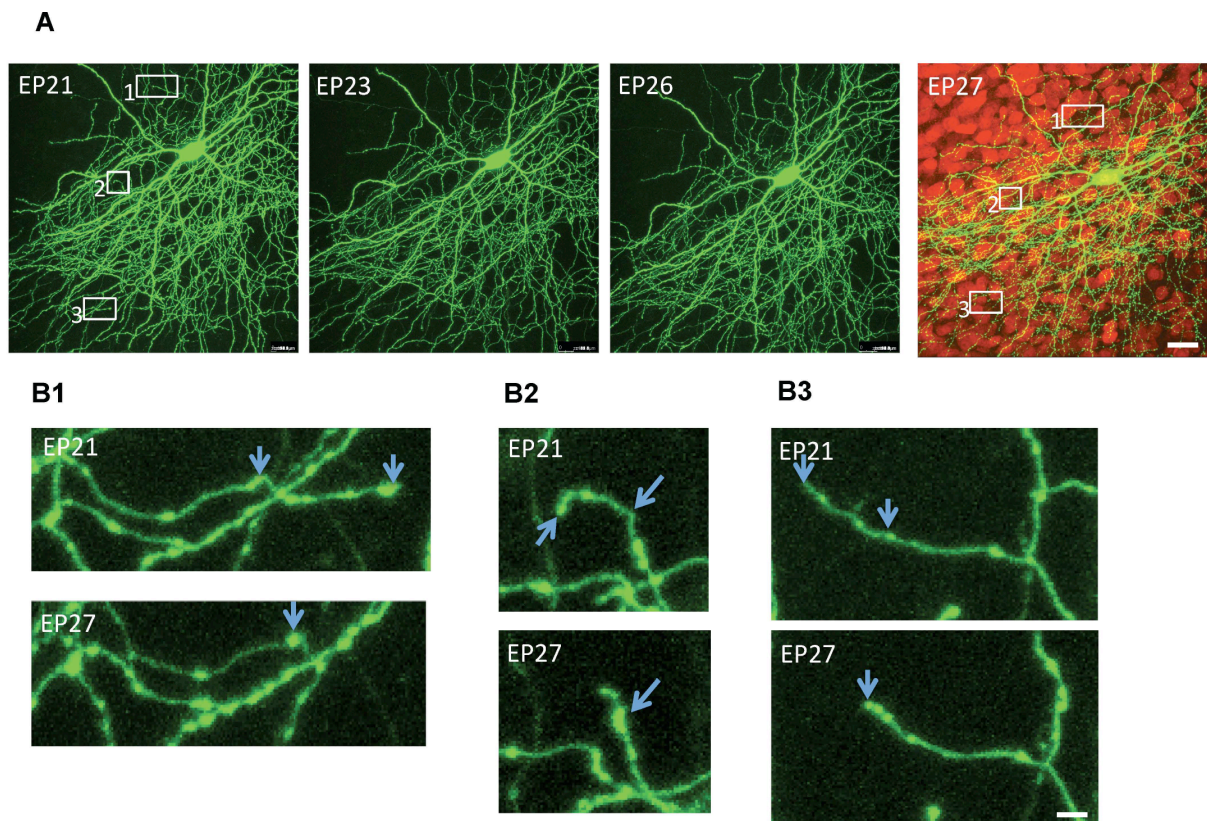
contrôles non transfectées, comme il a été démontré par Kohara et al. Ensuite, si proBDNF joue un rôle actif dans l'établissement du territoire d'une BC et que les effets que nous avons observés ne sont pas simplement dus à la concurrence avec les mBDNF endogènes pour les différents récepteurs, cet effet devrait être soit aggravé ou amélioré avec le traitement de mut-proBDNF et mBDNF, respectivement.

Finalement, nous pourrions répéter ces expériences avec des souris knockin *proBDNF-HA/+*, qui expriment moins de mBDNF comparées aux souris contrôles<sup>147</sup>. Similairement au traitement de mut-proBDNF, nous supposons que les BCs provenant des tissus proBDNF-HA/+ auront une diminution significative de densité des boutons, des terminaisons axonales de branchement et du pourcentage de cellules innervées. Il sera intéressant de traiter ces tissus proBDNF-HA/+ avec la forme wild-type de proBDNF ou avec l'anticorps REX, qui bloque p75NTR, afin d'observer si ces traitements causeront un rétablissement complet ou partiel du phénotype observé au niveau des BCs. Finalement, une surexpression de BDNF chez les souris transgénique *BDNF<sup>TG</sup>* cause une ouverture précoce de la plasticité de la OD, car BDNF accélère la maturation de l'innervation GABAergique. Contrairement aux souris *BDNF<sup>TG</sup>*, nous nous attendons à ce que les souris *proBDNF-HA/+* empêchent la maturation des cellules PV et la plasticité de la OD, qui commence vers P24. Ce phénomène est aussi observé chez les souris où l'OTX2 est supprimé dans les cellules PV.

Des études récentes d'imagerie suggèrent que la formation de l'innervation d'une BC est un processus hautement dynamique et itératif, qui implique à la fois des changements progressifs et régressifs des branchements axonales et du nombre de synapses<sup>26,239,247</sup>. Une augmentation nette du territoire synaptique d'une BC peut être obtenue soit par une réduction de l'élagage d'axones et/ou par une augmentation de la stabilisation et de l'extension des axones. Il serait alors intéressant de comprendre comment proBDNF influence ce processus dynamique. Pour répondre à cette question, nous allons réaliser des expériences d'imagerie en temps réel dans des cultures vivantes.

Notre objectif est de suivre les processus d'extension/rétraction des branchements axonaux et de la prolifération des boutons synaptiques d'une BC, en relation avec la présence de cibles post-synaptiques potentielles. Pour pouvoir étudier la dynamique axonale des BCs,

nous devons saisir des images d'une même BC, une fois par jour, au courant de la période où l'extension des branches et la prolifération de boutons périsonomatiques se produisent. Ces expériences sont réalisables puisque j'ai réussi l'optimisation de l'imagerie en temps réel dans notre laboratoire. Cette technique m'a permis de prendre des images quotidiennes d'une BC durant sept jours consécutifs.



**Figure 1. Expérience préliminaire démontrant la faisabilité de l'imagerie en temps réel des BCs.**

(A) Imagerie en temps réel d'une BC individuelle de EP21 à EP27. À la fin de l'expérience, les cultures organotypiques ont été fixées et immunomarquées avec NeuN (rouge). Pas de présence de photodommage ou de toxicité cellulaire visible après 7 jours d'imagerie. (B) Exemple d'élargage des axones d'une BC individuelle (flèches). La croissance axonale et la formation de boutons ont aussi été observées par cette technique.

Suite à l'ajout de la forme wild-type/mutante de proBDNF et/ou tPA/PPACK dans les cultures organotypiques, nous examinerons et analyserons la dynamique axonale de ces BCs. Nos hypothèses suggèrent que l'ajout de wt-proBDNF et de tPA favoriseraient l'extension et la

stabilisation des branchements axonaux et des boutons périsonmatiques pyramidaux. Par conséquent, mut-proBDNF et PPACK devraient augmenter l'élagage axonale et l'élimination des boutons périsonmatiques. Pour renforcer notre hypothèse, il serait important d'étudier la dynamique axonale des souris *proBDNF-HA/+*, qui surexpriment proBDNF. Nous estimons que les BCs simples auront des arborisations axonales réduites comparé aux cellules contrôles. Nous sommes bien placés pour vérifier notre hypothèse car nous sommes en mesure de visualiser les axones des BCs dans les tissus vivants pour la première fois.

Les expériences mentionnées ci-dessus sont importantes parce qu'elles vont préciser le rôle de proBDNF dans l'établissement du territoire synaptique dans une BC. De plus, ces expériences vont révéler les mécanismes dynamiques qui sous-tendent la régulation de proBDNF et mBDNF dans l'innervation des BCs.

## **1.7 L'interaction de mBDNF/TrkB et NCAM dans le développement du territoire synaptique GABAergique**

La signalisation BDNF-TrkB est mieux comprise que la signalisation proBDNF-p75NTR. TrkB est fortement exprimé par les interneurons GABAergiques et son activation, médiée par mBDNF, favorise la maturation des synapses GABAergiques. Lors de sa liaison avec mBDNF, TrkB a la capacité de phosphoryler une grande variété de molécules en fonction du type de neurone et de son stade de développement<sup>250</sup>. Il est donc important de déterminer la voie moléculaire reliant l'activation de TrkB à la maturation de l'innervation des BCs. Récemment, une étude a démontré que TrkB interagit directement avec la molécule d'adhésion des cellules neurales (NCAM). De plus, la liaison entre TrkB et BDNF induit la phosphorylation de NCAM et ce dernier favorise la croissance de neurites. En parallèle, nous avons démontré que NCAM contrôle fortement la maturation des BCs<sup>63</sup>. Dans cette étude, nous avons préparé des cultures organotypiques de souris NCAM floxé pour générer un knock-out conditionnel de NCAM. Ce KO est médié par CRE à l'aide d'une transfection biolistique de P<sub>G67</sub>-CREiresGFP dans des BCs individuelles, à différents stades de développement spécifiques<sup>63</sup>. Nos résultats ont démontré qu'un knock-out de NCAM altère de façon significative l'innervation périsonmatique formée par ces BCs mutantes. Par la suite, nous



voulions vérifier et explorer l'hypothèse selon laquelle les effets promoteurs de BDNF sur la maturation de l'innervation des BCs sont médiés en partie par l'activation de NCAM.

Premièrement, nous avons exploré la nécessité de NCAM dans l'expression des effets de mBDNF et de la maturation du territoire synaptique des BCs. Nous avons donc généré un KO de l'expression de NCAM, par transfection dans des BCs individuelles, pendant la phase de prolifération des synapses GABAergiques. Les BCs NCAM<sup>-/-</sup> ont aussi été traitées avec la forme wild-type de proBDNF au cours de cette même période de développement. Nos résultats préliminaires démontrent que NCAM est nécessaire pour l'action de mBDNF, car l'ajout de BDNF aux cellules NCAM<sup>-/-</sup> n'est pas suffisant pour empêcher les déficits d'innervation périsomatique formées par les BCs NCAM<sup>-/-</sup>. Cependant, les BCs sauvages traitées avec wt-proBDNF ont formé un nombre accru de boutons et de branchements périsomatiques autour des somas pyramidaux.

Deuxièmement, il serait important de déterminer si NCAM est le seul effecteur de la signalisation de BDNF dans les BCs ou si mBDNF favorise la croissance axonale GABAergique ainsi que la formation de synapses périsomatiques à travers d'autres voies parallèles. Pour répondre à cette question, nous pouvons comparer simultanément des cellules NCAM<sup>-/-</sup> non-traitées avec des cellules NCAM<sup>-/-</sup> traitées avec wt-proBDNF à EP16 jusqu'à EP24. Si ces deux groupes présentent un phénotype similaire avec une réduction dramatique semblable de l'innervation périsomatique, nous pourrions conclure que la signalisation NCAM est la cible principale de la signalisation de mBDNF dans les BCs.

Afin d'étudier ce phénomène, nous pourrions utiliser l'imagerie en temps réel pour étudier la dynamique axonale des BCs NCAM<sup>-/-</sup> traitées simultanément avec wt-proBDNF. Cette technique d'imagerie nous permettra d'observer si ces cellules ont une réduction plus dramatique du branchement axonal au début du traitement et si celui-ci se stabilise par la suite, vers la fin du traitement. Cette technique nous permettra aussi de déterminer si les cellules NCAM<sup>-/-</sup> et le traitement de mut-proBDNF altèrent différemment le développement des BCs durant la phase de maturation. Par exemple, nous pouvons spéculer que proBDNF diminue les branchements axonaux vers la fin de la phase de maturation (EP21), comparé aux cellules NCAM<sup>-/-</sup>, qui ont une réduction axonale dès le début (EP16). Ces expériences et ces résultats

sont importants car ils permettent de clarifier les mécanismes moléculaires en aval de l'activation de BDNF/TrkB dans l'établissement du territoire synaptique des BCs matures.

## **1.8 La signalisation proBDNF/p75NTR dans des conditions pathologiques**

Plusieurs études ont démontré une forte corrélation entre les niveaux de BDNF et divers troubles pathologiques. Une surexpression de BDNF dans l'amygdale et l'hippocampe est en corrélation directe avec une forte anxiété sans changer les volumes de ces deux régions du cerveau<sup>251</sup>. De plus, le groupe de Dr. Patricia Franca Gardino a récemment observé une augmentation significative de l'expression de proBDNF dans l'hippocampe chez un modèle murin d'anxiété, «Carioca High-Conditioned Freezing» (CHF)<sup>251</sup>. Il serait donc intéressant de quantifier les niveaux de p75NTR chez ces souris CHF. Une suractivation de la voie de signalisation de p75NTR, causée par une augmentation de proBDNF, pourrait aussi expliquer les altérations morphologiques des dendrites des cellules pyramidales observées chez les souris CHF puisque ces neurones ont une réduction significative du nombre et de la longueur des dendrites comparés aux rats contrôles.

Le récepteur p75NTR est régulé positivement par plusieurs événements pathologiques, incluant l'épilepsie, la dépression et l'ischémie cérébrale<sup>215,252</sup>. Chez l'humain adulte, les patients souffrant de l'épilepsie temporale méssiale (MTLE), la forme la plus fréquente d'épilepsie chez l'adulte, présentent une expression de p75NTR significativement augmentée dans l'hippocampe tel qu'observé sur des spécimens chirurgicaux<sup>253</sup>. De plus, les niveaux d'ARNm du récepteur p75NTR sont élevés chez des sujets suicidaires atteints d'une dépression majeure<sup>254</sup>. Finalement, dans des modèles *in vitro* et *in vivo* d'ischémie cérébrale, Dr. B.L. Hempstead et ses collaborateurs ont démontré que p75NTR est rapidement induit dans l'hippocampe post-ischémique. L'activation de la voie de signalisation de proNGF-p75NTR conduit à la mort cellulaire<sup>252</sup>. Ce groupe a également identifié un mécanisme post-transcriptionnel de la régulation de p75NTR par le microARN mir-592. Ce mécanisme suggère une approche thérapeutique visant à limiter l'induction post-ischémique de p75NTR et son action pro-apoptotique.

Si nous nous basons sur nos données, notre hypothèse suppose que la régulation positive, induite par une pathologie des niveaux de p75NTR survenant au cours du développement précoce du cerveau, pourrait nuire à la maturation des BCs. Une altération de la maturation du circuit de ces BCs peut affecter l'expression et/ou la génération de la période critique de plasticité, contribuant ainsi à des pathologies comportementales et cognitives à long terme. En outre, nos données suggèrent qu'une augmentation de p75NTR dans le cortex pourrait réactiver la plasticité chez l'adulte. Cette réactivation de la plasticité peut donc avoir des effets positifs ou négatifs, soit en favorisant le rétablissement de l'AVC ou en augmentant l'hyperexcitabilité dans l'épilepsie. Ainsi, le récepteur p75NTR peut être régulé positivement dans le cortex adulte par diverses maladies et nos résultats démontrent son activation par proBDNF dans le cortex adulte.

## **6 : Conclusion**

La caractérisation des rôles de l'activité neuronale et de la voie de signalisation de p75NTR via proBDNF permettra une grande amélioration de notre compréhension des mécanismes de régulation de la maturation des cellules à paniers (BCs) corticales. De telles connaissances pourraient indiquer les divers substrats intracellulaires qui sont potentiellement affectés dans des maladies neurodéveloppementales spécifiques telles que l'épilepsie, l'autisme, la dépression et la schizophrénie. De plus, elles pourraient aider à développer de nouveaux outils thérapeutiques pour manipuler et favoriser la plasticité du cerveau chez l'adulte. Dans un avenir proche, l'association de la réadaptation cognitive avec des traitements pharmacologiques qui facilitent la plasticité du cerveau pourrait corriger et rétablir la connectivité et le fonctionnement neuronal des réseaux suite à une insulte cérébrale et ultimement améliorer les déficits cognitifs.

## 7 : Bibliographie

- 1 Cancedda, L., Fiumelli, H., Chen, K. & Poo, M. M. Excitatory GABA action is essential for morphological maturation of cortical neurons in vivo. *J Neurosci* **27**, 5224-5235, doi:10.1523/JNEUROSCI.5169-06.2007 (2007).
- 2 Levitt, P., Eagleson, K. L. & Powell, E. M. Regulation of neocortical interneuron development and the implications for neurodevelopmental disorders. *Trends Neurosci* **27**, 400-406, doi:10.1016/j.tins.2004.05.008S0166223604001626 [pii] (2004).
- 3 Rossignol, E. Genetics and function of neocortical GABAergic interneurons in neurodevelopmental disorders. *Neural Plast* **2011**, 649325, doi:10.1155/2011/649325 (2011).
- 4 Bartolini, G., Ciceri, G. & Marin, O. Integration of GABAergic interneurons into cortical cell assemblies: lessons from embryos and adults. *Neuron* **79**, 849-864, doi:10.1016/j.neuron.2013.08.014 (2013).
- 5 Marin, O. & Muller, U. Lineage origins of GABAergic versus glutamatergic neurons in the neocortex. *Curr Opin Neurobiol* **26**, 132-141, doi:10.1016/j.conb.2014.01.015 (2014).
- 6 Markram, H. *et al.* Interneurons of the neocortical inhibitory system. *Nat Rev Neurosci* **5**, 793-807, doi:10.1038/nrn1519 [pii] (2004).
- 7 Huang, Z. J., Di Cristo, G. & Ango, F. Development of GABA innervation in the cerebral and cerebellar cortices. *Nat Rev Neurosci* **8**, 673-686, doi:10.1038/nrn2188 (2007).
- 8 Vitalis, T. & Rossier, J. New insights into cortical interneurons development and classification: contribution of developmental studies. *Dev Neurobiol* **71**, 34-44, doi:10.1002/dneu.20810 (2011).
- 9 Gelman, D. M. *et al.* The embryonic preoptic area is a novel source of cortical GABAergic interneurons. *J Neurosci* **29**, 9380-9389, doi:10.1523/JNEUROSCI.0604-09.2009 [pii] (2009).
- 10 Lee, S., Hjerling-Leffler, J., Zaghera, E., Fishell, G. & Rudy, B. The largest group of superficial neocortical GABAergic interneurons expresses ionotropic serotonin receptors. *J Neurosci* **30**, 16796-16808, doi:10.1523/JNEUROSCI.1869-10.2010 [pii] (2010).
- 11 Marin, O. Cellular and molecular mechanisms controlling the migration of neocortical interneurons. *Eur J Neurosci* **38**, 2019-2029, doi:10.1111/ejn.12225 (2013).
- 12 Stuhmer, T., Anderson, S. A., Ekker, M. & Rubenstein, J. L. Ectopic expression of the *Dlx* genes induces glutamic acid decarboxylase and *Dlx* expression. *Development* **129**, 245-252 (2002).
- 13 Casarosa, S., Fode, C. & Guillemot, F. *Mash1* regulates neurogenesis in the ventral telencephalon. *Development* **126**, 525-534 (1999).
- 14 Bulfone, A. *et al.* An olfactory sensory map develops in the absence of normal projection neurons or GABAergic interneurons. *Neuron* **21**, 1273-1282 (1998).
- 15 Anderson, S. A. *et al.* Mutations of the homeobox genes *Dlx-1* and *Dlx-2* disrupt the striatal subventricular zone and differentiation of late born striatal neurons. *Neuron* **19**, 27-37 (1997).

- 16 Wonders, C. P. & Anderson, S. A. The origin and specification of cortical  
interneurons. *Nat Rev Neurosci* **7**, 687-696, doi:nrn1954 [pii]10.1038/nrn1954 (2006).
- 17 Butt, S. J. *et al.* The requirement of Nkx2-1 in the temporal specification of cortical  
interneuron subtypes. *Neuron* **59**, 722-732, doi:S0896-6273(08)00630-2  
[pii]10.1016/j.neuron.2008.07.031 (2008).
- 18 Batista-Brito, R. *et al.* The cell-intrinsic requirement of Sox6 for cortical interneuron  
development. *Neuron* **63**, 466-481, doi:S0896-6273(09)00590-X  
[pii]10.1016/j.neuron.2009.08.005 (2009).
- 19 Inan, M. & Anderson, S. A. The chandelier cell, form and function. *Curr Opin  
Neurobiol* **26**, 142-148, doi:10.1016/j.conb.2014.01.009 (2014).
- 20 Gulacsi, A. A. & Anderson, S. A. Beta-catenin-mediated Wnt signaling regulates  
neurogenesis in the ventral telencephalon. *Nat Neurosci* **11**, 1383-1391, doi:nn.2226  
[pii]10.1038/nn.2226 (2008).
- 21 Xu, Q. *et al.* Sonic hedgehog signaling confers ventral telencephalic progenitors with  
distinct cortical interneuron fates. *Neuron* **65**, 328-340, doi:S0896-6273(10)00009-7  
[pii]10.1016/j.neuron.2010.01.004 (2010).
- 22 Fogarty, M. *et al.* Spatial genetic patterning of the embryonic neuroepithelium  
generates GABAergic interneuron diversity in the adult cortex. *J Neurosci* **27**, 10935-  
10946, doi:27/41/10935 [pii]10.1523/JNEUROSCI.1629-07.2007 (2007).
- 23 Cauli, B., Zhou, X., Tricoire, L., Toussay, X. & Staiger, J. F. Revisiting enigmatic  
cortical calretinin-expressing interneurons. *Front Neuroanat* **8**, 52,  
doi:10.3389/fnana.2014.00052 (2014).
- 24 Sousa, V. H., Miyoshi, G., Hjerling-Leffler, J., Karayannis, T. & Fishell, G.  
Characterization of Nkx6-2-derived neocortical interneuron lineages. *Cereb Cortex* **19  
Suppl 1**, i1-10, doi:bhp038 [pii]10.1093/cercor/bhp038 (2009).
- 25 Sultan, K. T., Shi, W. & Shi, S. H. Clonal origins of neocortical interneurons. *Curr  
Opin Neurobiol* **26**, 125-131, doi:10.1016/j.conb.2014.01.010 (2014).
- 26 Huang, Z. J. Activity-dependent development of inhibitory synapses and innervation  
pattern: role of GABA signalling and beyond. *J Physiol* **587**, 1881-1888,  
doi:jphysiol.2008.168211 [pii]10.1113/jphysiol.2008.168211 (2009).
- 27 Marin, O., Yaron, A., Bagri, A., Tessier-Lavigne, M. & Rubenstein, J. L. Sorting of  
striatal and cortical interneurons regulated by semaphorin-neuropilin interactions.  
*Science* **293**, 872-875, doi:10.1126/science.1061891293/5531/872 [pii] (2001).
- 28 Andrews, W. *et al.* The role of Slit-Robo signaling in the generation, migration and  
morphological differentiation of cortical interneurons. *Dev Biol* **313**, 648-658,  
doi:10.1016/j.ydbio.2007.10.052 (2008).
- 29 Zimmer, G. *et al.* Ephrin-A5 acts as a repulsive cue for migrating cortical interneurons.  
*Eur J Neurosci* **28**, 62-73, doi:EJN6320 [pii]10.1111/j.1460-9568.2008.06320.x  
(2008).
- 30 Polleux, F., Whitford, K. L., Dijkhuizen, P. A., Vitalis, T. & Ghosh, A. Control of  
cortical interneuron migration by neurotrophins and PI3-kinase signaling. *Development*  
**129**, 3147-3160 (2002).
- 31 Pozas, E. & Ibanez, C. F. GDNF and GFRalpha1 promote differentiation and  
tangential migration of cortical GABAergic neurons. *Neuron* **45**, 701-713,  
doi:10.1016/j.neuron.2005.01.043 (2005).

- 32 Poluch, S., Rossel, M. & Konig, N. AMPA-evoked ion influx is strongest in tangential neurons of the rat neocortical intermediate zone close to the front of the migratory stream. *Dev Dyn* **227**, 416-421, doi:10.1002/dvdy.10312 (2003).
- 33 Marin, O. Interneuron dysfunction in psychiatric disorders. *Nat Rev Neurosci* **13**, 107-120, doi:10.1038/nrn3155 (2012).
- 34 Carlson, V. C. & Yeh, H. H. GABAA receptor subunit profiles of tangentially migrating neurons derived from the medial ganglionic eminence. *Cereb Cortex* **21**, 1792-1802, doi:bhq247 [pii]10.1093/cercor/bhq247 (2011).
- 35 Bortone, D. & Polleux, F. KCC2 expression promotes the termination of cortical interneuron migration in a voltage-sensitive calcium-dependent manner. *Neuron* **62**, 53-71, doi:10.1016/j.neuron.2009.01.034 (2009).
- 36 Delpy, A., Allain, A. E., Meyrand, P. & Branchereau, P. NKCC1 cotransporter inactivation underlies embryonic development of chloride-mediated inhibition in mouse spinal motoneuron. *J Physiol* **586**, 1059-1075, doi:jphysiol.2007.146993 [pii]10.1113/jphysiol.2007.146993 (2008).
- 37 Rivera, C., Voipio, J. & Kaila, K. Two developmental switches in GABAergic signalling: the K<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> cotransporter KCC2 and carbonic anhydrase CAVII. *J Physiol* **562**, 27-36, doi:jphysiol.2004.077495 [pii]10.1113/jphysiol.2004.077495 (2005).
- 38 Manent, J. B. *et al.* A noncanonical release of GABA and glutamate modulates neuronal migration. *J Neurosci* **25**, 4755-4765, doi:10.1523/JNEUROSCI.0553-05.2005 (2005).
- 39 Miyoshi, G. & Fishell, G. GABAergic interneuron lineages selectively sort into specific cortical layers during early postnatal development. *Cereb Cortex* **21**, 845-852, doi:10.1093/cercor/bhq155 (2011).
- 40 Di Cristo, G. Development of cortical GABAergic circuits and its implications for neurodevelopmental disorders. *Clin Genet* **72**, 1-8, doi:CGE822 [pii]10.1111/j.1399-0004.2007.00822.x (2007).
- 41 Wang, D. D. & Kriegstein, A. R. GABA regulates excitatory synapse formation in the neocortex via NMDA receptor activation. *J Neurosci* **28**, 5547-5558, doi:28/21/5547 [pii]10.1523/JNEUROSCI.5599-07.2008 (2008).
- 42 Cossart, R. The maturation of cortical interneuron diversity: how multiple developmental journeys shape the emergence of proper network function. *Curr Opin Neurobiol* **21**, 160-168, doi:S0959-4388(10)00188-1 [pii]10.1016/j.conb.2010.10.003 (2011).
- 43 Garaschuk, O., Linn, J., Eilers, J. & Konnerth, A. Large-scale oscillatory calcium waves in the immature cortex. *Nat Neurosci* **3**, 452-459, doi:10.1038/74823 (2000).
- 44 McCabe, A. K., Chisholm, S. L., Picken-Bahrey, H. L. & Moody, W. J. The self-regulating nature of spontaneous synchronized activity in developing mouse cortical neurones. *J Physiol* **577**, 155-167, doi:jphysiol.2006.117523 [pii]10.1113/jphysiol.2006.117523 (2006).
- 45 Crepel, V. *et al.* A parturition-associated nonsynaptic coherent activity pattern in the developing hippocampus. *Neuron* **54**, 105-120, doi:S0896-6273(07)00203-6 [pii]10.1016/j.neuron.2007.03.007 (2007).
- 46 Hensch, T. K. *et al.* Local GABA circuit control of experience-dependent plasticity in developing visual cortex. *Science* **282**, 1504-1508 (1998).

- 47 Pesold, C., Liu, W. S., Guidotti, A., Costa, E. & Caruncho, H. J. Cortical bitufted, horizontal, and Martinotti cells preferentially express and secrete reelin into perineuronal nets, nonsynaptically modulating gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 3217-3222 (1999).
- 48 Halabisky, B., Shen, F., Huguenard, J. R. & Prince, D. A. Electrophysiological classification of somatostatin-positive interneurons in mouse sensorimotor cortex. *J Neurophysiol* **96**, 834-845, doi:01079.2005 [pii]10.1152/jn.01079.2005 (2006).
- 49 Oda, S. *et al.* Thalamocortical projection from the ventral posteromedial nucleus sends its collaterals to layer I of the primary somatosensory cortex in rat. *Neurosci Lett* **367**, 394-398, doi:10.1016/j.neulet.2004.06.042S0304-3940(04)00779-7 [pii] (2004).
- 50 Silberberg, G. & Markram, H. Disynaptic inhibition between neocortical pyramidal cells mediated by Martinotti cells. *Neuron* **53**, 735-746, doi:S0896-6273(07)00111-0 [pii]10.1016/j.neuron.2007.02.012 (2007).
- 51 Porter, J. T. *et al.* Properties of bipolar VIPergic interneurons and their excitation by pyramidal neurons in the rat neocortex. *Eur J Neurosci* **10**, 3617-3628 (1998).
- 52 David, C., Schleicher, A., Zusratter, W. & Staiger, J. F. The innervation of parvalbumin-containing interneurons by VIP-immunopositive interneurons in the primary somatosensory cortex of the adult rat. *Eur J Neurosci* **25**, 2329-2340, doi:EJN5496 [pii]10.1111/j.1460-9568.2007.05496.x (2007).
- 53 Fu, Y. *et al.* A cortical circuit for gain control by behavioral state. *Cell* **156**, 1139-1152, doi:10.1016/j.cell.2014.01.050 (2014).
- 54 Stryker, M. P. A Neural Circuit That Controls Cortical State, Plasticity, and the Gain of Sensory Responses in Mouse. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, doi:10.1101/sqb.2014.79.024927 (2015).
- 55 Simon, A., Olah, S., Molnar, G., Szabadics, J. & Tamas, G. Gap-junctional coupling between neurogliaform cells and various interneuron types in the neocortex. *J Neurosci* **25**, 6278-6285, doi:25/27/6278 [pii]10.1523/JNEUROSCI.1431-05.2005 (2005).
- 56 Olah, S. *et al.* Regulation of cortical microcircuits by unitary GABA-mediated volume transmission. *Nature* **461**, 1278-1281, doi:nature08503 [pii]10.1038/nature08503 (2009).
- 57 Taniguchi, H. Genetic dissection of GABAergic neural circuits in mouse neocortex. *Front Cell Neurosci* **8**, 8, doi:10.3389/fncel.2014.00008 (2014).
- 58 Klausberger, T. & Somogyi, P. Neuronal diversity and temporal dynamics: the unity of hippocampal circuit operations. *Science* **321**, 53-57, doi:10.1126/science.1149381 (2008).
- 59 Schmidt, S., Braak, E. & Braak, H. Parvalbumin-immunoreactive structures of the adult human entorhinal and transentorhinal region. *Hippocampus* **3**, 459-470, doi:10.1002/hipo.450030407 (1993).
- 60 Gabbott, P. L. & Bacon, S. J. Local circuit neurons in the medial prefrontal cortex (areas 24a,b,c, 25 and 32) in the monkey: II. Quantitative areal and laminar distributions. *J Comp Neurol* **364**, 609-636, doi:10.1002/(SICI)1096-9861(19960122)364:4<609::AID-CNE2>3.0.CO;2-7 [pii]10.1002/(SICI)1096-9861(19960122)364:4<609::AID-CNE2>3.0.CO;2-7 (1996).
- 61 Taniguchi, H., Lu, J. & Huang, Z. J. The spatial and temporal origin of chandelier cells in mouse neocortex. *Science* **339**, 70-74, doi:10.1126/science.1227622 (2013).



- 62 Povysheva, N. V., Zaitsev, A. V., Gonzalez-Burgos, G. & Lewis, D. A. Electrophysiological heterogeneity of fast-spiking interneurons: chandelier versus basket cells. *PLoS One* **8**, e70553, doi:10.1371/journal.pone.0070553 (2013).
- 63 Chattopadhyaya, B., Baho, E., Huang, Z. J., Schachner, M. & Di Cristo, G. Neural cell adhesion molecule-mediated Fyn activation promotes GABAergic synapse maturation in postnatal mouse cortex. *J Neurosci* **33**, 5957-5968, doi:10.1523/JNEUROSCI.1306-12.2013 (2013).
- 64 Kohara, K. *et al.* A local reduction in cortical GABAergic synapses after a loss of endogenous brain-derived neurotrophic factor, as revealed by single-cell gene knock-out method. *J Neurosci* **27**, 7234-7244, doi:10.1523/JNEUROSCI.1943-07.2007 (2007).
- 65 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, doi:10.1523/JNEUROSCI.1851-04.2004 [pii]10.1523/JNEUROSCI.1851-04.2004 (2004).
- 66 Chattopadhyaya, B. *et al.* GAD67-mediated GABA synthesis and signaling regulate inhibitory synaptic innervation in the visual cortex. *Neuron* **54**, 889-903, doi:10.1016/j.neuron.2007.05.015 [pii]10.1016/j.neuron.2007.05.015 (2007).
- 67 Fishell, G. & Rudy, B. Mechanisms of inhibition within the telencephalon: "where the wild things are". *Annu Rev Neurosci* **34**, 535-567, doi:10.1146/annurev-neuro-061010-113717 (2011).
- 68 Cardin, J. A. *et al.* Driving fast-spiking cells induces gamma rhythm and controls sensory responses. *Nature* **459**, 663-667, doi:10.1038/nature08002 (2009).
- 69 Bartos, M., Vida, I. & Jonas, P. Synaptic mechanisms of synchronized gamma oscillations in inhibitory interneuron networks. *Nat Rev Neurosci* **8**, 45-56, doi:10.1038/nrn2044 (2007).
- 70 Galarreta, M. & Hestrin, S. Spike transmission and synchrony detection in networks of GABAergic interneurons. *Science* **292**, 2295-2299, doi:10.1126/science.1061395292/5525/2295 [pii]10.1126/science.1061395292/5525/2295 (2001).
- 71 Zaitsev, A. V., Povysheva, N. V., Lewis, D. A. & Krimer, L. S. P/Q-type, but not N-type, calcium channels mediate GABA release from fast-spiking interneurons to pyramidal cells in rat prefrontal cortex. *J Neurophysiol* **97**, 3567-3573, doi:10.1152/jn.01293.2006 [pii]10.1152/jn.01293.2006 (2007).
- 72 Swadlow, H. A. Fast-spike interneurons and feedforward inhibition in awake sensory neocortex. *Cereb Cortex* **13**, 25-32 (2003).
- 73 Cruikshank, S. J., Lewis, T. J. & Connors, B. W. Synaptic basis for intense thalamocortical activation of feedforward inhibitory cells in neocortex. *Nat Neurosci* **10**, 462-468, doi:10.1038/nn1861 [pii]10.1038/nn1861 (2007).
- 74 Katz, L. C. & Shatz, C. J. Synaptic activity and the construction of cortical circuits. *Science* **274**, 1133-1138 (1996).
- 75 Hensch, T. K. Critical period regulation. *Annu Rev Neurosci* **27**, 549-579, doi:10.1146/annurev.neuro.27.070203.144327 (2004).
- 76 Fagiolini, M. & Hensch, T. K. Inhibitory threshold for critical-period activation in primary visual cortex. *Nature* **404**, 183-186, doi:10.1038/35004582 (2000).
- 77 Hubel, D. H. & Wiesel, T. N. Receptive fields, binocular interaction and functional architecture in the cat's visual cortex. *J Physiol* **160**, 106-154 (1962).

- 78 Levi, D. M. Visual processing in amblyopia: human studies. *Strabismus* **14**, 11-19,  
doi:MJ6R12G164H24371 [pii]10.1080/09273970500536243 (2006).
- 79 Hubel, D. H. & Wiesel, T. N. The period of susceptibility to the physiological effects  
of unilateral eye closure in kittens. *J Physiol* **206**, 419-436 (1970).
- 80 Berardi, N., Pizzorusso, T. & Maffei, L. Critical periods during sensory development.  
*Curr Opin Neurobiol* **10**, 138-145, doi:S0959-4388(99)00047-1 [pii] (2000).
- 81 Gordon, J. A. & Stryker, M. P. Experience-dependent plasticity of binocular responses  
in the primary visual cortex of the mouse. *J Neurosci* **16**, 3274-3286 (1996).
- 82 Klausberger, T., Roberts, J. D. & Somogyi, P. Cell type- and input-specific differences  
in the number and subtypes of synaptic GABA(A) receptors in the hippocampus. *J  
Neurosci* **22**, 2513-2521, doi:2002622822/7/2513 [pii] (2002).
- 83 Katagiri, H., Fagiolini, M. & Hensch, T. K. Optimization of somatic inhibition at  
critical period onset in mouse visual cortex. *Neuron* **53**, 805-812,  
doi:10.1016/j.neuron.2007.02.026 (2007).
- 84 Di Cristo, G. *et al.* Subcellular domain-restricted GABAergic innervation in primary  
visual cortex in the absence of sensory and thalamic inputs. *Nat Neurosci* **7**, 1184-  
1186, doi:nn1334 [pii]10.1038/nn1334 (2004).
- 85 Wang, Y., Gupta, A., Toledo-Rodriguez, M., Wu, C. Z. & Markram, H. Anatomical,  
physiological, molecular and circuit properties of nest basket cells in the developing  
somatosensory cortex. *Cereb Cortex* **12**, 395-410 (2002).
- 86 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).
- 87 Asada, H. *et al.* Cleft palate and decreased brain gamma-aminobutyric acid in mice  
lacking the 67-kDa isoform of glutamic acid decarboxylase. *Proc Natl Acad Sci U S A*  
**94**, 6496-6499 (1997).
- 88 Di Cristo, G. *et al.* Activity-dependent PSA expression regulates inhibitory maturation  
and onset of critical period plasticity. *Nat Neurosci* **10**, 1569-1577, doi:nn2008  
[pii]10.1038/nn2008 (2007).
- 89 Sugiyama, S. *et al.* Experience-dependent transfer of Otx2 homeoprotein into the  
visual cortex activates postnatal plasticity. *Cell* **134**, 508-520, doi:S0092-  
8674(08)00839-8 [pii]10.1016/j.cell.2008.05.054 (2008).
- 90 Berardi, N., Sale, A. & Maffei, L. Brain structural and functional development:  
genetics and experience. *Dev Med Child Neurol* **57 Suppl 2**, 4-9,  
doi:10.1111/dmcn.12691 (2015).
- 91 Levi, D. M., Knill, D. C. & Bavelier, D. Stereopsis and amblyopia: A mini-review.  
*Vision Res*, doi:10.1016/j.visres.2015.01.002 (2015).
- 92 Putignano, E. *et al.* Developmental downregulation of histone posttranslational  
modifications regulates visual cortical plasticity. *Neuron* **53**, 747-759, doi:S0896-  
6273(07)00106-7 [pii]10.1016/j.neuron.2007.02.007 (2007).
- 93 Pizzorusso, T. *et al.* Reactivation of ocular dominance plasticity in the adult visual  
cortex. *Science* **298**, 1248-1251, doi:10.1126/science.1072699298/5596/1248 [pii]  
(2002).
- 94 Harauzov, A. *et al.* Reducing intracortical inhibition in the adult visual cortex  
promotes ocular dominance plasticity. *J Neurosci* **30**, 361-371,  
doi:10.1523/JNEUROSCI.2233-09.2010 (2010).

- 95 Morishita, H., Miwa, J. M., Heintz, N. & Hensch, T. K. Lynx1, a cholinergic brake, limits plasticity in adult visual cortex. *Science* **330**, 1238-1240, doi:science.1195320 [pii]10.1126/science.1195320 (2010).
- 96 Maya Vetencourt, J. F. *et al.* The antidepressant fluoxetine restores plasticity in the adult visual cortex. *Science* **320**, 385-388, doi:320/5874/385 [pii]10.1126/science.1150516 (2008).
- 97 Sale, A. *et al.* Environmental enrichment in adulthood promotes amblyopia recovery through a reduction of intracortical inhibition. *Nat Neurosci* **10**, 679-681, doi:nn1899 [pii]10.1038/nn1899 (2007).
- 98 Chattopadhyaya, B. Molecular mechanisms underlying activity-dependent GABAergic synapse development and plasticity and its implications for neurodevelopmental disorders. *Neural Plast* **2011**, 734231, doi:10.1155/2011/734231 (2011).
- 99 Baroncelli, L. *et al.* Brain plasticity and disease: a matter of inhibition. *Neural Plast* **2011**, 286073, doi:10.1155/2011/286073 (2011).
- 100 Chattopadhyaya, B. & Cristo, G. D. GABAergic circuit dysfunctions in neurodevelopmental disorders. *Front Psychiatry* **3**, 51, doi:10.3389/fpsyt.2012.00051 (2012).
- 101 Yip, J., Soghomonian, J. J. & Blatt, G. J. Decreased GAD67 mRNA levels in cerebellar Purkinje cells in autism: pathophysiological implications. *Acta Neuropathol* **113**, 559-568, doi:10.1007/s00401-006-0176-3 (2007).
- 102 Fatemi, S. H. *et al.* Glutamic acid decarboxylase 65 and 67 kDa proteins are reduced in autistic parietal and cerebellar cortices. *Biol Psychiatry* **52**, 805-810 (2002).
- 103 Fatemi, S. H. *et al.* mRNA and protein levels for GABAAalpha4, alpha5, beta1 and GABABR1 receptors are altered in brains from subjects with autism. *J Autism Dev Disord* **40**, 743-750, doi:10.1007/s10803-009-0924-z (2010).
- 104 Oblak, A. L., Gibbs, T. T. & Blatt, G. J. Decreased GABA(B) receptors in the cingulate cortex and fusiform gyrus in autism. *J Neurochem* **114**, 1414-1423, doi:10.1111/j.1471-4159.2010.06858.x (2010).
- 105 Gogolla, N. *et al.* Common circuit defect of excitatory-inhibitory balance in mouse models of autism. *J Neurodev Disord* **1**, 172-181, doi:10.1007/s11689-009-9023-x (2009).
- 106 Selby, L., Zhang, C. & Sun, Q. Q. Major defects in neocortical GABAergic inhibitory circuits in mice lacking the fragile X mental retardation protein. *Neurosci Lett* **412**, 227-232, doi:10.1016/j.neulet.2006.11.062 (2007).
- 107 Gatto, C. L. & Broadie, K. Genetic controls balancing excitatory and inhibitory synaptogenesis in neurodevelopmental disorder models. *Front Synaptic Neurosci* **2**, 4, doi:10.3389/fnsyn.2010.00004 (2010).
- 108 Liu, X. *et al.* The DLX1 and DLX2 genes and susceptibility to autism spectrum disorders. *Eur J Hum Genet* **17**, 228-235, doi:ejhg2008148 [pii]10.1038/ejhg.2008.148 (2009).
- 109 Asaka, Y., Jugloff, D. G., Zhang, L., Eubanks, J. H. & Fitzsimonds, R. M. Hippocampal synaptic plasticity is impaired in the Mecp2-null mouse model of Rett syndrome. *Neurobiol Dis* **21**, 217-227, doi:S0969-9961(05)00204-4 [pii]10.1016/j.nbd.2005.07.005 (2006).

- 110 Fernandez, F. & Garner, C. C. Over-inhibition: a model for developmental intellectual disability. *Trends Neurosci* **30**, 497-503, doi:S0166-2236(07)00201-9 [pii]10.1016/j.tins.2007.07.005 (2007).
- 111 Durand, S. *et al.* NMDA receptor regulation prevents regression of visual cortical function in the absence of Mecp2. *Neuron* **76**, 1078-1090, doi:10.1016/j.neuron.2012.12.004 (2012).
- 112 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, doi:10.1073/pnas.0812394106 (2009).
- 113 Fernandez, F. *et al.* Pharmacotherapy for cognitive impairment in a mouse model of Down syndrome. *Nat Neurosci* **10**, 411-413, doi:10.1038/nn1860 [pii]10.1038/nn1860 (2007).
- 114 Chakrabarti, L. *et al.* Olig1 and Olig2 triplication causes developmental brain defects in Down syndrome. *Nat Neurosci* **13**, 927-934, doi:10.1038/nn.2600 [pii]10.1038/nn.2600 (2010).
- 115 Deidda, G. *et al.* Reversing excitatory GABAAR signaling restores synaptic plasticity and memory in a mouse model of Down syndrome. *Nat Med* **21**, 318-326, doi:10.1038/nm.3827 (2015).
- 116 Caballero, A., Flores-Barrera, E., Cass, D. K. & Tseng, K. Y. Differential regulation of parvalbumin and calretinin interneurons in the prefrontal cortex during adolescence. *Brain Struct Funct* **219**, 395-406, doi:10.1007/s00429-013-0508-8 (2014).
- 117 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, doi:10.1038/sj.mp.4001599 [pii]10.1038/sj.mp.4001599 (2005).
- 118 Straub, R. E. *et al.* Allelic variation in GAD1 (GAD67) is associated with schizophrenia and influences cortical function and gene expression. *Mol Psychiatry* **12**, 854-869, doi:10.1038/sj.mp.4001988 [pii]10.1038/sj.mp.4001988 (2007).
- 119 Curley, A. A. *et al.* Cortical deficits of glutamic acid decarboxylase 67 expression in schizophrenia: clinical, protein, and cell type-specific features. *Am J Psychiatry* **168**, 921-929, doi:10.1176/appi.ajp.2011.11010052 (2011).
- 120 Lewis, D. A., Curley, A. A., Glausier, J. R. & Volk, D. W. Cortical parvalbumin interneurons and cognitive dysfunction in schizophrenia. *Trends Neurosci* **35**, 57-67, doi:10.1016/j.tins.2011.10.004 (2012).
- 121 Gonzalez-Burgos, G., Cho, R. Y. & Lewis, D. A. Alterations in Cortical Network Oscillations and Parvalbumin Neurons in Schizophrenia. *Biol Psychiatry* **77**, 1031-1040, doi:10.1016/j.biopsych.2015.03.010 (2015).
- 122 Rotaru, D. C., Lewis, D. A. & Gonzalez-Burgos, G. The role of glutamatergic inputs onto parvalbumin-positive interneurons: relevance for schizophrenia. *Rev Neurosci* **23**, 97-109, doi:10.1515/revneuro-2011-0059 (2012).
- 123 Lewis, D. A. The chandelier neuron in schizophrenia. *Dev Neurobiol* **71**, 118-127, doi:10.1002/dneu.20825 (2011).
- 124 Cho, R. Y., Konecky, R. O. & Carter, C. S. Impairments in frontal cortical gamma synchrony and cognitive control in schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 19878-19883, doi:10.1073/pnas.0609440103 (2006).
- 125 Lewin, G. R. & Barde, Y. A. Physiology of the neurotrophins. *Annu Rev Neurosci* **19**, 289-317, doi:10.1146/annurev.ne.19.030196.001445 (1996).

- 126 Lu, B., Pang, P. T. & Woo, N. H. The yin and yang of neurotrophin action. *Nat Rev Neurosci* **6**, 603-614, doi:nrn1726 [pii]10.1038/nrn1726 (2005).
- 127 Ibanez, C. F. Jekyll-Hyde neurotrophins: the story of proNGF. *Trends Neurosci* **25**, 284-286, doi:S0166223602021690 [pii] (2002).
- 128 Yang, J. *et al.* Neuronal release of proBDNF. *Nat Neurosci* **12**, 113-115, doi:nn.2244 [pii]10.1038/nn.2244 (2009).
- 129 Nagappan, G. *et al.* Control of extracellular cleavage of ProBDNF by high frequency neuronal activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 1267-1272, doi:10.1073/pnas.0807322106 (2009).
- 130 Heymach, J. V., Jr. & Shooter, E. M. The biosynthesis of neurotrophin heterodimers by transfected mammalian cells. *J Biol Chem* **270**, 12297-12304 (1995).
- 131 Reichardt, L. F. Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **361**, 1545-1564, doi:G280147415872711 [pii]10.1098/rstb.2006.1894 (2006).
- 132 Huang, E. J. & Reichardt, L. F. Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annu Rev Biochem* **72**, 609-642, doi:10.1146/annurev.biochem.72.121801.161629121801.161629 [pii] (2003).
- 133 Bramham, C. R. Local protein synthesis, actin dynamics, and LTP consolidation. *Curr Opin Neurobiol* **18**, 524-531, doi:10.1016/j.conb.2008.09.013 (2008).
- 134 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, doi:10.1146/annurev.cellbio.24.110707.175235 (2008).
- 135 Lu, Y., Christian, K. & Lu, B. BDNF: a key regulator for protein synthesis-dependent LTP and long-term memory? *Neurobiol Learn Mem* **89**, 312-323, doi:10.1016/j.nlm.2007.08.018 (2008).
- 136 Russo, S. J., Mazei-Robison, M. S., Ables, J. L. & Nestler, E. J. Neurotrophic factors and structural plasticity in addiction. *Neuropharmacology* **56 Suppl 1**, 73-82, doi:10.1016/j.neuropharm.2008.06.059 (2009).
- 137 Castren, E. & Rantamaki, T. Neurotrophins in depression and antidepressant effects. *Novartis Found Symp* **289**, 43-52; discussion 53-49, 87-93 (2008).
- 138 Chen, Z. Y. *et al.* Genetic variant BDNF (Val66Met) polymorphism alters anxiety-related behavior. *Science* **314**, 140-143, doi:10.1126/science.1129663 (2006).
- 139 Aid, T., Kazantseva, A., Piirsoo, M., Palm, K. & Timmusk, T. Mouse and rat BDNF gene structure and expression revisited. *J Neurosci Res* **85**, 525-535, doi:10.1002/jnr.21139 (2007).
- 140 Timmusk, T. *et al.* Multiple promoters direct tissue-specific expression of the rat BDNF gene. *Neuron* **10**, 475-489 (1993).
- 141 Gorski, J. A., Zeiler, S. R., Tamowski, S. & Jones, K. R. Brain-derived neurotrophic factor is required for the maintenance of cortical dendrites. *J Neurosci* **23**, 6856-6865 (2003).
- 142 An, J. J. *et al.* Distinct role of long 3' UTR BDNF mRNA in spine morphology and synaptic plasticity in hippocampal neurons. *Cell* **134**, 175-187, doi:10.1016/j.cell.2008.05.045 (2008).
- 143 Segal, M. Dendritic spines and long-term plasticity. *Nat Rev Neurosci* **6**, 277-284, doi:10.1038/nrn1649 (2005).

- 144 Segal, M. & Andersen, P. Dendritic spines shaped by synaptic activity. *Curr Opin Neurobiol* **10**, 582-586 (2000).
- 145 Segal, I., Korkotian, I. & Murphy, D. D. Dendritic spine formation and pruning: common cellular mechanisms? *Trends Neurosci* **23**, 53-57 (2000).
- 146 Chapleau, C. A. & Pozzo-Miller, L. Divergent roles of p75NTR and Trk receptors in BDNF's effects on dendritic spine density and morphology. *Neural Plast* **2012**, 578057, doi:10.1155/2012/578057 (2012).
- 147 Yang, J. *et al.* proBDNF negatively regulates neuronal remodeling, synaptic transmission, and synaptic plasticity in hippocampus. *Cell Rep* **7**, 796-806, doi:10.1016/j.celrep.2014.03.040 (2014).
- 148 Koshimizu, H. *et al.* Multiple functions of precursor BDNF to CNS neurons: negative regulation of neurite growth, spine formation and cell survival. *Mol Brain* **2**, 27, doi:10.1186/1756-6606-2-27 (2009).
- 149 Matsumoto, T. *et al.* Biosynthesis and processing of endogenous BDNF: CNS neurons store and secrete BDNF, not pro-BDNF. *Nat Neurosci* **11**, 131-133, doi:10.1038/nn2038 (2008).
- 150 Chao, M. V. Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. *Nat Rev Neurosci* **4**, 299-309, doi:10.1038/nrn1078 [pii] (2003).
- 151 Arevalo, J. C. *et al.* TrkA immunoglobulin-like ligand binding domains inhibit spontaneous activation of the receptor. *Mol Cell Biol* **20**, 5908-5916 (2000).
- 152 Strop, P., Bankovich, A. J., Hansen, K. C., Garcia, K. C. & Brunger, A. T. Structure of a human A-type potassium channel interacting protein DPPX, a member of the dipeptidyl aminopeptidase family. *J Mol Biol* **343**, 1055-1065, doi:10.1016/j.jmb.2004.09.003 (2004).
- 153 Esposito, D. *et al.* The cytoplasmic and transmembrane domains of the p75 and Trk A receptors regulate high affinity binding to nerve growth factor. *J Biol Chem* **276**, 32687-32695, doi:10.1074/jbc.M011674200 (2001).
- 154 Kuruvilla, R. *et al.* A neurotrophin signaling cascade coordinates sympathetic neuron development through differential control of TrkA trafficking and retrograde signaling. *Cell* **118**, 243-255, doi:10.1016/j.cell.2004.06.021S0092867404005847 [pii] (2004).
- 155 Epa, W. R., Markovska, K. & Barrett, G. L. The p75 neurotrophin receptor enhances TrkA signalling by binding to Shc and augmenting its phosphorylation. *J Neurochem* **89**, 344-353, doi:10.1111/j.1471-4159.2004.02344.xJNC2344 [pii] (2004).
- 156 Chang, M. S., Arevalo, J. C. & Chao, M. V. Ternary complex with Trk, p75, and an ankyrin-rich membrane spanning protein. *J Neurosci Res* **78**, 186-192, doi:10.1002/jnr.20262 (2004).
- 157 Arevalo, J. C., Yano, H., Teng, K. K. & Chao, M. V. A unique pathway for sustained neurotrophin signaling through an ankyrin-rich membrane-spanning protein. *EMBO J* **23**, 2358-2368, doi:10.1038/sj.emboj.76002537600253 [pii] (2004).
- 158 Lad, S. P., Peterson, D. A., Bradshaw, R. A. & Neet, K. E. Individual and combined effects of TrkA and p75NTR nerve growth factor receptors. A role for the high affinity receptor site. *J Biol Chem* **278**, 24808-24817, doi:10.1074/jbc.M212270200M212270200 [pii] (2003).

- 159 Gentry, J. J., Barker, P. A. & Carter, B. D. The p75 neurotrophin receptor: multiple interactors and numerous functions. *Prog Brain Res* **146**, 25-39, doi:S0079-6123(03)46002-0 [pii]10.1016/S0079-6123(03)46002-0 (2004).
- 160 Sole, C. *et al.* The death receptor antagonist FAIM promotes neurite outgrowth by a mechanism that depends on ERK and NF-kapp B signaling. *J Cell Biol* **167**, 479-492, doi:10.1083/jcb.200403093 (2004).
- 161 Nykjaer, A., Willnow, T. E. & Petersen, C. M. p75NTR--live or let die. *Curr Opin Neurobiol* **15**, 49-57, doi:S0959-4388(05)00005-X [pii]10.1016/j.conb.2005.01.004 (2005).
- 162 Naska, S., Lin, D. C., Miller, F. D. & Kaplan, D. R. p75NTR is an obligate signaling receptor required for cues that cause sympathetic neuron growth cone collapse. *Mol Cell Neurosci* **45**, 108-120, doi:S1044-7431(10)00135-1 [pii]10.1016/j.mcn.2010.05.015 (2010).
- 163 Hamanoue, M. *et al.* p75-mediated NF-kappaB activation enhances the survival response of developing sensory neurons to nerve growth factor. *Mol Cell Neurosci* **14**, 28-40, doi:10.1006/mcne.1999.0770 (1999).
- 164 Bogenmann, E. *et al.* Generation of mice with a conditional allele for the p75(NTR) neurotrophin receptor gene. *Genesis* **49**, 862-869, doi:10.1002/dvg.20747 (2011).
- 165 Peterson, D. A., Dickinson-Anson, H. A., Leppert, J. T., Lee, K. F. & Gage, F. H. Central neuronal loss and behavioral impairment in mice lacking neurotrophin receptor p75. *J Comp Neurol* **404**, 1-20, doi:10.1002/(SICI)1096-9861(19990201)404:1<1::AID-CNE1>3.0.CO;2-# [pii] (1999).
- 166 Lee, K. F., Bachman, K., Landis, S. & Jaenisch, R. Dependence on p75 for innervation of some sympathetic targets. *Science* **263**, 1447-1449 (1994).
- 167 Lee, K. F., Davies, A. M. & Jaenisch, R. p75-deficient embryonic dorsal root sensory and neonatal sympathetic neurons display a decreased sensitivity to NGF. *Development* **120**, 1027-1033 (1994).
- 168 Miller, F. D. & Kaplan, D. R. Neurotrophin signalling pathways regulating neuronal apoptosis. *Cell Mol Life Sci* **58**, 1045-1053 (2001).
- 169 Chu, G. K., Yu, W. & Fehlings, M. G. The p75 neurotrophin receptor is essential for neuronal cell survival and improvement of functional recovery after spinal cord injury. *Neuroscience* **148**, 668-682, doi:10.1016/j.neuroscience.2007.05.028 (2007).
- 170 Okuno, S., Saito, A., Hayashi, T. & Chan, P. H. The c-Jun N-terminal protein kinase signaling pathway mediates Bax activation and subsequent neuronal apoptosis through interaction with Bim after transient focal cerebral ischemia. *J Neurosci* **24**, 7879-7887, doi:10.1523/JNEUROSCI.1745-04.200424/36/7879 [pii] (2004).
- 171 Koshimizu, H., Hazama, S., Hara, T., Ogura, A. & Kojima, M. Distinct signaling pathways of precursor BDNF and mature BDNF in cultured cerebellar granule neurons. *Neurosci Lett* **473**, 229-232, doi:S0304-3940(10)00239-9 [pii]10.1016/j.neulet.2010.02.055 (2010).
- 172 Yaar, M. *et al.* Amyloid beta binds trimers as well as monomers of the 75-kDa neurotrophin receptor and activates receptor signaling. *J Biol Chem* **277**, 7720-7725, doi:10.1074/jbc.M110929200M110929200 [pii] (2002).
- 173 Troy, C. M. *et al.* beta-Amyloid-induced neuronal apoptosis requires c-Jun N-terminal kinase activation. *J Neurochem* **77**, 157-164 (2001).

- 174 Nykjaer, A. *et al.* Sortilin is essential for proNGF-induced neuronal cell death. *Nature* **427**, 843-848, doi:10.1038/nature02319nature02319 [pii] (2004).
- 175 Lebrun-Julien, F. *et al.* ProNGF induces TNFalpha-dependent death of retinal ganglion cells through a p75NTR non-cell-autonomous signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 3817-3822, doi:0909276107 [pii]10.1073/pnas.0909276107 (2010).
- 176 Lin, P. Y., Hinterneder, J. M., Rollor, S. R. & Birren, S. J. Non-cell-autonomous regulation of GABAergic neuron development by neurotrophins and the p75 receptor. *J Neurosci* **27**, 12787-12796, doi:27/47/12787 [pii]10.1523/JNEUROSCI.3302-07.2007 (2007).
- 177 Song, W., Volosin, M., Cragolini, A. B., Hempstead, B. L. & Friedman, W. J. ProNGF induces PTEN via p75NTR to suppress Trk-mediated survival signaling in brain neurons. *J Neurosci* **30**, 15608-15615, doi:30/46/15608 [pii]10.1523/JNEUROSCI.2581-10.2010 (2010).
- 178 Chen, Z. Y. *et al.* Sortilin controls intracellular sorting of brain-derived neurotrophic factor to the regulated secretory pathway. *J Neurosci* **25**, 6156-6166, doi:25/26/6156 [pii]10.1523/JNEUROSCI.1017-05.2005 (2005).
- 179 Vaegter, C. B. *et al.* Sortilin associates with Trk receptors to enhance anterograde transport and neurotrophin signaling. *Nat Neurosci* **14**, 54-61, doi:nn.2689 [pii]10.1038/nn.2689 (2011).
- 180 Niederost, B., Oertle, T., Fritsche, J., McKinney, R. A. & Bandtlow, C. E. Nogo-A and myelin-associated glycoprotein mediate neurite growth inhibition by antagonistic regulation of RhoA and Rac1. *J Neurosci* **22**, 10368-10376, doi:22/23/10368 [pii] (2002).
- 181 Fournier, A. E., GrandPre, T. & Strittmatter, S. M. Identification of a receptor mediating Nogo-66 inhibition of axonal regeneration. *Nature* **409**, 341-346, doi:10.1038/35053072 (2001).
- 182 Wong, S. T. *et al.* A p75(NTR) and Nogo receptor complex mediates repulsive signaling by myelin-associated glycoprotein. *Nat Neurosci* **5**, 1302-1308, doi:10.1038/nn975nn975 [pii] (2002).
- 183 Yamashita, T. & Tohyama, M. The p75 receptor acts as a displacement factor that releases Rho from Rho-GDI. *Nat Neurosci* **6**, 461-467, doi:10.1038/nn1045nn1045 [pii] (2003).
- 184 Park, K. J., Grosso, C. A., Aubert, I., Kaplan, D. R. & Miller, F. D. p75NTR-dependent, myelin-mediated axonal degeneration regulates neural connectivity in the adult brain. *Nat Neurosci* **13**, 559-566, doi:nn.2513 [pii]10.1038/nn.2513 (2010).
- 185 Roth, L. *et al.* The many faces of semaphorins: from development to pathology. *Cell Mol Life Sci* **66**, 649-666, doi:10.1007/s00018-008-8518-z (2009).
- 186 Klein, R. Eph/ephrin signaling in morphogenesis, neural development and plasticity. *Curr Opin Cell Biol* **16**, 580-589, doi:10.1016/j.ceb.2004.07.002S0955-0674(04)00097-3 [pii] (2004).
- 187 Sun, Y. *et al.* ProBDNF Collapses Neurite Outgrowth of Primary Neurons by Activating RhoA. *PLoS One* **7**, e35883, doi:10.1371/journal.pone.0035883PONE-D-11-24512 [pii] (2012).
- 188 Singh, K. K. *et al.* Developmental axon pruning mediated by BDNF-p75NTR-dependent axon degeneration. *Nat Neurosci* **11**, 649-658, doi:nn.2114 [pii]10.1038/nn.2114 (2008).



- 189 Teng, K. K., Felice, S., Kim, T. & Hempstead, B. L. Understanding proneurotrophin actions: Recent advances and challenges. *Dev Neurobiol* **70**, 350-359, doi:10.1002/dneu.20768 (2010).
- 190 Geetha, T., Kenchappa, R. S., Wooten, M. W. & Carter, B. D. TRAF6-mediated ubiquitination regulates nuclear translocation of NRIF, the p75 receptor interactor. *EMBO J* **24**, 3859-3868, doi:7600845 [pii]10.1038/sj.emboj.7600845 (2005).
- 191 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, doi:S0092-8674(00)81509-3 [pii] (1999).
- 192 Tao, X., Finkbeiner, S., Arnold, D. B., Shaywitz, A. J. & Greenberg, M. E. Ca<sup>2+</sup> influx regulates BDNF transcription by a CREB family transcription factor-dependent mechanism. *Neuron* **20**, 709-726 (1998).
- 193 Hong, E. J., McCord, A. E. & Greenberg, M. E. A biological function for the neuronal activity-dependent component of Bdnf transcription in the development of cortical inhibition. *Neuron* **60**, 610-624, doi:10.1016/j.neuron.2008.09.024 (2008).
- 194 Riffault, B. *et al.* Pro-brain-derived neurotrophic factor inhibits GABAergic neurotransmission by activating endocytosis and repression of GABAA receptors. *J Neurosci* **34**, 13516-13534, doi:10.1523/JNEUROSCI.2069-14.2014 (2014).
- 195 Gorba, T. & Wahle, P. Expression of TrkB and TrkC but not BDNF mRNA in neurochemically identified interneurons in rat visual cortex in vivo and in organotypic cultures. *Eur J Neurosci* **11**, 1179-1190 (1999).
- 196 Benevento, L. A., Bakkum, B. W. & Cohen, R. S. gamma-Aminobutyric acid and somatostatin immunoreactivity in the visual cortex of normal and dark-reared rats. *Brain Res* **689**, 172-182 (1995).
- 197 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).
- 198 Di Cristo, G. *et al.* Requirement of ERK activation for visual cortical plasticity. *Science* **292**, 2337-2340, doi:10.1126/science.1059075292/5525/2337 [pii] (2001).
- 199 Korte, M., Kang, H., Bonhoeffer, T. & Schuman, E. A role for BDNF in the late-phase of hippocampal long-term potentiation. *Neuropharmacology* **37**, 553-559 (1998).
- 200 Pang, P. T. *et al.* Cleavage of proBDNF by tPA/plasmin is essential for long-term hippocampal plasticity. *Science* **306**, 487-491, doi:10.1126/science.1100135 (2004).
- 201 Woo, N. H. *et al.* Activation of p75NTR by proBDNF facilitates hippocampal long-term depression. *Nat Neurosci* **8**, 1069-1077, doi:nn1510 [pii]10.1038/nn1510 (2005).
- 202 Egan, M. F. *et al.* The BDNF val66met polymorphism affects activity-dependent secretion of BDNF and human memory and hippocampal function. *Cell* **112**, 257-269 (2003).
- 203 Hariri, A. R. *et al.* Brain-derived neurotrophic factor val66met polymorphism affects human memory-related hippocampal activity and predicts memory performance. *J Neurosci* **23**, 6690-6694 (2003).
- 204 Chen, Z. Y., Bath, K., McEwen, B., Hempstead, B. & Lee, F. Impact of genetic variant BDNF (Val66Met) on brain structure and function. *Novartis Found Symp* **289**, 180-188; discussion 188-195 (2008).
- 205 Stern, A. J. *et al.* Impact of the brain-derived neurotrophic factor Val66Met polymorphism on levels of hippocampal N-acetyl-aspartate assessed by magnetic

- resonance spectroscopic imaging at 3 Tesla. *Biol Psychiatry* **64**, 856-862, doi:10.1016/j.biopsych.2008.07.009 (2008).
- 206 Lu, B. Pro-region of neurotrophins: role in synaptic modulation. *Neuron* **39**, 735-738 (2003).
- 207 Frodl, T. *et al.* Association of the brain-derived neurotrophic factor Val66Met polymorphism with reduced hippocampal volumes in major depression. *Arch Gen Psychiatry* **64**, 410-416, doi:10.1001/archpsyc.64.4.410 (2007).
- 208 Montag, C., Weber, B., Fliessbach, K., Elger, C. & Reuter, M. The BDNF Val66Met polymorphism impacts parahippocampal and amygdala volume in healthy humans: incremental support for a genetic risk factor for depression. *Psychol Med* **39**, 1831-1839, doi:10.1017/S0033291709005509 (2009).
- 209 Chiaruttini, C. *et al.* Dendritic trafficking of BDNF mRNA is mediated by translin and blocked by the G196A (Val66Met) mutation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 16481-16486, doi:10.1073/pnas.0902833106 (2009).
- 210 Siuciak, J. A., Lewis, D. R., Wiegand, S. J. & Lindsay, R. M. Antidepressant-like effect of brain-derived neurotrophic factor (BDNF). *Pharmacol Biochem Behav* **56**, 131-137, doi:10.1016/S0091-3057(96)00169-4 (1997).
- 211 Karege, F. *et al.* Decreased serum brain-derived neurotrophic factor levels in major depressed patients. *Psychiatry Res* **109**, 143-148 (2002).
- 212 Duman, R. S., Heninger, G. R. & Nestler, E. J. A molecular and cellular theory of depression. *Arch Gen Psychiatry* **54**, 597-606 (1997).
- 213 Hwang, J. P. *et al.* The Val66Met polymorphism of the brain-derived neurotrophic-factor gene is associated with geriatric depression. *Neurobiol Aging* **27**, 1834-1837, doi:10.1016/j.neurobiolaging.2005.10.013 (2006).
- 214 Ribeiro, L. *et al.* The brain-derived neurotrophic factor rs6265 (Val66Met) polymorphism and depression in Mexican-Americans. *Neuroreport* **18**, 1291-1293, doi:10.1097/WNR.0b013e328273bcb0 (2007).
- 215 Zhou, L. *et al.* Upregulation of blood proBDNF and its receptors in major depression. *J Affect Disord* **150**, 776-784, doi:10.1016/j.jad.2013.03.002 (2013).
- 216 Frey, B. N. *et al.* Effects of mood stabilizers on hippocampus BDNF levels in an animal model of mania. *Life Sci* **79**, 281-286, doi:10.1016/j.lfs.2006.01.002 (2006).
- 217 Knable, M. B. *et al.* Molecular abnormalities of the hippocampus in severe psychiatric illness: postmortem findings from the Stanley Neuropathology Consortium. *Mol Psychiatry* **9**, 609-620, 544, doi:10.1038/sj.mp.4001471 (2004).
- 218 Neves-Pereira, M. *et al.* The brain-derived neurotrophic factor gene confers susceptibility to bipolar disorder: evidence from a family-based association study. *Am J Hum Genet* **71**, 651-655, doi:10.1086/342288 (2002).
- 219 Sklar, P. *et al.* Family-based association study of 76 candidate genes in bipolar disorder: BDNF is a potential risk locus. Brain-derived neurotrophic factor. *Mol Psychiatry* **7**, 579-593, doi:10.1038/sj.mp.4001058 (2002).
- 220 Lohoff, F. W. *et al.* Confirmation of association between the Val66Met polymorphism in the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene and bipolar I disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* **139B**, 51-53, doi:10.1002/ajmg.b.30215 (2005).
- 221 Hong, C. J., Liou, Y. J. & Tsai, S. J. Effects of BDNF polymorphisms on brain function and behavior in health and disease. *Brain Res Bull* **86**, 287-297, doi:10.1016/j.brainresbull.2011.08.019 (2011).

- 222 Weinberger, D. R. From neuropathology to neurodevelopment. *Lancet* **346**, 552-557  
(1995).
- 223 Takahashi, M. *et al.* Abnormal expression of brain-derived neurotrophic factor and its  
receptor in the corticolimbic system of schizophrenic patients. *Mol Psychiatry* **5**, 293-  
300 (2000).
- 224 Chang, H. A. *et al.* Brain-derived neurotrophic factor Val66Met polymorphism:  
association with psychopathological symptoms of schizophrenia? *J Neuropsychiatry  
Clin Neurosci* **21**, 30-37, doi:10.1176/appi.neuropsych.21.1.30 (2009).
- 225 Spalletta, G. *et al.* BDNF Val66Met polymorphism is associated with aggressive  
behavior in schizophrenia. *Eur Psychiatry* **25**, 311-313,  
doi:10.1016/j.eurpsy.2009.10.008 (2010).
- 226 Ho, B. C. *et al.* Cognitive and magnetic resonance imaging brain morphometric  
correlates of brain-derived neurotrophic factor Val66Met gene polymorphism in  
patients with schizophrenia and healthy volunteers. *Arch Gen Psychiatry* **63**, 731-740,  
doi:10.1001/archpsyc.63.7.731 (2006).
- 227 Koolschijn, P. C. *et al.* Effects of brain-derived neurotrophic factor Val66Met  
polymorphism on hippocampal volume change in schizophrenia. *Hippocampus* **20**,  
1010-1017, doi:10.1002/hipo.20699 (2010).
- 228 Hall, D., Dhillon, A., Charalambous, A., Gogos, J. A. & Karayiorgou, M. Sequence  
variants of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene are strongly associated  
with obsessive-compulsive disorder. *Am J Hum Genet* **73**, 370-376,  
doi:10.1086/377003 (2003).
- 229 Rios, M. *et al.* Conditional deletion of brain-derived neurotrophic factor in the  
postnatal brain leads to obesity and hyperactivity. *Mol Endocrinol* **15**, 1748-1757,  
doi:10.1210/mend.15.10.0706 (2001).
- 230 Homayoun, H. & Moghaddam, B. NMDA receptor hypofunction produces opposite  
effects on prefrontal cortex interneurons and pyramidal neurons. *J Neurosci* **27**, 11496-  
11500, doi:10.1523/JNEUROSCI.2213-07.2007 (2007).
- 231 Pratt, J. A., Winchester, C., Egerton, A., Cochran, S. M. & Morris, B. J. Modelling  
prefrontal cortex deficits in schizophrenia: implications for treatment. *Br J Pharmacol*  
**153 Suppl 1**, S465-470, doi:10.1038/bjp.2008.24 (2008).
- 232 Noebels, J. L. The biology of epilepsy genes. *Annu Rev Neurosci* **26**, 599-625,  
doi:10.1146/annurev.neuro.26.010302.081210 (2003).
- 233 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, doi:10.1016/j.tins.2004.11.011 (2005).
- 234 LeBlanc, J. J. & Fagiolini, M. Autism: a "critical period" disorder? *Neural Plast* **2011**,  
921680, doi:10.1155/2011/921680 (2011).
- 235 Lechner, H. A., Lein, E. S. & Callaway, E. M. A genetic method for selective and  
quickly reversible silencing of Mammalian neurons. *J Neurosci* **22**, 5287-5290,  
doi:20026527 (2002).
- 236 Ben Fredj, N. *et al.* Synaptic activity and activity-dependent competition regulates  
axon arbor maturation, growth arrest, and territory in the retinotectal projection. *J  
Neurosci* **30**, 10939-10951, doi:10.1523/JNEUROSCI.1556-10.2010 (2010).

- 237 Bartos, M. & Elgueta, C. Functional characteristics of parvalbumin- and cholecystokinin-expressing basket cells. *J Physiol* **590**, 669-681, doi:10.1113/jphysiol.2011.226175 (2012).
- 238 Han, X. In vivo application of optogenetics for neural circuit analysis. *ACS Chem Neurosci* **3**, 577-584, doi:10.1021/cn300065j (2012).
- 239 Wu, X. *et al.* GABA signaling promotes synapse elimination and axon pruning in developing cortical inhibitory interneurons. *J Neurosci* **32**, 331-343, doi:10.1523/JNEUROSCI.3189-11.2012 (2012).
- 240 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, doi:10.1523/JNEUROSCI.3566-09.2009 (2009).
- 241 Bracken, B. K. & Turrigiano, G. G. Experience-dependent regulation of TrkB isoforms in rodent visual cortex. *Dev Neurobiol* **69**, 267-278, doi:10.1002/dneu.20701 (2009).
- 242 Deinhardt, K. *et al.* Neuronal growth cone retraction relies on proneurotrophin receptor signaling through Rac. *Sci Signal* **4**, ra82, doi:10.1126/scisignal.2002060 (2011).
- 243 Yamashita, T., Fujitani, M., Yamagishi, S., Hata, K. & Mimura, F. Multiple signals regulate axon regeneration through the Nogo receptor complex. *Mol Neurobiol* **32**, 105-111, doi:10.1385/MN:32:2:105 (2005).
- 244 Lim, Y. S. *et al.* p75(NTR) mediates ephrin-A reverse signaling required for axon repulsion and mapping. *Neuron* **59**, 746-758, doi:10.1016/j.neuron.2008.07.032 (2008).
- 245 Morishita, H., Cabungcal, J. H., Chen, Y., Do, K. Q. & Hensch, T. K. Prolonged Period of Cortical Plasticity upon Redox Dysregulation in Fast-Spiking Interneurons. *Biol Psychiatry*, doi:10.1016/j.biopsych.2014.12.026 (2015).
- 246 Carulli, D. *et al.* Animals lacking link protein have attenuated perineuronal nets and persistent plasticity. *Brain* **133**, 2331-2347, doi:10.1093/brain/awq145 (2010).
- 247 Baho, E. & Di Cristo, G. Neural activity and neurotransmission regulate the maturation of the innervation field of cortical GABAergic interneurons in an age-dependent manner. *J Neurosci* **32**, 911-918, doi:10.1523/JNEUROSCI.4352-11.2012 (2012).
- 248 Teng, H. K. *et al.* ProBDNF induces neuronal apoptosis via activation of a receptor complex of p75NTR and sortilin. *J Neurosci* **25**, 5455-5463, doi:10.1523/JNEUROSCI.5123-04.2005 (2005).
- 249 Fiorentino, H. *et al.* GABA(B) receptor activation triggers BDNF release and promotes the maturation of GABAergic synapses. *J Neurosci* **29**, 11650-11661, doi:10.1523/JNEUROSCI.3587-09.2009 (2009).
- 250 Cassens, C. *et al.* Binding of the receptor tyrosine kinase TrkB to the neural cell adhesion molecule (NCAM) regulates phosphorylation of NCAM and NCAM-dependent neurite outgrowth. *J Biol Chem* **285**, 28959-28967, doi:10.1074/jbc.M110.114835 (2010).
- 251 Dias, G. P. *et al.* Hippocampal biomarkers of fear memory in an animal model of generalized anxiety disorder. *Behav Brain Res* **263**, 34-45, doi:10.1016/j.bbr.2014.01.012 (2014).
- 252 Irmady, K. *et al.* Mir-592 regulates the induction and cell death-promoting activity of p75NTR in neuronal ischemic injury. *J Neurosci* **34**, 3419-3428, doi:10.1523/JNEUROSCI.1982-13.2014 (2014).

- 253 Kandratavicius, L., Hallak, J. E., Carlotti, C. G., Assirati, J. A., Jr. & Leite, J. P. Neurotrophin receptors expression in mesial temporal lobe epilepsy with and without psychiatric comorbidities and their relation with seizure type and surgical outcome. *Acta Neuropathol Commun* **2**, 81, doi:10.1186/s40478-014-0081-2 (2014).
- 254 Dwivedi, Y. *et al.* Neurotrophin receptor activation and expression in human postmortem brain: effect of suicide. *Biol Psychiatry* **65**, 319-328, doi:10.1016/j.biopsych.2008.08.035 (2009).