



Université de Montréal

Mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la régulation du  
développement des circuits d'interneurones GABAergiques dans le néocortex :  
rôle de la molécule d'adhésion cellulaire neurale (NCAM)

par  
Elie Baho

Département de science biomédicales  
Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté de médecine  
en vue de l'obtention du grade de M.Sc  
en Sciences biomédicales  
Option générale

Avril, 2010 dépôt de l'ouvrage

©, Elie Baho, 2010

Université de Montréal

Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :

Mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la régulation du développement des circuits d'interneurones GABAergiques dans le néocortex : rôle de la molécule d'adhésion cellulaire neurale (NCAM)

Présenté par :

Elie Baho

Président-rapporteur : Richard Robitaille

Directeur de recherche : Graziella Di Cristo

Membre du jury : Guy Doucet

## Résumé en français et mots clés

Les interneurons GABAergiques constituent une population mineure de cellules par rapport aux neurones glutamatergiques dans le néocortex. Cependant ils contrôlent fortement l'excitabilité neuronale, la dynamique des réseaux neuronaux et la plasticité synaptique. L'importance des circuits GABAergiques dans le processus fonctionnel et la plasticité des réseaux corticaux est soulignée par des résultats récents qui montrent que des modifications très précises et fiables des circuits GABAergiques sont associées à divers troubles du développement neurologique et à des défauts dans les fonctions cérébrales. De ce fait, la compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires impliquant le développement des circuits GABAergiques est la première étape vers une meilleure compréhension de la façon dont les anomalies de ces processus peuvent se produire. La molécule d'adhésion cellulaire neurale (NCAM) appartient à la super-famille des immunoglobulines de reconnaissance cellulaire et est impliquée dans des interactions homophiliques et hétérophiliques avec d'autres molécules. Même si plusieurs rôles de NCAM ont été démontrés dans la croissance neuronale, la fasciculation axonale, la formation et la maturation de synapses, de même que dans la plasticité cellulaire de plusieurs systèmes, le rôle de NCAM dans la formation des synapses GABAergiques reste inconnu.

Ce projet visait donc à déterminer le rôle précis de NCAM dans le processus de maturation des synapses GABAergiques dans le néocortex, en

modulant son expression à différentes étapes du développement. L'approche choisie a été de supprimer NCAM dans des cellules GABAergiques à paniers avant la maturation des synapses (EP12-18), pendant la maturation (EP16-24), ou durant le maintien de celles-ci (EP24-32). Les méthodes utilisées ont été le clonage moléculaire, l'imagerie confocale, la culture de coupes organotypiques et des techniques morphométriques de quantification de l'innervation GABAergique. Nos résultats montrent que l'inactivation de NCAM durant la phase de maturation des synapses périsonomatiques (EP16-24) cause une réduction du nombre de synapses GABAergiques périsonomatiques et du branchement de ces axones. En revanche, durant la phase de maintien (EP26-32), l'inactivation de NCAM n'a pas affecté ces paramètres des synapses GABAergiques. Or, il existe trois isoformes de NCAM (NCAM120, 140 et 180) qui pourraient jouer des rôles différents dans les divers types cellulaires ou à des stades développementaux différents. Nos données montrent que NCAM120 et 140 sont nécessaires à la maturation des synapses périsonomatiques GABAergiques. Cependant, NCAM180, qui est l'isoforme la plus étudiée et caractérisée, ne semble pas être impliquée dans ce processus. De plus, l'inactivation de NCAM n'a pas affecté la densité des épines dendritiques ou leur longueur. Elle est donc spécifique aux synapses périsonomatiques GABAergiques. Finalement, nos résultats suggèrent que le domaine conservé C-terminal KENESKA est essentiel à la maturation des synapses périsonomatiques GABAergiques. Des expériences futures nous aideront à mieux comprendre la mécanistique et les différentes voies de signalisation impliquées.

Mots clés : développement, cortex, interneurone, GABA, synapse,  
NCAM, isoformes, maturation

**Abstract and key words**

GABAergic interneurons, though a minor population in the neocortex, play an important role in cortical function and plasticity. Alterations in GABAergic circuits are implicated in various neurodevelopmental disorders. The GABAergic network comprises diverse interneuron subtypes that have different morphological and physiological characteristics, and localize their synapses onto distinct subcellular locations on the postsynaptic targets. Precisely how activity and molecularly driven mechanisms conspire to achieve the remarkable specificity of GABAergic synapse localization and formation is unknown. Therefore, unravelling the cellular and molecular mechanisms involved in this process is crucial for a better understanding of both cortical function and the basis of various neurological disorders. Here we focus our study on a subtype of GABAergic neurons - the basket interneurons which localize synapses, called perisomatic synapses, onto the soma and proximal dendrites of the postsynaptic targets, and tightly regulate their firing patterns. Although recent studies have shown the activity dependence of basket synapse formation, the molecular mechanisms implicated in the perisomatic synapse formation process are poorly understood.

NCAM, the neural cell adhesion molecule, is a prime molecular player implicated both in early synaptogenesis events, and during maturation of glutamatergic synapses in the hippocampus. Recent studies have implicated the polysialylated form of NCAM (PSA-NCAM) in basket synapse formation.

However, whether and how NCAM per se plays a role in the formation of GABAergic synapses is unknown.

Using single cell genetics to knock down NCAM in individual basket interneurons at specific developmental time periods, we characterized the role of NCAM during perisomatic synapse formation and maintenance. Here we show that loss of NCAM during perisomatic synapse formation from equivalent postnatal day (EP) 16 to EP24, in organotypic slices from mouse visual cortex, significantly retards the process of basket cell axonal branching and bouton formation. However, loss of NCAM at a later stage (EP26 to EP32), when the synapses are already formed, did not affect the number or intricacy of perisomatic synapses. NCAM is therefore implicated in perisomatic synapse formation but not in its maintenance. Further studies also show that isoforms of NCAM, such as NCAM140 and NCAM120 are involved in perisomatic GABAergic synapse maturation. However, NCAM180 is not implicated in this process. Also, NCAM does not affect dendritic spine density and length during maturation and maintenance phases, therefore its action is specific only to GABAergic perisomatic synapses. Finally, the highly conserved C-terminal domain KENESKA is essential for GABAergic perisomatic synapse maturation. Future experiments will help us clarify this mechanism and the involved signalling pathways related to NCAM.

Key words : developpement, cortex, interneuron, GABA, axon, synapse, NCAM, isoforms, maturation



## Table des matières

<b>Résumé en français et mots clés</b> .....	<b>i</b>
<b>English summary and key words</b> .....	<b>iv</b>
<b>Table des matières</b> .....	<b>vi</b>
<b>Liste des figures</b> .....	<b>viii</b>
<b>Liste des abréviations</b> .....	<b>ix</b>
<b>Chapitre 1: Introduction</b> .....	<b>1</b>
1.1 Réseau GABAergique cortical .....	1
1.1.1 Les interneurons inhibiteurs .....	1
1.1.2 Types d'interneurones.....	3
1.1.3 Rôles des interneurons corticaux.....	6
1.1.4 Développement des circuits corticaux GABAergiques.....	10
1.1.5 De la migration vers le ciblage.....	11
1.1.6 Formation et maturation des synapses .....	13
1.2 NCAM.....	16
1.2.1 NCAM et ses partenaires structuraux.....	16
1.2.2 Signalisation intracellulaire.....	20
1.2.3 Déficience en NCAM.....	26
1.2.4 Les fonctions de NCAM dans la formation et la plasticité des synapses.....	29
1.3 Objectifs de recherche .....	32
1.3.1 Contexte .....	32
1.3.2 Objectif principal .....	32
1.3.3 Objectifs spécifiques .....	32
<b>Chapitre 2: Méthodologie</b> .....	<b>34</b>
2.1 Génération de souris déficientes en NCAM.....	34
2.2 Culture de tranches de cerveau et transfection biolistique .....	34
2.3 Clonage.....	35
2.4 Immunohistochimie.....	35
2.5 Acquisition et analyse des images.....	36
2.6 Analyse statistique.....	38

<b>Chapitre 3: Résultats</b> .....	<b>39</b>
3.1 NCAM est nécessaire à la maturation des synapses GABAergiques périsomatiques, mais non à leur maintien.....	39
3.2 Un knockout de NCAM entre les 3 <sup>ème</sup> et 4 <sup>ème</sup> semaines post-natales n’affecte pas la densité des épines dendritiques.....	44
3.3 Les isoformes NCAM120 et 140 peuvent compenser le KO de NCAM dans la maturation des synapses GABAergiques périsomatiques, mais pas la NCAM180..	47
3.4 Le domaine intracellulaire conservé KENESKA de NCAM140 est nécessaire à la maturation des synapses GABAergiques.....	53
<b>Chapitre 4: Discussion</b> .....	<b>56</b>
4.1 Implication d’autres molécules d’adhésion cellulaire dans le développement de synapses GABAergiques .....	56
4.2 NCAM et la maturation des neurones pyramidaux.....	57
4.3 NCAM120 et la voie de signalisation Fyn.....	58
4.4 Importance du domaine intracellulaire conservé KENESKA.....	61
4.5 MLCK et la maturation des synapses GABAergiques .....	63
<b>Chapitre 5: Bibliographie</b> .....	<b>65</b>

## Liste des figures

Figure 1. Diversité anatomique des neurones corticaux.....	6
Figure 2. Structure des trois isoformes de NCAM.....	18
Figure 3. Schéma illustrant les complexes de signalisation de NCAM140 .....	23
Figure 4. Les différentes voies de signalisation impliquées dans la croissance de neurites régulée par NCAM .....	25
Figure 5. <i>Knock-down</i> de NCAM dans les interneurons à paniers.....	40
Figure 6. NCAM est nécessaire à la maturation des synapses périsonomatiques et non pour leur formation ni leur maintien .....	43
Figure 7. Le rôle de NCAM est spécifique aux interneurons GABAergiques et n'influence pas les neurones excitateurs aux stades de développement étudiés (EP12-18, EP16-24 et EP26-32).....	46
Figure 8. Transfection biolistique des isoformes de NCAM.....	48
Figure 9. Les isoformes NCAM120 et 140 compensent la perte de NCAM dans la maturation des synapses périsonomatiques GABAergiques, mais pas NCAM180 .....	50
Figure 10. Le rôle des trois isoformes NCAM est spécifique aux interneurons GABAergiques et n'affecte pas les neurones excitateurs à EP16-24.....	52
Figure 11. Le domaine intracellulaire conservé KENESKA de NCAM140 est nécessaire à la maturation des synapses GABAergiques .....	55
Figure 12. Voie de signalisation impliquant Fyn dans la croissance de neurites régulée par NCAM120 ou 140.....	60

## Liste des abréviations

2-AG : 2-arachidonylglycérol

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

AA : acide arachidonique

AIS : segment initial de l'axone

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

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

ARNm : acide ribonucléique messenger

ARNsi : ARN interférant

BDNF : facteur neurotrophique dérivé du cerveau

CAM : molécule d'adhésion cellulaire

CB : calbindine

CCK : cholécystokinine

Cl<sup>-</sup> : chlore

CR : calrétinine

DAG : diacylglycérol

EP : jour équivalent post-natal

ER : réticulum endoplasmique

FAK : kinase d'adhésion focale

FGFR : récepteur des facteurs de croissance des fibroblastes

GDNF : facteur neurotrophique dérivé d'une lignée de cellules gliales

GFP : protéine fluorescente verte

GFR $\alpha$  : récepteur du GDNF

HFS : stimulation de haute fréquence

Ig : immunoglobuline

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

K<sup>+</sup> : potassium

KCC : co-transporteur de potassium/chlore

KO : knockout

LBC : cellule à gros paniers

LTD : dépression à long terme

LTP : potentialisation à long terme

NBC : cellule à paniers en nid

NMDA : acide N-méthyl-D-aspartique

NGS : normal goat serum

MAPK : protéine kinase activée par les mitogènes

NCAM : molécule d'adhésion cellulaire neurale

MLC : chaîne légère de la myosine

MLCK : kinase de la chaîne légère de la myosine

NF186 : neurofascine 186

NYP : neuropeptide Y

PLC $\beta$  : phospholipase C $\beta$

PKA : protéine kinase A

PSA : acide polysialique

PSD : densité post-synaptique

PV : parvabumine

Py : pyramidal

RPTP $\alpha$  : récepteur à phosphatase de tyrosine protéique

SBC : cellule à petits paniers

SH2 : Src Homology 2 domain

SSC : cellule épineuse étoilée

TGN : réseau trans Golgi

VIP : peptide intestinal vasoactif

## **Chapitre 1 : Introduction générale**

### 1.1 Réseau GABAergique cortical

#### 1.1.1 Les interneurons inhibiteurs

La plupart des neurones néocorticaux (70-80%) sont des neurones pyramidaux excitateurs, qui ont des propriétés anatomiques, physiologiques et moléculaires relativement stéréotypées<sup>1-3</sup>. Les autres 20-30% des neurones néocorticaux sont des interneurons, principalement inhibiteurs, qui ont diverses caractéristiques morphologiques, physiologiques, moléculaires et synaptiques<sup>1, 4-11</sup>. Même si la majorité des interneurons sont inhibiteurs, ils peuvent aussi être excitateurs. Ainsi, les cellules étoilées à épines (SSC) constituent un type d'interneurons excitateurs (glutamatergiques) important qui partage plusieurs caractéristiques avec les neurones pyramidaux<sup>1, 12-15</sup>.

Malgré leur diversité, les interneurons inhibiteurs néocorticaux, qui utilisent l'acide  $\gamma$ -aminobutyrique (GABA) comme transmetteur, ont plusieurs traits communs, dont certains les distinguent des neurones pyramidaux. Premièrement, la plupart des interneurons inhibiteurs matures ont des dendrites sans épines<sup>14, 16, 17</sup>. Deuxièmement, ces interneurons peuvent recevoir des synapses excitatrices et inhibitrices au niveau de leur corps cellulaire<sup>16-18</sup>. Troisièmement, leurs axones s'arborisent habituellement à l'intérieur des colonnes corticales et peuvent projeter latéralement vers d'autres.

Cependant, ils ne se projettent typiquement pas vers la matière blanche pour contacter des régions distantes du cerveau<sup>19</sup>. Donc, les interneurones néocorticaux sont généralement appelés des « neurones de circuit local » pour refléter la restriction de leur arborisation axonale et dendritique au néocortex<sup>20</sup>. Finalement, divers types de neurones inhibiteurs sont capables de cibler différents sous-domaines de neurones<sup>8,21</sup>.

Les interneurones inhibiteurs varient grandement dans leur morphologie somatique, dendritique et axonale<sup>1</sup>. La morphologie dendritique est la caractéristique la plus variable et ne peut pas être utilisée pour définir de façon fiable le type d'interneurones. Cette dernière caractéristique est cause d'une polémique dans la littérature actuelle concernant la classification de ces neurones parce que plusieurs études, manquant d'un arrière-plan anatomique approfondi, confondent les types cellulaires en se basant uniquement sur les traits dendritiques des interneurones. Ainsi, par exemple, les caractéristiques d'orientation "multipolaires" ou "bipolaires" des dendrites proximales des interneurones ne permettent pas à elles-seules d'identifier un type spécifique de cellule<sup>1</sup>. En revanche, l'arborisation et le ciblage axonaux peuvent révéler l'identité anatomique d'un interneurone, car certains semblent être particulièrement spécialisés à cibler des domaines neuronaux spécifiques à l'échelle cellulaire, ou différentes couches d'une ou plusieurs colonnes corticales. Bref, ces interneurones peuvent être plus efficacement caractérisés fonctionnellement selon leurs cibles axonales spécifiques sur les cellules

adjacentes, contactant soit l'axone, le corps cellulaire ou les dendrites, proximales ou distales (Figure 1)<sup>8, 21</sup>.

### 1.1.2 Types d'interneurones

Les pourcentages relatifs de chaque type d'interneurones varient selon les espèces, les régions du cerveau ou les couches corticales. Environ 50% de tous les interneurones inhibiteurs corticaux, chez les rongeurs, sont des cellules à paniers, nommées ainsi à cause de la forme en paniers de leur arborisation axonale terminale autour des corps cellulaires des cellules pyramidales<sup>1, 16, 22</sup>. Ces interneurones ciblent ainsi les corps cellulaires et les dendrites proximales des neurones excitateurs pyramidaux et de certains interneurones<sup>23-25</sup>. Cette caractéristique leur confère la capacité unique d'ajuster le gain de la réponse synaptique intégrée<sup>1</sup>. Une autre caractéristique importante de ce type de cellules est d'exprimer typiquement plusieurs neuropeptides et deux protéines liant le calcium: la parvabumine (PV) et la calbindine (CB). Au niveau de leur morphologie axonale et dendritique, les cellules à paniers peuvent être divisées en trois sous-classes : à gros paniers, à petits paniers et à paniers en nid (Figure 1)<sup>1</sup>.

Les cellules à gros paniers (LBCs) sont les cellules à paniers classiques. Elles possèdent de grosses dendrites multipolaires sans épines et des arborisations axonales très étendues qui peuvent inhiber des neurones dans les couches supérieures et inférieures du cortex, et dans les colonnes voisines ou



distantes<sup>16, 23, 26-28</sup>. Les LBCs sont donc la source primaire d'inhibition latérale à travers les colonnes au sein des couches qui contiennent leurs corps cellulaires. L'arborisation axonale locale est clairsemée, possède une densité faible de boutons (synapses) et tend à s'enbrancher fortement. Les LBCs expriment la CB, la PV, le neuropeptide Y (NYP) et la cholécystokinine (CCK). En revanche, elles n'expriment jamais le peptide intestinal vasoactif (VIP)<sup>1</sup>.

Les cellules à petits paniers (SBCs) se différencient des autres par leur morphologie somato-dendritique, qui peut être multipolaire, bitouffe ou bipolaire, avec différentes tendances selon les couches : la plupart des SBCs de la couche IV sont multipolaires, et celles de la couche II/III sont souvent bitouffes ou bipolaires<sup>23, 27, 29-31</sup>. Les SBCs peuvent aussi facilement se différencier des LBCs par leurs branchements fréquents et leurs axones incurvés et recourbés. De plus, elles forment un nombre plus élevé de synapses sur les neurones pyramidaux. Elles se différencient aussi des autres cellules à paniers parce qu'elles peuvent exprimer le VIP<sup>1</sup>.

Les cellules à paniers en nid (NBCs) étaient fréquemment associées aux interneurons ayant des arborisations irrégulières, cependant il a été récemment démontré qu'elles appartiennent à une classe distincte de cellules ciblant spécifiquement le soma<sup>9, 23, 26, 32, 33</sup>. Les NBCs, dont les arborisations axonales ressemblent à des nids d'oiseau, paraissent comme des hybrides des LBCs et des SBCs. Elles ont une arborisation axonale locale similaire à celle des SBCs, mais possèdent une fréquence de branchements moindre et des collatérales axonales plus longues avec une densité faible de boutons, tout comme les

LBCs. Les NBCs n'expriment typiquement pas la calrétinine (CR) et n'expriment jamais la VIP<sup>1</sup>.

Puisque les cellules à paniers représentent la majorité des interneurons GABAergiques dans le néocortex, elles ont été l'objet de plusieurs études. Cependant, il existe d'autres interneurons ayant des cibles différentes. Les cellules à chandeliers, qui se retrouvent dans les couches II-VI, ciblent les axones des cellules pyramidales et modulent ainsi spécifiquement la sortie des potentiels d'action somatiques, outrepassant toute l'intégration survenant au niveau de leur complexe dendritique<sup>8, 21, 34-37</sup>. On retrouve également les cellules de type Martinotti, qui se situent dans les couches II-VI, et qui projettent leurs axones vers la couche I, dans laquelle elles inhibent les dendrites des neurones pyramidaux<sup>7, 11, 16, 19, 38, 39</sup>. Les cellules bipolaires, localisées au niveau des couches II-VI, sont de petites cellules possédant deux dendrites opposées qui s'étendent verticalement (dans l'axe dorso-ventral) respectivement vers la couche I et vers la couche VI<sup>16, 40, 41</sup>. Les cellules dites à « double bouquet », retrouvées dans les couches II-V, innervent principalement les dendrites<sup>16, 42, 43</sup>. En résumé, il existe une grande diversité d'interneurones dans le néocortex, exprimant plusieurs neuropeptides et protéines liant le calcium, et visant différentes cibles neuronales (Figure 1).

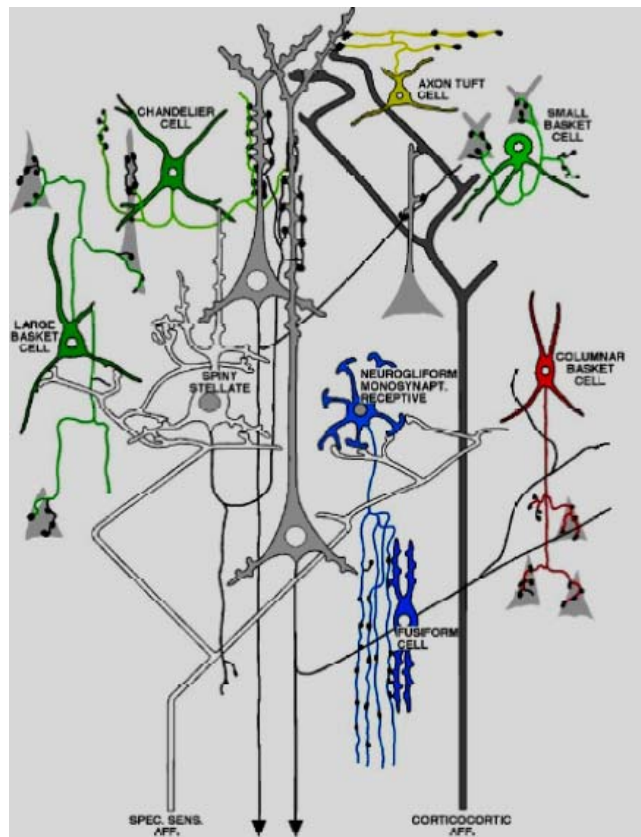


Figure 1. Diversité anatomique des neurones corticaux.  
Schéma résumant les propriétés anatomiques principales des interneurons néocorticaux (modifiée de Z.J. Huang et al.<sup>44</sup>)

### 1.1.3 Rôles des interneurons corticaux

Récemment, des études sur les cellules GABAergiques ont changé notre point de vue concernant leur rôle dans le développement et le traitement cortical. Traditionnellement, la fonction des interneurons GABAergiques avait été décrite comme étant simplement inhibitrice de l'activité dans la circuiterie neuronale corticale. Cependant, nous savons désormais que leur fonction est beaucoup plus complexe. Il a été démontré que les interneurons corticaux

jouent un rôle vital dans la modulation et l'intégration de l'excitabilité neuronale ainsi que dans la génération d'une synchronie temporelle (oscillations) parmi les réseaux de neurones glutamatergiques<sup>45</sup>. De plus, les interneurons GABAergiques régulent presque toutes les étapes clés du développement cortical : c.-à-d. dans la prolifération neuronale<sup>46</sup>, la migration cellulaire et finalement dans le raffinement, dépendant de l'expérience, des circuits corticaux locaux<sup>45, 47</sup>. Considérant les rôles multiples joués par les interneurons GABAergiques dans le développement, le fonctionnement et la plasticité des réseaux corticaux, il est raisonnable de supposer qu'une perturbation dans le développement de ces interneurons, par des facteurs génétiques ou épigénétiques, peut fortement affecter diverses fonctions du cerveau. En effet, un développement aberrant des réseaux GABAergiques serait impliqué dans plusieurs maladies neurodéveloppementales et psychiatriques telles que l'autisme, la schizophrénie, le syndrome de Tourette et l'épilepsie<sup>48-57</sup>. Ainsi, une meilleure compréhension des mécanismes gouvernant le développement des interneurons GABAergiques pourrait révéler des substrats moléculaires et cellulaires spécifiques affectés par ces maladies neurodéveloppementales.

La compréhension des fonctions des interneurons GABAergiques est compliquée par leur hétérogénéité surprenante. En effet, il a été pointé précédemment qu'il existe différents sous-types d'interneurons possédant des morphologies, des propriétés physiologiques, des motifs de connectivité et des constituants biochimiques bien distincts. Une bonne compréhension de ces

paramètres est donc nécessaire dans le but d'identifier, d'une manière non équivoque, les sous-types d'interneurones corticaux. Malgré ce désavantage, plusieurs études nous ont fourni des outils utiles qui permettent de distinguer les groupes majeurs d'interneurones: l'expression des neuropeptides et de protéines chélatrices du calcium, de même que les différents sous-types de contacts synaptiques sur des domaines anatomiques distincts des cellules glutamatergiques. Ainsi, il semble que, pour réellement appréhender le développement et la fonction des circuits GABAergiques, il soit essentiel de tenir compte de toutes les caractéristiques des divers sous-types d'interneurones GABAergiques. Plusieurs laboratoires utilisent des outils moléculaires modernes particuliers pour ces types d'études : en premier lieu, il est possible d'utiliser des promoteurs qui permettent l'expression spécifique de protéines dans des classes définies de cellules GABAergiques<sup>58, 59</sup>. De plus, avec l'aide des protéines fluorescentes, telles que la GFP (protéine fluorescente verte), il est possible de marquer ces interneurones spécifiques avec une haute résolution<sup>58, 59</sup>.

Un autre facteur entravant la compréhension des fonctions des interneurones GABAergiques est le fait que le résultat de leur action change, d'une excitation à une inhibition, au cours du développement. Bien que les rôles des neurotransmetteurs aient été généralement reconnus en fonction des communications neuronales d'un cerveau mature, on sait maintenant que de multiples systèmes de transmetteurs peuvent également influencer divers aspects du développement de la circuiterie neuronale<sup>60</sup>. En effet, la synthèse et

la signalisation de GABA débutent à la mi-gestation, bien avant l'apparition des connexions synaptiques, et sont impliquées dans plusieurs processus du développement neural, incluant la prolifération, la migration et la différenciation cellulaires<sup>46</sup>. Dans les neurones adultes, l'ouverture des canaux des récepteurs GABA<sub>A</sub> permet l'influx du Cl<sup>-</sup> et mène à l'hyperpolarisation du potentiel de membrane. Cette hyperpolarisation est largement due à l'expression du co-transporteur KCC2, qui transporte le K<sup>+</sup> vers l'intérieur et le Cl<sup>-</sup> vers l'extérieur de la cellule, maintenant ainsi un gradient effectif favorisant l'entrée de Cl<sup>-</sup>, lors de l'ouverture des canaux chlorure du récepteur au GABA. Or, l'expression neuronale de KCC2 est faible au début du développement, de sorte que le Cl<sup>-</sup> est plus concentré dans le cytoplasme et que le GABA agit alors comme un neurotransmetteur excitateur, permettant la sortie de Cl<sup>-</sup>, plutôt qu'inhibiteur comme chez l'adulte<sup>61</sup>. À cause de cette inversion du gradient de Cl<sup>-</sup> transmembranaire, les effets du GABA sur la prolifération, la migration et la différenciation cellulaires aux périodes embryonnaire et périnatale sont largement expliqués par son action dépolarisante dans les neurones immatures, déclenchant un influx et une signalisation calciques<sup>61, 62</sup>. Plus tard, cette signalisation GABA régule la maturation des synapses GABAergiques, alors que le GABA a déjà assumé sa fonction inhibitrice dans le cortex<sup>59</sup>. Cependant, les détails des mécanismes de cette action sont encore inconnus. L'ensemble de ces résultats suggère qu'une altération de la synthèse ou de la signalisation GABA, par des causes génétiques ou environnementales, puisse affecter la

quasi-totalité des stades de formation du réseau cortical, menant ainsi au développement d'un cerveau dysfonctionnel.

#### 1.1.4 Développement des circuits corticaux GABAergiques

La formation des circuits GABAergiques est divisée en étapes distinctes de développement: la génération de sous-types d'interneurones GABAergiques, la migration de ces cellules aux régions appropriées du cerveau, la croissance axonale des cellules GABAergiques vers des cibles synaptiques spécifiques et la formation puis l'ajustement du nombre et de la force des synapses GABAergiques. Tandis que les premières étapes sont probablement orchestrées par des programmes génétiques, la maturation des synapses est fortement régulée par l'expérience<sup>58</sup>. Autrement dit, le développement des circuits corticaux, incluant les réseaux d'interneurones GABAergiques, implique un riche éventail de signaux diffusant un nombre de messages considérable lors des mécanismes intrinsèques aux neurones progéniteurs et des mécanismes extrinsèques au cortex, incluant ceux qui requièrent une activité neurale conduite par l'expérience<sup>45</sup>. Les prochains paragraphes vont résumer la migration et le positionnement des cellules GABAergiques et se concentrer davantage sur la formation et la maturation des synapses GABAergiques.

### 1.1.5 De la migration neuronale au ciblage synaptique

La formation des connexions GABAergiques débute par la genèse de divers types d'interneurones distincts. Contrairement aux neurones corticaux dérivés du télencéphale dorsal et migrant radialement dans la zone du manteau cortical, certains interneurones corticaux dérivent du télencéphale ventral (*subpallium*) pour migrer d'abord tangentiellement puis radialement vers le cortex en développement<sup>63, 64</sup>. Les interneurones GABAergiques prennent origine de multiples régions de prolifération du télencéphale subpallial incluant les éminences ganglionnaires latérales, médianes et caudales. Ils proviennent aussi de la région entopédunculaire antérieure et de la région entourant la base du bulbe olfactif<sup>63, 64</sup>.

Une fois générés, les interneurones GABAergiques parcourent de longues distances afin d'atteindre leur destination finale dans le cortex. Des études ont montré que la migration des interneurones GABAergiques immatures, vers le cortex en développement, implique des facteurs chimiorépulsifs et chimioattractifs<sup>45</sup>. Ces indices chimiques sont nécessaires pour empêcher la migration d'interneurones des éminences ganglionnaires vers des structures télencéphaliques autres que le cortex<sup>45</sup>.

Une caractéristique remarquable des circuits d'interneurones GABAergiques est que les axones des différentes classes ciblent des domaines subcellulaires distincts de leurs partenaires post-synaptiques. La localisation subcellulaire des synapses GABAergiques détermine le rôle des sous-types



d'interneurones impliqués dans le traitement des réseaux neuronaux<sup>65-67</sup>. Il semble ainsi qu'un mauvais agencement des synapses GABAergiques pourrait affecter le fonctionnement du cerveau et la plasticité corticale. Aujourd'hui, les mécanismes moléculaires qui contrôlent l'organisation sous-cellulaire des synapses GABAergiques corticales sont complètement inconnus. Des études récentes suggèrent que les indices moléculaires ont un rôle crucial dans ce processus. L'innervation sélective périsomatique ou dendritique distale des cellules glutamatergiques corticales, respectivement par les cellules à paniers exprimant la PV ou des interneurones exprimant la somatostatine se développe normalement et sans intervention dans des cultures organotypiques. Ceci indique que la localisation sélective des synapses implique probablement des indices moléculaires ou des formes d'activité indépendantes des entrées sensorielles<sup>68</sup>. Quoique l'identité de ces indices moléculaires dans le cortex soit inconnue, un progrès significatif a été effectué dans la compréhension d'un phénomène similaire, soit l'innervation du segment initial de l'axone (AIS) des cellules de Purkinje par les interneurones à paniers du cervelet. Les neurones de Purkinje, qui forment la seule sortie du cortex cérébelleux, reçoivent deux séries d'entrées inhibitrices GABAergiques, des interneurones à paniers et des cellules étoilées. Ces dernières et les cellules à paniers innervent respectivement les dendrites et l'AIS des cellules de Purkinje. Les axones des cellules à paniers sont les premiers à entrer en contact avec les corps cellulaires des cellules de Purkinje. Ils se déplacent ensuite directement à l'AIS, sans s'arrêter au soma ou aux dendrites. Lorsqu'ils atteignent l'AIS, les axones des cellules à paniers

forment plusieurs branchements terminaux qui établissent des synapses spécialisées. La direction précise de la croissance axonale des cellules à paniers suggère la présence d'indices d'orientation sur la surface des cellules de Purkinje. Par exemple, des rôles particuliers concernant une protéine du cytosquelette, l'ankirine G, et la neurofascine-186 (NF186) ont été démontrés récemment<sup>69</sup>. Il sera donc important d'explorer les autres indices de guidage, comme les molécules d'adhésion cellulaire, et de déterminer si ces molécules contribuent à l'organisation subcellulaire des synapses GABAergiques le long des neurones glutamatergiques corticaux.

#### 1.1.6 Formation et maturation des synapses GABAergiques

Une caractéristique importante des interneurons GABAergiques est l'exubérance de leur champ d'innervation. Ainsi, une cellule à paniers peut former une arborisation axonale dense qui innerve plusieurs centaines de neurones, chacun avec de multiples synapses couvrant leur corps cellulaire et leurs dendrites proximales<sup>70</sup>. Cette configuration riche en innervation n'est pas achevée avant la fin de l'adolescence, chez les rongeurs et les primates, laissant une fenêtre temporelle prolongée durant laquelle l'expérience peut sculpter l'architecture fine des champs d'innervations GABAergiques<sup>71-75</sup>. Ceci dit, une privation sensorielle durant la période critique, post-natale, retarde significativement la maturation des synapses GABAergiques dans le cortex visuel et somatosensoriel<sup>58, 73</sup>.

Quelles sont les mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans cette maturation dépendante de l'activité et dans la plasticité des synapses inhibitrices? La première molécule à avoir été découverte comme jouant un rôle dans ce processus est le BDNF. Celui-ci favorise la formation de synapses GABAergiques *in vitro* dans des cultures corticales et hippocampiques, ainsi que la maturation de l'innervation périsonomatique dans le cortex visuel<sup>76-79</sup>. Ainsi, comme le BDNF est produit par des cellules glutamatergiques du cortex et aussi par les astrocytes, et que sa signalisation est dépendante de l'activité, il peut potentiellement ajuster le nombre et la force des synapses GABAergiques sur les cellules cibles glutamatergiques<sup>79</sup>.

Récemment, Chattopadhyaya et al.<sup>59</sup> ont démontré que la signalisation GABAergique peut elle-même réguler la maturation des innervations GABAergiques dans le cortex juvénile. Plus spécifiquement, la synthèse du GABA dans ces interneurons régule le nombre de neurones avoisinants qui seront innervés et le nombre de synapses formées sur chacune de ces mêmes cellules<sup>59</sup>. Ces résultats concordent bien avec des données montrant que la signalisation induite par le glutamate régule, pour sa part, plusieurs aspects du développement des synapses glutamatergiques<sup>80-83</sup>. Comme médiateurs clés dans la communication neuronale, les neurotransmetteurs sont particulièrement bien adaptés pour coupler une neurotransmission fonctionnelle avec la morphogenèse et le raffinement synaptiques. D'autre part, une déficience dans cette neurotransmission, au niveau pré- ou post-synaptique, a le potentiel de

perturber fortement la plasticité et la formation des synapses, causant un fonctionnement aberrant des circuits corticaux<sup>45</sup>.

D'autres molécules d'intérêt récemment découvertes forment le complexe d'adhésion neuroligine/neurexine dont diverses études visent à caractériser l'implication dans le développement des synapses excitatrices et inhibitrices<sup>84</sup>. Ces travaux ont généré un grand intérêt vis-à-vis l'implication plausible de ces molécules dans le contrôle de l'équilibre entre les synapses excitatrices et inhibitrices. En revanche, des études *in vitro* seront nécessaires pour clarifier le rôle des neuroligines dans les différents aspects du développement synaptique, incluant la formation initiale des contacts, la reconnaissance de la cible, la stabilisation/maturation des synapses, ainsi que la plasticité synaptique<sup>85</sup>. En définitive, il ne faut pas oublier que la formation et la maturation des synapses comptent sur plusieurs voies d'adhésion parallèles ou chronologiquement distinctes, qui introduisent certainement des niveaux additionnels de complexité.

Récemment, Di Cristo et al.<sup>86</sup> ont démontré que le carbohydrate principal attaché à la molécule d'adhésion cellulaire neurale (NCAM), soit l'acide polysialique (PSA), joue un rôle dans la maturation postnatale et activité-dépendante de l'inhibition GABAergique dans le cortex visuel. Son expression est ainsi diminuée dans le cortex visuel à la suite de l'ouverture des yeux, et ce déclin dépend de l'expérience sensorielle. De plus, une suppression enzymatique artificielle de PSA induit une maturation précoce des innervations périsonotiques GABAergiques dans le cortex, indiquant ainsi que l'expression

de PSA, dépendante de l'activité visuelle, peut réguler le temps de maturation de l'innervation périsomatique GABAergique et le début de la plasticité de la dominance oculaire<sup>86</sup>. Le rôle de PSA dans le développement des circuits locaux dans le néocortex juvénile étant défini, il serait de ce fait intéressant d'étudier le rôle de NCAM dans la maturation des synapses GABAergiques.

## 1.2 NCAM

### 1.2.1 NCAM et ses partenaires structuraux

La migration cellulaire, l'adhésion cellulaire, la croissance des neurites, la fasciculation des axones et la stabilisation des synapses sont chacune des événements cruciaux dans la construction de l'architecture unique du cerveau. Certains de ces phénomènes sont également indispensables aux interactions adéquates entre les cellules et dans la plasticité synaptique associée à l'apprentissage et la mémoire. Une perturbation de l'un ou l'autre de ces processus peut mener à des maladies développementales très sévères chez l'humain. Les molécules d'adhésion cellulaire (CAMs) sont particulièrement importantes dans ces processus. Ce groupe de molécules est divisé en trois familles majeures : les intégrines, les cadhérines et la super-famille des immunoglobulines<sup>87</sup>. Les CAMs, qui sont impliquées d'une façon plus importantes dans le fonctionnement et le développement du cerveau, appartiennent à la super-famille des immunoglobulines, qui sont caractérisées

par au moins un domaine Ig, leur permettant de gérer l'adhésion cellulaire d'une manière indépendante du calcium. La super-famille des Ig se divise en trois sous-groupes, selon le nombre des domaines Ig, des répétitions de séquences de type fibronectine III et du mode d'attachement à la membrane de la cellule. Cet ensemble contient la molécule d'adhésion cellulaire neurale (NCAM), la L1 et la CHL1, un proche homologue de L1<sup>87,88</sup>.

Il y a trente ans, NCAM a été identifiée comme étant une glycoprotéine de surface cellulaire et un médiateur clé de l'adhésion cellulaire dans le système nerveux central<sup>89</sup>. Les premières études ont démontré que NCAM interagissait avec d'autres molécules de type NCAM dans une même cellule (interaction-*cis*) ou dans des membranes de cellules adjacentes (interaction-*trans*)<sup>90</sup>.

Les isoformes de NCAM sont produites par un seul gène qui contient vingt exons majeurs et six petits exons additionnels, chez la souris<sup>91</sup>. L'épissage alternatif donne lieu aux trois isoformes majeures nommées selon leur poids moléculaire apparent : NCAM-180 est une protéine transmembranaire générée par les exons 0-19; NCAM-140 diffère de NCAM-180 seulement au niveau de l'exon 18 et est également une protéine transmembranaire ayant un domaine cytoplasmique considérablement plus court; et NCAM-120 est une protéine ancrée dans la membrane par un lien glycosylphosphatidylinositol (GPI) résultant de la transcription des exons 0-15<sup>91</sup>. Structurellement, NCAM appartient à la super-famille des immunoglobulines (Ig)<sup>92</sup>. Son domaine extracellulaire présente plusieurs motifs identifiables : cinq modules

d'homologues d'Ig (Ig I-V) suivis par deux domaines de séquences fibronectine de type III (Figure 2)<sup>93,94</sup>.

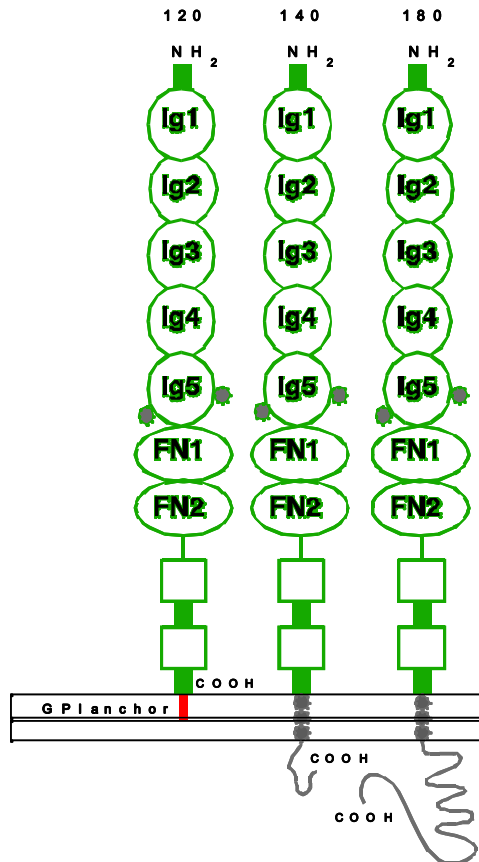


Figure 2. Structure des trois isoformes de NCAM.

Les modèles courants concernant les interactions homophiliques de NCAM viennent d'études structurales et fonctionnelles. L'interaction-*cis* dépend des résidus aromatiques localisés dans le module Ig I, qui sont enfouis dans la poche hydrophobique formée dans le module Ig II. Cependant, l'interaction-*trans* requiert d'abord la formation de dimères *cis* de NCAM. Deux types d'interaction *trans* ont été proposés entre ces dimères: le phénomène de

« flat zipper » amenant les domaines Ig I et II à se lier ensemble et le phénomène de « compact zipper » favorisant une interaction entre les domaines Ig I-III et Ig II-II. NCAM est aussi capable d'interagir avec un grand nombre d'autres molécules de façon hétérophilique<sup>91,94</sup>.

Il a été démontré que NCAM peut se lier avec d'autres membres de la famille d'adhésion cellulaire Ig comme L1 ou TAG-1<sup>92</sup>. De plus, NCAM interagit avec divers composants de la matrice extracellulaire, incluant l'héparine glycosaminoglycane, les protéoglycanes de type chondroïtine sulfate comme les phosphocans ou les neurocans, et les protéoglycanes de type héparine sulfate<sup>95-98</sup>.

Cependant, l'interaction de NCAM avec certains récepteurs de facteurs de croissance est d'une plus grande importance. Des études ont démontré que NCAM peut interagir avec, et activer, les récepteurs des FGF (FGFR)<sup>99</sup>. Aussi, le GDNF peut signaler, via le réticulum endoplasmique (ER), par un complexe récepteur formé de NCAM et GFR $\alpha$ , le récepteur du GDNF<sup>100</sup>.

Le cœur de la protéine NCAM est soumis à plusieurs modifications post-traductionnelles<sup>91</sup>. Cependant, fonctionnellement, la glycosylation est de loin la plus importante. La glycosylation est une modification commune des protéines membranaires et des protéines sécrétées. Les résidus de carbohydrates ont souvent un impact majeur sur le repliement tridimensionnel, la stabilité et la fonction des protéines natives<sup>101</sup>. NCAM subit donc une glycosylation extensive dans l'ER et dans les compartiments du Golgi<sup>102</sup>. Le carbohydrate principal, attaché à NCAM est l'acide polysialique (PSA), qui est un



homopolymère linéaire de  $\alpha 2.8$  lié à l'acide sialique<sup>103, 104</sup>. Les caractéristiques biochimiques de l'acide polysialique dérivent essentiellement du groupe carboxyle de l'acide sialique et incluent une charge négative, couvrant un large espace et soutenant des molécules ioniques et de l'eau<sup>102, 105</sup>. À cause de sa composition, il a été prouvé que PSA atténue les interactions NCAM-NCAM et interfère dans l'adhésion cellulaire<sup>106</sup>. L'expression de PSA sur NCAM est strictement régulée et il existe un pic d'expression au début du développement, suivi par une réduction progressive qui mène au stade adulte, où NCAM ne contient plus de PSA, dans plusieurs régions du cerveau<sup>106</sup>. En revanche, certaines régions du cerveau conservent tout de même un niveau d'expression élevé de PSA. Ces régions, comme l'hypothalamus, l'hippocampe ou le bulbe olfactif sont associées à la plasticité neurale, au remodelage des connexions neuronales ou à la génération de nouvelles cellules neuronales même chez l'adulte<sup>102, 107</sup>.

### 1.2.2 Signalisation intracellulaire de NCAM

Au cours des dernières décennies, plusieurs études ont enrichi nos connaissances sur les fonctions de NCAM, de simple médiateur d'adhésion cellulaire à celles d'une molécule versatile de transduction participant à une large gamme de processus biologiques tels que l'adhésion cellulaire, la plasticité synaptique et la croissance ou le guidage de neurites<sup>89, 108-110</sup>. Étant dépourvue d'activité enzymatique, sa signalisation intracellulaire dépend de sa

capacité à interagir, directement ou indirectement, avec d'autres molécules. Quelques molécules, comme la spectrine, la protéine tyrosine kinase, Fyn, et la kinase d'adhésion focale, FAK, se sont avérées participer à la signalisation de NCAM (Figure 4)<sup>106</sup>.

La spectrine est une protéine d'échafaudage ubiquitaire qui agit en conjugaison avec une variété de protéines adaptatrices de l'organisation des microdomaines de la membrane cellulaire<sup>111</sup>. NCAM interagit ainsi sélectivement avec le domaine NH<sub>2</sub>-terminal de la β1-spectrine pour former un complexe qui comprend aussi la protéine kinase-Cβ<sub>2</sub> (PKCβ<sub>2</sub>) qui se lie à la spectrine par son domaine homologue de la pleckstrine (PH). Cette interaction NCAM-spectrine-PKCβ<sub>2</sub> est requise pour l'effet neuritogénique de NCAM<sup>112</sup>. L'interaction entre NCAM et la spectrine est également importante pour leur propre assemblage, maintien et remodelage, qui sont dépendantes de l'activité des complexes de signalisation post-synaptiques des synapses excitatrices<sup>113</sup>. Plus précisément, des études initiales ont démontré que la spectrine du cerveau co-purifiait avec NCAM-180 en chromatographie par immuno-affinité et interagissait spécifiquement avec celle-ci, mais pas avec les deux autres isoformes<sup>114, 115</sup>. Par contre, des études plus récentes ont démontré que les trois isoformes de NCAM co-immunoprécipitaient avec la β1-spectrine, dans des cellules CHO transfectées individuellement avec NCAM-180, -140 ou -120. Cependant, le domaine intracellulaire de NCAM-140 possède une affinité significativement plus faible pour la β1-spectrine, comparée au domaine intracellulaire de NCAM-180; ce qui explique les résultats trouvés

auparavant<sup>112</sup>. Aussi, la co-précipitation de NCAM-120 avec la spectrine, malgré l'absence d'un domaine intracellulaire, pourrait être la conséquence d'une haute concentration de cette isoforme dans les radeaux lipidiques et de la tendance de la spectrine à interagir avec les radeaux lipidiques acides. Donc, NCAM-120 et la spectrine pourraient co-précipiter à cause de leur association commune aux radeaux plutôt que d'une interaction moléculaire directe. Une autre explication, plus vraisemblable, serait que NCAM-120 co-précipite avec la spectrine, dans un complexe hétérodimérique avec l'une des isoformes transmembranaires de NCAM<sup>116</sup>.

NCAM est aussi connue pour stimuler la voie de signalisation de la protéine kinase activée par les mitogènes (MAPK), grâce à des interactions avec Fyn et FAK<sup>117, 118</sup>. En effet, des interactions NCAM-NCAM induisent une phosphorylation de Fyn et de FAK. Lorsque FAK est phosphorylée, elle peut interagir avec des protéines adaptatrices, comme Grb2, Cas ou Shc, et recruter et activer plusieurs éléments de la voie MAPK, incluant Ras ou Raf<sup>119-122</sup>. Il faut noter que Fyn s'associe constitutivement avec NCAM, tandis que FAK n'interagit pas directement avec NCAM, mais avec le domaine SH2 de Fyn<sup>123</sup>. Il est donc suggéré que Fyn agit comme un « détecteur » des interactions homophiliques de NCAM en recrutant FAK et en initiant la cascade intracellulaire menant à l'activation de la MAPK<sup>124</sup> (Figure 4). En ce qui concerne les isoformes de NCAM, seule NCAM-140 co-précipite avec Fyn, alors que NCAM-180 et -120 ne le font pas<sup>123</sup>. Un candidat possible, qui pourrait occuper le rôle de troisième partenaire de liaison dans le complexe

NCAM-Fyn pouvant activer Fyn, est le récepteur protéine tyrosine phosphatase (RPTP $\alpha$ ). Ce dernier est fortement exprimé dans les neurones et dans les cônes de croissance, et est aussi un activateur bien connu des kinases de la famille Src<sup>125</sup>. Le RPTP $\alpha$  s'associe avec NCAM en se liant au domaine intracellulaire de NCAM-140 et, dans une moindre mesure, de NCAM-180<sup>126</sup>. Cette association lie apparemment NCAM à Fyn parce que Fyn n'est pas co-immunoprécipitée avec NCAM dans les cerveaux déficients en RPTP $\alpha$ <sup>126</sup>. Cette forte association entre RPTP $\alpha$  et NCAM-140 peut expliquer pourquoi seule l'isoforme NCAM-140 s'associe et active Fyn. De plus, l'activation de Fyn par la médiation de NCAM est complètement abolie dans des neurones déficients en RPTP $\alpha$ , et l'extension de neurites modulée par NCAM est inhibée par l'usage d'un inhibiteur de RPTP<sup>126</sup>. Donc, on peut conclure que RPTP $\alpha$  se lie physiquement et fonctionnellement à NCAM et à Fyn (Figure 3)<sup>116</sup>.

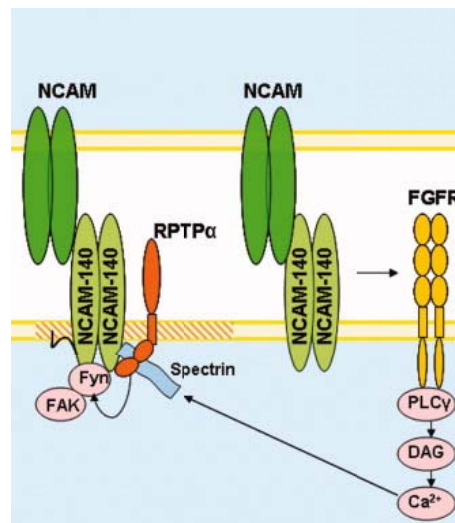


Figure 3. Schéma illustrant les complexes de signalisation de NCAM140. (modifié de Ditlevsen, D.K. et al<sup>116</sup>)

NCAM cause active aussi une cascade de signalisation par des interactions hétérophiliques de son domaine extracellulaire. Une preuve importante de ce phénomène est l'interaction directe de NCAM avec FGFR, qui induit l'autophosphorylation de celui-ci<sup>127</sup>. Il est aussi bien connu qu'une liaison homophile entre NCAM résulte en la dimérisation et l'autophosphorylation de FGFR<sup>127</sup>. La cascade intracellulaire activée par FGFR implique principalement l'activation de la phospholipase C $\gamma$  (PLC $\gamma$ ), qui génère un messager secondaire, l'inositol-1, 4, 5- triphosphate, IP<sub>3</sub>, et le diacylglycérol (DAG). L'IP<sub>3</sub> est connu pour induire la relâche de calcium par des compartiments internes alors que la DAG reste dans la membrane de la cellule où il est clivé par la DAG lipase pour donner naissance à l'acide arachidonique (AA) et au 2-arachidonylglycérol (2-AG) (Figure 4)<sup>106</sup>.

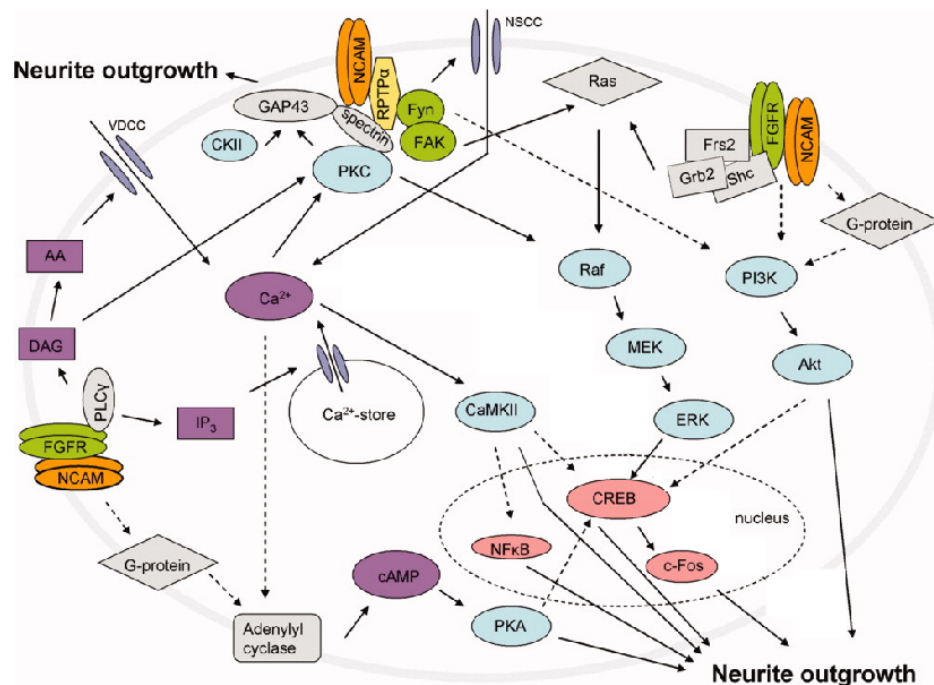


Figure 4. Les différentes voies de signalisation impliquées dans la croissance de neurites modulée par NCAM (modifié de Ditlevsen, D.K. et al.<sup>116</sup>).

NCAM peut aussi agir comme un co-récepteur pour les membres de la famille des GDNF<sup>100</sup>. NCAM se lie ainsi au GDNF et cette interaction est potentialisée par la présence de GFR $\alpha$ . De plus, GFR $\alpha$  forme directement un complexe avec NCAM causant une diminution des interactions homophiliques de NCAM<sup>128</sup>. Ces interactions peuvent être physiologiquement pertinentes, car la migration des cellules de Schwann et la croissance axonale des neurones hippocampiques primaires sont stimulées par le GDNF via NCAM-GFR $\alpha$ . Il faut enfin noter que l'activité GDNF-NCAM-GFR $\alpha$  est transmise à travers la cascade de Fyn-FAK-MAP kinase, indépendamment du FGFR<sup>106</sup>.

### 1.2.3 Déficience en NCAM

Même si NCAM est exprimée tout au long du développement et reste exprimée dans tous les types de cellules neurales, chez l'adulte, les souris déficientes en NCAM ne montrent pas de phénotype sévère. Ces animaux transgéniques avec un knockout total de NCAM présentent seulement des défauts mineurs dans le développement cérébral et le comportement. Une déficience en NCAM réduit ainsi la taille totale du cerveau d'environ 10%, du bulbe olfactif de 30%, et cause une altération dans la cytoarchitecture de l'hippocampe<sup>129-131</sup>. L'ensemble des résultats comportementaux obtenus dans le labyrinthe de Morris montre que les souris NCAM<sup>-/-</sup> sont déficientes dans l'acquisition de l'orientation spatiale précise au début de la période

d'apprentissage, mais que ce déficit peut être subséquemment surmonté par l'entraînement<sup>132</sup>. Cependant, ces souris knockouts ne sont pas déficientes pour la mémoire spatiale à long ou à court terme, comparées aux souris de type sauvage, NCAM<sup>+/+</sup><sup>132</sup>.

Étant donné que ces effets mitigés du knockout de NCAM pourraient s'expliquer par un mécanisme quelconque de compensation, il est nécessaire de faire un knockout de ce gène sélectivement durant certains stades du développement et dans des types cellulaires spécifiques pour pouvoir étudier plus clairement et comprendre le rôle de NCAM dans la formation et la plasticité des synapses. Pour étudier l'importance de NCAM après la naissance, une souris transgénique exprimant la Cre-recombinase (Cre) sous le contrôle du promoteur de l' $\alpha$ CAMKII a été croisée avec une autre dont l'exon 5 du gène NCAM est flanqué de deux sites loxP (souris NCAM<sup>lox/lox</sup>), qui seront reconnus par la Cre<sup>133, 134</sup>. Lorsque l'expression de Cre débute, cette enzyme clive l'exon 5 du gène de NCAM; ce qui termine la traduction et cause ainsi un knockout conditionnel. Il faut noter que  $\alpha$ CAMKII est exprimée uniquement par les neurones pyramidaux après deux semaines de vie, chez la souris. De cette façon, il est possible de tester le rôle spécifique de NCAM durant la phase post-natale du développement<sup>132</sup>. À P9 ou P15 (P pour jours post-natales), la souris knockout conditionnelle ne montre aucune différence comparée à la souche sauvage, car les niveaux d'expression des trois isoformes de NCAM (180, 140 et 120), dans le bulbe olfactif, le cortex cérébral et l'hippocampe, sont

identiques. Par contre, à P22, une réduction significative des isoformes de NCAM a été mesurée dans l'hippocampe<sup>132</sup>.

En comparant cette souris transgénique NCAM<sup>-/-</sup> conditionnelle avec celle de type sauvage, on peut alors étudier la plasticité synaptique, incluant la LTP (potentialisation à long terme) et la LTD (dépression à long terme), qui ont été définies comme des changements durables de la force synaptique<sup>135</sup>.

Ces modifications dans les propriétés synaptiques reflètent une cascade de changements continus passant par des alternations subtiles dans l'efficacité de la transmission synaptique à des réorganisations structurales distinctes des connexions<sup>136, 137</sup>. Des preuves multiples indiquent qu'une grande partie de cette plasticité se produit au niveau des épines dendritiques, sites post-synaptiques des connexions excitatrices<sup>137</sup>. Des événements liés à la plasticité incluent des changements dans la composition des récepteurs aux sites post-synaptiques, des élargissements des surfaces synaptiques ou des épines, la formation de synapses perforées, la bifurcation d'épines et la formation de nouvelles synapses et épines<sup>136, 137</sup>. La LTP est typiquement induite par une stimulation à haute fréquence (HFS) d'une entrée excitatrice menant à un influx rapide de calcium dans les épines dendritiques post-synaptiques, via les récepteurs NMDA. Le maintien de la LTP implique une phase précoce de modifications covalentes et rapides de protéines préexistantes et une phase tardive, associée à une synthèse d'ARNm et de protéines<sup>138-140</sup>.

Ceci dit, plusieurs groupes ont rapporté qu'une altération de NCAM ou de NCAM-PSA pouvait modifier les propriétés de la LTP dans la région CA1



de l'hippocampe, sans affecter la transmission synaptique basale<sup>109, 141-144</sup>. Ces résultats ont été obtenus avec des anticorps dirigés contre la molécule de NCAM<sup>142, 143</sup>, chez des souris transgéniques déficientes de ce gène<sup>109, 141</sup> et à la suite d'un clivage spécifique de PSA de NCAM avec l'enzyme Endo-N<sup>109, 144</sup>. Le déficit de la LTP, observé dans les knockouts de NCAM, a été confirmé chez des souris knockouts conditionnelles, dont le gène de NCAM était supprimé en post-natal, dans les neurones excitateurs, après la terminaison des événements majeurs du développement<sup>109, 132, 141-143</sup>. Ainsi, la déficience en LTP dans CA1, chez les souris NCAM<sup>-/-</sup> n'était pas la conséquence d'anomalies développementales, mais le résultat du dysfonctionnement de la glycoprotéine NCAM dans les synapses matures. Le fait que la suppression de PSA de NCAM par le traitement à l'Endo-N prévienne l'induction de la LTP, suggère que le PSA ou la balance entre PSA-NCAM et NCAM peut représenter un facteur important<sup>106</sup>.

#### 1.2.4 Les fonctions de NCAM dans la formation et la plasticité des synapses

Maintenant, la question critique est de savoir comment et où NCAM/NCAM-PSA affecte la plasticité. La fonction la plus plausible de NCAM/NCAM-PSA dans ce phénomène est liée à la balance dynamique entre la stabilité et la plasticité des connexions synaptiques. Plus spécifiquement, celles-ci dépendent, d'une part, de l'adhésion solide et de la stabilisation des contacts intermembranaires contenant la forme non-polysialylée de NCAM et,

d'autre part, des contacts instables et plastiques promus par la PSA-NCAM<sup>106</sup>. Ce scénario est conséquent avec le profil d'expression développemental de NCAM/NCAM-PSA dans les axones et les synapses. En effet, PSA est exprimé sur les axones et les dendrites, avant la formation de contacts, mais montre une diminution rapide, une fois que les contacts synaptiques sont établis<sup>145</sup>.

Chez les souris de type sauvage, exprimant NCAM et NCAM-PSA, les axones des motoneurones innervent à nouveau et préférentiellement leurs cibles musculaires respectives à la suite de dommages axonaux périphériques<sup>146</sup>. Ce phénotype d'innervation est perturbé chez des souris NCAM<sup>-/-</sup> ou après le clivage enzymatique de PSA<sup>146</sup>. Ce type de régénération requiert une germination axonale et un élagage d'axones mal connectés. Plusieurs exemples montrent que l'expression de NCAM-PSA durant le développement, et même durant la plasticité adulte, peut participer à la régulation de la croissance axonale. Donc, l'élimination de PSA réduit drastiquement la capacité de NCAM à stimuler la croissance axonale, ce qui suggère que PSA est un modulateur plutôt positif de NCAM.

En utilisant des cultures hétérogénotypiques (NCAM<sup>+/+</sup>; NCAM<sup>-/-</sup>) de neurones hippocampiques, des expériences récentes *in vitro* ont indiqué que la NCAM pourrait jouer un rôle crucial dans la formation initiale et la stabilisation des synapses<sup>147</sup>. Dans ce modèle, la formation préférentielle et la stabilisation des synapses ont été observées entre les cellules exprimant NCAM<sup>147</sup>. Aussi, à ce jour, il a été démontré que NCAM joue un rôle important dans la formation et la stabilisation des synapses excitatrices. Ainsi, la présence de NCAM sur les

épines peut être importante pour la formation et le fonctionnement adéquats des synapses<sup>106</sup>.

Des études récentes traitent aussi de mécanismes impliquant NCAM dans la formation des synapses glutamatergiques. En utilisant ce même modèle *in vitro*, il a été démontré que NCAM est recrutée aux contacts axo-dendritiques quelques minutes après le contact initial, lors de la formation des synapses. Ce transport de NCAM aux synapses naissantes apparaît impliquer des organelles du réseau trans-golgien (TGN); une observation qui est conséquente avec les résultats montrant que NCAM joue un rôle dans la mobilisation et le cycle des vésicules synaptiques à la jonction neuromusculaire<sup>148, 149</sup>. L'ancrage des organelles du TGN aux synapses est réduit dans les neurones déficients en NCAM, suggérant que NCAM contribue à cet ancrage des organelles intracellulaires aux synapses naissantes<sup>150</sup>. De plus, NCAM participe à l'échafaudage, principalement composé de spectrines, des densités post-synaptiques (PDS) et elle promeut une accumulation de spectrines dans les PSDs<sup>113, 114, 148</sup>. Cependant, NCAM-180, et non -140, est liée aux spectrines dans les organelles du TGN<sup>148</sup>. La spectrine se lie au C-terminal des sous-unités NR1 et NR2B des récepteurs NMDA, et non aux sous-unités GluR1 et GluR2/3 des récepteurs AMPA<sup>111, 126, 151</sup>. Elle se lie également à des kinases et phosphatases telles que la CAMKII $\alpha$ , un joueur clé de la LTP<sup>111, 126, 151</sup>. L'assemblage de ces composantes aux synapses est affaibli chez les souris NCAM<sup>-/-</sup> et réduit dans les synapses NCAM<sup>+/+</sup> par un fragment de spectrine dominant négatif qui contient le site de liaison à NCAM, ou lorsque

l'expression de  $\beta$ 1-spectrine est réduite en utilisant la technologie ARNsi<sup>113</sup>. Une accumulation réduite de spectrine et de récepteurs de NMDA dans les PSDs NCAM<sup>-/-</sup> résulte en une incapacité à recruter CAMKII $\alpha$  aux synapses d'une manière activité-dépendante, qui est nécessaire pour plus de changements durables au niveau de la force synaptique. En résumé, NCAM joue un rôle central dans le recrutement d'organelles et de composantes moléculaires au niveau des sites des contacts synaptiques et contribue ainsi à la formation et à la consolidation des synapses<sup>106, 113</sup>.

### 1.3 Objectifs de recherche

#### 1.3.1 Contexte :

- Il a été démontré que NCAM joue un rôle important dans la formation et la plasticité des synapses glutamatergiques. Cependant, son rôle dans le développement des synapses GABAergiques est encore inconnu.

#### 1.3.2 Objectif principal :

- Déterminer le rôle fonctionnel de NCAM dans la formation des synapses GABAergiques et, en particulier, dans la formation des synapses périsonmatiques produites par les cellules à paniers du cortex cérébral.

#### 1.3.3 Objectifs spécifiques :

- Tester le rôle spécifique de NCAM et de ses trois isoformes durant trois stades de développement: soit avant et durant la maturation et lors du maintien des synapses GABAergiques périsonmatiques, sans interférer avec d'autres processus développementaux.
- Déterminer séparément le rôle de NCAM dans des cellules pré- ou post-synaptiques des synapses GABAergiques, grâce à l'utilisation de

promoteurs qui confèrent une spécificité d'expression dans des types cellulaires particuliers; plus précisément les cellules à paniers pré-synaptiques ou les cellules glutamatergiques post-synaptiques.

- Initier l'investigation de la participation potentielle et du rôle spécifique d'une voie de signalisation moléculaire de NCAM dans la maturation des synapses GABAergiques.

## Chapitre 2 : Méthodologie

### 2.1 Génération de souris déficientes en NCAM

Les souris NCAM<sup>lox/lox</sup>, dont l'exon 5 du gène de NCAM est flanqué de deux sites loxP, ont été obtenues d'un collaborateur (Dr Schachner). Lorsque la Cre-recombinase est transfectée en culture organotypique, l'exon 5 est excisé, entraînant le knockout de NCAM.

### 2.2 Culture de tranches du cerveau et transfection biolistique

Des souriceaux ont été décapités à P2-5 (jours post-nataux) et leur cerveau a été rapidement prélevé et immergé dans un milieu de culture (DMEM contenant 20% de sérum de cheval, 1 mM glutamine, 13 mM glucose, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 2 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.5 µM/ml insuline, 30 mM HEPES, 5 mM NaHCO<sub>3</sub>, et 0.001% d'acide ascorbique). Des tranches coronales de 400 µm d'épaisseur du cortex visuel ont été coupées avec un hachoir à tissu ("*tissue chopper*", Stoelting, Wood Dale, IL) et déposées sur des membranes transparentes "*Millicell*" (Millipore, Bedford, MA). Généralement, 2 tranches par membrane étaient mises dans des pétris de 30 mm contenant 1 mL de milieu de culture. Ces chambres furent finalement incubées dans un incubateur humidifié à 34°C sous une atmosphère de 5% en CO<sub>2</sub>. Le milieu a été changé trois fois par semaine et toutes les procédures ont été effectuées sous des conditions stériles.

Les constructions de vecteurs géniques ont été transfectées avec le système du canon à gène, "Gene Gun 9" de BioRad.

### 2.3 Clonage

La construction P<sub>G67</sub>-GFP a été générée en sous-clonant la région de 10kb du promoteur du gène *Gad1* par réparation de brèche en aval de la région codante GFP dans pEGFP tel que décrit (Chattopadhyaya et al. 2004). La région codante EGFP a été substituée par un fragment d'ADN contenant GFP-*ires*-Cre pour générer P<sub>G67</sub>-GFP-*ires*-Cre. Les constructions P<sub>G67</sub>-mRFP-NCAM-180 ou -140 ou -120 ou -140 tronquée ont été générées séparément, en clonant les cDNA codant pour NCAM-180 ou -140 ou -120 ou -140 tronquée dans la construction du P<sub>G67</sub>, respectivement.

### 2.4 Immunohistochimie

Une fois les tranches prêtes, elles ont été fixées au paraformaldéhyde 4% durant 2 heures, à la température de la pièce. Après trois lavages dans le PBS, on a appliqué la méthode de congélation/décongélation avec 30% de sucrose dans du PBS, pour augmenter la pénétration des anticorps et la sensibilité de l'immunomarquage dans les tissus du cerveau. Les tranches de cerveaux ont ensuite été bloquées dans du sérum normal de chèvre à 10% (NGS) contenant 1% de Triton X100. Puis, elles ont été incubées toute la nuit à



4°C dans du 10% NGS, 0.1% Triton et l'anticorps primaire anti-NeuN pan-neuronal (monoclonal, 1:400, Chemicon). Des anticorps secondaires chèvre-anti-souris-Alexa555 (1:400, Invitrogen) ou -Alexa 633 (1:400, Invitrogen) ont été utilisés, en présence de 10% NGS et 0.1% Triton. Après une incubation de 2 heures à la température de la pièce, les tranches ont été lavées avec du PBS et étalées sur des lames (5-6 tranches/lame). Les lames ont finalement été couvertes de lamelles en utilisant le milieu de montage "*Vectashield*" (Vector).

## 2.5 Acquisition et analyse des images

Nous avons utilisé des tranches de cortex visuel en provenance d'au moins trois animaux pour chaque groupe d'âge et pour chaque condition expérimentale. Des images confocales non-chevauchantes de l'arborisation axonale des cellules à paniers et des épines dendritiques des cellules pyramidales ont été prises avec un microscope confocal (LEICA TCS SPE-DM500Q) équipé d'un objectif à huile de 63x (LEICA NA 1.3), à zoom 2. On a acquis les piles-Z avec des paliers de 1  $\mu\text{m}$  (Scale factor: 0.085315  $\mu\text{m}/\text{pixel}$ ). Les images ont toutes 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 cellules à paniers et les épines dendritiques des cellules pyramidales ont été tracés en trois dimensions.

Les paramètres suivants ont été analysés pour les cellules à paniers : la densité de synapses périsonmatiques, le nombre d'intersections entre les axones et les sphères de Sholl et le pourcentage de somas pyramidaux innervés par des axones de cellules à paniers. Pour les neurones pyramidaux, on a mesuré les densités d'épines basales et apicales, et la longueur de ces épines.

Pour la densité synaptique et le nombre d'intersections autour des somas pyramidaux, une analyse morphométrique tri-dimensionnelle de Sholl a été effectuée. Il s'agit de l'application d'une multitude de sphères virtuelles concentriques possédant des diamètres croissants à intervalle régulier d'un micron l'une de l'autre. La première sphère de la série était toujours placée au centre du corps cellulaire de la cellule pyramidale à l'étude. On a choisi de limiter ce Sholl à un rayon de 9  $\mu\text{m}$ , car le diamètre moyen de ces somas était de 18  $\mu\text{m}$ . Entre 10 et 15 somas innervés pour chaque cellule à paniers et entre 5 et 10 cellules à paniers ont été analysés pour chacune des expériences.

Pour l'analyse des cellules pyramidales, on a divisé chaque cellule en quatre images pour acquérir les piles-Z, et on a ensuite superposé ces images dans un montage tri-dimensionnel unique pour ensuite tracer le tout dans cette image intégrée. Pour les densités d'épines dendritiques basales et apicales, et pour la longueur des épines, le logiciel *NeuroLucida Explorer* a calculé toutes ces données après que les neurones aient été tracés. Entre 5 et 10 neurones pyramidaux ont été analysés pour chacune de ces expériences. Il faut noter que tous les traçages ont été faits à double insu, l'observateur n'étant pas au courant des conditions relatives aux coupes analysées.

## 2.6 Analyses statistiques

Les différences entre plusieurs groupes ont été évaluées avec le test d'ANOVA unidirectionnelle, suivi du test *post hoc* de Holm-Sidak. Pour les données non-normalisées, le test de Dunn a été utilisé. Pour évaluer la différence entre deux groupes normalisés, le test "t" de Student a été utilisé, et le test Mann-Whitney pour les données non-normalisées. Lorsque  $p < 0.001$ , on a considéré qu'il y avait une différence significative entre des groupes de données et le groupe témoin.

## Chapitre 3 : Résultats

### 3.1 NCAM est nécessaire à la maturation des synapses GABAergiques périsomatiques mais non à leur maintien

Les caractéristiques de base de l'innervation périsomatique des neurones pyramidaux par des interneurons à paniers matures en culture organotypique du cortex visuel ont été récemment décrites<sup>58</sup>. De telles cultures organotypiques corticales développent un niveau considérable d'activité synaptique spontanée lors d'un état d'excitation et d'inhibition bien équilibré<sup>58</sup>.

Pour examiner le rôle de NCAM dans le développement des synapses GABAergiques du cortex visuel, nous avons utilisé des souris transgéniques (NCAM<sup>lox/lox</sup>) permettant un *knock-down* de la synthèse de NCAM par excision de l'exon 5 par la Cre-recombinase. Pour réduire la synthèse de NCAM dans les cellules à paniers et les marquer simultanément, nous avons utilisé un promoteur caractérisé précédemment comme permettant l'expression de la Cre-recombinase et d'EGFP (P<sub>G67</sub>-GFP-*ires*-Cre) sélectivement dans des interneurons à paniers exprimant la parvalbumine. La transfection de cette construction dans des cultures organotypiques du cortex visuel de souris NCAM<sup>lox/lox</sup> a ainsi permis d'éliminer ce gène uniquement dans ces cellules<sup>58</sup> (Figure 5).

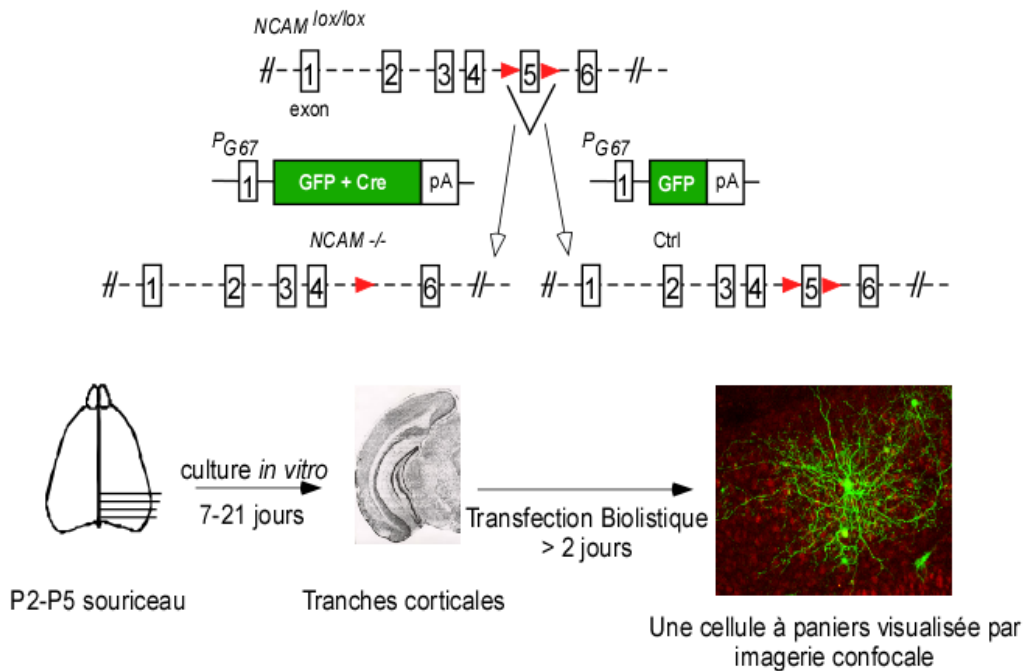


Figure 5. *Knock-down* de NCAM dans les interneurones à paniers. L'exon 5 du gène de NCAM est flanqué de deux sites loxP pour créer NCAM<sup>lox/lox</sup>. Les cultures organotypiques corticales sont transfectées avec P<sub>G67</sub>-GFP-Cre pour générer NCAM<sup>-/-</sup> et pour visualiser les cellules à paniers transfectées, ou sont transfectées seulement avec P<sub>G67</sub>-GFP pour obtenir des cellules à paniers témoins.

En culture organotypique, les interneurones à paniers témoins ont d'abord développé des axones assez simples et clairsemés, puis une arborisation très élaborée, au cours des quatre semaines suivantes. Ainsi, à EP18, les axones des cellules à paniers étaient simples et formaient très peu de branchements terminaux et de synapses autour des somas des cellules pyramidales. À EP24, les axones étaient plus complexes, formant de multiples branchements terminaux et des synapses périsonatiques agrégées<sup>58</sup>.

Des résultats antérieurs avaient démontré que la vaste majorité des boutons marqués par la GFP avec la construction P<sub>G67</sub>-GFP représentaient fort probablement des terminaisons présynaptiques. En premier lieu, 96% des

boutons GFP-positifs contenaient le marqueur synaptique GABAergique, soit la décarboxylase de l'acide glutamique, GAD65. Cette dernière est fortement concentrée dans les terminaisons présynaptiques matures, où elle est physiquement associée au transporteur vésiculaire du GABA<sup>58</sup>. Deuxièmement, il avait aussi été démontré que lorsqu'on co-transfectait des cellules à paniers avec les constructions P<sub>G67</sub>-tdtomato et P<sub>G67</sub>-synaptophysin-GFP (syn-GFP), pour visualiser simultanément la morphologie des axones avec leurs boutons et un marqueur synaptique, 95.3% des boutons marqués par le *tdtomato* contenaient la syn-GFP à EP18 et 98.5 à EP24<sup>59</sup>. Finalement, l'examen en immuno-EM de l'ultrastructure des boutons marqués à la GFP à EP24, a montré des boutons ayant des traits typiques de terminaisons présynaptiques inhibitrices établissant des contacts symétriques avec des cibles postsynaptiques. Ces contacts présentaient clairement une fente synaptique, une agrégation de vésicules présynaptiques, des mitochondries et un épaississement de la membrane post-synaptique<sup>59</sup>. Toutes ces études démontrent donc que les boutons GFP-positifs sont des terminaisons présynaptiques de synapses symétriques<sup>58, 59</sup>.

Notre objectif était de déterminer le rôle de NCAM dans la maturation des synapses GABAergiques périsonmatiques. On a concentré notre étude sur trois stades de développement. Premièrement, lorsque les cultures avaient été transfectées au début de la phase de maturation des synapses GABAergiques, soit entre EP12-18, avec P<sub>G67</sub>-GFP-Cre pour inactiver NCAM et comparer avec les cultures témoins transfectées avec P<sub>G67</sub>-GFP, on n'a pas observé de

différences significatives dans la densité des synapses périsonomatiques, le branchement terminal ou le pourcentage d'innervation de somas pyramidaux (Figure 6E et 6F; test "t",  $p > 0.05$ ).

Après transfection de Cre à EP16-24, on a noté que les axones des cellules à paniers NCAM<sup>-/-</sup> étaient beaucoup plus droits, avec une réduction significative des branchements terminaux et un nombre réduit de synapses périsonomatiques (Figure 6B1-2). Ainsi, en interférant avec l'expression de NCAM pendant la phase de maturation, nous avons pu influencer significativement le développement de ces paramètres (Figure 6E, 6F et 6G; boutons/soma  $\pm$  SEM,  $9.1 \pm 0.6$  pour les cellules témoins c.  $5.4 \pm 0.3$  pour les cellules NCAM<sup>-/-</sup>; test "t",  $p < 0.001$ ; innervation  $\pm$  SEM =  $74 \pm 2\%$  avec les cellules témoins c.  $50 \pm 1\%$  pour NCAM<sup>-/-</sup>; test "t",  $p < 0.001$ ).

Finalement, le knockout de NCAM à EP26-32 n'a montré aucune différence avec les témoins, indiquant que NCAM n'est pas essentielle au maintien des arborisations axonales et de l'innervation périsonomatique (Figure 6E, 6F et 6G; test "t",  $p > 0.05$ ).

Il apparaît donc que NCAM joue un rôle important, spécifiquement durant la phase de maturation des synapses GABAergiques périsonomatiques.

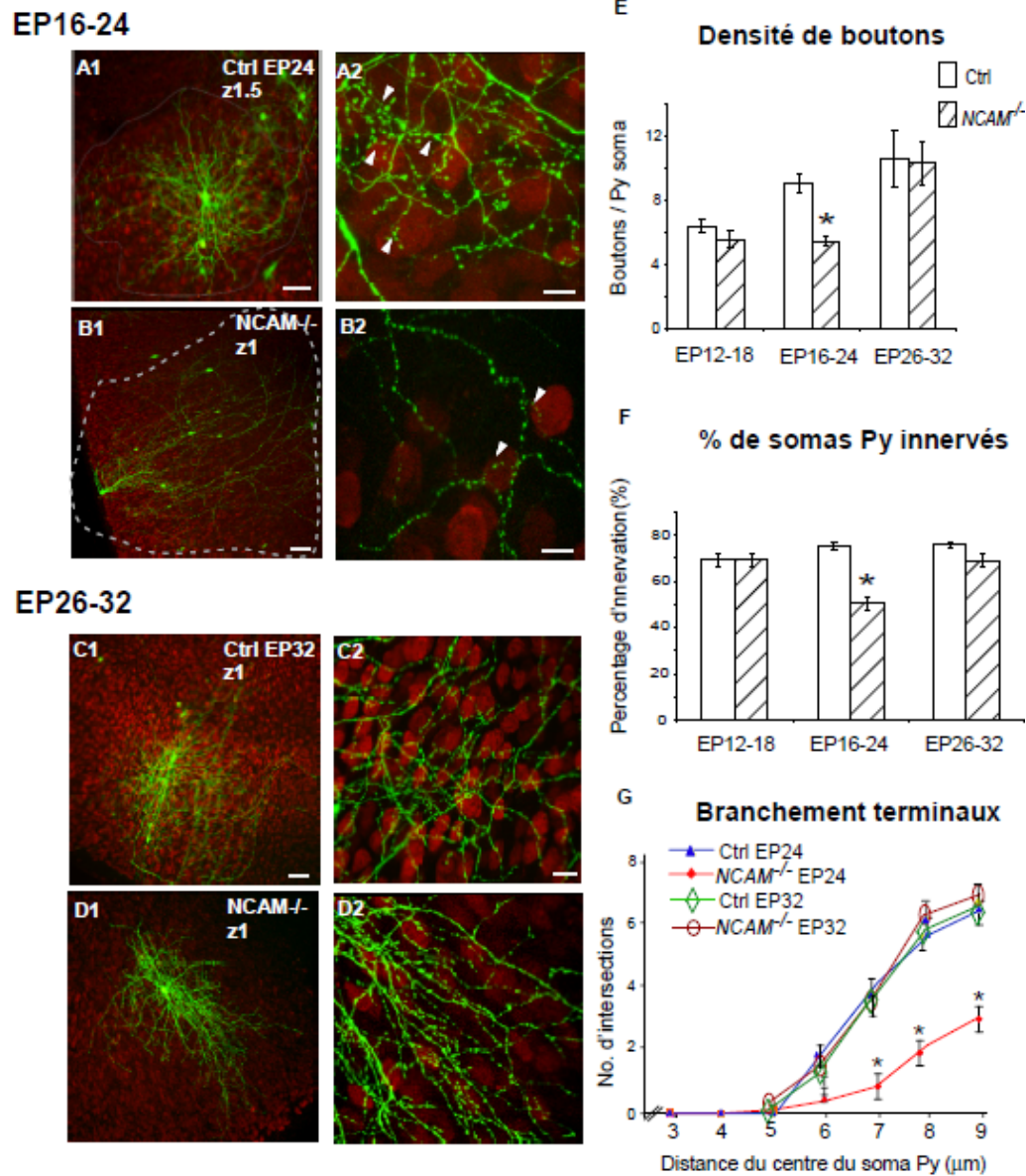


Figure 6. NCAM est nécessaire à la maturation des synapses périssomatiques et non pour leur formation ni leur maintien.

(A1) Les cellules à paniers (vertes) témoins à EP24, ont un champ d'innervation exubérant caractérisé par des branchements extensifs, des boutons denses le long des axones et des branchements terminaux (A2) avec des boutons éminents et en agrégats (flèches) autour des somas des cellules pyramidales (immunomarquage NeuN, rouge). Échelle 50  $\mu\text{m}$  pour A1 et 10  $\mu\text{m}$  pour A2.

(B) Après transfection à EP24, les cellules à paniers NCAM<sup>-/-</sup> montrent un élargissement du champ axonal (B1), une réduction du branchement axonal, du branchement terminal et de la densité des boutons périssomatiques (B2). Échelle 50  $\mu\text{m}$  pour B1 et 10  $\mu\text{m}$  pour B2.



(C-D) Le knockout de NCAM à EP26-32 (D), ne produit aucune différence au niveau du motif de branchement et des innervations périsomatiques en comparaison des cellules témoins (C). Échelle, 50  $\mu\text{m}$  pour C1/D2 et 10  $\mu\text{m}$  pour C2/D2.

(E) Densité de boutons périsomatiques après un knockout conditionnel de NCAM à l'un ou l'autre des trois stades développementaux (EP12-18, EP16-24 et EP26-32).

(F) Innervation des somas pyramidaux après un knockout conditionnel de NCAM à l'un ou l'autre des trois stades développementaux.

(G) Branchements terminaux après un knockout conditionnel de NCAM à l'un ou l'autre des trois stades développementaux.

(E-G) : EP12-18 : 90 somas pyramidaux innervés par 6 cellules à paniers comme témoins; 135 somas pyramidaux innervés par 9 cellules à paniers pour NCAM<sup>-/-</sup>.

EP16-24 : 150 somas pyramidaux innervés par 10 cellules à paniers comme témoins; 225 somas pyramidaux innervés par 15 cellules à paniers pour NCAM<sup>-/-</sup>. EP26-32 : 30 somas pyramidaux innervés par 2 cellules à paniers comme témoins; 75 somas pyramidaux innervés par 5 cellules à paniers pour NCAM<sup>-/-</sup>.

### 3.2 Un knockout de NCAM entre les 3<sup>ème</sup> et 4<sup>ème</sup> semaines post-natales n'affecte pas la densité des épines dendritiques

Il avait été démontré que, lorsque PSA est enlevé de NCAM à l'aide de l'enzyme Endo-N, le taux de formation des épines dendritiques est réduit, de même que la stabilité de ces épines<sup>152</sup>. Au niveau présynaptique, les résultats d'autres études suggéraient d'autre part qu'un dysfonctionnement de NCAM menait à une réduction de la stabilité des contacts synaptiques aux jonctions neuromusculaires<sup>152</sup>.

Nous voulions alors investiguer la possibilité qu'un knockout de NCAM affecte la densité des synapses glutamatergiques durant les stades de développement considérés. De ce fait, nous avons pris avantage du fait que la transfection du P<sub>G67</sub>-GFP/P<sub>G67</sub>-GFP-Cre n'était efficace qu'à 90%, et qu'on observait aussi, occasionnellement, un marquage de neurones non-

GABAergiques, incluant des neurones excitateurs pyramidaux qui étaient transfectés et marqués par la protéine fluorescente verte (GFP).

Pour étudier l'effet de NCAM sur ces neurones excitateurs, nous avons encore une fois pris en compte les trois stades de développement EP12-18, EP16-24 et EP26-32, pour analyser les paramètres suivants : la densité des épines dendritiques basales et apicales et la longueur de ces épines. Les résultats n'ont pas montré d'effet significatif du knockout de NCAM sur ces paramètres, comparativement aux témoins, à aucun des trois stades de développement considérés (Figure 7B et 7C1-2; pour EP12-18 : test Mann-Whitney,  $p > 0.05$ ; EP16-24: test "t",  $p > 0.05$ ; EP26-32 : test Mann-Whitney,  $p > 0.05$ ).

Ces données cumulées suggèrent que NCAM joue un rôle sélectif dans la maturation des synapses périsonmatiques GABAergiques pendant la 3<sup>ème</sup> semaine post-natale.

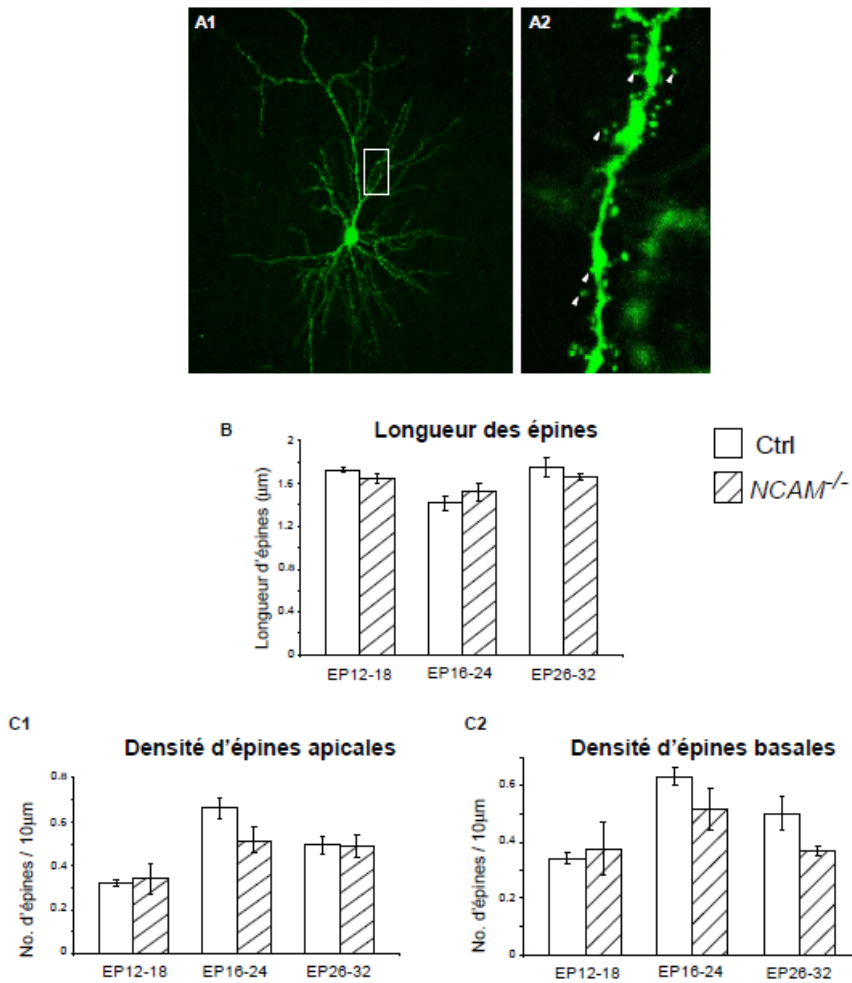


Figure 7. Le rôle de NCAM est spécifique aux interneurons GABAergiques et n'influence pas les neurones excitateurs aux stades de développement étudiés (EP12-18, EP16-24 et EP26-32).

(A1) Image confocale d'une cellule pyramidale (verte) témoin, à EP24, transfectée avec la GFP. (A2) Magnification de la boîte observée en A1. Les flèches indiquent des épines dendritiques.

(B) Longueur des épines dendritiques des neurones pyramidaux après un knockout conditionnel de NCAM à l'un ou l'autre des trois stades de développement (EP12-18, EP16-24 et EP26-32).

(C) Densité des épines dendritiques apicales (C1) et basales (C2) des neurones pyramidaux après un knockout conditionnel de NCAM à l'un ou l'autre des trois stades de développement.

(B-C) : EP12-18 : 6 neurones pyramidaux innervés comme témoins; 6 neurones pyramidaux innervés pour NCAM<sup>-/-</sup>.

EP16-24 : 4 neurones pyramidaux innervés comme témoins; 4 neurones pyramidaux innervés pour NCAM<sup>-/-</sup>.

EP26-32 : 3 neurones pyramidaux innervés comme témoins; 3 neurones pyramidaux innervés pour NCAM<sup>-/-</sup>.

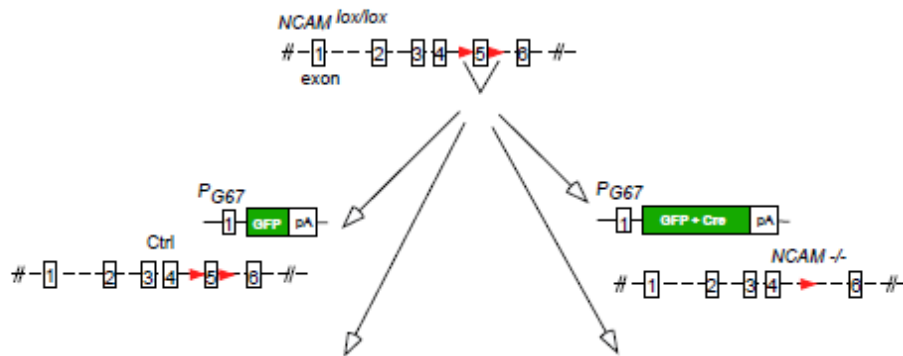
### 3.3 Les isoformes NCAM120 et 140 peuvent compenser le KO de NCAM dans la maturation des synapses GABAergiques périsonmatiques, mais pas la NCAM180

Chez les mammifères, NCAM existe sous trois isoformes résultant de l'épissage alternatif d'un seul gène contenant 26 exons. Ces trois isoformes majeures, soient NCAM-180, 140 et 120, sont reconnues selon leur poids moléculaire<sup>116</sup>.

Ayant déterminé que NCAM est essentielle à la maturation des synapses GABAergiques périsonmatiques, nous avons voulu étudier plus spécifiquement le rôle de chacune de ces trois isoformes. Pour ces expériences, nous avons utilisé les mêmes souris transgéniques (NCAM<sup>lox/lox</sup>) pour éliminer NCAM avec P<sub>G67</sub>-GFP-*ires*-Cre (Figure 8A). Simultanément, nous avons réintroduit chacune des isoformes de NCAM (P<sub>G67</sub>-mRFP-NCAM180 ou 140 ou 120), séparément, pour déterminer si elles pouvaient compenser la perte du gène dans la maturation GABAergique au stade EP16-24, pendant lequel nous avons démontré que NCAM était essentielle. Les isoformes de NCAM étaient fusionnées avec la protéine fluorescente rouge (mRFP) pour permettre la visualisation des cellules transfectées. Ces constructions ont été obtenues du laboratoire de la Dre Lynn Landmesser, qui avait démontré que cette protéine de fusion se comportait comme la forme sauvage de chacune des isoformes NCAM<sup>153</sup>. Lorsque cette construction a été transfectée avec P<sub>G67</sub>-GFP-*ires*-Cre, nous avons observé le signal rouge (mRFP) dans les somas, les dendrites et les

axones des cellules à paniers. Sur la base de la fluorescence mRFP, nous avons conclu que les niveaux d'expression des trois isoformes de NCAM étaient similaires (Figure 8B).

A



B

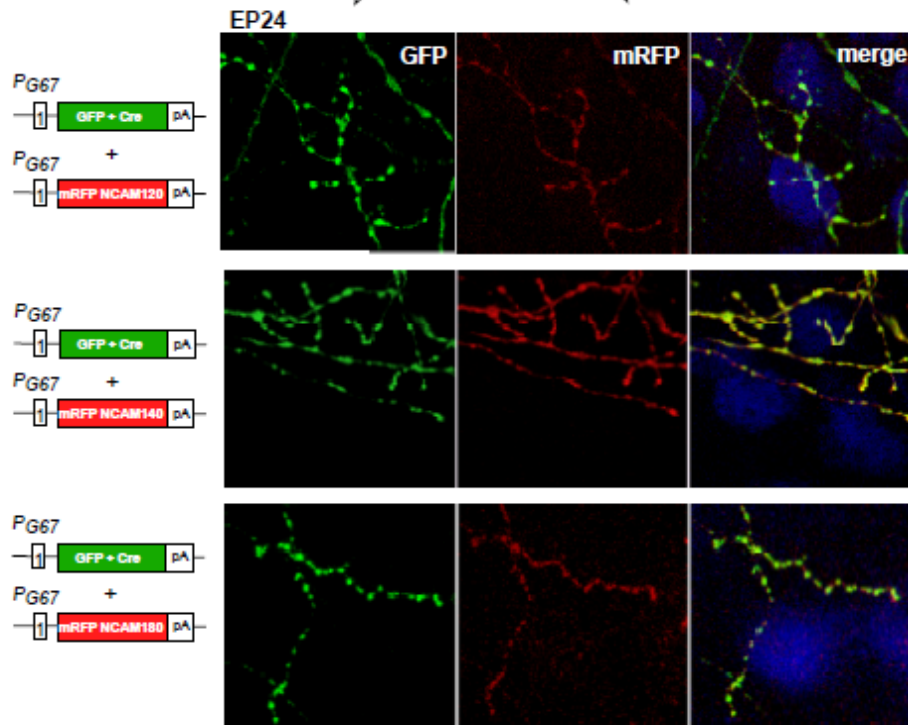


Figure 8. Transfection biolistique des isoformes de NCAM.

(A) *Knock-down* ( $P_{G67}$ -GFP-Cre) de cellules uniques de NCAM chez des interneurones à paniers et réintroduction simultanée spécifique de l'une ou l'autre des isoformes NCAM ( $P_{G67}$ -mRFP-NCAM-180 ou 140 ou 120).

(B) À EP16-24, une co-localisation des deux constructions contenant la GFP (verte, knock-down NCAM ou témoins) et la RFP (rouge, isoformes NCAM) est démontrée par la couleur jaune résultante ("merge") dans les cellules à paniers transfectées.

Nous avons ensuite déterminé quelles isoformes étaient capables de compenser le phénotype causé par le *knockdown* de NCAM, entre EP16-24. Des cellules à paniers NCAM<sup>-/-</sup> exprimant la NCAM180 montraient une réduction de la densité des boutons périssomatiques, du branchement terminal et de l'innervation des somas pyramidaux similaire aux cellules NCAM<sup>-/-</sup> (Figure 9C, 9D, 9E et 9F; boutons/soma  $\pm$  SEM,  $5.4 \pm 0.3$  pour les cellules NCAM<sup>-/-</sup> c.  $5.3 \pm 0.2$  pour NCAM180, ANOVA unidirectionnelle, test *post hoc* de Holm-Sidak;  $p > 0.05$ ; innervation  $\pm$  SEM,  $50 \pm 1\%$  cellules NCAM<sup>-/-</sup> c.  $39 \pm 3\%$  pour NCAM180, ANOVA unidirectionnelle, test *post hoc* de Holm-Sidak;  $p > 0.05$ ). Ces résultats montrent que la NCAM180 ne permet pas la maturation des synapses GABAergiques périssomatiques. Toutefois, les deux autres isoformes, NCAM120 et NCAM140, ont permis de compenser au moins en partie l'absence du gène (Figure 9A, 9B, 9D, 9E et 9F; boutons/soma  $\pm$  SEM,  $9.1 \pm 0.6$  pour les cellules témoins c.  $8.7 \pm 0.7$  pour NCAM120 et  $7.6 \pm 0.8$  pour NCAM140, ANOVA unidirectionnelle, test *post hoc* de Holm-Sidak;  $p < 0.001$ ; innervation  $\pm$  SEM,  $74 \pm 2\%$  cellules témoins c.  $71 \pm 2\%$  pour NCAM120 et  $59 \pm 7\%$  pour NCAM140, ANOVA unidirectionnelle, test *post hoc* de Holm-Sidak;  $p < 0.001$ ). La récupération de l'innervation des somas pyramidaux par NCAM140 dans les cellules à paniers était plus faible que celle des cellules NCAM<sup>+/+</sup>, mais la différence entre ces deux groupes n'a pas atteint la

signification statistique (test "t",  $p > 0.05$ ). Nous concluons que les deux isoformes de 120 et 140 kd permettent de récupérer la densité synaptique, le branchement terminal et l'innervation des somas pyramidaux à la suite d'un knockout de NCAM, mais pas l'isoforme NCAM180.

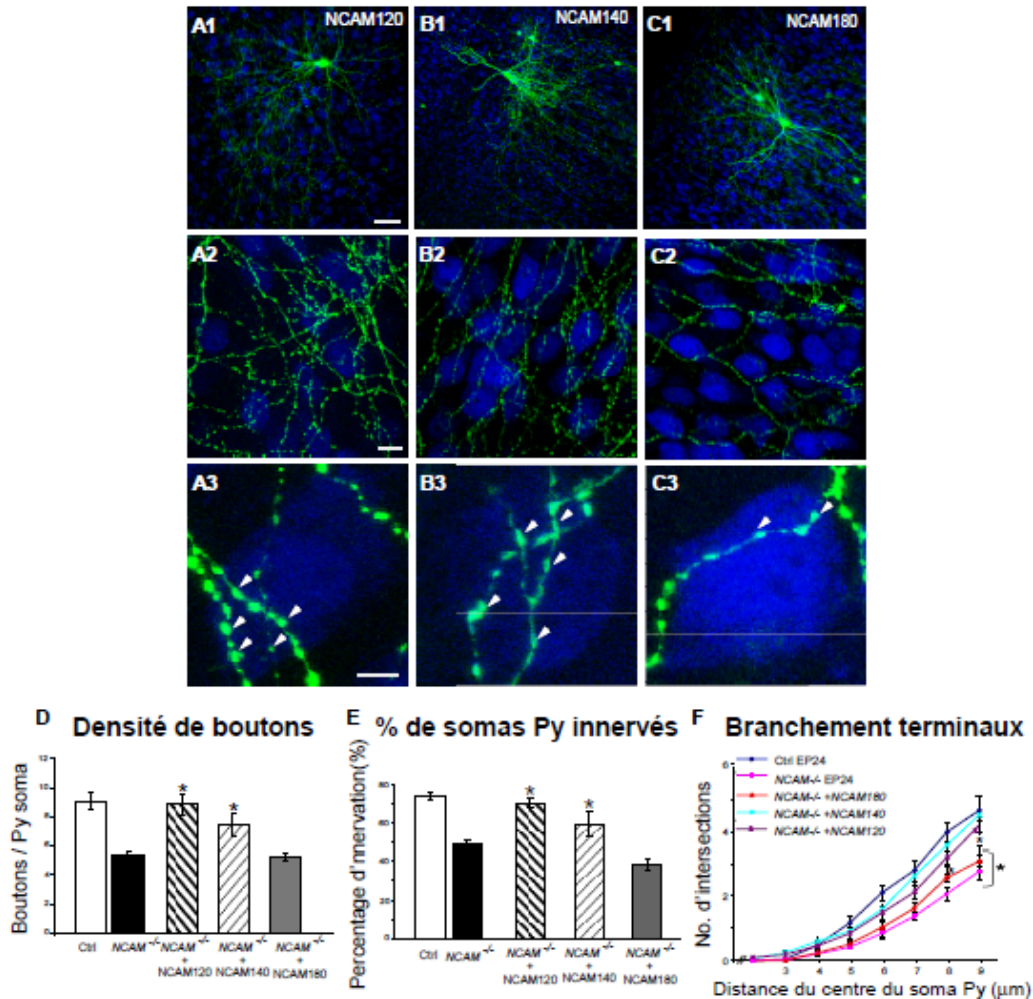


Figure 9. Les isoformes NCAM120 et 140 compensent la perte de NCAM dans la maturation des synapses périssomatiques GABAergiques, mais pas NCAM180.

(A-B) Les cellules à paniers (vertes) NCAM<sup>-/-</sup> qui expriment les NCAM120 (A) ou 140 (B) ont un champ d'innervation exubérant caractérisé par des branchements extensifs, des boutons denses le long des axones (A2-B2) et des branchements terminaux (A3-B3) avec des boutons éminents et en agrégats (flèches) autour des somas des cellules pyramidales (bleues). Ces paramètres sont identiques aux cellules à paniers NCAM<sup>+/+</sup>. Échelle 50 μm pour A1/B1, 10 μm pour A2/B2 et 5 μm pour A3/B3.

(C) Des cellules à paniers NCAM<sup>-/-</sup> exprimant NCAM180 montrent un élargissement du champ axonal (C1), une réduction du branchement axonal (C2), du branchement terminal et de la densité des boutons périsonomatiques (flèches) (C3). Ces paramètres sont similaires à ceux des cellules à paniers NCAM<sup>-/-</sup>. Échelle 50 µm pour C1, 10 µm pour C2 et 5 µm pour C3.

(D) Densité de boutons périsonomatiques après transfection de l'une ou l'autre des isoformes de NCAM à EP16-24.

(E) Innervation des somas pyramidaux après transfection de l'une ou l'autre des isoformes de NCAM à EP16-24.

(F) Branchements terminaux après transfection de l'une ou l'autre des isoformes de NCAM à EP16-24.

(D-F) : EP16-24 : 150 somas pyramidaux innervés par 10 cellules à paniers comme témoins; 225 somas pyramidaux innervés par 15 cellules à paniers pour NCAM<sup>-/-</sup>, 105 somas pyramidaux innervés par 7 cellules à paniers pour NCAM180; 135 somas pyramidaux innervés par 9 cellules à paniers pour NCAM140; 105 somas pyramidaux innervés par 7 cellules à paniers pour NCAM120.

Enfin, nous n'avons obtenu aucune différence significative au niveau de la densité des épines dendritiques basales ou apicales ou de la longueur des épines entre les neurones pyramidaux transfectés avec l'une ou l'autre des isoformes de NCAM (Figure 10A, 10B et 10C; ANOVA unidirectionnelle, test *post hoc* de Holm-Sidak;  $p > 0.05$ ). En conséquence, comme nos résultats précédents le suggéraient, NCAM joue un rôle important spécifiquement durant la phase de maturation (EP16-24) des neurones GABAergiques.



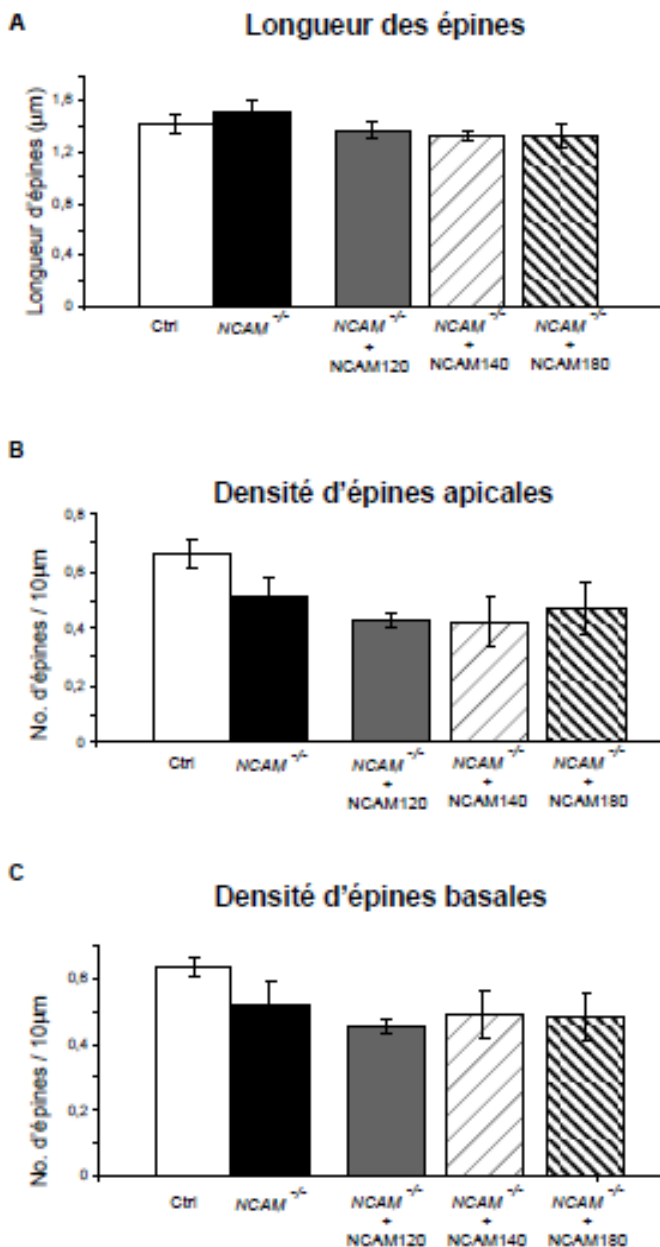


Figure 10. Le rôle des trois isoformes NCAM est spécifique aux interneurons GABAergiques et n'affecte pas les neurones excitateurs à EP16-24.

(A) La longueur des épines dendritiques des neurones pyramidaux après transfection de l'une ou l'autre des isoformes de NCAM à EP16-24.

(B-C) La densité des épines dendritiques apicales (B) et basales (C) des neurones pyramidaux après transfection de l'une ou l'autre des isoformes de NCAM à EP16-24.

(A-C): EP16-24: 4 neurones pyramidaux innervés comme témoins; 4 neurones pyramidaux innervés pour NCAM<sup>-/-</sup>; 4 neurones pyramidaux innervés pour NCAM180; 5 neurones pyramidaux innervés pour NCAM140; 5 neurones pyramidaux innervés pour NCAM120.

### 3.4 Le domaine intracellulaire conservé KENESKA de NCAM140 est nécessaire à la maturation des synapses GABAergiques

Nous avons aussi vérifié si la forme tronquée de NCAM140, dont le domaine conservé KENESKA est excisé, peut encore compenser l'effet du knockout de la NCAM. La séquence carboxy-terminale de NCAM (ATQTKENESKA) est conservée parmi diverses espèces (humain, souris, rat, xenopus et cynphy) et sa portion la plus C-terminale, KENESKA, ressemble à un domaine de liaison PDZ (postsynaptic density-95/disc large/zona occludens-1) de classe I. Les domaines PDZ sont trouvés dans de multiples molécules d'échafaudage ou adaptatrices comme PSD-95 et Disc-large (Dg), où ils favorisent l'agrégation et la localisation de protéines en interactions à des sites de contacts spécifiques<sup>154</sup>. De plus, il a été démontré que les fonctions et les interactions du domaine PDZ sont régulées par la phosphorylation des résidus sérine/thréonine au sein de cette séquence<sup>154, 155</sup>. Ce haut degré de conservation des domaines PDZ indique aussi son importance dans le rôle de NCAM. De plus, des études suggèrent que des interactions entre ce domaine de NCAM et d'autres molécules dans les terminaisons présynaptiques peuvent servir à ancrer d'autres molécules à des sites spécifiques, permettant un ciblage approprié de la relâche de transmetteur au niveau de zones actives précises et en facilitant la livraison des vésicules synaptiques à ces zones<sup>156, 157</sup>.

De manière surprenante, la réintroduction d'une telle NCAM140 tronquée de cette séquence KENESKA à la suite à d'un knockout de NCAM

n'a pas permis de récupérer le phénotype de synapses GABAergiques. On a ainsi observé une réduction de la densité des synapses périsomatiques, du branchement terminal et de l'innervation des somas pyramidaux similaire à celle observée pour le mêmes paramètres après le knockout de NCAM à EP16-24 (Figure 11B, 11C, 11D et 11E; boutons/soma  $\pm$  SEM,  $5.4 \pm 0.3$  pour les cellules NCAM<sup>-/-</sup> c.  $5.5 \pm 0.4$  pour la NCAM140 tronquée; innervation  $\pm$  SEM,  $50 \pm 1\%$  cellules NCAM<sup>-/-</sup> c.  $40 \pm 2\%$  pour la NCAM140 tronquée, ANOVA unidirectionnelle, test *post hoc* de Holm-Sidak;  $p < 0.001$ ). Nos résultats indiquent que ces paramètres n'ont pas été récupérés et que le domaine intracellulaire conservé KENESKA, de même que la voie de signalisation qu'il permet d'activer, sont indispensables à la maturation des synapses GABAergiques des cellules à paniers.

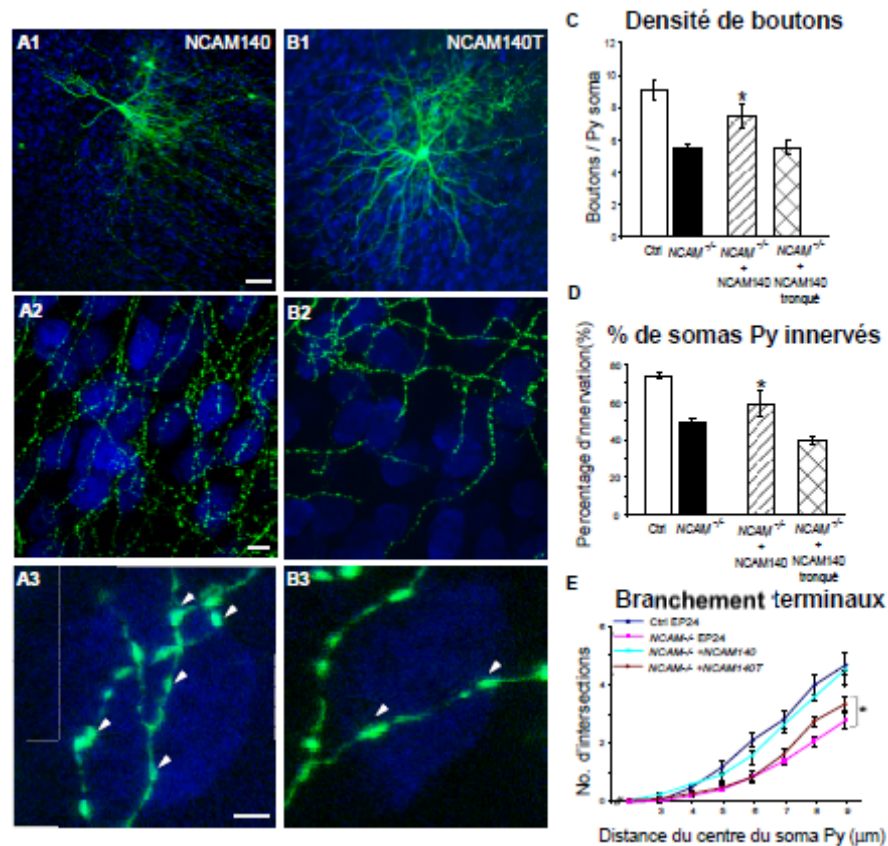


Figure 11. Le domaine intracellulaire conservé KENESKA de NCAM140 est nécessaire à la maturation des synapses GABAergiques

(A) À EP16-24, la réintroduction de NCAM140 tronquée chez un knockout de NCAM n'a pas récupéré le motif normal de branchement (B2) ou d'innervation périsonomatique (flèches) (B3). Échelle 50 µm pour A1/B1, 10 µm pour A2/B2 et 5 µm pour A3/B3.

(C) Densité de boutons périsonomatiques après transfection de NCAM140T à EP16-24.

(D) Innervation des somas pyramidaux après transfection de NCAM140T à EP16-24.

(E) Branchements terminaux après transfection de NCAM140T à EP16-24.

(C-E) EP16-24 : 150 somas pyramidaux innervés par 10 cellules à paniers comme témoins; 225 somas pyramidaux innervés par 15 cellules à paniers pour NCAM<sup>-/-</sup>, 105 somas pyramidaux innervés par 7 cellules à paniers pour NCAM140T.

## Chapitre 4 : Discussion

### 4.1 Implication d'autres molécules d'adhésion cellulaire dans le développement de synapses GABAergiques

L'ensemble de nos données suggère que NCAM joue un rôle restreint à la maturation des synapses GABAergiques périsonmatiques sur les neurones pyramidaux, pendant la 3<sup>ème</sup> semaine post-natale (EP16-24). Les preuves obtenues sont basées sur des techniques comme l'approche génétique Cre/lox, qui nous permettent de cibler des cellules spécifiques dans le néocortex pour causer un knockout conditionnel de NCAM à des stades développementaux précis. En contrôlant le moment de la transfection de Cre dans ces cellules, il a ainsi été possible de tester le rôle spécifique de NCAM et de ses isoformes, sans interférer avec d'autres processus développementaux. Aussi, nous avons pu identifier séparément le rôle de NCAM dans les cellules pré- ou post-synaptiques des jonctions GABAergiques, grâce à l'utilisation de promoteurs conférant une spécificité au type cellulaire ciblé. Plus précisément cette approche nous a permis d'étudier les cellules à paniers pré-synaptiques ainsi que certaines cellules glutamatergiques post-synaptiques. Enfin, ces techniques nous ont permis d'utiliser des cultures organotypiques avec un taux de transfection efficace (2-4 cellules/tranche). Étant donné qu'un nombre élevé de coupes ont pu être préparées à partir de chaque souriceau (10-15 tranches/animal), nous avons pu effectuer une évaluation rapide de la

participation potentielle et du rôle spécifique d'une voie moléculaire dans la maturation des synapses GABAergiques, tout en utilisant un nombre relativement petit d'animaux<sup>58, 59</sup>.

Nos résultats nous incitent ainsi à penser qu'il existe d'autres molécules d'adhésion qui contrôlent le début de la phase de maturation ou le maintien des synapses GABAergiques périsonomatiques. Il serait donc intéressant d'étudier le rôle d'autres CAMs, comme les neuroligines, SynCAM ou L1-CAM dans la formation de ces synapses<sup>84, 85, 158-160</sup>.

#### 4.2 NCAM et la maturation des neurones pyramidaux

Nous avons trouvé qu'un knockout de NCAM n'affecte pas la densité des épines dendritiques sur les neurones pyramidaux durant les phases de maturation et de maintien des synapses GABAergiques périsonomatiques (à EP16-24 et EP26-32). Nonobstant, Mendez et al. ont démontré que NCAM était nécessaire pour la stabilité de contacts synaptiques chez ces neurones excitateurs<sup>161</sup>. Une hypothèse qui permettrait d'expliquer cette différence serait que les neurones pyramidaux deviennent matures plus rapidement que les interneurons GABAergiques<sup>147, 162</sup>. Il serait alors possible que ces neurones puissent être affectés par un knockout plus précoce de NCAM, à EP8-14, comparativement aux cellules inhibitrices. En testant cette hypothèse, nous aurions une idée plus claire de la possibilité que NCAM affecte la densité de leurs épines dendritiques ou même la longueur de celles-ci durant leur phase de

maturation. Un autre postulat qui pourrait expliquer pourquoi nous n'avons pas trouvé de différences entre les neurones pyramidaux témoins et les NCAM<sup>-/-</sup> serait que ces changements ne sont pas détectables avec les techniques utilisées. Les épines de ces cellules pourraient, par exemple, s'élargir ou s'amincir chez un knockout de NCAM, sans que notre logiciel d'analyse nous permette d'évaluer ces paramètres. Aussi, il existe trois types d'épines : les épines dendritiques minces, de type « trapu » ou en forme de « champignon »<sup>152</sup>. Or, nous n'avons pas tenu compte de ces différents types d'épines, mais seulement de leur densité et leur longueur. Il est donc possible que l'absence de NCAM modifie un type spécifique d'épines dendritiques et que ceci n'ait pas été décelé dans la présente étude. Enfin, il faudrait aussi évaluer la densité des récepteurs glutamatergiques (NMDA/AMPA) en électrophysiologie, pour compléter notre analyse et comparer les différentes entrées dans les cellules pyramidales témoins et NCAM<sup>-/-</sup>.

#### 4.3 NCAM120 et la voie de signalisation Fyn

Nos résultats démontrent aussi que les isoformes NCAM120 ou 140 sont essentielles à la maturation des synapses GABAergiques périsomatiques, mais non la NCAM180. Cette observation peut sembler étonnante, car NCAM180 est l'isoforme la plus étudiée et caractérisée comme étant impliquée dans plusieurs processus neuraux<sup>157</sup>. De plus, compte tenu du fait que NCAM120 ne possède aucun domaine intracellulaire, on doit donc envisager

une association avec un co-récepteur dont les voies de signalisation sont, à ce jour, beaucoup moins connues que celles des deux autres isoformes<sup>116</sup>. Certaines études suggèrent aussi que NCAM120 est localisé uniquement dans les cellules gliales<sup>163</sup>. Il y a donc une grande incertitude concernant le rôle et la localisation de NCAM120. Une hypothèse qui expliquerait les résultats obtenus avec cette isoforme serait reliée à la localisation de NCAM120 dans les radeaux lipidiques, influençant sa signalisation. Les radeaux lipidiques sont des plaques de la membrane plasmique contenant une concentration élevée de cholestérol, de sphingolipides et de protéines de signalisation<sup>116</sup>. Toutes les isoformes de NCAM (180/140/120) se retrouvent majoritairement dans ces radeaux de lipides, mais il a été démontré que NCAM120 y est localisé exclusivement<sup>116</sup>. Une étude a aussi démontré qu'une stimulation par NCAM de cellules CHO transfectées avec NCAM120 permettait l'activation d'ERK, indépendamment du FGFR<sup>164</sup>. Subséquemment, il a été démontré que, même si la NCAM120 ne possède aucun domaine intracellulaire, elle pouvait activer ERK à travers MEK et Ras, peut-être par le complexe Fyn/FAK (figure 12)<sup>116</sup>. Nos études démontrent que NCAM120 seule, qui est exclusivement associée aux radeaux lipidiques, est capable de récupérer la maturation des synapses périsonomatiques GABAergiques après un knockout de NCAM. Ainsi, pour étudier particulièrement cette voie de signalisation, nous planifions d'effectuer des expériences en utilisant une forme dominante-négative de Fyn dans des cellules à paniers, pour tester son rôle dans la maturation des synapses GABAergiques périsonomatiques. Ainsi, si une transfection simultanée de la Cre-recombinase, de



la NCAM120 et de la forme dominante-négative de Fyn empêchant la maturation des synapses GABAergiques périsonmatiques, nous pourrions conclure que Fyn est une voie de signalisation nécessaire pour la NCAM120 et la maturation des contacts inhibiteurs.

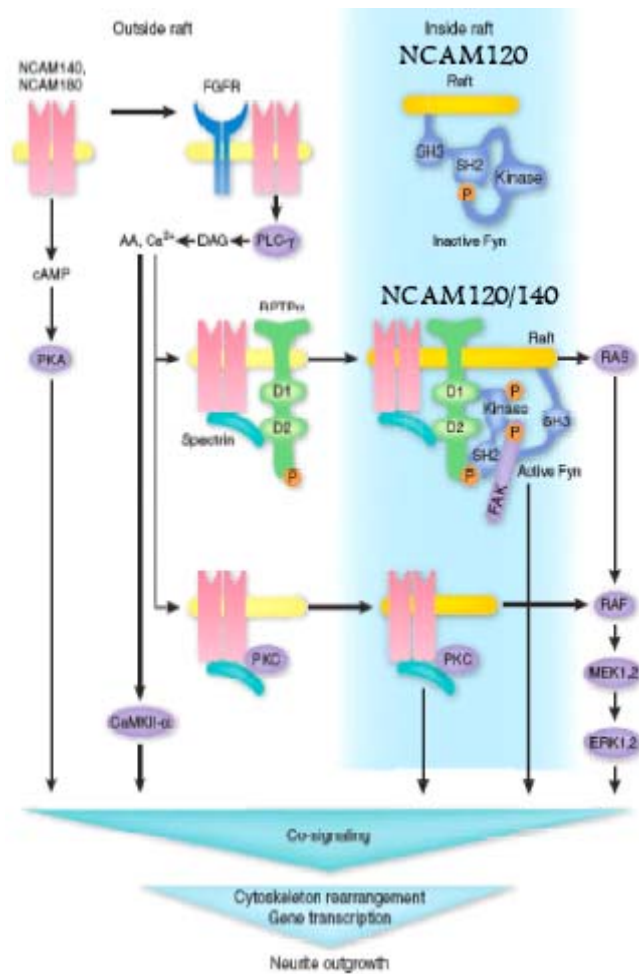


Figure 12. Voies de signalisation impliquant Fyn dans la croissance de neurites modulée par NCAM120 ou 140. (modifié de Maness P.F. et al.<sup>165</sup>)

#### 4.4 Importance du domaine intracellulaire conservé KENESKA

Nos résultats indiquent que la NCAM180 n'est pas nécessaire à la maturation des synapses GABAergiques périsonomatiques. Cependant, plusieurs études précédentes avaient déjà montré que la NCAM180 jouait un rôle important dans le maintien efficace de la transmission neuromusculaire lors d'une stimulation répétitive<sup>157</sup>. Même si cette isoforme ne requiert aucune NCAM post-synaptique pour des ciblage synaptiques<sup>153</sup>, NCAM180 pourrait agir en signalant ou en interagissant avec d'autres protéines, pour ainsi organiser la machinerie de relâche présynaptique nécessaire au maintien d'une transmission efficace lors de stimulations répétitives<sup>157</sup>. Une autre hypothèse pouvant expliquer cette observation serait que la réintroduction des isoformes dans les cellules à paniers ne permet pas un transport de NCAM180 aussi efficace que celui des autres isoformes (140/120), à cause de son poids moléculaire plus élevé, comparé à celui des autres isoformes<sup>116</sup>. Toutefois, nous avons testé cette problématique et avons observé que NCAM180 se situe bel et bien dans les axones et les dendrites des cellules étudiées et ce à des niveaux d'intensité comparables aux autres isoformes (Figure 8B). Donc, nous pensons que NCAM180 ne joue pas un rôle essentiel dans la maturation des interneurons GABAergiques corticaux.

Nos résultats démontrent également que le domaine intracellulaire conservé KENESKA de NCAM140 est nécessaire à la maturation des synapses GABAergiques. Il est maintenant reconnu que le domaine conservé KENESKA

de NCAM est responsable de ses effets et agit en permettant l'agrégation d'une quantité suffisante de la kinase de la chaîne légère de la myosine (MLCK)<sup>157</sup>. Le MLCK, qui active la MLC à son tour, est considéré comme étant nécessaire aux mouvements produits par la myosine de type II, permettant de reconstituer les stocks de vésicules synaptiques utilisées durant une stimulation à haute fréquence<sup>157</sup>. À la jonction neuromusculaire, une autre étude avait montré que la NCAM140 n'était pas capable de compenser l'absence de l'isoforme 180, puisqu'elle causait des échecs de transmission aux synapses neuromusculaires, malgré le fait que les isoformes de NCAM (180 et 140) possèdent ce même domaine de KENESKA<sup>157</sup>. Étant donné que nos résultats nous démontrent que NCAM140 est essentielle à la maturation des synapses GABAergiques périsonomatiques dans le cortex visuel, nous avons alors décidé d'évaluer plus spécifiquement le rôle de ce domaine KENESKA de la NCAM140 sur la maturation de ces synapses. Notamment, nous avons trouvé que le domaine KENESKA, qui est enlevé dans la forme tronquée de NCAM140, est absolument nécessaire à la formation de synapses GABAergiques périsonomatiques. À l'heure actuelle, nous nous interrogeons donc sur la manière dont ce domaine est impliqué dans les voies de signalisation classiques de NCAM, car ceci n'a pas encore été clairement établi dans la littérature.

#### 4.5 MLCK et la maturation des synapses GABAergiques

Un effecteur possible de MLCK est la voie de signalisation impliquant la protéine kinase A (PKA). La PKA, qui est activée par la voie de la phospholipase C (PLC $\gamma$ ), est reconnue comme capable de phosphoryler et activer la MLCK<sup>116, 157</sup>. Ceci suggère que la PKA pourrait potentiellement moduler cette voie. Il faudrait donc étudier davantage le rôle de PKA dans notre modèle, pour savoir l'impact de celle-ci sur le MLCK et sur la maturation des synapses GABAergiques. Une façon de procéder serait d'introduire simultanément l'isoforme NCAM140 tronquée et une forme constitutivement active de PKA pour savoir si PKA peut récupérer la maturation des synapses périsonomatiques GABAergiques à EP16-24.

Nos résultats démontrent aussi que même si l'isoforme NCAM140 récupère complètement la densité synaptique GABAergiques périsonomatique, cette isoforme ne récupère que partiellement la densité d'innervation des somas pyramidaux. Nous avons observé que, parmi les cellules à paniers, il y a celles qui récupèrent le phénotype et celles qui ne le font pas; ce qui explique un écart-type relativement grand. Nous proposons donc d'augmenter le nombre de cellules à paniers analysées, en espérant obtenir des résultats un peu plus précis qui nous permettraient d'étoffer le mécanisme de signalisation pour l'isoforme NCAM140.

En conclusion, nous avons exploré un nouveau mécanisme modulant la maturation des synapses GABAergiques périsonomatiques. La NCAM, qui joue

un rôle spécifique important durant la phase de maturation GABAergique à EP16-24, possède deux isoformes, NCAM120 et 140, qui sont nécessaires à cette maturation des synapses GABAergiques périsonomatiques. Cependant, la NCAM180, qui est l'isoforme la plus étudiée, n'est pas nécessaire dans ce processus. De plus, le domaine intracellulaire conservé KENESKA et sa voie de signalisation semblent indispensables à la maturation de ce type de synapses GABAergiques. Finalement, des expériences futures clarifieront les différentes voies de signalisation activées par NCAM dans la maturation de ces synapses.

Dans l'avenir, il serait intéressant d'étudier d'autres interneurons comme les cellules Martinotti et d'autres molécules d'adhésion cellulaire qui pourraient potentiellement être impliquées dans ces processus de maturation synaptique. Il serait aussi important de bien définir les voies de signalisation impliquant Fyn pour l'isoforme NCAM 120 et la voie de MLCK pour la NCAM140 pour avoir une meilleure compréhension de la maturation des synapses GABAergiques corticales. Finalement, nous voudrions également développer de nouvelles techniques expérimentales pour augmenter la sensibilité de nos analyses et détecter tous changements dans les épines dendritiques des neurones pyramidaux lors d'un knockout de NCAM.

## Chapitre 5 : Bibliographie

1. Markram H, Toledo-Rodriguez M, Wang Y, Gupta A, Silberberg G, Wu C. Interneurons of the neocortical inhibitory system. *Nat Rev Neurosci* 2004;5:793-807.
2. DeFelipe J, Farinas I. The pyramidal neuron of the cerebral cortex: morphological and chemical characteristics of the synaptic inputs. *Prog Neurobiol* 1992;39:563-607.
3. Peters A, Sethares C. Organization of pyramidal neurons in area 17 of monkey visual cortex. *J Comp Neurol* 1991;306:1-23.
4. Cauli B, Audinat E, Lambolez B, et al. Molecular and physiological diversity of cortical nonpyramidal cells. *J Neurosci* 1997;17:3894-906.
5. DeFelipe J. Neocortical neuronal diversity: chemical heterogeneity revealed by colocalization studies of classic neurotransmitters, neuropeptides, calcium-binding proteins, and cell surface molecules. *Cereb Cortex* 1993;3:273-89.
6. Kawaguchi Y, Kubota Y. GABAergic cell subtypes and their synaptic connections in rat frontal cortex. *Cereb Cortex* 1997;7:476-86.
7. DeFelipe J. Cortical interneurons: from Cajal to 2001. *Prog Brain Res* 2002;136:215-38.
8. Somogyi P, Tamas G, Lujan R, Buhl EH. Salient features of synaptic organisation in the cerebral cortex. *Brain Res Brain Res Rev* 1998;26:113-35.
9. Gupta A, Wang Y, Markram H. Organizing principles for a diversity of GABAergic interneurons and synapses in the neocortex. *Science* 2000;287:273-8.
10. Thomson AM, Deuchars J. Temporal and spatial properties of local circuits in neocortex. *Trends Neurosci* 1994;17:119-26.
11. Toledo-Rodriguez M, Gupta A, Wang Y, Wu CZ, Markram H. *The Handbook of Brain Theory and Neural Networks*. 2003:719-25.
12. Lund JS. Organization of neurons in the visual cortex, area 17, of the monkey (*Macaca mulatta*). *J Comp Neurol* 1973;147:455-96.
13. LeVay S. Synaptic patterns in the visual cortex of the cat and monkey. Electron microscopy of Golgi preparations. *J Comp Neurol* 1973;150:53-85.
14. Peters A. *Cellular Components of the Cerebral Cortex* (eds Peters, A, & Jones, E.G.). 1984.
15. Houser CR, Vaughn JE, Hendry SH, Jones EG, Peters A. *Cerebral Cortex: Functional Properties of Cortical Cells*. 1984:63-90.
16. White EL. Cortical circuits. *Synaptic Organization of the Cerebral Cortex*. 1989.
17. Douglas R, Martin KA. *The Synaptic Organization of the Brain*. 1998:459-511.
18. Peters A. *Synaptic Functions* (eds Edelman, G.M., Gall, W.E. & Cowan, W.M.). 1987.

19. Fairen A, DeFelipe J, Regidor J. Cellular Components of the Cerebral Cortex. 1984.
20. Letinic K, Zoncu R, Rakic P. Origin of GABAergic neurons in the human neocortex. *Nature* 2002;417:645-9.
21. DeFelipe J. Types of neurons, synaptic connections and chemical characteristics of cells immunoreactive for calbindin-D28K, parvalbumin and calretinin in the neocortex. *J Chem Neuroanat* 1997;14:1-19.
22. Gilbert CD. Circuitry, architecture, and functional dynamics of visual cortex. *Cereb Cortex* 1993;3:373-86.
23. Wang Y, Gupta A, Toledo-Rodriguez M, Wu CZ, Markram H. Anatomical, physiological, molecular and circuit properties of nest basket cells in the developing somatosensory cortex. *Cereb Cortex* 2002;12:395-410.
24. Somogyi P. *Neuronal Mechanisms of Visual Perception*. 1989.
25. Marin-Padilla M. Origin of the pericellular baskets of the pyramidal cells of the human motor cortex: a Golgi study. *Brain Res* 1969;14:633-46.
26. Jones EG. Varieties and distribution of non-pyramidal cells in the somatic sensory cortex of the squirrel monkey. *J Comp Neurol* 1975;160:205-67.
27. Cajal SR. *Histology Due Systeme Nerveux de Homme et des Vertebrates*. 1909.
28. Kisvarday ZF, Eysel UT. Cellular organization of reciprocal patchy networks in layer III of cat visual cortex (area 17). *Neuroscience* 1992;46:275-86.
29. Jones EG. Cellular Components of the Cerebral Cortex (eds Peters, A. & Jones, E.G.). 1984:521-54.
30. Kisvarday ZF, Martin KA, Whitteridge D, Somogyi P. Synaptic connections of intracellularly filled clutch cells: a type of small basket cell in the visual cortex of the cat. *J Comp Neurol* 1985;241:111-37.
31. Szentagothai J. Central processing of Visual Information. 1973:269-324.
32. DeFelipe J, Fairen A. A type of basket cell in superficial layers of the cat visual cortex. A Golgi-electron microscope study. *Brain Res* 1982;244:9-16.
33. Lund JS, Lewis DA. Local circuit neurons of developing and mature macaque prefrontal cortex: Golgi and immunocytochemical characteristics. *J Comp Neurol* 1993;328:282-312.
34. Somogyi P. A specific 'axo-axonal' interneuron in the visual cortex of the rat. *Brain Res* 1977;136:345-50.
35. Fairen A, Valverde F. A specialized type of neuron in the visual cortex of cat: a Golgi and electron microscope study of chandelier cells. *J Comp Neurol* 1980;194:761-79.
36. Buhl EH, Halasy K, Somogyi P. Diverse sources of hippocampal unitary inhibitory postsynaptic potentials and the number of synaptic release sites. *Nature* 1994;368:823-8.
37. Zhu Y, Stornetta RL, Zhu JJ. Chandelier cells control excessive cortical excitation: characteristics of whisker-evoked synaptic responses of layer 2/3 nonpyramidal and pyramidal neurons. *J Neurosci* 2004;24:5101-8.

38. Wang Y, Toledo-Rodriguez M, Gupta A, et al. Anatomical, physiological and molecular properties of Martinotti cells in the somatosensory cortex of the juvenile rat. *J Physiol* 2004;561:65-90.
39. Braitenberg V, Schuz A. *Cortex: Statistics and Geometry of Neural Connectivity*. 1998.
40. Peters A. The axon terminals of vasoactive intestinal polypeptide (VIP)-containing bipolar cells in rat visual cortex. *J Neurocytol* 1990;19:672-85.
41. Peters A, Harriman KM. Enigmatic bipolar cell of rat visual cortex. *J Comp Neurol* 1988;267:409-32.
42. Somogyi P, Cowey A. Combined Golgi and electron microscopic study on the synapses formed by double bouquet cells in the visual cortex of the cat and monkey. *J Comp Neurol* 1981;195:547-66.
43. DeFelipe J, Hendry SH, Hashikawa T, Molinari M, Jones EG. A microcolumnar structure of monkey cerebral cortex revealed by immunocytochemical studies of double bouquet cell axons. *Neuroscience* 1990;37:655-73.
44. Huang ZJ, Di Cristo G, Ango F. Development of GABA innervation in the cerebral and cerebellar cortices. *Nat Rev Neurosci* 2007;8:673-86.
45. Di Cristo G. Development of cortical GABAergic circuits and its implications for neurodevelopmental disorders. *Clin Genet* 2007;72:1-8.
46. Owens DF, Kriegstein AR. Developmental neurotransmitters? *neuron* 2002;36:989-91.
47. Hensch TK. Critical period plasticity in local cortical circuits. *Nat Rev Neurosci* 2005;6:877-88.
48. Belmonte MK, Cook EH, Jr., Anderson GM, et al. Autism as a disorder of neural information processing: directions for research and targets for therapy. *Mol Psychiatry* 2004;9:646-63.
49. Lewis DA, Hashimoto T, Volk DW. Cortical inhibitory neurons and schizophrenia. *Nat Rev Neurosci* 2005;6:312-24.
50. Kalanithi PS, Zheng W, Kataoka Y, et al. Altered parvalbumin-positive neuron distribution in basal ganglia of individuals with Tourette syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:13307-12.
51. Dani VS, Chang Q, Maffei A, Turrigiano GG, Jaenisch R, Nelson SB. Reduced cortical activity due to a shift in the balance between excitation and inhibition in a mouse model of Rett syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:12560-5.
52. Ribak CE, Harris AB, Vaughn JE, Roberts E. Inhibitory, GABAergic nerve terminals decrease at sites of focal epilepsy. *Science* 1979;205:211-4.
53. Arellano JI, Munoz A, Ballesteros-Yanez I, Sola RG, DeFelipe J. Histopathology and reorganization of chandelier cells in the human epileptic sclerotic hippocampus. *Brain* 2004;127:45-64.
54. Calcagnotto ME, Paredes MF, Tihan T, Barbaro NM, Baraban SC. Dysfunction of synaptic inhibition in epilepsy associated with focal cortical dysplasia. *J Neurosci* 2005;25:9649-57.



55. During MJ, Ryder KM, Spencer DD. Hippocampal GABA transporter function in temporal-lobe epilepsy. *Nature* 1995;376:174-7.
56. Lloyd KG, Bossi L, Morselli PL, Munari C, Rougier M, Loiseau H. Alterations of GABA-mediated synaptic transmission in human epilepsy. *Adv Neurol* 1986;44:1033-44.
57. Meldrum BS. Epilepsy and gamma-aminobutyric acid-mediated inhibition. *Int Rev Neurobiol* 1975;17:1-36.
58. Chattopadhyaya B, Di Cristo G, Higashiyama H, et al. Experience and activity-dependent maturation of perisomatic GABAergic innervation in primary visual cortex during a postnatal critical period. *J Neurosci* 2004;24:9598-611.
59. Chattopadhyaya B, Di Cristo G, Wu CZ, et al. GAD67-mediated GABA synthesis and signaling regulate inhibitory synaptic innervation in the visual cortex. *Neuron* 2007;54:889-903.
60. Levitt P, Harvey JA, Friedman E, Simansky K, Murphy EH. New evidence for neurotransmitter influences on brain development. *Trends Neurosci* 1997;20:269-74.
61. Ben-Ari Y. Excitatory actions of gaba during development: the nature of the nurture. *Nat Rev Neurosci* 2002;3:728-39.
62. Represa A, Ben-Ari Y. Trophic actions of GABA on neuronal development. *Trends Neurosci* 2005;28:278-83.
63. Corbin JG, Nery S, Fishell G. Telencephalic cells take a tangent: non-radial migration in the mammalian forebrain. *Nat Neurosci* 2001;4 Suppl:1177-82.
64. Marin O, Rubenstein JL. A long, remarkable journey: tangential migration in the telencephalon. *Nat Rev Neurosci* 2002;2:780-90.
65. Somogyi P, Klausberger T. Defined types of cortical interneurons structure space and spike timing in the hippocampus. *J Physiol* 2005;562:9-26.
66. Miles R, Toth K, Gulyas AI, Hajos N, Freund TF. Differences between somatic and dendritic inhibition in the hippocampus. *Neuron* 1996;16:815-23.
67. Huang ZJ. Subcellular organization of GABAergic synapses: role of ankyrins and L1 cell adhesion molecules. *Nat Neurosci* 2006;9:163-6.
68. Di Cristo G, Wu C, Chattopadhyaya B, et al. Subcellular domain-restricted GABAergic innervation in primary visual cortex in the absence of sensory and thalamic inputs. *Nat Neurosci* 2004;7:1184-6.
69. Ango F, di Cristo G, Higashiyama H, Bennett V, Wu P, Huang ZJ. Ankyrin-based subcellular gradient of neurofascin, an immunoglobulin family protein, directs GABAergic innervation at purkinje axon initial segment. *Cell* 2004;119:257-72.
70. Tamas G, Buhl EH, Somogyi P. Fast IPSPs elicited via multiple synaptic release sites by different types of GABAergic neurone in the cat visual cortex. *J Physiol* 1997;500 ( Pt 3):715-38.
71. Morales B, Choi SY, Kirkwood A. Dark rearing alters the development of GABAergic transmission in visual cortex. *J Neurosci* 2002;22:8084-90.

72. Lewis DA, Cruz D, Eggen S, Erickson S. Postnatal development of prefrontal inhibitory circuits and the pathophysiology of cognitive dysfunction in schizophrenia. *Ann N Y Acad Sci* 2004;1021:64-76.
73. Jiao Y, Zhang C, Yanagawa Y, Sun QQ. Major effects of sensory experiences on the neocortical inhibitory circuits. *J Neurosci* 2006;26:8691-701.
74. Knott GW, Quairiaux C, Genoud C, Welker E. Formation of dendritic spines with GABAergic synapses induced by whisker stimulation in adult mice. *Neuron* 2002;34:265-73.
75. Micheva KD, Beaulieu C. An anatomical substrate for experience-dependent plasticity of the rat barrel field cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:11834-8.
76. Palizvan MR, Sohya K, Kohara K, et al. Brain-derived neurotrophic factor increases inhibitory synapses, revealed in solitary neurons cultured from rat visual cortex. *Neuroscience* 2004;126:955-66.
77. Rutherford LC, DeWan A, Lauer HM, Turrigiano GG. Brain-derived neurotrophic factor mediates the activity-dependent regulation of inhibition in neocortical cultures. *J Neurosci* 1997;17:4527-35.
78. Vicario-Abejon C, Collin C, McKay RD, Segal M. Neurotrophins induce formation of functional excitatory and inhibitory synapses between cultured hippocampal neurons. *J Neurosci* 1998;18:7256-71.
79. Huang ZJ, Kirkwood A, Pizzorusso T, et al. BDNF regulates the maturation of inhibition and the critical period of plasticity in mouse visual cortex. *Cell* 1999;98:739-55.
80. Matus A. Growth of dendritic spines: a continuing story. *Curr Opin Neurobiol* 2005;15:67-72.
81. Tashiro A, Dunaevsky A, Blazeski R, Mason CA, Yuste R. Bidirectional regulation of hippocampal mossy fiber filopodial motility by kainate receptors: a two-step model of synaptogenesis. *Neuron* 2003;38:773-84.
82. Wong WT, Wong RO. Changing specificity of neurotransmitter regulation of rapid dendritic remodeling during synaptogenesis. *Nat Neurosci* 2001;4:351-2.
83. Zhang LI, Poo MM. Electrical activity and development of neural circuits. *Nat Neurosci* 2001;4 Suppl:1207-14.
84. Dean C, Dresbach T. Neuroligins and neurexins: linking cell adhesion, synapse formation and cognitive function. *Trends Neurosci* 2006;29:21-9.
85. Lise MF, El-Husseini A. The neuroligin and neurexin families: from structure to function at the synapse. *Cell Mol Life Sci* 2006;63:1833-49.
86. Di Cristo G, Chattopadhyaya B, Kuhlman SJ, et al. Activity-dependent PSA expression regulates inhibitory maturation and onset of critical period plasticity. *Nat Neurosci* 2007;10:1569-77.
87. Walsh FS, Doherty P. Neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily: role in axon growth and guidance. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1997;13:425-56.

88. Harpaz Y, Chothia C. Many of the immunoglobulin superfamily domains in cell adhesion molecules and surface receptors belong to a new structural set which is close to that containing variable domains. *J Mol Biol* 1994;238:528-39.
89. Rutishauser U, Thiery JP, Brackenbury R, Sela BA, Edelman GM. Mechanisms of adhesion among cells from neural tissues of the chick embryo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1976;73:577-81.
90. Rutishauser U, Hoffman S, Edelman GM. Binding properties of a cell adhesion molecule from neural tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1982;79:685-9.
91. Walmod PS, Kolkova K, Berezin V, Bock E. Zippers make signals: NCAM-mediated molecular interactions and signal transduction. *Neurochem Res* 2004;29:2015-35.
92. Brummendorf T, Rathjen FG. Cell adhesion molecules 1: immunoglobulin superfamily. *Protein Profile* 1995;2:963-1108.
93. Kasper C, Rasmussen H, Kastrup JS, et al. Structural basis of cell-cell adhesion by NCAM. *Nat Struct Biol* 2000;7:389-93.
94. Soroka V, Kolkova K, Kastrup JS, et al. Structure and interactions of NCAM Ig1-2-3 suggest a novel zipper mechanism for homophilic adhesion. *Structure* 2003;11:1291-301.
95. Cole GJ, Glaser L. A heparin-binding domain from N-CAM is involved in neural cell-substratum adhesion. *J Cell Biol* 1986;102:403-12.
96. Milev P, Meyer-Puttlitz B, Margolis RK, Margolis RU. Complex-type asparagine-linked oligosaccharides on phosphacan and protein-tyrosine phosphatase-zeta/beta mediate their binding to neural cell adhesion molecules and tenascin. *J Biol Chem* 1995;270:24650-3.
97. Retzler C, Gohring W, Rauch U. Analysis of neurocan structures interacting with the neural cell adhesion molecule N-CAM. *J Biol Chem* 1996;271:27304-10.
98. Storms SD, Anvekar VM, Adams LD, Murray BA. Heterophilic NCAM-mediated cell adhesion to proteoglycans from chick embryonic brain membranes. *Exp Cell Res* 1996;223:385-94.
99. Doherty P, Walsh FS. CAM-FGF Receptor Interactions: A Model for Axonal Growth. *Mol Cell Neurosci* 1996;8:99-111.
100. Paratcha G, Ledda F, Ibanez CF. The neural cell adhesion molecule NCAM is an alternative signaling receptor for GDNF family ligands. *Cell* 2003;113:867-79.
101. Varki A. Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiology* 1993;3:97-130.
102. Kiss JZ, Rougon G. Cell biology of polysialic acid. *Curr Opin Neurobiol* 1997;7:640-6.
103. Finne J, Finne U, Deagostini-Bazin H, Goridis C. Occurrence of alpha 2-8 linked polysialosyl units in a neural cell adhesion molecule. *Biochem Biophys Res Commun* 1983;112:482-7.

104. Hoffman S, Sorkin BC, White PC, et al. Chemical characterization of a neural cell adhesion molecule purified from embryonic brain membranes. *J Biol Chem* 1982;257:7720-9.
105. Rutishauser U, Landmesser L. Polysialic acid in the vertebrate nervous system: a promoter of plasticity in cell-cell interactions. *Trends Neurosci* 1996;19:422-7.
106. Gascon E, Vutskits L, Kiss JZ. Polysialic acid-neural cell adhesion molecule in brain plasticity: from synapses to integration of new neurons. *Brain Res Rev* 2007;56:101-18.
107. Bruses JL, Rutishauser U. Roles, regulation, and mechanism of polysialic acid function during neural development. *Biochimie* 2001;83:635-43.
108. Kiryushko D, Kofoed T, Skladchikova G, Holm A, Berezin V, Bock E. A synthetic peptide ligand of neural cell adhesion molecule (NCAM), C3d, promotes neuritogenesis and synaptogenesis and modulates presynaptic function in primary cultures of rat hippocampal neurons. *J Biol Chem* 2003;278:12325-34.
109. Muller D, Wang C, Skibo G, et al. PSA-NCAM is required for activity-induced synaptic plasticity. *Neuron* 1996;17:413-22.
110. Zhang H, Vutskits L, Calaora V, Durbec P, Kiss JZ. A role for the polysialic acid-neural cell adhesion molecule in PDGF-induced chemotaxis of oligodendrocyte precursor cells. *J Cell Sci* 2004;117:93-103.
111. De Matteis MA, Morrow JS. Spectrin tethers and mesh in the biosynthetic pathway. *J Cell Sci* 2000;113 ( Pt 13):2331-43.
112. Leshchyn'ska I, Sytnyk V, Morrow JS, Schachner M. Neural cell adhesion molecule (NCAM) association with PKC $\beta$ 2 via  $\beta$ 1 spectrin is implicated in NCAM-mediated neurite outgrowth. *J Cell Biol* 2003;161:625-39.
113. Sytnyk V, Leshchyn'ska I, Nikonenko AG, Schachner M. NCAM promotes assembly and activity-dependent remodeling of the postsynaptic signaling complex. *J Cell Biol* 2006;174:1071-85.
114. Pollerberg GE, Schachner M, Davoust J. Differentiation state-dependent surface mobilities of two forms of the neural cell adhesion molecule. *Nature* 1986;324:462-5.
115. Pollerberg GE, Burridge K, Krebs KE, Goodman SR, Schachner M. The 180-kD component of the neural cell adhesion molecule N-CAM is involved in cell-cell contacts and cytoskeleton-membrane interactions. *Cell Tissue Res* 1987;250:227-36.
116. Ditlevsen DK, Povlsen GK, Berezin V, Bock E. NCAM-induced intracellular signaling revisited. *J Neurosci Res* 2008;86:727-43.
117. Kolkova K, Novitskaya V, Pedersen N, Berezin V, Bock E. Neural cell adhesion molecule-stimulated neurite outgrowth depends on activation of protein kinase C and the Ras-mitogen-activated protein kinase pathway. *J Neurosci* 2000;20:2238-46.
118. Schmid RS, Graff RD, Schaller MD, et al. NCAM stimulates the Ras-MAPK pathway and CREB phosphorylation in neuronal cells. *J Neurobiol* 1999;38:542-58.

119. Lin TH, Aplin AE, Shen Y, et al. Integrin-mediated activation of MAP kinase is independent of FAK: evidence for dual integrin signaling pathways in fibroblasts. *J Cell Biol* 1997;136:1385-95.
120. Schaller MD. Biochemical signals and biological responses elicited by the focal adhesion kinase. *Biochim Biophys Acta* 2001;1540:1-21.
121. Barberis L, Wary KK, Fiucci G, et al. Distinct roles of the adaptor protein Shc and focal adhesion kinase in integrin signaling to ERK. *J Biol Chem* 2000;275:36532-40.
122. Zhang L, Bewick M, Lafrenie RM. Role of Raf-1 and FAK in cell density-dependent regulation of integrin-dependent activation of MAP kinase. *Carcinogenesis* 2002;23:1251-8.
123. Beggs HE, Baragona SC, Hemperly JJ, Maness PF. NCAM140 interacts with the focal adhesion kinase p125(fak) and the SRC-related tyrosine kinase p59(fyn). *J Biol Chem* 1997;272:8310-9.
124. He Q, Meiri KF. Isolation and characterization of detergent-resistant microdomains responsive to NCAM-mediated signaling from growth cones. *Mol Cell Neurosci* 2002;19:18-31.
125. Roskoski R, Jr. Src kinase regulation by phosphorylation and dephosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;331:1-14.
126. Bodrikov V, Leshchyn'ska I, Sytnyk V, Overvoorde J, den Hertog J, Schachner M. RPTPalpha is essential for NCAM-mediated p59fyn activation and neurite elongation. *J Cell Biol* 2005;168:127-39.
127. Williams EJ, Walsh FS, Doherty P. The FGF receptor uses the endocannabinoid signaling system to couple to an axonal growth response. *J Cell Biol* 2003;160:481-6.
128. Durbec P, Marcos-Gutierrez CV, Kilkenny C, et al. GDNF signalling through the Ret receptor tyrosine kinase. *Nature* 1996;381:789-93.
129. Cremer H, Lange R, Christoph A, et al. Inactivation of the N-CAM gene in mice results in size reduction of the olfactory bulb and deficits in spatial learning. *Nature* 1994;367:455-9.
130. Cremer H, Chazal G, Goridis C, Represa A. NCAM is essential for axonal growth and fasciculation in the hippocampus. *Mol Cell Neurosci* 1997;8:323-35.
131. Tomasiewicz H, Ono K, Yee D, et al. Genetic deletion of a neural cell adhesion molecule variant (N-CAM-180) produces distinct defects in the central nervous system. *Neuron* 1993;11:1163-74.
132. Bukalo O, Fentrop N, Lee AY, et al. Conditional ablation of the neural cell adhesion molecule reduces precision of spatial learning, long-term potentiation, and depression in the CA1 subfield of mouse hippocampus. *J Neurosci* 2004;24:1565-77.
133. Mayford M, Wang J, Kandel ER, O'Dell TJ. CaMKII regulates the frequency-response function of hippocampal synapses for the production of both LTD and LTP. *Cell* 1995;81:891-904.
134. Mantamadiotis T, Lemberger T, Bleckmann SC, et al. Disruption of CREB function in brain leads to neurodegeneration. *Nat Genet* 2002;31:47-54.

135. Bliss TV, Collingridge GL. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 1993;361:31-9.
136. Muller D, Djebbara-Hannas Z, Jourdain P, et al. Brain-derived neurotrophic factor restores long-term potentiation in polysialic acid-neural cell adhesion molecule-deficient hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:4315-20.
137. Yuste R, Bonhoeffer T. Morphological changes in dendritic spines associated with long-term synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci* 2001;24:1071-89.
138. Kelleher RJ, 3rd, Govindarajan A, Jung HY, Kang H, Tonegawa S. Translational control by MAPK signaling in long-term synaptic plasticity and memory. *Cell* 2004;116:467-79.
139. Malenka RC, Bear MF. LTP and LTD: an embarrassment of riches. *Neuron* 2004;44:5-21.
140. Nguyen PV, Kandel ER. A macromolecular synthesis-dependent late phase of long-term potentiation requiring cAMP in the medial perforant pathway of rat hippocampal slices. *J Neurosci* 1996;16:3189-98.
141. Cremer H, Chazal G, Carleton A, Goridis C, Vincent JD, Lledo PM. Long-term but not short-term plasticity at mossy fiber synapses is impaired in neural cell adhesion molecule-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:13242-7.
142. Luthi A, Gahwiler BH, Gerber U. Potentiation of a metabotropic glutamatergic response following NMDA receptor activation in rat hippocampus. *Pflugers Arch* 1994;427:197-202.
143. Ronn LC, Bock E, Linnemann D, Jahnsen H. NCAM-antibodies modulate induction of long-term potentiation in rat hippocampal CA1. *Brain Res* 1995;677:145-51.
144. Becker CG, Artola A, Gerardy-Schahn R, Becker T, Welzl H, Schachner M. The polysialic acid modification of the neural cell adhesion molecule is involved in spatial learning and hippocampal long-term potentiation. *J Neurosci Res* 1996;45:143-52.
145. Bruses JL, Chauvet N, Rubio ME, Rutishauser U. Polysialic acid and the formation of oculomotor synapses on chick ciliary neurons. *J Comp Neurol* 2002;446:244-56.
146. Franz CK, Rutishauser U, Rafuse VF. Polysialylated neural cell adhesion molecule is necessary for selective targeting of regenerating motor neurons. *J Neurosci* 2005;25:2081-91.
147. Dityatev A, Dityateva G, Schachner M. Synaptic strength as a function of post- versus presynaptic expression of the neural cell adhesion molecule NCAM. *Neuron* 2000;26:207-17.
148. Sytnyk V, Leshchynska I, Delling M, Dityateva G, Dityatev A, Schachner M. Neural cell adhesion molecule promotes accumulation of TGN organelles at sites of neuron-to-neuron contacts. *J Cell Biol* 2002;159:649-61.

149. Sytnyk V, Leshchyns'ka I, Dityatev A, Schachner M. Trans-Golgi network delivery of synaptic proteins in synaptogenesis. *J Cell Sci* 2004;117:381-8.
150. Polo-Parada L, Bose CM, Landmesser LT. Alterations in transmission, vesicle dynamics, and transmitter release machinery at NCAM-deficient neuromuscular junctions. *Neuron* 2001;32:815-28.
151. Wechsler A, Teichberg VI. Brain spectrin binding to the NMDA receptor is regulated by phosphorylation, calcium and calmodulin. *EMBO J* 1998;17:3931-9.
152. Muller D, Mendez P, De Roo M, Klauser P, Steen S, Poglia L. Role of NCAM in Spine Dynamics and Synaptogenesis. *Neurochem Res* 2008.
153. Hata K, Polo-Parada L, Landmesser LT. Selective targeting of different neural cell adhesion molecule isoforms during motoneuron myotube synapse formation in culture and the switch from an immature to mature form of synaptic vesicle cycling. *J Neurosci* 2007;27:14481-93.
154. Kim E, Sheng M. PDZ domain proteins of synapses. *Nat Rev Neurosci* 2004;5:771-81.
155. Chung HJ, Huang YH, Lau LF, Huganir RL. Regulation of the NMDA receptor complex and trafficking by activity-dependent phosphorylation of the NR2B subunit PDZ ligand. *J Neurosci* 2004;24:10248-59.
156. Polo-Parada L, Bose CM, Plattner F, Landmesser LT. Distinct roles of different neural cell adhesion molecule (NCAM) isoforms in synaptic maturation revealed by analysis of NCAM 180 kDa isoform-deficient mice. *J Neurosci* 2004;24:1852-64.
157. Polo-Parada L, Plattner F, Bose C, Landmesser LT. NCAM 180 acting via a conserved C-terminal domain and MLCK is essential for effective transmission with repetitive stimulation. *Neuron* 2005;46:917-31.
158. Gerrow K, El-Husseini A. Cell adhesion molecules at the synapse. *Front Biosci* 2006;11:2400-19.
159. Fogel AI, Akins MR, Krupp AJ, Stagi M, Stein V, Biederer T. SynCAMs organize synapses through heterophilic adhesion. *J Neurosci* 2007;27:12516-30.
160. Schmid RS, Maness PF. L1 and NCAM adhesion molecules as signaling coreceptors in neuronal migration and process outgrowth. *Curr Opin Neurobiol* 2008;18:245-50.
161. De Paola V, Arber S, Caroni P. AMPA receptors regulate dynamic equilibrium of presynaptic terminals in mature hippocampal networks. *Nat Neurosci* 2003;6:491-500.
162. Dityatev A, Dityateva G, Sytnyk V, et al. Polysialylated neural cell adhesion molecule promotes remodeling and formation of hippocampal synapses. *J Neurosci* 2004;24:9372-82.
163. Noble M, Albrechtsen M, Moller C, et al. Glial cells express N-CAM/D2-CAM-like polypeptides in vitro. *Nature* 1985;316:725-8.

164. Niethammer P, Delling M, Sytnyk V, Dityatev A, Fukami K, Schachner M. Cosignaling of NCAM via lipid rafts and the FGF receptor is required for neuriteogenesis. *J Cell Biol* 2002;157:521-32.
165. Maness PF, Schachner M. Neural recognition molecules of the immunoglobulin superfamily: signaling transducers of axon guidance and neuronal migration. *Nat Neurosci* 2007;10:19-26.



