



**HAL**  
open science

# Contrôler la plasticité du cortex cérébral adulte à travers l'action non-autonome de l'homéoprotéine Otx2

Damien Testa

► **To cite this version:**

Damien Testa. Contrôler la plasticité du cortex cérébral adulte à travers l'action non-autonome de l'homéoprotéine Otx2. Neurosciences [q-bio.NC]. Sorbonne Université, 2018. Français. NNT : 2018SORUS234 . tel-02479650

**HAL Id: tel-02479650**

**<https://theses.hal.science/tel-02479650>**

Submitted on 14 Feb 2020

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**THÈSE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ PARIS VI**  
**ÉCOLE DOCTORALE CERVEAU-COGNITION-COMPORTEMENT**

*Centre Interdisciplinaire de Recherche en Biologie, Collège de France*  
*Equipe d'Alain PROCHIANTZ : Développement et Neuropharmacologie*

---

**CONTRÔLER LA PLASTICITÉ DU CORTEX CÉRÉBRAL  
ADULTE À TRAVERS L'ACTION NON-AUTONOME DE  
L'HOMÉOPROTÉINE Otx2**

---

Par **M. Damien TESTA**

Thèse de doctorat de Neurosciences

Dirigée par **Dr Ariel DI NARDO**

Soutenance le 05 septembre 2018

Composition du jury

Pr Alain TREMBLEAU  
Dr Sonia GAREL  
Pr Dulce PAPY-GARCIA  
Dr Alberto BACCI  
Pr Andreas FAISSNER  
Dr Ariel DI NARDO

Président  
Rapporteur  
Rapporteur  
Examineur  
Examineur  
Directeur de thèse



*Seul on va vite,  
Ensemble on va loin*

Proverbe africain





## Un grand merci ...

... aux membres de mon jury d'avoir accepté d'évaluer le travail fourni au cours de cette thèse, et plus particulièrement à Sonia Garel et Dulce Papy-Garcia pour le temps consacré à l'évaluation de ce manuscrit.

... à Alain pour ton accueil chaleureux au sein de ton laboratoire. Tu as su quotidiennement nous consacrer du temps malgré la charge de ton travail. Sans oublier de te remercier pour l'optimisme dont tu fais preuve et pour ta passion de la recherche.

... à Ariel de m'avoir coaché tout au long de la thèse. A tes côtés j'ai beaucoup appris tant au point de vue scientifique que personnel. Merci de ta confiance, de ta gentillesse et pour toute l'aide que tu m'as apportée.

... à mes collaborateurs, Jean-Maurice Mallet, Solange Lavielle, Rodrigue Marquant, Gérard Chassaing pour l'étude des mimes de GAG... à Jérôme pour ton aide avec l'optical imaging et ton enthousiasme durant les expériences.

... aux anciens du laboratoire de m'avoir beaucoup appris, surtout à Clémence pour m'avoir fait découvrir l'univers des GAG et de m'avoir aidé de A à Z ... FX et Hocine pour nos discussions lors de nos balades après le labo!

... aux membres de l'équipe cortex et surtout à Jessica d'avoir été un super binôme dès mon arrivée, à Vanessa, Rachel et Hadhemi pour votre joie de vivre.

... à l'ambiance musicale latinisée au labo (Luis Fonsi, MTZ...) ... merci Mélanie pour cette ambiance et pour ton soutien.

... à Olivia de répondre à mes questions ...même, et surtout, à 19h!

... à tous les membres de l'équipe, anciens et nouveaux, qui ont contribué au plaisir de venir chaque matin travailler au Collège.

... aux membres du CIRB, et plus particulièrement à l'équipe Joliot-Vriz pour votre bonne humeur contagieuse et à Francine pour ton aide administratif.

... à mes amis pour tous les merveilleux instants partagés.

... à Chloé et à ma famille d'avoir rendu tout cela possible par votre amour au quotidien.



# Sommaire

<b>Index des figures</b>	<b>1</b>
<b>Liste des abréviations</b>	<b>2</b>
<b>INTRODUCTION</b>	<b>5</b>
I. Homéoprotéines	9
A. Découverte des protéines à homéodomaine	9
B. Rôles durant le développement	10
C. Structure des homéoprotéines	11
D. Fonctions cellulaires non-autonomes	13
II. Réseaux périneuronaux	15
A. Structure chimique des glycosaminoglycanes	15
B. Organisation en protéoglycane	19
C. Modifications de la matrice extracellulaire	20
D. Fonctions physiologiques	20
III. Périodes critiques	23
A. Apprentissage durant le développement	23
B. Modèle de plasticité de la vision binoculaire	23
C. Balance excitation-inhibition	25
D. Modifications épigénétiques	28
IV. Otx2 dans la plasticité	31
A. Contrôle la fenêtre de plasticité	31
B. Spécificité de reconnaissance	33
C. Boucle de rétrocontrôle positive Otx2/PNN	33
D. Réouverture de plasticité chez l'adulte	35
V. Objectifs de la thèse	37
<b>RÉSULTATS</b>	<b>41</b>
Article 1 : un modèle de souris à sécrétion conditionnelle d'anticorps simple-chaîne fournit la preuve génétique de l'activité non-autonome d'une homéoprotéine pour la régulation de la plasticité corticale.	43
Article 2 : la régulation de la plasticité du cortex visuel par l'activité non-autonome de l'homéoprotéine Otx2 s'effectue via Gadd45b/g	61

Article 3 : utilisation de peptides enrichis en acide cystéique comme mimes bioactifs de glycosaminoglycanes	75
<b>DISCUSSION</b>	<b>81</b>
I. Les PNN, un composant clé pour la physiologie du cerveau	83
A. Le dysfonctionnement des PNN à l'origine de pathologies	83
B. Développement d'outils permettant de cibler directement la matrice extracellulaire	85
C. Développement d'outils permettant de modifier l'interaction protéine-GAG	85
II. Régulation mutuelle des homéoprotéines et des PNN	89
A. Hypothèse d'un code sucre pour le transfert d'homéoprotéines	89
B. Otx2 modifie la matrice extracellulaire	91
C. Otx2 régulateur global des PNN corticaux	95
<b>PERSPECTIVES - CONCLUSION</b>	<b>97</b>
<b>RÉFÉRENCES</b>	<b>103</b>
<b>ANNEXE</b>	<b>115</b>
Perineuronal nets in brain physiology and disease	117

# Index des figures

Figure 1 : Mutation homéotique d'Antennapedia	8
Figure 2 : Structure et interaction de l'homéodomaine avec l'ADN	8
Figure 3 : Homéodomains conservés entre homéoprotéines	12
Figure 4 : Modèle d'internalisation d'homéoprotéines	12
Figure 5 : Représentation de l'activité non-autonome des homéoprotéines	12
Figure 6 : Unités oses constituant les glycosaminoglycanes	16
Figure 7 : Les glycosaminoglycanes	16
Figure 8 : Différents chondroïtines sulfates en fonction du patron de sulfatation	16
Figure 9 : Complexité et variabilité de la famille des lecticanes	18
Figure 10 : Coopération cellulaire à la mise en place des PNN	18
Figure 11 : Période critique de dominance oculaire	24
Figure 12 : Fenêtre temporelle de plasticité chez la souris	24
Figure 13 : La période critique est dictée par la fonction du GABA	26
Figure 14 : Localisation des neurones dans les couches du cortex	26
Figure 15 : Distribution d'Otx2 dans le cortex	30
Figure 16 : Otx2 contrôle la période critique de dominance oculaire	30
Figure 17 : Domaine d'Otx2 reconnaissant les glycosaminoglycanes	32
Figure 18 : Modèle à deux seuils du contrôle de la plasticité par Otx2	34
Figure 19 : Méthodes de réouverture de plasticité en interférant avec Otx2	34
Figure 20 : Motifs des domaines de reconnaissance aux glycosaminoglycanes	88
Figure 21 : Structure de l'homéoprotéine Otx2	90
Figure 22 : <i>Adamts9</i> est une cible d'Otx2 dans le cortex visuel	92
Figure 23 : Modèle de la régulation de la mise en place des PNN par Otx2	94
Figure 24 : Modèle de compétition de Sema3A et Otx2	100
Tableau 1 : Méthodes de déstabilisation de la matrice extracellulaire	84
Tableau 2 : Liste des miRNA ciblant des gènes ayant un changement d'expression pendant la période critique.	92

# Liste des abréviations

<b>5hmC</b>	5-hydroxyméthylcytosine
<b>5mC</b>	5-méthylcytosine
<b>A1</b>	Cortex auditif primaire
<b>ADAM</b>	Désintégrine et métalloprotéinase
<b>ADAMTS</b>	Désintégrine et métalloprotéinase à motif thrombospondines
<b>AMPA</b>	a-amino-3-hydroxy-5-méthylisoazol-4-propionate
<b>BDNF</b>	Brain-Derived Neurotrophic Factor
<b>Bral</b>	Brain-specific hyaluronan-binding protein
<b>ChABC</b>	Chondroitinase ABC
<b>Chst</b>	Carbohydre sulfotransférase
<b>CR</b>	Calrétinine
<b>CS</b>	Chondroïtine sulfate
<b>CSF</b>	Liquide cérébro-spinal
<b>CSPG</b>	Chondroïtine sulfate protéoglycane
<b>DS</b>	Dermatane sulfate
<b>DSPG</b>	Dermatane sulfate protéoglycane
<b>En</b>	Engrailed
<b>FGF</b>	Fibroblast growth factor
<b>GABA</b>	Acide $\gamma$ -aminobutyrique
<b>GAD</b>	Glutamate décarboxylase
<b>Gadd45b</b>	Growth Arrest And DNA Damage Inducible Beta
<b>GAG</b>	Glycosaminoglycane
<b>Gal</b>	Galactose
<b>GalNAc</b>	N-acétylgalactosamine
<b>GlcA</b>	Acide glucuronique
<b>GlcNAc</b>	N-acétylglucosamine
<b>HA</b>	Hyaluronane
<b>Hapln</b>	Hyaluronan- and proteoglycan-binding protein
<b>HAS</b>	Hyaluronane synthase
<b>HDAC</b>	Histone désacétylase
<b>HS</b>	Héparane sulfate
<b>HSPG</b>	Héparane sulfate protéoglycane
<b>IdoA</b>	Acide iduronique
<b>KS</b>	Kératine sulfate
<b>KSPG</b>	Kératine sulfate protéoglycane
<b>LGN</b>	Corps géniculé latéral
<b>MD</b>	Occlusion monoculaire
<b>MEC</b>	Matrice extracellulaire
<b>MeCP2</b>	Methyl-CpG-binding protein 2
<b>MMP</b>	Métalloprotéinase matricielle
<b>mPFC</b>	Cortex préfrontal médian
<b>NP1</b>	Neuropiline-1
<b>Otd</b>	Orthodenticle
<b>Otx</b>	Orthodenticle homeobox

<b>PG</b>	Protéoglycane
<b>PNN</b>	Réseau périneuronaux
<b>PSA</b>	Acide polysialique
<b>PV</b>	Parvalbumine
<b>scFv</b>	Anticorps simple-chaîne
<b>Sema3A</b>	Semaphorine-3A
<b>SNC</b>	Système Nerveux Central
<b>Tn-C</b>	Ténascine-C
<b>Tn-R</b>	Ténascine-R
<b>V1</b>	Cortex visuel primaire
<b>WFA</b>	<i>Lectine Wisteria Floribunda</i>





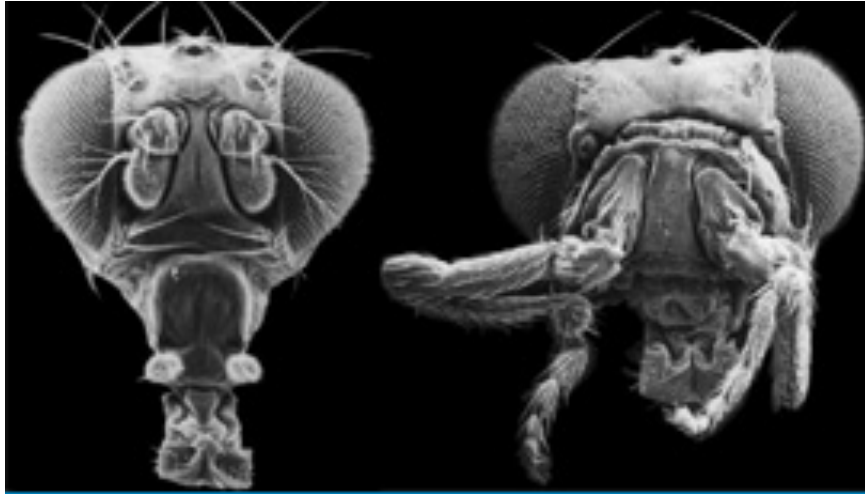
# **INTRODUCTION**



Les homéoprotéines sont des facteurs de transcription actifs tout au long du développement. Leur liaison à l'ADN a lieu grâce à leur homéodomaine, très conservé dans la famille des gènes à homéoboîte. Les homéoprotéines ont aussi la capacité de transfert intercellulaire, ce qui leur confère des activités cellulaires non-autonomes. Deux séquences distinctes permettant la sécrétion et l'internalisation, respectivement, ont été identifiées. Ces activités non-autonomes ont été décrites *in vivo* pour plusieurs homéoprotéines telles qu'Otx2, Pax6 et Engrailed dans différents modèles de la drosophile à la souris.

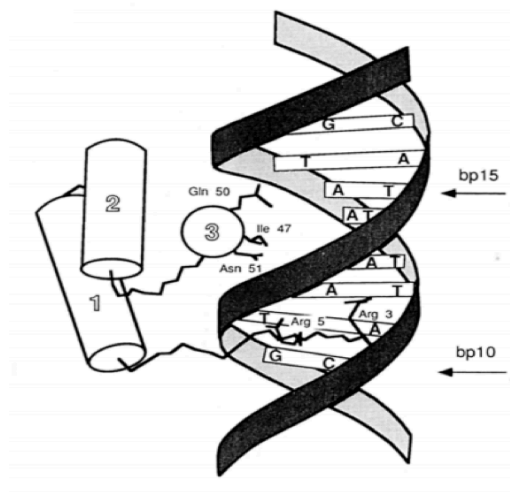
Durant le développement postnatal, le cortex cérébral possède de courtes périodes temporelles de forte plasticité, appelées périodes critiques. Ces fenêtres d'apprentissage sont réglées par de nombreux facteurs environnementaux qui influencent la balance corticale entre les systèmes excitateur et inhibiteur. La plasticité du cortex visuel pour la mise en place de la vision binoculaire a été très largement étudiée et nous a servi de modèle d'étude de la période critique. Cette période critique, chez la souris, s'ouvre au vingtième jour après la naissance (postnatal day (P) 20), avec un pic de plasticité à P30 et se referme peu après à P40. Un des mécanismes régulant la fermeture de la période critique est la mise en place d'une matrice condensée en réseaux périneuronaux (perineuronal nets, PNN) entourant les interneurons inhibiteurs exprimant la parvalbumine (PV) dans la couche IV du cortex. Cette matrice extracellulaire (MEC) est enrichie en sucres complexes, les glycosaminoglycanes (GAG), qui sont chargés négativement et sont nécessaires aux rôles physiologiques des PNN. L'homéoprotéine Otx2 est transférée depuis une source extra-corticale jusqu'au cortex. La reconnaissance d'un GAG spécifique par Otx2 permet son accumulation préférentielle dans les cellules PV, leur maturation et la condensation de la MEC en PNN contrôlant ainsi la mise en place et la fermeture de la période critique. Cette boucle de rétrocontrôle positive entre Otx2 et les PNN maintient l'état non-plastique du cortex cérébral adulte, ce qui permet de rouvrir une fenêtre de plasticité en interférant avec le transfert d'Otx2 et son accumulation corticale chez l'adulte.

Au préalable, une description de la famille des homéoprotéines, et plus particulièrement d'Otx2, de leur structure et de leurs activités non-autonomes sera présentée. Ensuite, l'organisation, la diversité, les modifications et les fonctions physiologiques de la MEC condensée en PNN seront exposées. Puis, la mise en place de la période critique, et plus précisément celle de la vision binoculaire avec les facteurs qui la contrôlent, sera rappelée. Le cas spécifique du rôle du transfert d'Otx2 dans cette période critique clôturera l'introduction.



**Figure 1 : Mutation homéotique d'Antennapedia**

Drosophile non mutée (à gauche) et mutée (à droite) pour Antennapedia avec un remplacement des antennes par des pattes (Photos de F.R. Turner, Indiana University).



**Figure 2 : Structure et interaction de l'homéodomaine avec l'ADN**

Structure de l'homéodomaine en trois hélices  $\alpha$  (1, 2 et 3) : les deux premières hélices sont antiparallèles et la troisième perpendiculaire aux deux premières. L'hélice 3 interagit avec le grand sillon tandis que la partie N-terminale de l'homéodomaine interagit au niveau du petit sillon de l'ADN (Extrait de (Kissinger et al., 1990)).

## I. Homéoprotéines

---

### A. Découverte des protéines à homéodomaine

Les homéoprotéines sont des facteurs de transcription actifs à toutes les étapes du développement et de la vie adulte. Elles sont encodées par les homéogènes, famille de gène découverte pour ses fonctions au cours du développement embryonnaire précoce, en particulier pour leur rôle dans la mise en place de l'axe antéro-postérieur des arthropodes et des vertébrés.

Leur découverte chez la drosophile a été provoquée par des mutations affectant totalement ou en partie la morphologie de segments, ou d'organes. Les premières observations ont été faites dans la première moitié du XXe siècle par Bridges & Morgan (Morgan and Bridges, 1923), pour lesquelles certains mutants montraient un remplacement du troisième segment thoracique par le deuxième. Il a été démontré par la suite que cette modification était dirigée par la mutation du complexe Bithorax porteur de huit homéogènes (Lewis, 1978). Autre exemple spectaculaire, la mutation d'un membre du complexe Antennapedia entraîne un remplacement des antennes par des pattes (Gehring, 1967) (Figure 1). Les études sur Antennapedia ont conduit à la découverte d'une séquence de 180 paires de bases, l'homéoboîte, très conservée chez tous les homéogènes, qu'ils aient ou non une action homéotique, telle que définie par les transformations dont certains exemples viennent d'être rappelés. Au niveau protéique l'homéoboîte encode une séquence de 60 acides aminés, appelée homéodomaine, elle aussi, très conservée (McGinnis et al., 1984). La structure tertiaire de l'homéodomaine a d'abord été décrite chez Antennapedia en RMN (Qian et al., 1989). L'homéodomaine adopte une structure globulaire qui contient trois régions  $\alpha$ -hélicales et une partie non-structurée en position N-terminale. Ces régions hélicales sont structurées de la manière suivante : hélice 1 - boucle - hélice 2 - coude - hélice 3. Les deux premières hélices  $\alpha$  sont antiparallèles et la troisième hélice est perpendiculaire aux deux premières (Figure 2) (Billeter et al., 1990; 1993). La troisième hélice interagit avec le grand sillon de l'ADN. L'hélice 1 se lie au squelette de l'ADN et la partie non-structurée en N-terminale interagit au niveau du petit sillon de l'ADN (Otting et al., 1990) (Figure 2). Les homéoprotéines ont tout d'abord été décrites comme facteurs de transcription, quand bien-même dès 1996, il a été démontré que Bicoid contrôle la traduction du messenger du gène *Caudal* grâce à la reconnaissance de ce messenger et du facteur eIF4E nécessaire à l'initiation de la traduction

(Dubnau and Struhl, 1996). Le domaine d'interaction avec eIF4E est largement conservé au sein de la famille des homéoprotéines et cette activité régulatrice de la traduction a été élargie à d'autres homéoprotéines dont *Emx2*, *Hoxa9*, *PRH*, *Otx2* et *Engrailed* (Nédélec et al., 2004; Topisirovic and Borden, 2005).

La famille des homéoprotéines a été définie comme l'ensemble des protéines possédant un homéodomaine similaire à celui décrit chez *Antennapedia*. C'est ainsi qu'elle inclue des homéoprotéines qui ne participent pas à la définition de l'identité d'une région, et n'ont donc pas une action homéotique, telle que définie par les mutations éponymes. La famille des homéoprotéines compte environ 300 membres dont certains exercent des fonctions importantes au cours du développement du système nerveux central (SNC). Par exemple, une perte de fonction de l'homéoprotéine *Engrailed-1* (*En1*) engendre un développement incomplet du mésencéphale chez les vertébrés (Joyner, 1996). Autre exemple, pris chez la drosophile, l'inactivation d'orthodenticle (*Otd*), majoritairement exprimé dans la partie antérieure des ganglions cérébraux engendre une perte de cette partie. *Otd* agit comme un gène GAP, au sens où sa délétion entraîne la perte d'une région (Finkelstein and Perrimon, 1990; Cohen and Jürgens, 1991; Hirth et al., 1995). *Otd* possède des homologues chez les vertébrés nommés orthodenticle homeobox 1 (*Otx1*) et *Otx2* (Simeone et al., 1992; 1993). Cette famille d'homéoprotéine possède un homéodomaine et le patron d'expression d'*Otx2* dans le développement embryonnaire de la souris est similaire à celui d'*Otd* chez la drosophile. On dit qu'*Otd* et *Otx2* sont orthologues (homologues sur le plan évolutif) alors qu'*Otx1* est un paralogue d'*Otx2* mais n'a pas d'orthologue chez les arthropodes.

## **B. Rôles durant le développement**

Durant le développement embryonnaire de la souris, *Otx2* s'exprime dès E5.5, avant la gastrulation, dans l'endoderme viscéral et l'épiblaste. Après gastrulation et induction neurale, à E7.5, *Otx2* reste exprimé dans l'endoderme et le mésoderme mais l'est aussi dans la plaque neurale rostrale qui donnera le télencéphale, le diencéphale et le mésencéphale (Acamпора et al., 2001). Au niveau du neuroectoderme rostral, l'expression d'*Otx2* rappelle celle d'*Otd* chez la drosophile.

L'expression d'*Otx1* débute à E8.5 au niveau de l'épithélium qui donnera naissance au cerveau antérieur et au mésencéphale (Simeone et al., 1992). Pendant le développement du cerveau et sa régionalisation, les expressions d'*Otx1* et *Otx2* sont semblables. En revanche, *Otx1* continue à s'exprimer au niveau de la zone ventriculaire corticale au début de la corticogénèse (E10.5) et au niveau des cellules progénitrices des neurones des couches V et VI du cortex (Simeone et al., 1993; Frantz et al., 1994).

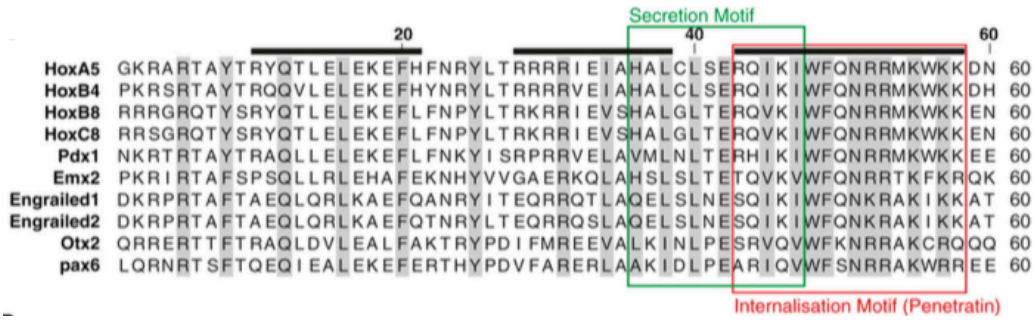
La délétion des gènes *Otx1* et *Otx2* a été réalisée chez la souris. Celle d'*Otx1* engendre des souris viables qui souffrent de crises d'épilepsie et présentent des anomalies du télencéphale et des retards de développement des organes sensoriels visuel et auditif (Acampora et al., 1995). Chez l'adulte, le cerveau de souris *Otx1*<sup>-/-</sup> a une épaisseur corticale plus faible. Une inactivation totale d'*Otx2* est létale très tôt dans le développement du fait de la perte des régions cérébrales rostrales, comme cela a aussi été observé chez la drosophile après invalidation d'*Otd*. Cependant les souris hétérozygotes pour *Otx2* (*Otx2*<sup>+/*GFP*</sup>) sont viables et fertiles (Martinez-Morales et al., 2001; Koike et al., 2007).

### **C. Structure des homéoprotéines**

Par des travaux initiés dès le début des années 90, le laboratoire d'Alain Prochiantz a découvert que les homéoprotéines sont douées de la propriété de transfert intercellulaire grâce à la présence dans l'homéodomaine de deux domaines peptidiques permettant pour l'un la sécrétion et pour l'autre l'internalisation de ces protéines.

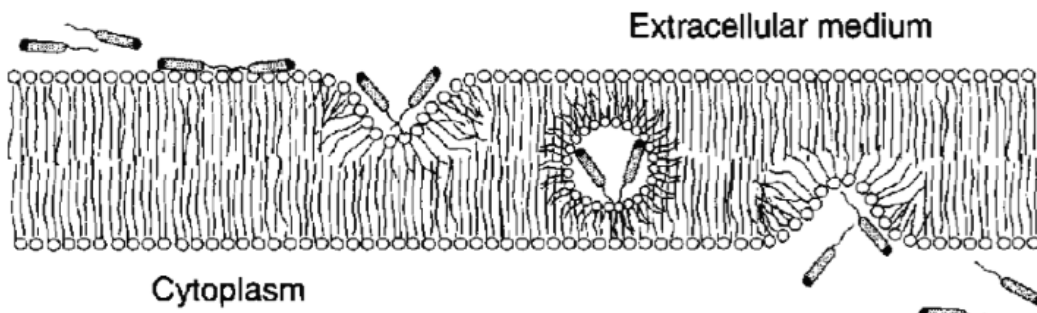
Les premiers travaux sur ce thème ont démontré que l'homéodomaine d'Antennapedia, ajouté au milieu de culture est internalisé par les neurones (par d'autres types cellulaires aussi) et adressé au cytoplasme et au noyau des cellules (Joliot et al., 1991a). Le tryptophane en position 48 de l'homéodomaine, donc dans sa troisième hélice, est nécessaire à l'internalisation (Figure 3) (Derossi et al., 1994). Cette troisième hélice de 16 acides aminés est aussi suffisante pour l'internalisation et a été nommée pénétratine (Figure 3). Cette internalisation requiert des acides aminés basiques et hydrophobes ce qui distingue la pénétratine de séquence d'internalisation TAT, exempte de résidus hydrophobes.





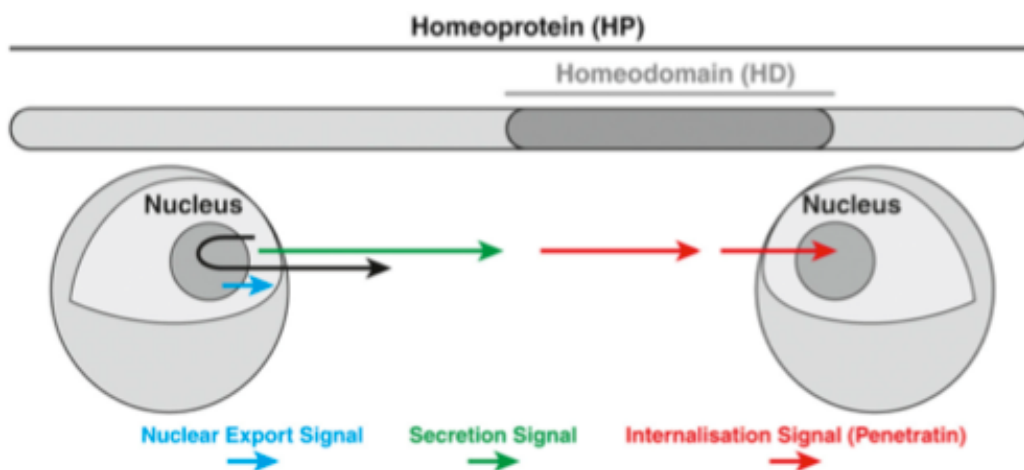
**Figure 3 : Homéodomaines conservés entre homéoprotéines**

Séquences des 60 acides aminés composant l'homéodomaine de dix homéoprotéines ayant une activité non-autonome. Les trois hélices composant l'homéodomaine sont représentées avec un trait en gras (Extrait de (Spatazza et al., 2013a)).



**Figure 4 : Modèle d'internalisation d'homéoprotéines**

La membrane est déstabilisée par le tryptophane 48 de l'homéodomaine ce qui entraîne des micelles inversées et une internalisation de l'homéoprotéine (Extrait de (Derossi et al., 1998)).



**Figure 5 : Représentation de l'activité non-autonome des homéoprotéines**

L'activité non-autonome des homéoprotéines est possible par un signal d'export du noyau, de sécrétion et d'internalisation (Extrait de (Spatazza et al., 2013a)).

L'internalisation de la pénétratine ne nécessite pas la présence de récepteur chiral et s'observe aussi à 4°C (Derossi et al., 1996). L'interaction électrostatique de la pénétratine avec les lipides anioniques de la membrane a été particulièrement étudiée. En milieu aqueux, le peptide n'est pas structuré mais, à faible ratio peptide/lipide, il adopte une structure en hélice  $\alpha$  qui se change en structure en feuillet  $\beta$  si ce ratio augmente. Une internalisation en deux étapes a ainsi pu être proposée. La première étape est l'accumulation des homéoprotéines au niveau des bicouches lipidiques enrichies en lipides anioniques, le deuxième implique l'insertion du tryptophane 48 dans la bicouche et l'induction subséquente de micelles inversées qui déstabilisent la bicouche (Figure 4) (Berlose et al., 1996; Christiaens et al., 2002; Dupont et al., 2007).

La séquence de sécrétion des homéoprotéines a été étudiée chez Engrailed. Engrailed exprimé dans des cellules COS est retrouvé dans des neurones co-cultivés avec les COS (Joliot et al., 1998). Cette sécrétion est dépendante d'un court motif (appelé  $\Delta I$ ), très conservé parmi les homéoprotéines, se situant entre les hélices 2 et 3 de l'homéodomaine et mordant sur ces hélices (Figure 3). Il s'agit d'une sécrétion non-conventionnelle n'impliquant pas la voie réticulum/Golgi, et non modifiée par la brefeldin A, agent inhibiteur de cette voie. La séquence  $\Delta I$  contient une partie de la séquence nécessaire à l'export nucléaire, ce qui a conduit à démontrer que la sécrétion d'Engrailed nécessite un passage par le noyau (Figure 5). Engrailed sécrété est associé à des fractions membranaires riches en cholestérol et en glycosphingolipides et la sécrétion est contrôlée par phosphorylation de la protéine par la caséine-kinase II (Maizel et al., 2002). Ces études initiales ont été réalisées *in vitro*, mais présentent des points de convergences avec les études *in vivo* puisque près de 5% d'Engrailed se trouvent soit dans les vésicules de sécrétion soit à la surface des cellules *in vitro* comme *in vivo*.

#### **D. Fonctions cellulaires non-autonomes**

Grâce à ces deux domaines (pénétratine et  $\Delta I$ ), les homéoprotéines présentent une activité cellulaire non-autonome. Etant donné que les séquences de sécrétion et d'internalisation se trouvent au sein même de l'homéodomaine, des mutations spécifiques ne peuvent pas y être effectuées sans affecter sa capacité à lier l'ADN, donc les fonctions autonomes cellulaires. Pour distinguer les deux types de fonctions, il a donc fallu développer des outils spécifiques,

dont des anticorps simple-chaîne (scFv) anti-homéoprotéines, sécrétés dans le milieu et n'affectant que les actions non-autonomes. C'est ainsi qu'il a pu être démontré que la signalisation par transfert de Pax6 diminue le développement du territoire œil (eye anlagen) chez le poisson zèbre (Lesaffre et al., 2007) et la migration des précurseurs d'oligodendrocytes chez le poulet (Di Lullo et al., 2011). Des études similaires ont démontré que la signalisation par Engrailed est nécessaire au guidage des cellules ganglionnaires de la rétine chez le poulet et la grenouille et au développement approprié des projections entre la rétine et le toit optique (Brunet et al., 2005; Wizenmann et al., 2009). Cette signalisation par Engrailed est aussi impliquée dans la formation de la veine transverse antérieure dans le disque imaginal de l'aile de la drosophile (Layalle et al., 2011). Plus récemment, comme on le verra, cette technologie a été appliquée à Otx2 et à l'étude de son rôle de facteur de signalisation dans le développement du cortex cérébral (Bernard et al., 2016).

## II. Réseaux périneuronaux

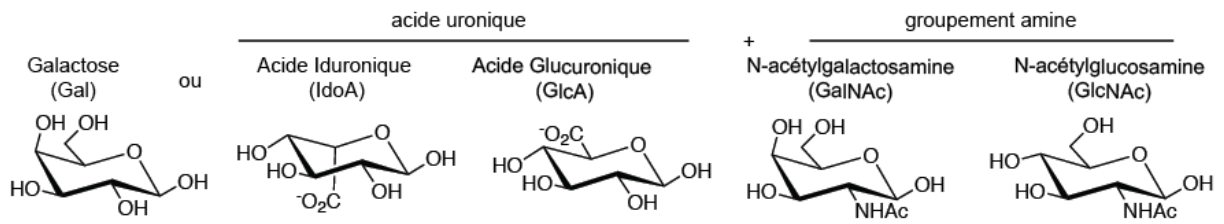
---

La matrice extracellulaire a un rôle physique de maintien des tissus mais aussi un rôle dynamique via ses fonctions de signalisations. Au sein du SNC elle représente de 10 à 20% du volume du cerveau (Cragg, 1979). Il existe trois organisations principales de cette matrice : en feuillets avec un rôle de frontière entre les cellules endothéliales et le parenchyme cérébral, diffuse au sein du parenchyme et formant la matrice interstitielle neurale, enrichie en glycosaminoglycanes (GAG) et condensée en réseaux périneuronaux (PNN) qu'on peut visualiser par la *lectine Wisteria Floribunda* (WFA).

### A. Structure chimique des glycosaminoglycanes

Les GAG sont de longues chaînes, non ramifiées, composées de plusieurs dizaines ou centaines de répétitions de disaccharides. Les complexes formés ont un poids moléculaire de quelques kDa à plusieurs dizaines de milliers de kDa. Les disaccharides sont formés par liaisons glycosidiques entre une amine et un ose. Les groupements amines qui composent les GAG sont le N-acétylgalactosamine (GalNAc), dérivant du galactose, et le N-acétylglucosamine (GlcNAc) dérivant du glucose (Figure 6). Cette amine peut se lier avec un deuxième ose : l'acide glucuronique (GlcA), l'acide iduronique (IdoA) ou le galactose (Gal). Les GAG sont composés d'une combinaison de deux monosaccharides en alternance répétée et homogène. Les types de GAG sont définis par la nature du motif répété (Figure 7).

L'acide hyaluronique, ou hyaluronane (HA), est composé de centaines de répétitions de GlcA et GlcNAc liés par une liaison glycosidique (1→3). HA est le seul GAG ne possédant pas de forme sulfatée et libre d'attachement à un groupement protéique. HA est synthétisé par des hyaluronane synthases (HAS) au niveau de la membrane plasmique et est nécessaire au maintien de la matrice extracellulaire, plus particulièrement sa forme condensée en PNN. Il existe trois isoformes de synthases : HAS1, HAS2 et HAS3. HAS1 et HAS2 forment de longues chaînes de HA avec une synthèse rapide. HAS3 synthétise le HA plus lentement et les chaînes formées sont plus courtes. HAS3 est obligatoire pour la formation des PNN et sa seule expression en présence de *hyaluronan- and proteoglycan-binding protein 1* (*Hapln1*) dans des cellules HEK engendre une condensation en PNN (Kwok et al., 2010).



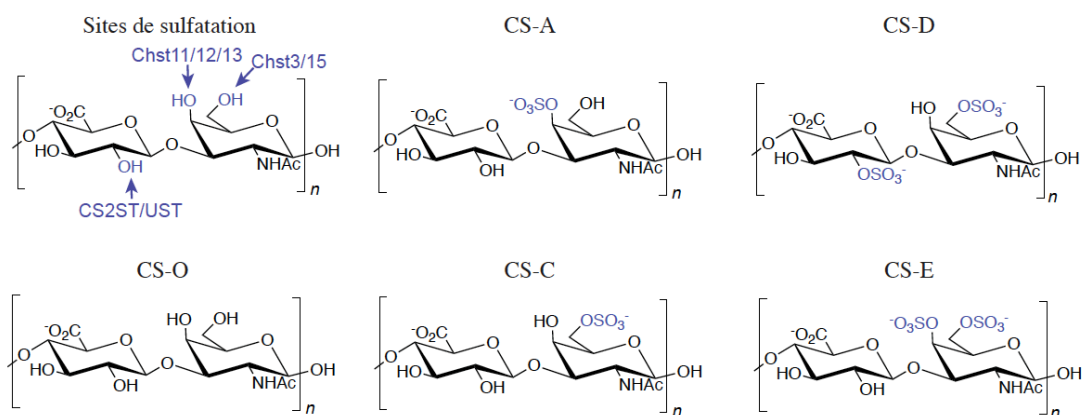
**Figure 6 : Unités oses constituant les glycosaminoglycane**

Les glycosaminoglycane peuvent contenir du galactose (Gal), un acide iduronique (IdoA) ou glucuronique (GlcA) associé avec un groupement amine comme le N-acétylgalactosamine (GalNAc) ou le N-acétylglucosamine (GlcNAc).

GAG	Unités répétées	
Hyaluronane (HA)	GlcA	+ GlcNAc
Chondroïtine sulfate (CS)	GlcA	+ GalNAc
Héparane sulfate (HS)	GlcA or IdoA	+ GlcNAc
Kératane sulfate (KS)	Gal	+ GlcNAc
Dermatane sulfate (DS)	IdoA	+ GalNAc

**Figure 7 : Les glycosaminoglycane**

Les différents glycosaminoglycane en fonction des combinaisons de disaccharides répétées.

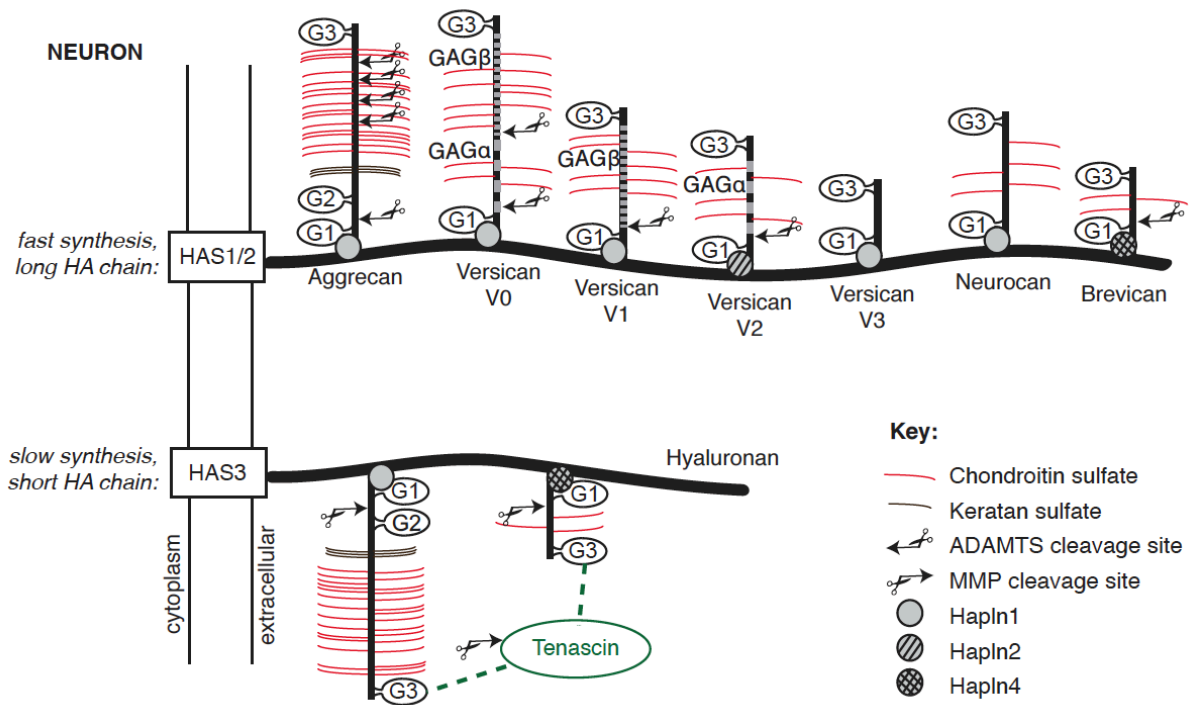


**Figure 8 : Différents chondroïtines sulfates en fonction du patron de sulfatation**

Le chondroïtine sulfate (CS) à  $n$  répétitions possède trois sites de sulfatation (fléchés en bleu). Ces différents patrons de sulfatation engendrent plusieurs sous-types de CS : le non-sulfaté CS-O, les monosulfatés CS-A et CS-C ainsi que les disulfatés CS-D et CS-E.

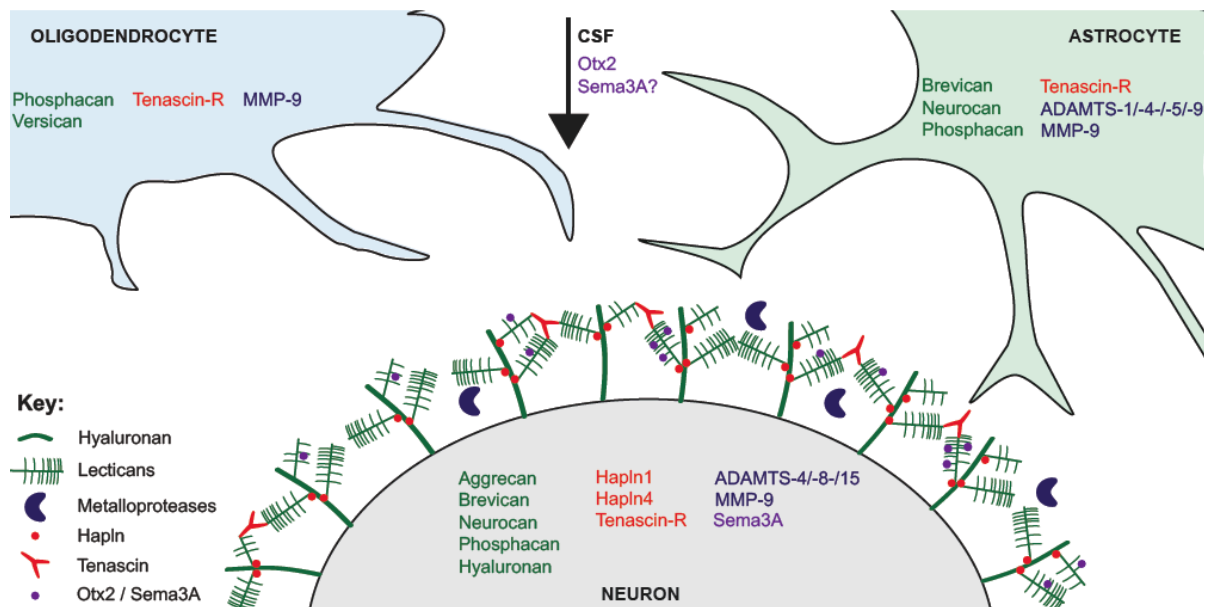
A l'inverse de HA, les autres GAG sont sulfatés et peuvent être attachés à un cœur protéique. C'est le cas des chondroïtines sulfates (CS) composés de répétitions de GlcA et GalNAc assemblées par liaison glycosidique (1→3), du dermatane sulfate (DS) formé par l'alternance de IdoA et GalNAc et de l'héparane sulfate (HS) obtenu indifféremment par la liaison GlcA ou IdoA avec un GlcNAc. Sans oublier le kératane sulfate (KS) structuré par un Gal lié au GlcNAc (Figure 7). Dans le SNC, le ratio HS:CS est de 9:1, sauf dans les PNN où il passe à 7:3. La liaison covalente à un cœur protéique est catalysée par une xylosyltransférase qui lie une sérine au tétrasaccharide Xylose-Galactose-Galactose-Glucuronate, commun aux CS et HS, et d'abord synthétisée au niveau du réticulum endoplasmique. La distinction entre le CS et le HS se réalise dès le premier ose transféré sur le tétrasaccharide commun. Si l'élongation est initiée par le transfert d'un GalNAc (par la GalNAcT-I) il y a formation de CS, et si elle l'est par le transfert d'un GlcNAc (par le GlcNAcT-I) le GAG formé est un HS (Silbert and Sugumaran, 2002). Par la suite, au niveau du Golgi, l'élongation du GAG se réalise par la GalNAcT-II, la GlcNAcT-II ou la GlcAT-II pour l'ajout d'un GalNAc, d'un GlcNAc ou d'un GlcA, respectivement.

Les chaînes de HS et de CS possèdent différents sites possibles de sulfatation au niveau de leurs monosaccharides. La forme non-sulfatée du GalNAc possède deux sites accepteurs respectivement pour la 4-*O*- et la 6-*O*-sulfatation. Le GlcA peut être sulfaté au niveau du C-2. Il existe différentes formes de CS en fonction du patron de sulfatation. On nomme CS-O la forme non sulfatée. Le CS-O peut être sulfaté en C-4 du GalNAc par la 4-*O*-sulfotransférases de types C4ST-1/2/3 (carbohydre sulfotransferase (Chst11/12/13)) ce qui donne le CS-A. Le CS-O sulfaté en C-6 du GalNAc par la C6ST-1 (Chst3) donne le CS-C. Ces formes monosulfatées peuvent accepter une deuxième sulfatation. Pour le CS-A le GalNAc peut être sulfaté une deuxième fois en C-6 par le GalNAc4S-6ST (Chst15) et donner le CS-E (Figure 8). Dans le cas du CS-C, c'est le GlcA qui est le site de la seconde sulfatation en C-2 par le CS2S/UST, ce qui conduit au CS-D (Figure 8). Ces différents sous-types de CS sont à l'origine de la diversité des chaînes de GAG qui sous-tend celle de leurs fonctions physiologiques.



**Figure 9 : Complexité et variabilité de la famille des lecticanes**

Représentation des différents lecticanes : aggrecan, versican et ses isoformes (V0, V1, V2 et V3), neurocan et brevican. La hyaluronane (HA) est synthétisée par les hyaluronane synthases (HAS) qui possèdent différentes propriétés. Les isoformes HAS1 et HAS2 synthétisent de longues chaînes de HA d'une manière rapide, tandis que HAS3 forme de courtes chaînes plus lentement. Les sites de clivages par les métalloprotéinases sont indiqués.



**Figure 10 : Coopération cellulaire à la mise en place des PNN**

Les oligodendrocytes, les astrocytes, les neurones et le liquide cérébro-spinal (CSF) fournissent les constituants nécessaires à la formation de la matrice extracellulaire.

## B. Organisation en protéoglycane

La liaison des GAG (à l'exception de HA) avec un cœur protéique forme un complexe appelé protéoglycane (PG). Les différents groupes de PG sont définis par leur composition. Un cœur protéique contenant des CS forme un CSPG. Par la même logique, il existe les KSPG, DSPG et HSPG. Au niveau du SNC, la famille des CSPG est fortement exprimée et connue pour exercer de nombreuses fonctions physiologiques. La famille des CSPG est composée de lecticanes qui interagissent avec HA et les lectines, de phosphacane qui est la forme prédominante dans le SNC et de NG2 exprimé principalement par les précurseurs des oligodendrocytes. La différence entre ces différentes entités est leur capacité à être sécrétées ou non. Au sein de la famille des lecticanes, on distingue les aggrecans, brevicans, neurocans et versicans (Figure 9). La différence entre ces lecticanes est principalement liée à la diversité de leurs cœurs protéiques, notamment de la partie qui se trouve entre les domaines G1, G2 et G3 (voir plus bas). Tandis qu'aggrecan peut lier des centaines de chaînes de CS, neurocan ou brevican ne peuvent pas en lier plus d'une dizaine. Le nom brevican illustre, pour ce PG, le petit nombre de résidus attachés à son cœur protéique. Brevican possède une forme sécrétée, exprimée par les neurones, et une forme gliale ancrée à la membrane (Figure 10) (Seidenbecher et al., 1995). Pour revenir sur le cœur protéique et sa structure, rappelons l'existence, au niveau du N-terminal, des deux domaines globulaires G1 et G2 qui interagissent avec HA via les protéines de la famille des Hapln. Le domaine globulaire G3 est C-terminal et est lui-même divisible en 3 différents domaines : EGF, lectine et CRP-like (Yamaguchi, 2000). Le domaine lectine permet une interaction de forte affinité avec différentes protéines de la MEC, notamment avec le domaine fibronectine de type III des ténascines (Rauch et al., 1997; Day et al., 2004).

La famille des ténascines possède quatre différentes glycoprotéines. Dans le SNC, les formes les plus communes sont la ténascine-C (Tn-C) et la ténascine-R (Tn-R) exprimées par les neurones et les cellules gliales (Figure 10). En ce qui concerne la Tn-C, deux trimères s'assemblent et peuvent ainsi lier six domaines G3 du cœur protéique en même temps. La Tn-R permet seulement trois liaisons simultanées à G3 mais elles sont plus affines que celles de la Tn-C. La diversité des ténascines est amplifiée par les épissages alternatifs et l'action des métalloprotéinases. La Tn-R est nécessaire à la condensation de la matrice extracellulaire en PNN et, logiquement, les souris knock-out (KO) pour la *Tn-R* présentent une mauvaise maturation des PNN (Brückner et al., 2000).



La famille des Hapln possède quatre membres, ce sont les link proteins qui se lient à HA (Spicer et al., 2003) ou encore les brain-specific hyaluronan-binding proteins (Bral) pour celles spécifiques du SNC. Au sein du SNC, on trouve Hapln1, Hapln2/Bral1 et Hapln4/Bral2. Les formes Hapln1 et Hapln4 sont présentes dans la matrice extracellulaire condensée en PNN et sont synthétisées par ces neurones (Figure 10). En revanche, Hapln2 est plus communément retrouvée au niveau des nœuds de Ranvier (Oohashi et al., 2015).

### **C. Modifications de la matrice extracellulaire**

La matrice extracellulaire est constamment remodelée en réponse à divers signaux, notamment par les métalloprotéinases. Ces protéases appartiennent à la famille des "metzincines". Elles sont appelées ainsi du fait de la méthionine qui suit le domaine catalytique constitué d'une séquence de liaison au zinc : HExxHxxGxxH avec H pour histidine, G pour glycine, E pour glutamate et x pour un autre acide aminé. Il existe trois familles de métalloprotéinases : les désintégrines et les métalloprotéinases (ADAM) dont les ADAM à motifs thrombospondine (ADAMTS) et les métalloprotéinases matricielles (MMP). Au sein de ces groupes, on décompte 19 ADAMTS et 25 MMP. Parmi les ADAMTS sécrétées, certaines ont une activité de dégradation des PG, comme ADAMTS-1/-4/-5/-8/-9/-15/-20 (Kelwick et al., 2015). La majorité de ces ADAMTS sont sécrétées par les astrocytes, leur expression par les neurones reste disputée, mis à part pour ADAMTS-8 et -15 (Rossier et al., 2015) (Figure 10). De même, au sein de la famille des MMP, certaines sont retrouvées dans le SNC, comme MMP-2/-3/-9. Elles peuvent hydrolyser les aggrecans par clivage entre leurs domaines G1 et G2 et les brevicans clivés au niveau du cœur protéique à côté du domaine G1. Au sein du SNC, la MMP-9 a été plus largement étudiée, notamment dans son rôle de dégradation de la matrice extracellulaire condensée en PNN (Wen et al., 2017).

### **D. Fonctions physiologiques**

La matrice extracellulaire est composée majoritairement de sucres chargés négativement ce qui entraîne un environnement polyanionique (Brückner et al., 1993). Cette caractéristique permet à la matrice d'être un réservoir d'ions chargés positivement comme le  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$  et  $\text{Fe}^{3+}$ . Nous retrouvons cette matrice extracellulaire condensée principalement autour d'interneurones à parvalbumine (PV) à décharge rapide. La différence des concentrations

ioniques, rendue possible par ce microenvironnement, facilite les décharges à hautes fréquences de ces interneurons (Härtig et al., 1999). De même, l'interaction des PNN avec l'ion  $Fe^{3+}$  limite le stress oxydatif (Suttkus et al., 2014), comme le suggère l'analyse des lignées transgéniques KO pour *Hapln1*, *Tn-R* ou *aggrecan*. Cette caractéristique protectrice a été confortée par son importance dans les lignées de souris défectueuses pour la synthèse du glutathion (Cabungcal et al., 2013).

Une deuxième fonction de la matrice extracellulaire est son rôle de barrière physique. Les cellules entourées de PNN sont plus résistantes à la neurotoxicité du peptide  $\beta$ -amyloïde (Miyata et al., 2007). Ce rôle de barrière peut aussi intervenir dans la compartimentation des récepteurs au niveau de la membrane, notamment en contrôlant la diffusion latérale des récepteurs  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-méthylisoazol-4-propionate (AMPA). Dans des cultures d'hippocampe, l'hydrolyse des PNN augmente le coefficient de diffusion de chaque récepteur, donc la surface qu'il explore (Frischknecht et al., 2009).

Enfin le thème de la fonction de signalisation des PNN sera le plus développé dans ce manuscrit, notamment à travers l'importance des motifs des GAG dans la fonction des PG. Ces sucres ont de nombreux variants aussi bien par le nombre et la longueur de leurs chaînes que par leur patron de sulfatations. Les études de Sasisekharan et Venkataraman ont montré qu'il y avait plus de  $10^6$  possibilités de sulfatations pour un seul octasaccharide (Sasisekharan and Venkataraman, 2000). Ces différentes sulfatations jouent un rôle primordial dans la reconnaissance des facteurs extracellulaires. L'un des exemples le mieux décrit est la liaison des Fibroblast growth factors (FGF) aux différents HS. En effet, la 2-*O* sulfatation du HS est nécessaire à la reconnaissance du FGF-2, quand le HS 6-*O* sulfaté est reconnu par FGF-10 (Ashikari-Hada et al., 2004; 2009). De même, la Semaphorine-3A (Sema3A) et l'homéoprotéine Otx2 reconnaissent-elles les CS de la matrice extracellulaire, majoritairement la forme disulfatée CS-E (Beurdeley et al., 2012; Miyata et al., 2012; Dick et al., 2013). Les GAG permettent aussi de favoriser les interactions protéine-protéine, comme celle d'une protéine et de son récepteur, initialement étudiée pour le complexe ternaire composé de HS, FGF et son récepteur FGFR (Ornitz, 2000). De même, Sema3A interagit-elle avec divers récepteurs membranaires, tels que les membres de la famille des plexines, interactions stabilisées par la neuropiline-1 (NP1). Au niveau des cellules PV, on trouve de nombreuses

plexines et de GAG, mais NP1 semble absent, ce qui suggère que l'interaction de Sema3A avec son récepteur pourrait être stabilisée par les CS de la MEC (de Winter et al., 2016).

### III. Périodes critiques

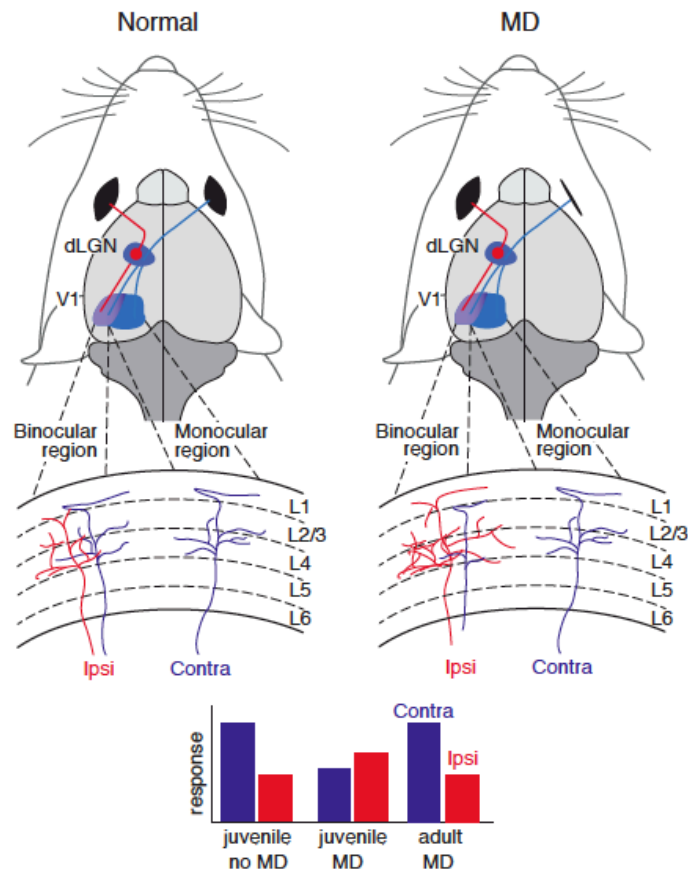
---

#### A. Apprentissage durant le développement

L'apprentissage est possible tout au long de notre développement postnatal et chez l'adulte, mais il est plus performant au cours de périodes de plasticité, appelées périodes critiques. Durant ces périodes, certaines régions du cerveau peuvent être spécifiquement et fortement remodelées en adaptation aux changements d'environnement. Les différentes périodes critiques ne sont pas synchrones. Les aires primaires sensorielles (odorat, audition, vision), viennent en premier, suivies par celles du langage (chez *sapiens*), de la locomotion et enfin par les aires cognitives. Un exemple classique de période critique concerne l'apprentissage de la vision binoculaire et l'amblyopie induite par un déficit de stimulation visuelle d'un des deux yeux sur un temps prolongé. Chez des enfants de 7 à 17 ans les traitements sont possibles mais moins efficaces que durant la période critique (Scheiman et al., 2005). Cette perte partielle de plasticité chez l'adulte, nécessaire à la consolidation de l'apprentissage, présente aussi des inconvénients comme les difficultés d'apprentissage d'une nouvelle langue ou la réparation réduite des circuits corticaux endommagés.

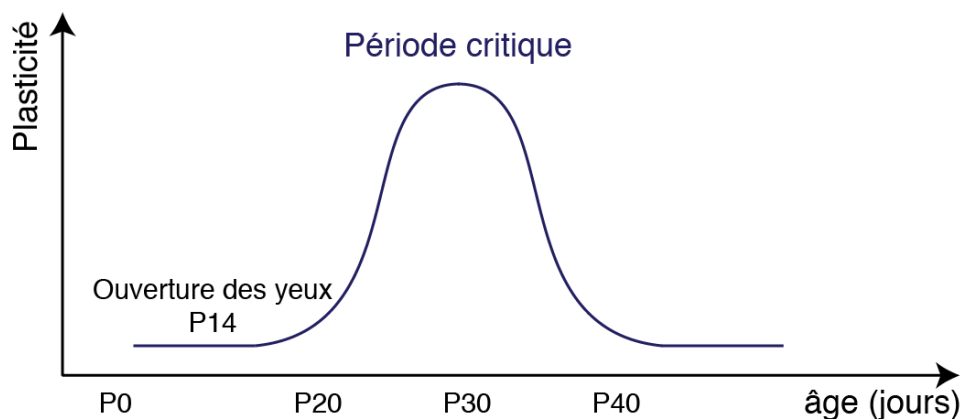
#### B. Modèle de plasticité de la vision binoculaire

Les études pionnières de Wiesel et Hubel chez le chat ont montré que les afférences thalamiques au niveau du cortex visuel primaire (V1) étaient organisées en colonnes. La couche IV, pouvant répondre à une stimulation des deux yeux, est le lieu de compétition des afférences thalamiques limité à une période précise du développement postnatal. En effet, ces deux chercheurs ont démontré par déprivation monoculaire (MD) qu'il existe une période précise, durant laquelle la fermeture de l'œil entraîne une perte permanente de son acuité visuelle. Cette MD n'affecte pas l'œil en lui-même, ni le corps géniculé latéral (LGN) mais modifie les afférences dans la couche IV de V1 avec diminution du nombre d'afférences venues du LGN correspondant à l'œil fermé, au profit de celles correspondant à l'œil resté ouvert (Figure 11). A la suite de ces études faites chez le chat, la plasticité de dominance oculaire par MD a été étudiée dans de nombreux autres modèles, comme la souris (Gordon and Stryker, 1996), le furet (Issa et al., 1999) et le macaque (Horton and Hocking, 1997). Dans tous les cas, la MD entraîne une modification importante, quantifiable et reproductible de l'innervation au niveau du seul cortex.



**Figure 11 : Période critique de dominance oculaire**

Les afférences thalamiques de l'œil contralatéral (en bleu) et de l'œil ipsilatéral (en rouge) sont en compétitions dans la zone binoculaire (en violet). L'occlusion monoculaire (MD) d'une souris juvénile diminue les afférences de l'œil contralatéral et ainsi la réponse associée dans le cortex visuel. Aucune modification de réponse n'est observée après une MD chez l'adulte (Extrait de (Di Nardo et al., 2018)).



**Figure 12 : Fenêtre temporelle de plasticité chez la souris**

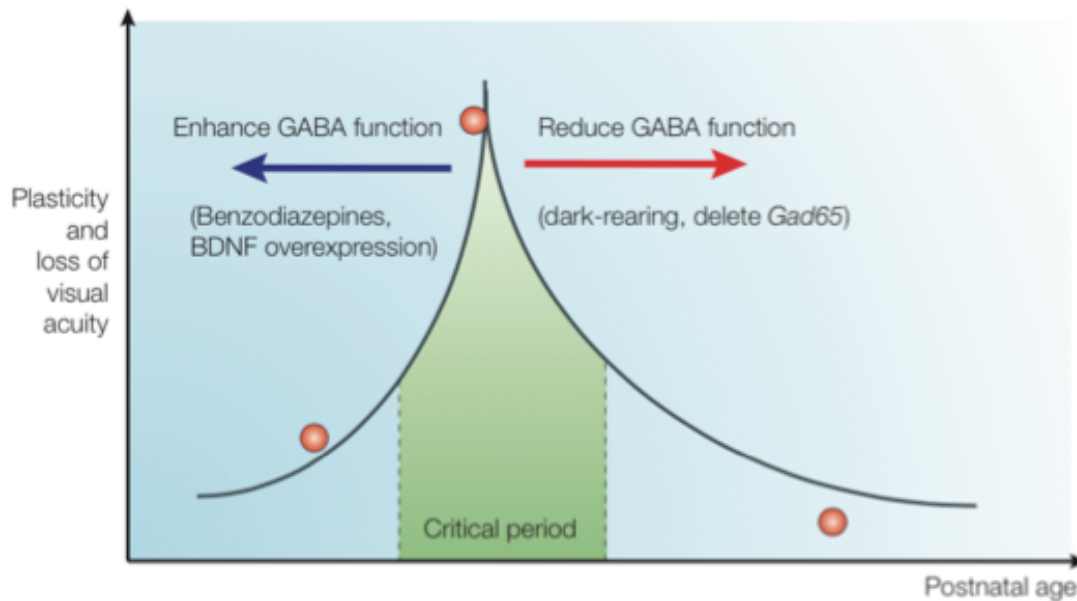
La plasticité de dominance oculaire chez la souris est bien déterminée dans le temps. Après l'ouverture des yeux à 14 jours après la naissance (P14), l'ouverture de plasticité se réalise à P20 avec un pic de plasticité à P30 et se ferme à P40.

Grâce à ces qualités, l'analyse des facteurs régulant les périodes critiques a été principalement menée dans le modèle de l'établissement de la vision binoculaire.

Chez la souris, il n'y a pas de colonne de dominance oculaire, mais il existe au niveau du cortex visuel primaire une zone précise qui répond à la stimulation de chaque œil. Cette zone s'appelle la zone binoculaire et possède une dominance oculaire cellule par cellule. Par ailleurs, du fait de la disposition latérale de ses yeux, la souris présente une dominance naturelle pour l'œil contralatéral. En réalisant des MD à différents âges, il a été établi que la période critique pour la vision binoculaire débute à P20, soit 6 jours après ouverture des yeux, présente un pic de plasticité à P30 et se ferme rapidement après P40 (Figure 12) (Gordon and Stryker, 1996). Une MD effectuée chez des souris avant P20 ou après P40 entraîne donc peu de modifications de la dominance oculaire, mais une MD effectuée durant la fenêtre de plasticité entraîne des modifications visibles (Figure 11). Une MD de 3 jours entraîne une forte diminution de la réponse de l'œil fermé sans modification de la réponse de l'œil resté ouvert, ce qui caractérise la plasticité hebbienne. En revanche une MD de 5 jours ajoute à la diminution de la réponse à l'œil fermé une augmentation de la réponse de l'œil resté ouvert, ce qui marque une coopération entre plasticités hebbienne et homéostatique dont les mécanismes sont distincts (Espinosa and Stryker, 2012).

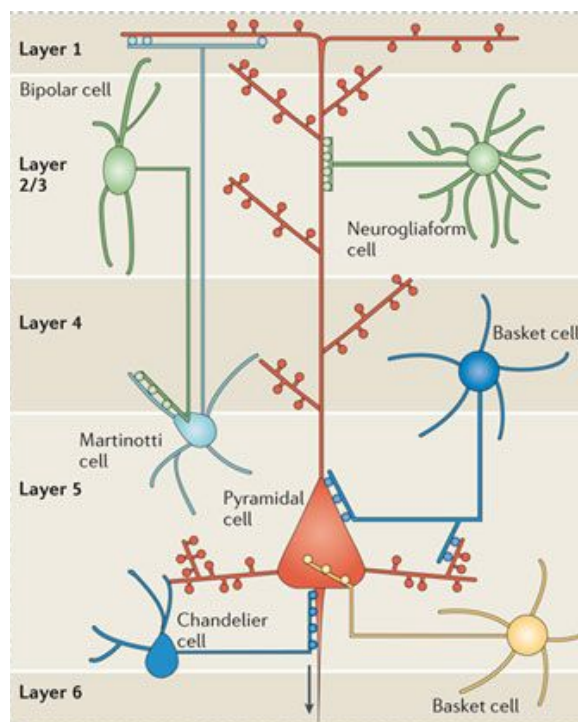
### **C. Balance excitation-inhibition**

La balance excitation-inhibition est primordiale à la compréhension de la période critique. Le neurotransmetteur acide  $\gamma$ -aminobutyrique (GABA) a un rôle inhibiteur et est synthétisé par la glutamate décarboxylase (GAD). Des deux isoformes de GAD, GAD65 et GAD67, GAD67 est responsable de 90% de la synthèse de GABA et les souris KO pour *GAD67* meurent à la naissance. A l'inverse, les souris KO pour *GAD65* sont viables et présentent des concentrations de GABA ainsi qu'une dominance oculaire normales. Néanmoins, une MD chez ces souris durant la période critique n'a pas d'effets (Hensch et al., 1998), mais la plasticité peut être restaurée par l'augmentation de l'affinité du GABA pour ses récepteurs grâce au diazépam. Curieusement, cette restauration est possible à n'importe quel âge chez ces souris, ce qui souligne l'importance du niveau de la transmission inhibitrice dans la plasticité transitoire du cortex visuel.



**Figure 13 : La période critique est dictée par la fonction du GABA**

La période critique de la dominance oculaire peut être avancée en augmentant la fonction de GABA. Une réduction du fonctionnement de GABA entraîne un délai de plasticité (Extrait de (Hensch, 2005)).



**Figure 14 : Localisation des neurones dans les couches du cortex**

Diversité des interneurones et organisation du cortex visuel en six différentes couches (notées 1 à 6). Les cellules à parvalbumine font parties des interneurones en paniers (Basket cell, en bleu) présents dans la couche IV du cortex visuel. Leurs synapses sur le soma des cellules pyramidales sont nécessaires à la période critique (Extrait de (Marín, 2012)).

L'importance de la maturation du circuit inhibiteur a été confirmée par des expériences de privation sensorielle. En effet, une diminution de la quantité de Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF), une perte de maturation du circuit inhibiteur et un retard de la période critique sont observés chez les souris élevées sans lumière. En revanche lorsque, chez ces même souris, les neurones GABAergiques sont forcés dans leur maturation (diazépam ou BDNF), le retard d'ouverture de plasticité est aboli. De façon similaire, l'ouverture de la période critique peut être avancée par la maturation précoce des neurones GABAergique provoquée par l'addition de benzodiazépine, la surexpression du *BDNF* ou la diminution des quantités d'acide polysialique (PSA) (Figure 13) (Huang et al., 1999; Di Cristo et al., 2007). Une diminution drastique de la quantité de PSA est normalement observée après l'ouverture des yeux, ce qui correspond à la maturation de la NCAM dont les formes immatures sont, en effet, polysialylées. Comment un changement de modification post-traductionnelle de la NCAM entraîne-t-il une maturation des cellules GABAergique n'est pas clair, même si l'avancement observé de la période critique en est le résultat prévisible (Di Cristo et al., 2007).

Les neurones GABAergique ne comptent que pour 20 % des neurones corticaux, mais présentent une forte diversité, au niveau de leur morphologie, de leur localisation, de leurs propriétés électrophysiologiques et dans l'expression de certains gènes. On distingue trois types d'interneurones sur la base de l'expression différentielle de PV, de somatostatine ou du récepteur à la sérotonine 5HT<sub>3aR</sub>. La majorité des données impliquent les interneurones PV dans le contrôle de la plasticité. Ces cellules à décharges rapides peuvent être catégorisées en deux groupes : les larges cellules en panier qui projettent leurs synapses sur le soma et les régions périsonomatiques des cellules pyramidales et les cellules en chandeliers qui se connectent au segment initial de l'axone des cellules pyramidales. Les premières constituent le type le plus commun d'interneurones et sont présentes de la couche II à VI du néocortex, avec une quantité plus importante dans les couches IV et V. Leurs décharges rapides impliquent une faible résistance aux signaux d'entrée et génèrent de courts potentiels d'action. Les secondes se connectent au segment initial de l'axone des cellules pyramidales, sont aussi retrouvées dans les couches de II à VI (Figure 14), mais déchargent plus lentement que les cellules en panier. L'inhibition des cellules pyramidales par les cellules PV implique les récepteurs somatiques GABA<sub>A</sub> contenant la sous-unité  $\alpha 1$  (Fagiolini et al., 2004).



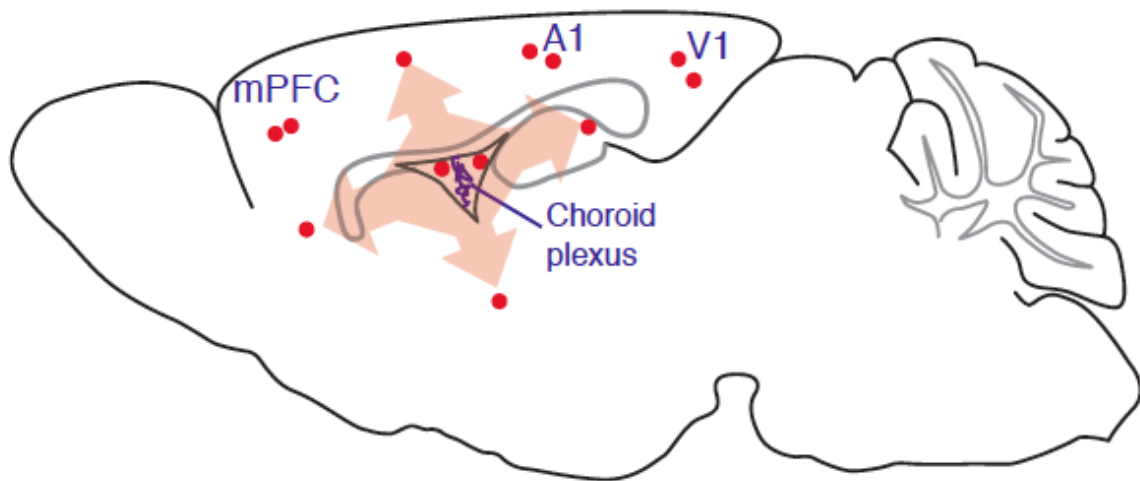
La balance entre excitation et inhibition atteinte à la fin de la période critique par la maturation des systèmes inhibiteurs est nécessaire au maintien de l'état non plastique du cerveau adulte. L'inhibition restreint la plasticité chez l'adulte, comme le démontre l'augmentation de plasticité qui suit une diminution du niveau de GABA chez le rongeur adulte obtenue grâce à un antagoniste GABAergique (picrotoxine) ou par inhibition de la synthèse de GABA (MPA) (Harauzov et al., 2010). La maturation des cellules inhibitrices affecte non seulement le niveau d'inhibition mais encore modifie la qualité de la transmission synaptique inhibitrice de façon autonome cellulaire. En effet, après transplantation de neurones inhibiteurs provenant de souris entre P12 et P16 dans le cortex de nouveau-nés, la période critique s'ouvre lorsque les neurones transplantés ont atteint « l'âge plastique » de P30 même si l'environnement est « pré-plastique » (Southwell et al., 2010).

#### **D. Modifications épigénétiques**

L'expression de très nombreux gènes est modifiée au cours de la fenêtre de plasticité (Prasad et al., 2001). Certaines de ces modifications sont rendues possible par des changements du statut épigénétique de la chromatine. Les modifications épigénétiques permettent un remaniement de la chromatine et contrôlent ainsi son état de compaction. Ces niveaux de compactations en euchromatine et en hétérochromatine influent directement sur l'accessibilité de l'ADN et l'expression génétique. La régulation peut notamment s'effectuer par modifications post-traductionnelles des histones (méthylation, acétylation, ubiquitination, sumoylation, phosphorylation, poly(ADP)ribosylation) et par méthylations de l'ADN. La méthylation de l'ADN transforme la cytosine en 5-méthylcytosine (5mC), le plus communément sur des dinucléotides CpG et, pour le système nerveux, CpA. Ces deux modifications interfèrent : la méthylation de l'ADN par une méthyltransférase entraîne le recrutement de complexes contenant des enzymes qui « déacetylent » les histones (HDAC), ce qui condense la chromatine. La méthylation des cytosines permet le recrutement de plusieurs protéines, notamment la methyl-CpG-binding protein 2 (MeCP2) communément connue comme répresseur de la transcription une fois liée à la 5mC (Mellén et al., 2012), mais aux effets parfois activateurs après liaison à la 5-hydroxyméthylcytosine (5hmC).

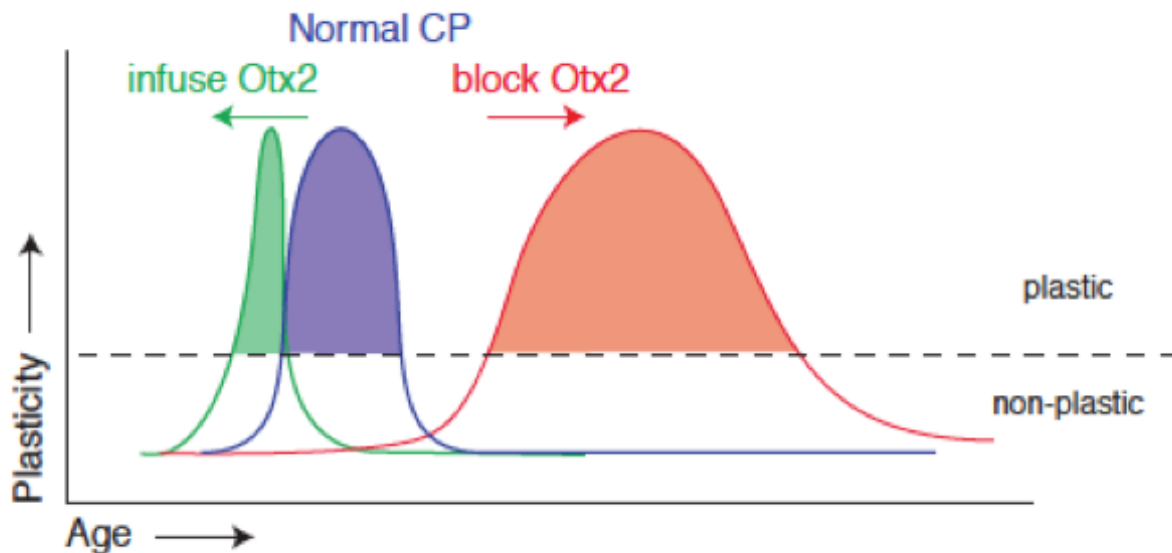
Les premiers stimuli visuels entraînent une phosphorylation d'histones dépendantes de ERK (Putignano et al., 2007). La fermeture de la période critique de dominance oculaire est

généralement associée à une diminution de l'acétylation et de la phosphorylation des histones. La présence de formes déacétylées des histones favorise la condensation de la chromatine et diminue l'expression de certains gènes. Ainsi une réouverture de fenêtre de plasticité pour la vision binoculaire chez l'adulte est-elle rendue possible en augmentant les formes acétylées des histones par l'action d'inhibiteurs de HDAC (Putignano et al., 2007). L'utilisation de souris à délétion conditionnelle pour *MeCP2* a permis de mettre en évidence l'importance de cette protéine dans la régulation de la période critique (He et al., 2014). Une délétion spécifique de *MeCP2* dans les cellules PV entraîne un retard d'initiation de la plasticité du cortex visuel. En revanche, aucune modification de cette période critique n'est observée après délétion de ce gène dans les interneurons à somatostatine ou les cellules pyramidales. Tandis que les homéoprotéines ont été décrites comme ayant un rôle dans le remodelage de la chromatine (Rekaik et al., 2015; Hannon et al., 2017), avec une action qui dépend de leur concentration (Hannon et al., 2017), leur rôle possible au niveau épigénétique dans la plasticité du cortex visuel n'a pas été étudié.



**Figure 15 : Distribution d'Otx2 dans le cortex**

Les plexus choroïdes sécrètent Otx2 (points rouge) au sein du liquide cérébro-spinal. Otx2 est retrouvé dans le cortex et il a été démontré qu'il y contrôle la plasticité des cortex primaires visuel (V1) et auditif (A1) et du cortex préfrontal médian (mPFC) (Extrait de (Di Nardo et al., 2018)).



**Figure 16 : Otx2 contrôle la période critique de dominance oculaire**

La période critique (CP) de plasticité (en bleu) peut être avancée par infusion d'Otx2 (en vert) ou retardée en bloquant Otx2 (en rouge) (Extrait de (Di Nardo et al., 2018)).

## IV. Otx2 dans la plasticité

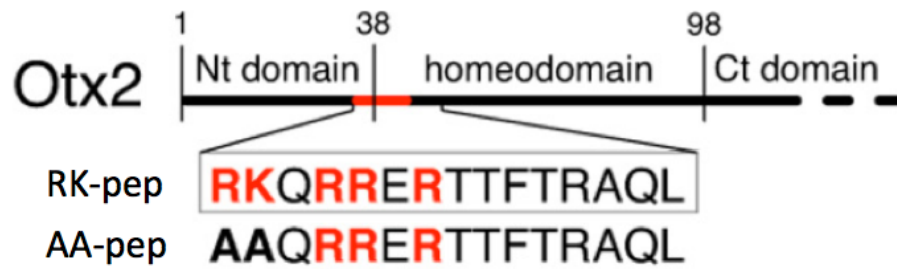
---

### A. Contrôle la fenêtre de plasticité

J'ai rapidement évoqué plus haut l'importance du rôle d'Otx2 dans le développement embryonnaire. Au cours du développement postnatal, l'expression d'Otx2 est restreinte à certaines régions précises dont la glande pinéale, le plexus choroïde, la rétine, le LGN, le colliculus supérieur et le cervelet. Au niveau du cortex, le locus d'Otx2 est totalement silencieux mais la protéine y est présente (Spatazza et al., 2013b). Il a été démontré que l'homéoprotéine Otx2 contrôle, de façon non-autonome directe, la plasticité de plusieurs régions du cortex cérébrale, comme V1, le cortex auditif primaire A1 et le cortex préfrontal médian (mPFC) (Figure 15) (Lee et al., 2017).

Les premières études ont porté sur le cortex visuel et le contrôle de la plasticité de la dominance oculaire. Les expériences de perte et de gain de fonction d'Otx2 dans le cortex visuel ont démontré que cette homéoprotéine régule la maturation des cellules PV et la condensation de la matrice extracellulaire en PNN. Ces modifications dictent l'ouverture et la fermeture de la période critique de vision binoculaire (Sugiyama et al., 2008). En effet, les souris hétérozygotes pour *Otx2* (*Otx2<sup>+GFP</sup>*) présentent un délai d'ouverture de la fenêtre de plasticité. A contrario, l'infusion d'Otx2 exogène dans le cortex V1 de souris avant P18 entraîne une ouverture précoce de cette fenêtre (Figure 16). La quantité d'Otx2 présente au niveau des cellules PV du cortex visuel est dépendante de l'activité visuelle. En effet, chez des souris élevées dans le noir, on observe une réduction de près de 70% de cette quantité, traduite par un délai de maturation des cellules PV et d'ouverture de la période critique (Sugiyama et al., 2008). Mais un retour à la normalité de la maturation des cellules PV et du marquage des PNN est rendu possible par infusion d'Otx2 exogène chez ces souris élevées dans le noir (Sugiyama et al., 2008).

Dans les conditions physiologiques, tout comme après son infusion, Otx2 est retrouvé à plus de 90% dans les cellules GAD67 positives et ce sont les interneurons PV qui l'internalisent majoritairement (71%) tandis que les neurones à calrétinine (CR) en internalisent environ 17%.



**Figure 17 : Domaine d'Otx2 reconnaissant les glycosaminoglycanes**

La séquence d'Otx2 (trait noir) contient un motif de reconnaissance des glycosaminoglycanes (trait rouge) riche en arginine (R) et lysine (K). La mutation de la séquence RK du RK-pep par deux alanines (A) entraîne une diminution d'interaction avec les GAG des PNN (Extrait de (Beurdeley et al., 2012)).

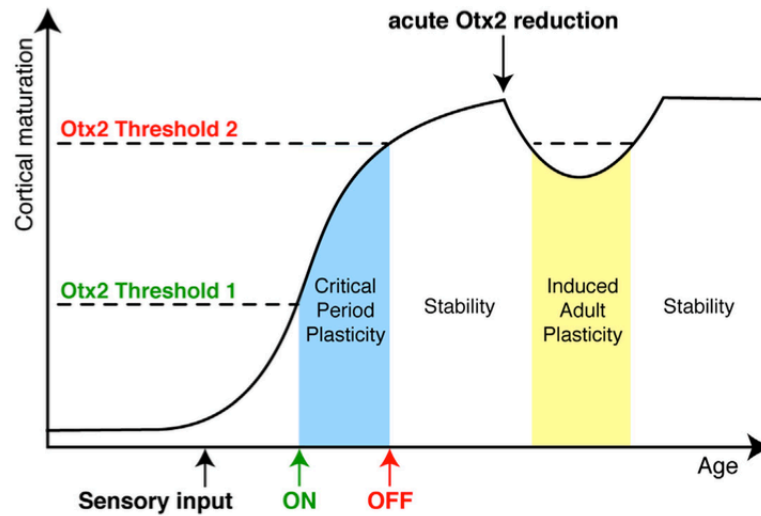
## B. Spécificité de reconnaissance

La quantité d'Otx2 dans les cellules PV est diminuée après déstructuration de la matrice extracellulaire condensée en PNN, effectuée par son hydrolyse avec la chondroitinase ABC (ChABC) ou par la modification du statut rédox des cellules PV (Beurdeley et al., 2012; Morishita et al., 2015). Cela suggère l'existence d'un motif de reconnaissance d'un partenaire présent dans les PNN. Un domaine de reconnaissance des GAG (RKQRRER) a été identifié au niveau de la première hélice de l'homéodomaine en position N-terminale d'Otx2 (Figure 17) (Beurdeley et al., 2012). L'identification de ce domaine a mené à la synthèse d'un peptide de 15 acides aminés (RKQRRERTTFTRAQL) appelé peptide RK (RK-pep) pour souligner l'importance des acides aminés arginine-lysine (RK) dans la reconnaissance des GAG. En effet, remplacer ces deux acides aminés par deux alanines (AA-pep) abolit la spécificité de reconnaissance des cellules PV (Beurdeley et al., 2012). Une lignée de souris transgénique a été réalisée, en mutant ce doublet RK en AA (la lignée *Otx2<sup>+AA</sup>*), ce qui diminue peu l'action cellulaire autonome d'Otx2, mais altère son interaction avec la matrice extracellulaire (Bernard et al., 2014) et sa spécificité d'adressage aux cellules PV du cortex visuel, retardant la maturation de ces cellules et l'ouverture de la fenêtre de plasticité (Lee et al., 2017).

Le patron de sulfatation des CS est important pour la reconnaissance d'Otx2. Les expériences de calorimétries de titration isotherme avec différents CS commerciaux et le RK-pep ont démontré que ce domaine de reconnaissance aux sucres avait une plus forte affinité pour les formes disulfatées CS-D et CS-E (Beurdeley et al., 2012). La protéine entière Otx2 se lie à un hexasaccharide synthétique analogue au CS-E (Despras et al., 2013). Cette reconnaissance préférentielle a été aussi démontrée *in vivo* chez des souris où la diminution du ratio 4S/6S, favorisant le CS-A au détriment du CS-E, entraîne une réduction d'accumulation d'Otx2 dans les cellules PV (Miyata et al., 2012).

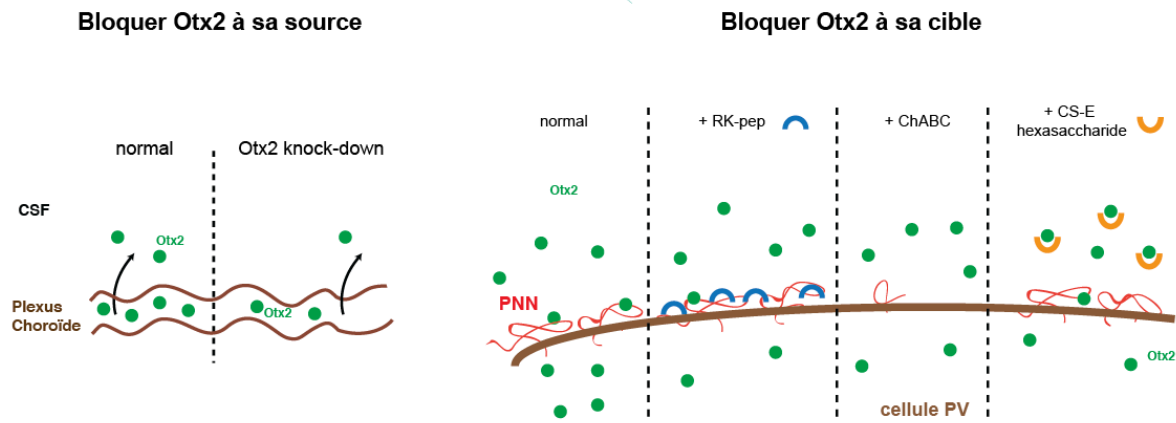
## C. Boucle de rétrocontrôle positive Otx2/PNN

La condensation de la matrice extracellulaire autour des cellules PV est nécessaire à la reconnaissance d'Otx2, mais est elle-même régulée par l'accumulation d'Otx2. L'infusion d'Otx2 avant la période critique, entraîne une augmentation des PNN et clos précocement la fenêtre de plasticité (Sugiyama et al., 2008).



**Figure 18 : Modèle à deux seuils du contrôle de la plasticité par Otx2**

L'accumulation d'Otx2 dans les cellules PV entraîne une maturation corticale. A partir d'un premier seuil d'accumulation d'Otx2 il y a ouverture de la fenêtre de plasticité. Le franchissement du second seuil entraîne une fermeture de la plasticité et le maintien de l'état non-plastique du cerveau adulte. Une réduction d'Otx2 chez l'adulte entraîne une induction transitoire de la plasticité (Extrait de (Prochiantz and Di Nardo, 2015)).



**Figure 19 : Méthodes de réouverture de plasticité en interférant avec Otx2**

La modification de synthèse d'Otx2 par les plexus par un knock-down d'Otx2 diminue la quantité d'Otx2 dans le cortex visuel. Il est possible de modifier l'interaction d'Otx2 avec les PNN, soit en utilisant le séquence de reconnaissance aux GAG (RK-pep), soit en hydrolysant la matrice avec la chondroitinase ABC (ChABC), soit en infusant un CS-E synthétique (CS-E hexasaccharide) (Adapté de la thèse de Clémence Bernard).

Chez les souris élevées dans le noir, il y a un retard d'accumulation des PNN qui peut être rétabli par l'ajout d'Otx2 exogène (Sugiyama et al., 2008). A l'inverse, un retard de maturation des PNN est observé dans les modèles de pertes de fonctions d'Otx2, notamment avec les souris *Otx2<sup>+/-GFP</sup>* et *Otx2<sup>+/-AA</sup>* (Lee et al., 2017). Lorsqu'on réduit l'expression *Otx2* spécifiquement dans les plexus choroïdes, on observe une diminution de la condensation de la matrice en PNN dans le cortex visuel (Spatazza et al., 2013b). De même, bloquer l'internalisation préférentielle d'Otx2 dans les cellules PV au cours du développement par compétition de reconnaissance avec l'infusion du RK-pep entraîne une diminution de la condensation en PNN (Beurdeley et al., 2012). Le transfert d'Otx2 régule la maturation des PNN entourant les cellules PV. Cette condensation pourrait clôturer la période critique et maintenir la stabilité chez l'adulte en attirant Otx2, ce qui suppose l'existence d'une boucle de rétrocontrôle positive entre Otx2 et les PNN.

#### **D. Réouverture de plasticité chez l'adulte**

Ces études sur Otx2 ont conduit à un modèle à deux seuils d'accumulation d'Otx2 dans les cellules PV régulant la fenêtre de plasticité du cortex visuel (Figure 18). Le franchissement du premier seuil d'accumulation d'Otx2 dans les cellules PV entraîne l'ouverture de la période critique. Cette période de plasticité se ferme dès qu'Otx2 atteint un second seuil. Chez l'adulte cette accumulation est nécessaire au maintien de l'état non plastique. Ainsi, diminuer la quantité d'Otx2 dans les cellules PV, et repasser en dessous du deuxième seuil, entraîne une réouverture de plasticité. Cette réouverture de plasticité a pu être réalisée avec différents modèles impliquant Otx2 directement ou indirectement (Figure 19). L'hydrolyse totale des PNN à l'aide de la ChABC démontre l'importance des PNN au maintien de l'état non plastique chez l'adulte (Pizzorusso et al., 2002). Mais cette méthode influe non seulement sur la matrice condensée en PNN mais encore sur la matrice diffuse, ce qui rend délicate l'interprétation de cette expérience. D'autres façons de rouvrir la plasticité ciblant plus précisément Otx2 peuvent être effectuées à la source, de part un knock-down conditionnel de la synthèse d'Otx2 par le plexus (Spatazza et al., 2013b) ou à la cible en modifiant son interaction avec la MEC (Figure 19). Ceci a été réalisé soit par séquestration d'Otx2 après l'infusion d'un analogue synthétique du CS-E (hexasaccharide) (Despras et al., 2013), soit en bloquant les sites de la matrice reconnus par Otx2 grâce au RK-pep. Ces expériences suggèrent qu'il est possible d'accroître la plasticité du cortex cérébral adulte en modifiant la quantité d'Otx2 s'accumulant



dans les cellules PV. Ceux sont des pistes intéressantes à envisager pour de nouvelles approches thérapeutiques de certaines pathologies impliquant un défaut de plasticité du cortex cérébral telles que l'amblyopie, certaines maladies psychiatriques et à la suite d'un accident vasculaire cérébrale. De fait, l'utilisation thérapeutique d'une de ces méthodes (RK-pep) a permis de guérir l'amblyopie chez des souris adultes (Beurdeley et al., 2012).

## V. Objectifs de la thèse

---

L'homéoprotéine Otx2 est une molécule essentielle à la mise en place des fenêtres de plasticité du cortex cérébral. L'aspect fondamental de son activité réside dans sa capacité de transfert intercellulaire, depuis une source extra-corticale jusqu'aux cellules PV. Cette action non-autonome est délicate à étudier puisque les deux séquences nécessaires à ce transfert (pénétratine et  $\Delta I$ ) sont situées au sein même de l'homéodomaine. Ainsi, toute mutation directe de ces séquences modifie à la fois l'activité autonome et non-autonome des homéoprotéines. Le premier objectif de ma thèse était de développer un outil permettant de distinguer l'activité autonome et non-autonome d'Otx2, outil qui pourra être généralisé aux autres homéoprotéines.

Les cellules PV sont nécessaires à la synchronisation des différentes régions corticales et à la balance excitation-inhibition. Les PNN sont le plus souvent associés à ces cellules dans la couche IV du cortex, et leur étude a donc pris une place de plus en plus importante dans la littérature. Dans le contexte de la plasticité du cortex visuel, Otx2 s'accumule dans les cellules PV, entraîne une maturation de ces cellules et une condensation de leur matrice extracellulaire. Cette condensation en PNN est nécessaire à la reconnaissance préférentielle des cellules PV par Otx2. En revanche, les mécanismes par lesquels Otx2 régule la maturation de ces cellules et la condensation en PNN restent très peu connus mais seront nécessaires au développement d'outils pour contrôler les fenêtres de plasticité. Le deuxième objectif de ma thèse était donc de comprendre les mécanismes moléculaires d'action d'Otx2 dans les cellules PV.

Les PNN ont un rôle fondamental dans la physiologie du cortex cérébral grâce à leur structure et leur organisation spatiale. Les GAG de cette matrice interagissent avec de nombreux facteurs extracellulaires grâce à des interactions électrostatiques et stéréochimiques, comme par exemple l'interaction entre Otx2 et le CS-E contenu dans les PNN. Le dernier objectif de ma thèse était donc de développer un outil permettant d'étudier l'interaction entre homéoprotéines et PNN, afin de pouvoir bloquer le transfert des homéoprotéines et moduler leurs activités non-autonomes.

Les résultats obtenus vont être présentés en trois axes principaux :

**Article 1 : un modèle de souris à sécrétion conditionnelle d'anticorps simple-chaîne fournit la preuve génétique de l'activité non-autonome d'une homéoprotéine pour la régulation de la plasticité corticale.**

Cette première étude a permis de développer un outil permettant la distinction des actions autonomes et non-autonomes d'Otx2. Pour établir cette distinction, il était nécessaire de neutraliser Otx2 dans le milieu extracellulaire lors de son transfert. Les études précédentes du laboratoire ont montré que l'infusion d'un anticorps anti-Otx2 directement dans le cortex visuel permettait sa neutralisation (Sugiyama et al., 2008). De même, l'utilisation d'une fusion de la partie variable de la chaîne lourde et de la chaîne légère d'un anticorps (formant un anticorps simple chaîne, scFv) permet de bloquer l'activité non-autonome des homéoprotéines chez le poulet et le poisson zèbre (Lesaffre et al., 2007; Di Lullo et al., 2011). Ainsi, nous avons développé une stratégie similaire pour séquestrer Otx2 directement dans le milieu extracellulaire grâce à un anticorps scFv dirigé contre cette protéine (anti-Otx2 scFv). Nous avons mis en place une lignée de souris transgénique (*scFvOtx2<sup>tg/o</sup>*) afin d'étudier l'impact de la sécrétion de l'anti-Otx2 scFv *in vivo* chez le rongeur. La caractérisation de la lignée *scFvOtx2<sup>tg/o</sup>* a été réalisée en répondant aux questions suivantes :

- L'anti-Otx2 scFv peut-il se lier à la protéine Otx2 ?
- L'anti-Otx2 scFv peut-il séquestrer Otx2 dans le milieu extracellulaire *in vivo* ?
- L'action de l'anti-Otx2 scFv est-elle suffisante pour moduler la plasticité du cortex visuel ?

**Article 2 : la régulation de la plasticité du cortex visuel par l'activité non-autonome de l'homéoprotéine Otx2 s'effectue via Gadd45b/g**

Cette étude a permis de mettre en avant les cibles transcriptionnelles d'Otx2 dans les cellules PV pour le contrôle de la période critique du cortex visuel. Les questions élucidées par cette étude sont les suivantes :

- Quelles sont les cibles directes de l'Otx2 transféré dans le cortex visuel ?
- Otx2 se lie-t-il physiquement au promoteur de *Gadd45b/g* ?
- L'action de Gadd45b est-elle suffisante pour contrôler la plasticité du cortex visuel ?
- Otx2 et Gadd45b modifient-ils le statut épigénétique des cellules PV ?

### **Article 3 : utilisation de peptides enrichis en acide cystéique comme mimes bioactif de glycosaminoglycanes**

Otx2 influence la plasticité du cortex cérébral et la maturation des PNN, ce qui lui confère un potentiel thérapeutique. Pour aller plus loin dans cette hypothèse, il est nécessaire d'avoir des méthodes de contrôle de la quantité d'Otx2 extracellulaire. Puisqu'Otx2 reconnaît le CS-E de la matrice extracellulaire, une possibilité est d'interférer avec cette reconnaissance. Malheureusement, l'extraction, la purification et la synthèse de CS-E restent très difficiles. Ainsi nous avons cherché une alternative rapide, reproductible et efficace pour bloquer l'interaction GAG-Otx2. Dans cette partie plus biochimique, nous cherchons à répondre aux questions suivantes :

- Peut-on mimer un CS-E par une séquence peptidique ?
- Les motifs peptidiques utilisés ont-ils la même affinité pour Sema3A et Otx2 ?
- Peut-on modifier la plasticité du cortex visuel en utilisant un mime peptidique du CS-E ?



# RÉSULTATS



## **Article 1 : un modèle de souris à sécrétion conditionnelle d'anticorps simple-chaîne fournit la preuve génétique de l'activité non-autonome d'une homéoprotéine pour la régulation de la plasticité corticale.**

---

### **Objectif de l'étude :**

L'homéoprotéine Otx2 régule la plasticité du cortex visuel à travers son activité non-autonome. Ce transfert d'Otx2 a lieu grâce à une séquence d'internalisation (pénétratine) et une séquence de sécrétion ( $\Delta$ 1), situées au sein même de l'homéodomaine. Toute mutation directe d'une de ces séquences impacte donc directement l'action autonome et non-autonome des homéoprotéines. C'est pourquoi aucune étude génétique n'a été jusqu'alors réalisée pour séparer les activités autonomes et non-autonomes des homéoprotéines. Cette première étude avait donc pour objectif de développer un outil génétique permettant de séquestrer Otx2 dans le milieu extracellulaire lors de son transfert et de vérifier ainsi l'importance de son activité non-autonome dans la régulation de la plasticité du cortex visuel.

### **Méthodes :**

La stratégie développée a été de neutraliser Otx2 directement dans le milieu extracellulaire grâce à un anticorps simple-chaîne dirigé contre la protéine (anti-Otx2 scFv). Cet anticorps est constitué par fusion des parties variables des chaînes lourdes et légères d'un anticorps anti-Otx2. Une lignée de souris *scFvOtx2<sup>glo</sup>*, knock-in pour anti-Otx2 scFv, permet la sécrétion inductible de l'anticorps et le contrôle spatio-temporel de la neutralisation d'Otx2 extracellulaire. La validation de la construction a été réalisée par immunohistochimie, western-blot et co-immunoprécipitation. Les modifications physiologiques de la séquestration d'Otx2 ont été quantifiées par immunohistochimie de marqueurs de maturation des cellules PV (PV, WFA, Otx2), par qRT-PCR des gènes de plasticité (*Arc*, *Fos*, *Egr4* et *Nr4a1*) et par mesure d'acuité visuelle en imagerie optique.

### **Résultats :**

- Une culture de fibroblastes traitée avec une Cre recombinase perméable aux cellules (Cre-TAT) sécrète l'anti-Otx2 scFv. L'anticorps sécrété reconnaît la protéine Otx2 recombinante.
- A P30, l'anti-Otx2 scFv est exprimé dans le cortex visuel, *in vivo*, par les cellules PV dans la lignée *PV::Cre;scFvOtx2<sup>glo</sup>*. Dans ce modèle, l'anti-Otx2 scFv sécrété se lie avec la



protéine Otx2 endogène dans le cervelet (utilisé car beaucoup plus riche en Otx2 que le cortex).

- Bloquer Otx2 au niveau des cellules PV (avec la lignée *PV::Cre;scFvOtx2<sup>tg/o</sup>*) durant le développement postnatal entraîne une diminution de 20% de la quantité d'Otx2 internalisée, un retard de maturation des cellules PV et de la condensation de leur matrice extracellulaire en PNN (WFA), et une expression réduite des gènes de plasticité (*Fos*, *Egr4*, *Nr4a1*), ce qui suggère un délai de l'ouverture de la période critique de plasticité.
- Bloquer Otx2 dans le liquide cérébro-spinal de souris adultes entraîne une diminution de 20% d'Otx2 dans le cortex visuel. Cette diminution modifie l'état de maturation des cellules PV (marqueurs PV, WFA) et entraîne une augmentation de l'expression des gènes de plasticité dans la couche IV du cortex visuel. La réouverture de plasticité est confirmée par l'augmentation de l'acuité visuelle de l'œil resté ouvert après 4 jours d'occlusion monoculaire.

#### **Discussion :**

- Le scFv est sécrété mais il est possible qu'une partie de l'anticorps reste intracellulaire et agisse sur l'activité cellulaire autonome d'Otx2. Cette modification de l'activité cellulaire autonome peut être négligée étant donné que l'expression des cibles cellulaire autonomes d'Otx2 (par exemple *C1qL3*), n'est pas modifiée dans le plexus choroïde après induction de l'anti-scFv Otx2. De plus, cet effet n'est pas envisageable dans la lignée *PV::Cre;scFvOtx2<sup>tg/o</sup>* puisque les cellules PV n'expriment pas Otx2.
- L'effet de la sécrétion de l'anti-Otx2 scFv par les cellules PV, avec les souris *PV::Cre;scFvOtx2<sup>tg/o</sup>*, sur la diminution de la quantité d'Otx2 dans le cortex visuel est faible. Cela peut être dû à l'expression tardive de PV (à partir de P10). De plus, Otx2 reconnaît et se lie aux PNN du cortex, ce qui ne favorise pas la capture d'Otx2 par l'anti-Otx2 scFv.
- On observe la présence de 80% d'Otx2 dans le cortex visuel après deux semaines de séquestration d'Otx2 dans le CSF. Il est possible qu'Otx2 produit avant sécrétion de l'anti-scFv soit stable et persiste dans le cortex visuel. De plus, l'Otx2 cortical pourrait provenir en partie d'autres sources, comme la rétine ou la glande pinéale.

RESEARCH ARTICLE

# A Mouse Model for Conditional Secretion of Specific Single-Chain Antibodies Provides Genetic Evidence for Regulation of Cortical Plasticity by a Non-cell Autonomous Homeoprotein Transcription Factor

Clémence Bernard<sup>‡</sup>, Clémentine Vincent<sup>‡</sup>, Damien Testa<sup>‡</sup>, Eva Bertini, Jérôme Ribot, Ariel A. Di Nardo, Michel Volovitch, Alain Prochiantz<sup>\*</sup>

Centre for Interdisciplinary Research in Biology (CIRB), Collège de France, CNRS UMR 7241/INSERM U1050, PSL Research University, Paris, France

‡ These authors contributed equally to this work.

\* [alain.prochiantz@college-de-france.fr](mailto:alain.prochiantz@college-de-france.fr)



CrossMark  
click for updates

 OPEN ACCESS

**Citation:** Bernard C, Vincent C, Testa D, Bertini E, Ribot J, Di Nardo AA, et al. (2016) A Mouse Model for Conditional Secretion of Specific Single-Chain Antibodies Provides Genetic Evidence for Regulation of Cortical Plasticity by a Non-cell Autonomous Homeoprotein Transcription Factor. *PLoS Genet* 12 (5): e1006035. doi:10.1371/journal.pgen.1006035

**Editor:** Jean M. Hébert, Albert Einstein College of Medicine, UNITED STATES

**Received:** October 9, 2015

**Accepted:** April 18, 2016

**Published:** May 12, 2016

**Copyright:** © 2016 Bernard et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

**Funding:** The study was supported by ERC Advanced Grant HOMEOSIGN n°339379, ANR-11-BLAN-069467 BrainEver, Région Ile de France, Fondation Bettencourt Schueller and GRL program N°2009-00424. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

## Abstract

During postnatal life the cerebral cortex passes through critical periods of plasticity allowing its physiological adaptation to the environment. In the visual cortex, critical period onset and closure are influenced by the non-cell autonomous activity of the *Otx2* homeoprotein transcription factor, which regulates the maturation of parvalbumin-expressing inhibitory interneurons (PV cells). In adult mice, the maintenance of a non-plastic adult state requires continuous *Otx2* import by PV cells. An important source of extra-cortical *Otx2* is the choroid plexus, which secretes *Otx2* into the cerebrospinal fluid. *Otx2* secretion and internalization requires two small peptidic domains that are part of the DNA-binding domain. Thus, mutating these “transfer” sequences also modifies cell autonomous transcription, precluding this approach to obtain a cell autonomous-only mouse. Here, we develop a mouse model with inducible secretion of an anti-*Otx2* single-chain antibody to trap *Otx2* in the extracellular milieu. Postnatal secretion of this single-chain antibody by PV cells delays PV maturation and reduces plasticity gene expression. Induced adult expression of this single-chain antibody in cerebrospinal fluid decreases *Otx2* internalization by PV cells, strongly induces plasticity gene expression and reopens physiological plasticity. We provide the first mammalian genetic evidence for a signaling mechanism involving intercellular transfer of a homeoprotein transcription factor. Our single-chain antibody mouse model is a valid strategy for extracellular neutralization that could be applied to other homeoproteins and signaling molecules within and beyond the nervous system.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

## Author Summary

Classically, cell signaling is based on the secretion of molecules that bind cell surface receptors. Lipophilic agents can do without cell-surface receptors due to their ability to diffuse through the plasma membrane, but this is normally not the case for proteins, which cannot pass the membrane barrier. However, homeoprotein transcription factors represent an exception as they are secreted and internalized by live cells owing to two peptidic domains. An important illustration of this novel signaling mechanism is provided by Otx2, a homeoprotein that travels from the choroid plexus to specific inhibitory neurons in the cerebral cortex, where it regulates physiological plasticity throughout life. Because the two transfer peptides are in the DNA-binding domain of Otx2, it is impossible to mutate them without altering both cell signaling and cell-autonomous functions. We have therefore developed a mouse in which a secreted anti-Otx2 single-chain antibody can be induced to trap extracellular Otx2 while leaving its cell autonomous function untouched. We show that neutralizing extracellular Otx2 modifies the expression of plasticity genes in the visual cortex, thus providing the first genetic demonstration for homeoprotein signaling in a mammal.

## Introduction

During postnatal life, the cerebral cortex passes through critical periods (CPs) of plasticity allowing the neuronal circuitry to shape in response to environmental stimuli. CPs are driven by the maturation of a subset of inhibitory interneurons, the fast-spiking parvalbumin-expressing GABAergic neurons (PV cells), present in layers III and IV of the cerebral cortex [1]. Plasticity terminates with the full maturation of PV cells and the consolidation of the Excitation/Inhibition (E/I) cortical balance [2]. CPs for different sensory, motor or cognitive behaviors are spread out during postnatal development and thus open and close at different times [3]. In the mouse, plasticity for the establishment of binocular vision opens at post-natal day 20 (P20) and closes at P40 [4]. Closing one eye during this period (but not before P20 or after P40) leads to an irreversible loss of visual acuity for the temporarily closed eye, a state known as amblyopia, which affects 3% of the human population.

The transfer of the homeoprotein (HP) transcription factor Otx2 from extra-cortical sources into PV cells of the primary visual cortex (V1) regulates CP timing [5]. Cortical infusion of recombinant Otx2 accelerates both CP onset and closure. Recently, the choroid plexus was identified as one of these sources, as Otx2 knock-down specifically in the choroid plexus reopens a window of plasticity in the adult V1 [6]. Reopening plasticity in the adult was also achieved by blocking Otx2 binding to complex sugars embedded in perineuronal nets (PNNs) that surround PV cells, thus reducing its internalization [7, 8]. Together, these results led to the important concept that Otx2 accumulation by PV cells leads to a first concentration threshold that opens plasticity at P20 and to a second threshold that closes plasticity at P40; the maintenance of a non-plastic adult state requires the continuous internalization of this HP [9, 10].

In this report we aimed at developing genetic evidence for direct non-cell autonomous regulation of plasticity by Otx2 in the mouse. An obvious approach would be the production of a “cell autonomous-only” mouse through the mutation of Otx2 import and/or export sequences. This strategy is precluded by the fact that the latter sequences are part of the DNA-binding domain and cannot be modified without modifying the cell autonomous transcription of Otx2 targets [11, 12]. Based on previous studies on non-mammalian embryonic development [13–16], we turned to a strategy that employs the extracellular expression of neutralizing single-

chain variable fragment (scFv) antibodies. We generated conditional knock-in mouse lines (*scFvOtx2<sup>tg/o</sup>* and *scFvPax6<sup>tg/o</sup>*) expressing secreted scFv antibodies directed against Otx2 or Pax6 (as a control). Targeted expression of anti-Otx2 scFv in juvenile or adult mice resulted in the delay or reactivation of plasticity genes, respectively. This strategy provides the first genetic evidence for HP transfer in mammals and will allow for precise genetic manipulation of non-cell autonomous homeoprotein activities to study their functions in embryonic and postnatal development.

## Results

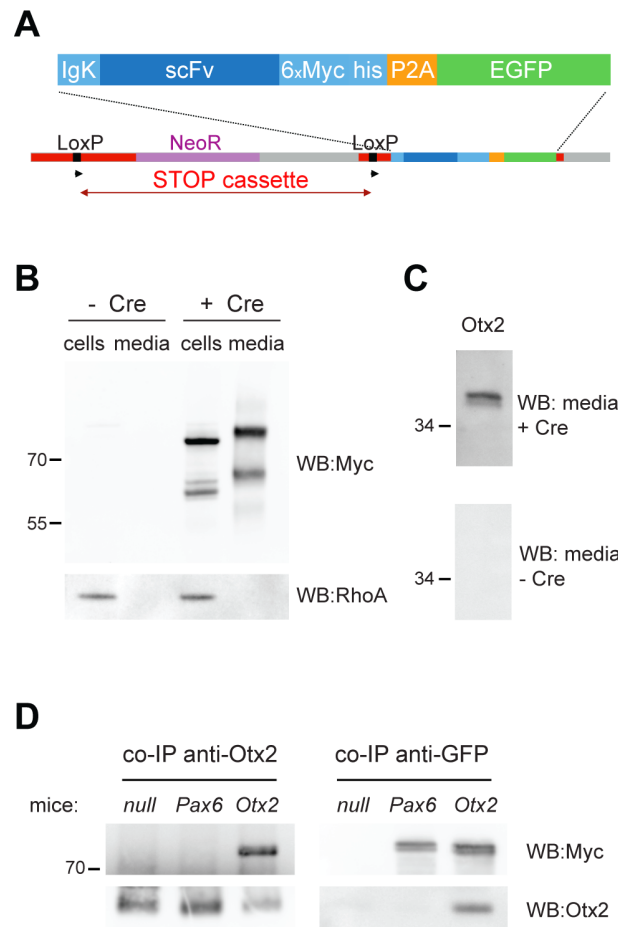
We generated knock-in mouse lines expressing inducible secreted Myc-tagged anti-Otx2 or anti-Pax6 single-chain antibodies (*scFvOtx2<sup>tg/o</sup>* and *scFvPax6<sup>tg/o</sup>*) designed to neutralize HPs in the extracellular space without affecting cell autonomous functions. Tagged anti-Otx2 and anti-Pax6 scFv constructs were generated from hybridoma, cloned behind a floxed STOP cassette, and knocked into the *ROSA26a* locus (Fig 1A).

To validate scFv expression, fibroblasts cultured from adult *scFvOtx2<sup>tg/o</sup>* ear biopsies were treated with the cell-permeable Cre bacterial recombinase Cre-TAT [11]. Cells and media were collected 48h later and analyzed by Western blot (Fig 1B). Anti-Otx2 scFv was only present in cells treated with Cre-TAT and in the medium collected from these cells. Intracellular control RhoA confirms cell integrity. The anti-Myc antibody revealed two bands in the cell extract and in the medium. The lower band corresponds to the scFv recombinant protein and the upper band to the scFv-GFP fusion protein, establishing that the P2A skipping peptide was not 100% efficient. The slightly lower mobility of the antibodies retrieved from the extracellular milieu is due to differences in glycosylation [17].

The anti-Pax6 scFv functional activity has been demonstrated earlier [13, 16]. To examine whether secreted anti-Otx2 scFv binds Otx2 specifically, the media of *scFvOtx2<sup>tg/o</sup>* fibroblasts treated or not with Cre-TAT were used as a source of primary antibodies. Otx2 is recognized by the medium of *scFvOtx2<sup>tg/o</sup>* fibroblasts treated with Cre-TAT (Fig 1C). To confirm scFv in vivo activity, we crossed *scFv* mice with *PV::Cre* mice, where the Cre recombinase is driven by the PV promoter [18], and extracted adult cerebellum, which expresses both HPs [19] as well as PV. The anti-Otx2 scFv co-immunoprecipitated with Otx2 and, conversely, Otx2 co-immunoprecipitated with the scFv (Fig 1D). Association with Otx2 protein was not found in *PV::Cre* or *PV::Cre;scFvPax6<sup>tg/o</sup>* cerebellar extracts.

Two models were developed to disrupt non-cell autonomous Otx2 in V1. A first model was based on local scFv secretion by PV cells. A second model consisted in inducing scFv secretion in the cerebrospinal fluid (CSF) from the choroid plexus, which is an endogenous source of extracellular Otx2 [6]. Pax6 is poorly expressed in the postnatal cortex and choroid plexus [20, 21], making *scFvPax6<sup>tg/o</sup>* mice an appropriate negative control. To induce scFv expression by PV cells, *scFv* mice were crossed with *PV::Cre* mice, where recombination is driven by the PV promoter starting at around P10 in V1 [1]. At P30, PV cells of *PV::Cre;scFvOtx2<sup>tg/o</sup>* and *PV::Cre;scFvPax6<sup>tg/o</sup>* mice but not of *PV::Cre* mice express scFvs in the V1 binocular zone (Fig 2A and S1 Fig). While most PV cells express the scFv, curiously some cells not stained with the PV antibody also express the scFv. This may result from poor PV expression at P30 or by the capture of secreted scFv by PV-negative cells. To induce scFv expression in the choroid plexus and subsequent secretion into the CSF, adult *scFvPax6<sup>tg/o</sup>* and *scFvOtx2<sup>tg/o</sup>* mice were injected with Cre-TAT in the lateral ventricles [6]. Western blot analysis of the CSF confirmed the induction and secretion of both the scFv and scFv-GFP proteins 5 d post-injection (Fig 2B).

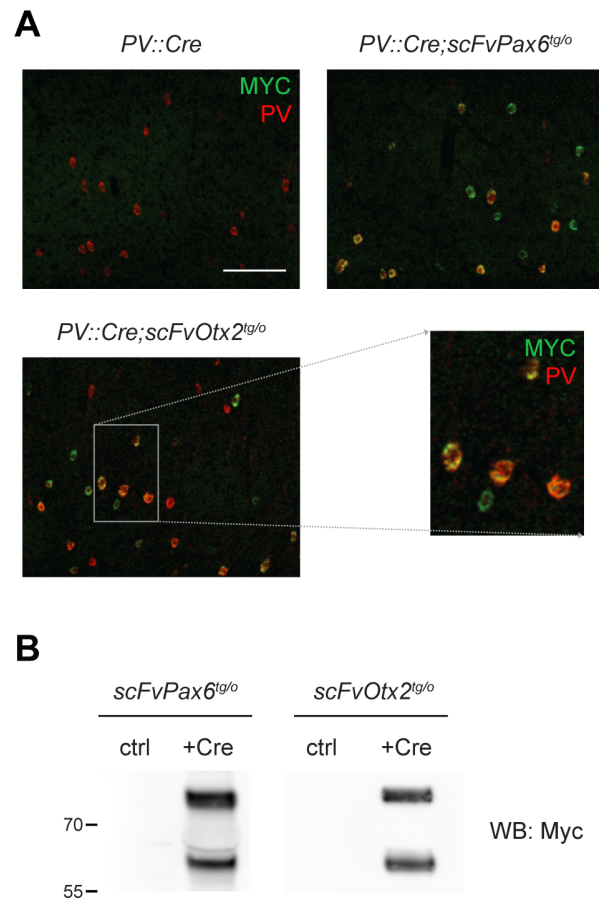
The accumulation of Otx2 in V1 PV cells controls CP timing through the maturation of PV cells [10]. CP kinetics are paralleled by increasing PV expression and assembly of extracellular



**Fig 1. Inducible scFv knock-in mice.** **A)** Construct for scFv knock-in mouse. The single chain antibody (scFv) is knocked in the *ROSA26* locus of C57Bl6 mice. The scFv plasmid contains an IgK signal peptide for secretion, 6 Myc tags for detection and a skipping peptide (P2A) before EGFP. A STOP cassette is inserted before the scFv construct, flanked by two LoxP sites. **B)** Western blot showing expression (cells) and secretion (media) of anti-Otx2 scFv, upon treatment with Cre-TAT protein of *scFvOtx2<sup>tg/o</sup>* ear fibroblasts. The scFv was revealed with an anti-Myc antibody and RhoA served as an intracellular protein control. **C)** Western blot with recombinant Otx2 protein, revealed with media of *scFvOtx2<sup>tg/o</sup>* fibroblasts treated or not with Cre-TAT. **D)** Co-immunoprecipitation of Otx2 protein and anti-Otx2 scFv from P30 *PV::Cre*, *PV::Cre;scFvPax6<sup>tg/o</sup>* and *PV::Cre;scFvOtx2<sup>tg/o</sup>* cerebellum lysates. Co-immunoprecipitations were performed using Otx2 (left) or GFP (right) antibodies and probed on Western blots using anti-Otx2 or anti-Myc antibodies.

doi:10.1371/journal.pgen.1006035.g001

matrix perineuronal nets (PNNs) revealed by the WFA lectin [22]. To follow PV cell maturation, P30 V1 sections were stained with antibodies against Otx2 and PV and with fluorescent WFA (Fig 3A). *PV::Cre* and *PV::Cre;scFvPax6<sup>tg/o</sup>* mice were undistinguishable for all criteria used. In contrast, *PV::Cre;scFvOtx2<sup>tg/o</sup>* mice showed a decrease in the number of PV cells containing detectable amounts of Otx2 (Fig 3B). In addition scFv expression reduced by ~20% the number of cells decorated with Otx2 and PV antibodies or with WFA (Fig 3C). Intensity of Otx2 staining was also reduced by 20%. The number of GABAergic neurons and Calretinin (CR) neurons were not modified by scFv induction (Fig 3C and S2 Fig). This possibly reflects limited antibody diffusion and is in agreement with the fact that Otx2 is primarily captured by PV cells and does not influence the maturation of other interneurons [5]. Thus, the anti-Otx2



**Fig 2. Strategies for inducing expression of scFv in PV cells or in CSF. A)** Co-staining for Myc and PV in layers II-IV of the binocular zone of the visual cortex (V1b) of P30 *PV::Cre*, *PV::Cre;scFvPax6<sup>tg/0</sup>* and *PV::Cre;scFvOtx2<sup>tg/0</sup>* mice (scale bar: 100 $\mu$ m). The enlarged view shows the immunofluorescence overlap. **B)** Western blot of cerebrospinal fluid (CSF) protein extracts from *scFvOtx2<sup>tg/0</sup>* and *scFvPax6<sup>tg/0</sup>* adult mice injected (+Cre) or not (ctrl) with Cre-TAT protein in lateral ventricles. Anti-Otx2 and anti-Pax6 scFvs (revealed with anti-Myc antibody) are secreted in the CSF upon choroid plexus recombination.

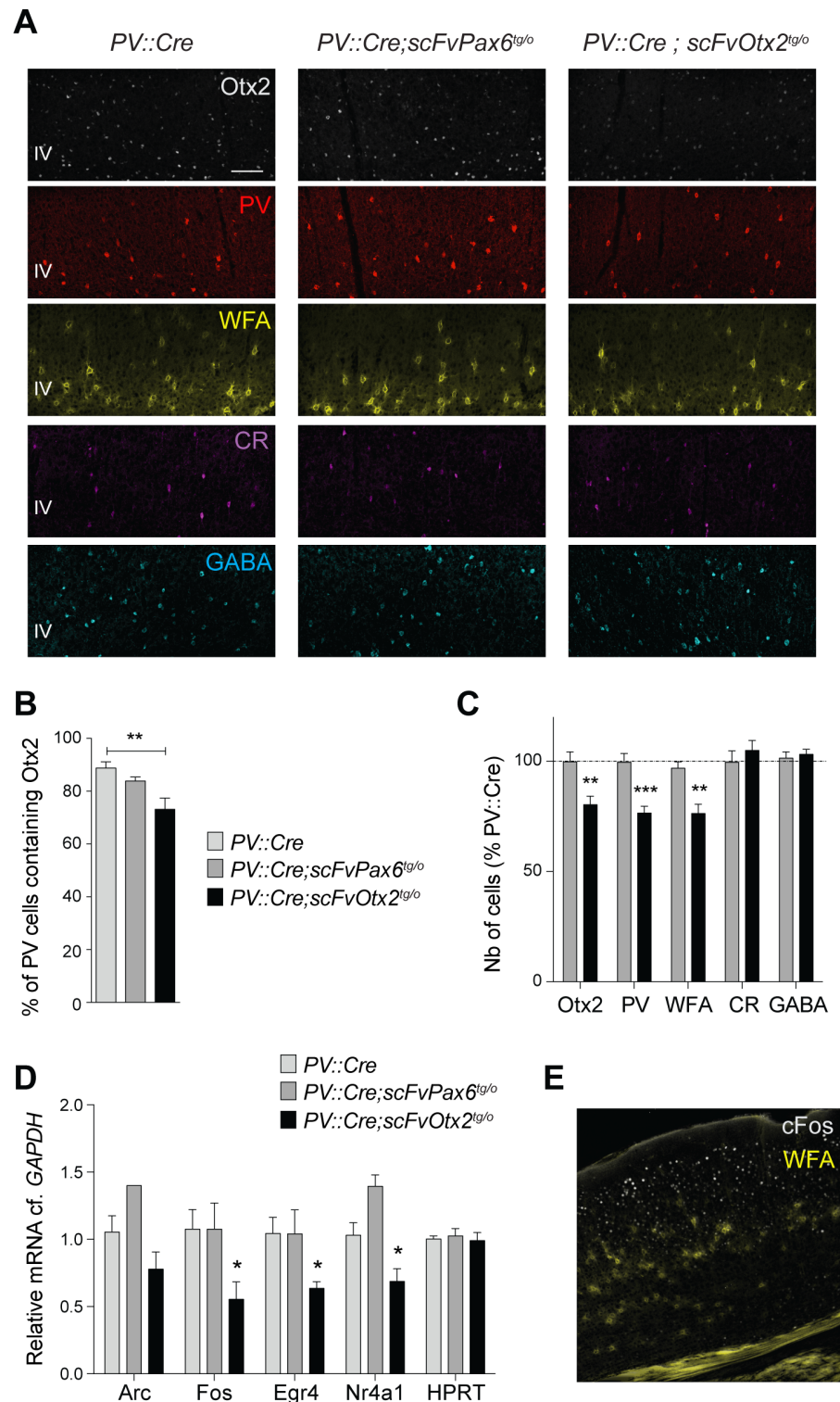
doi:10.1371/journal.pgen.1006035.g002

scFv secretion by PV cells during postnatal development partially blocked Otx2 internalization and delayed PV cell maturation.

Due to the existence of thresholds, small changes in Otx2 concentrations within PV cells can have dramatic effects on V1 plasticity [6, 7]. Plasticity is paralleled by the expression of plasticity genes in V1 layer IV such as *Arc*, *Fos*, *Nr4a1* and *Egr4* [23–28]. Quantitative mRNA analysis of V1 layer IV extracts at P30 demonstrated that the expression of the anti-Otx2 scFv, in addition to delaying PV cell maturation, significantly decreased the up-regulation of *Fos*, *Egr4* and *Nr4a1* transcripts (Fig 3D). *Arc* and *c-Fos* are expressed throughout V1 layers, and *Egr4* and *Nr4a1*, although showing higher levels of expression in V1 layer IV (Fig 3E and S3 Fig), are not necessarily specifically expressed in PV cells. Thus, changes in layer IV gene expression reflect the global effect on plasticity caused by Otx2 reduction.

Adult choroid plexus expression of scFv was induced in P90-P120 *scFvOtx2<sup>tg/0</sup>* and *scFvPax6<sup>tg/0</sup>* mice. After 15 d, the number of cells expressing Otx2, PV or stained with WFA (PNN assembly) was analyzed. In binocular V1 of injected *scFvOtx2<sup>tg/0</sup>* compared to injected *scFvPax6<sup>tg/0</sup>*, the number of cells stained with Otx2 as well as the number of cells expressing the





**Fig 3. Local expression of anti-Otx2 scFv delays PV cell maturation. A)** Immunostaining for Otx2, PV, WFA, CR and GABA in V1b layers II-IV of P30 *PV::Cre*, *PV::Cre;scFvPax6<sup>tg/o</sup>* and *PV::Cre;scFvOtx2<sup>tg/o</sup>* mice (scale bar: 100µm). **B)** Percentages of PV-positive cells that contain Otx2 in V1b layers II-IV of P30 *PV::Cre*, *PV::Cre;scFvPax6<sup>tg/o</sup>* and *PV::Cre;scFvOtx2<sup>tg/o</sup>* mice. Absolute cell numbers are provided in [S2 Fig](#). **C)** Quantification of cells stained for Otx2, PV, WFA, CR and GABA in V1b layers II-IV of P30 *PV::Cre*, *PV::Cre*;

*scFvPax6<sup>tg/o</sup>* and *PV::Cre;scFvOtx2<sup>tg/o</sup>* mice (in percentage of *PV::Cre* mice, dashed line indicates *PV::Cre* levels). Absolute cell numbers are provided in [S2 Fig. D](#)) Quantification of Arc, c-Fos, Nr4a1, Egr4 and HPRT mRNA contents (relative to GAPDH) in V1b layer IV extracts from P30 *PV::Cre*, *PV::Cre;scFvPax6<sup>tg/o</sup>* and *PV::Cre;scFvOtx2<sup>tg/o</sup>* mice. **E**) Co-staining for c-Fos and WFA in V1b of P30 *PV::Cre* mice. (t-tests and one-way ANOVAs; 2–9 mice per group; \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ; error bars indicate SEM)

doi:10.1371/journal.pgen.1006035.g003

two markers of PV cell maturation were reduced by 20 to 30%, with no change in the percentage of CR neurons or of the entire population of GABAergic neurons ([Fig 4A and 4B](#) and [S2 Fig](#)). In parallel, plasticity transcript expression was dramatically enhanced in V1 layer IV ([Fig 4C](#)), suggesting induced brain plasticity similar to the effect obtained by recombination of *Otx2* in the adult choroid plexus [6].

To verify if the reactivation of plasticity genes was reflected at a physiological level, we used optical imaging of intrinsic signals to measure visual acuity [29, 30]. Two weeks after intra-ventricular injection of Cre-TAT or NaCl, adult (P105) *scFvOtx2<sup>tg/o</sup>* mice underwent 4 d of monocular deprivation (MD) prior to optical imaging in the opposite hemisphere ([Fig 5A](#)). The responses to different spatial frequencies were measured and quantified, as illustrated in [Fig 5B and 5C](#). The expression of anti-Otx2 scFv enhances visual acuity of the ipsilateral eye ([Fig 5D](#)) but does not modify that of contralateral eye ([Fig 5E](#)), leading to a shift in ocular dominance for the highest spatial frequencies (above 0.14 cpd, [Fig 5F](#)).

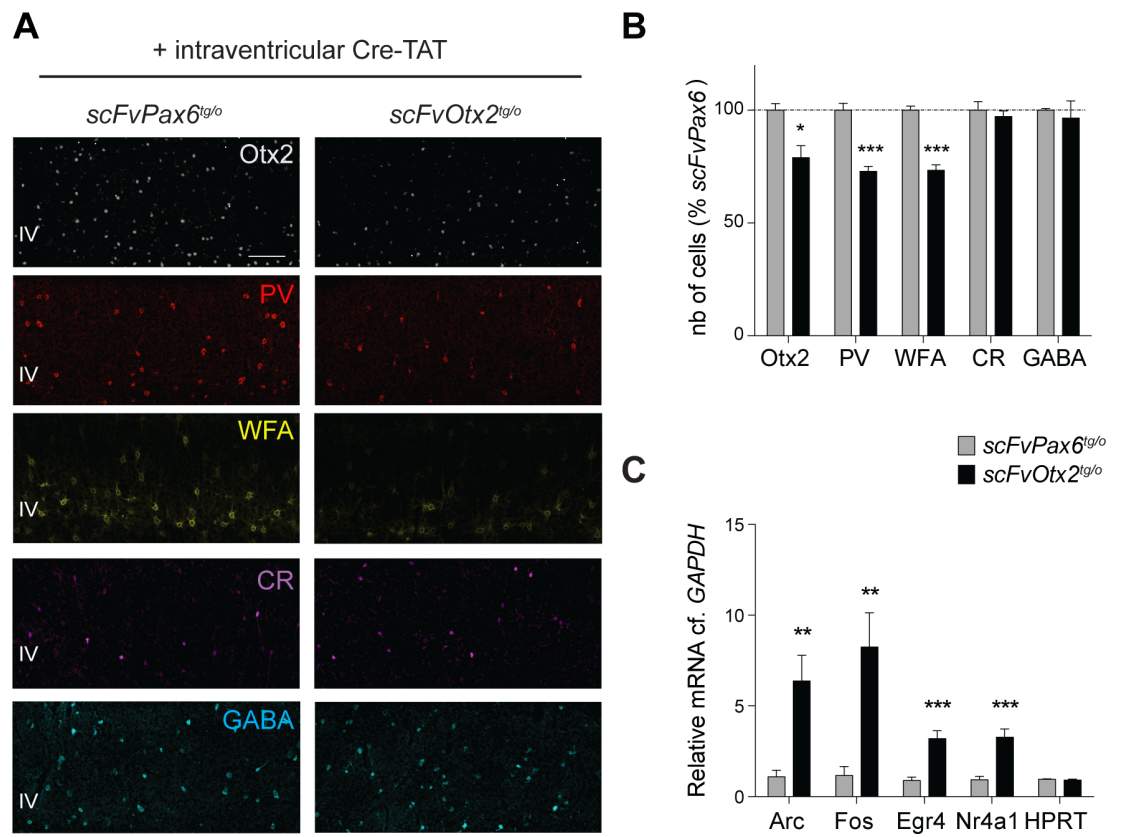
## Discussion

The possibility of the anti-Otx2 scFv neutralizing cell autonomous Otx2 cannot be ignored even though the amount of antibody that might escape the secretion pathway is low and the disulfide bond necessary for antibody activity is reduced in the intracellular milieu [31, 32]. This risk can be excluded when PV cells express the antibody, given that the *Otx2* locus is not active in these cells. In contrast, the issue can be raised for the choroid plexus, which strongly expresses *Otx2*. However, we have verified that potential *Otx2* target genes in the choroid plexus are not quantitatively modified in the recombined *scFvOtx2<sup>tg/o</sup>* plexus. For example an identified target gene is *C1qL3* which, compared to GAPDH, is up-regulated from  $1.01 \pm 0.11$  ( $n = 3$ ) to  $5.21 \pm 0.62$  ( $n = 3$ ) in the plexus of *Otx2<sup>+/-</sup>* mice and unchanged  $1.40 \pm 0.07$  ( $n = 3$ ) in the scFv mouse choroid plexus.

The consequences of expressing the anti-Otx2 scFv under the control of the PV promoter are only a modest reduction of *Otx2* content, PV expression and PNN assembly at P30. One likely reason is that PV expression starts at around P10 [1] and that it might take some time before the concentration of extracellular antibody is high enough to completely block *Otx2* internalization. Another possibility is that the high affinity (in the nM range) of *Otx2* for PNN complex sugars [7] partially protects *Otx2* from being neutralized by the antibody. It is nevertheless clear that the delayed time course in PV cell maturation is enough to delay the expression of plasticity genes.

A similarly modest reduction in cortical *Otx2* content occurred after anti-Otx2 scFv expression was induced in the adult choroid plexus. Nonetheless, the level of reduction is comparable to what was previously obtained when *Otx2* expression was knocked down in the adult choroid plexus, which resulted in the reopening of V1 binocular plasticity [6]. This suggests that the antibody complexes most of the extracellular transcription factor in the CSF. The remaining *Otx2* still present in PV cells after 2 weeks either reflects the stability of protein present before scFv expression or the existence of sources other than the choroid plexus, in particular the eye [5, 33] and the pineal gland, another established site of *Otx2* expression [34]. Regardless, this modest reduction is enough to induce a dramatic re-expression of plasticity genes in the adult





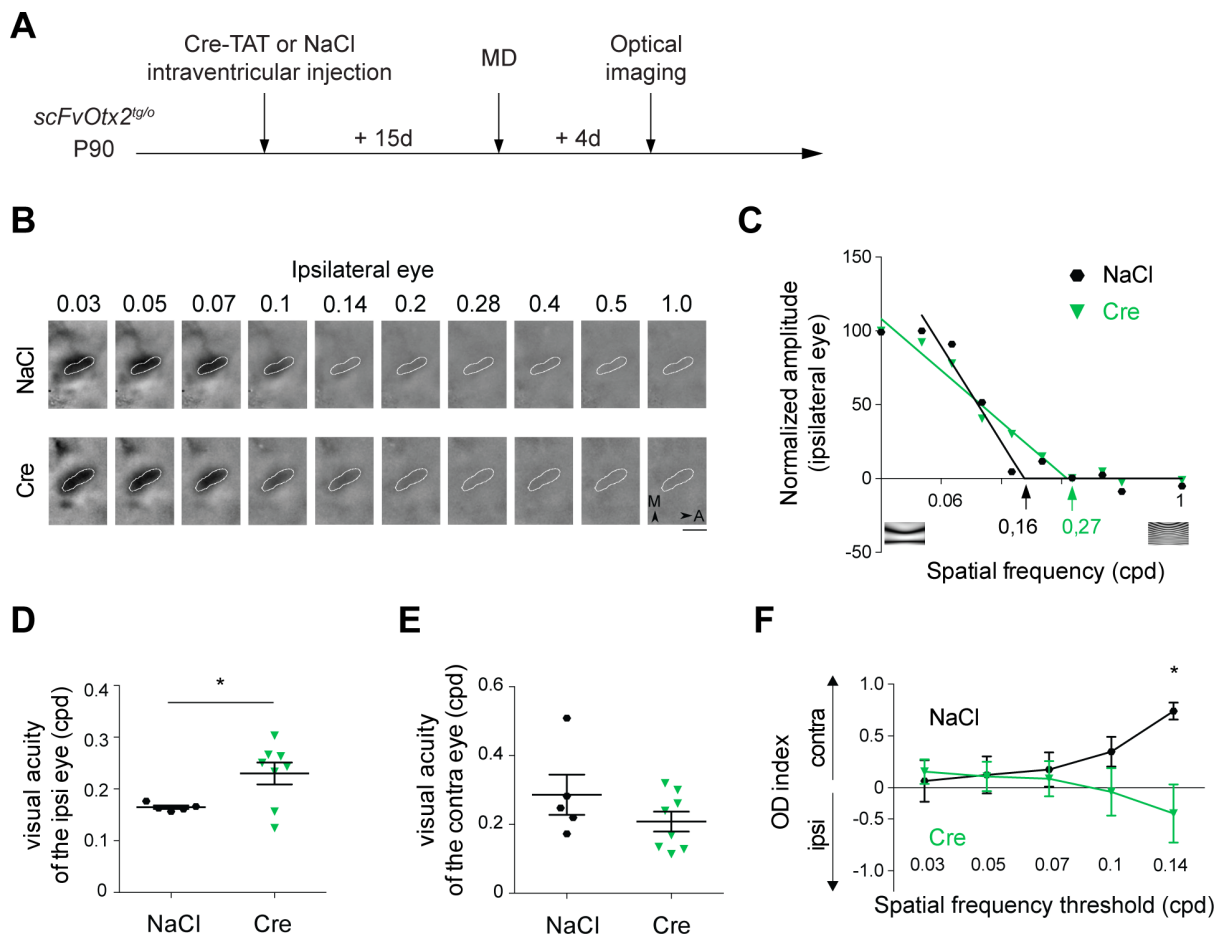
**Fig 4. Anti-Otx2 scFv in adult CSF activates plasticity genes.** **A**) Immunostaining for Otx2, PV, WFA, CR and GABA in V1b layers II-IV of adult *scFvPax6<sup>tg/o</sup>* and *scFvOtx2<sup>tg/o</sup>* mice, 15 days after intracerebroventricular (icv) injection of Cre-TAT protein (scale bar: 100µm). **B**) Quantification of number of Otx2-, PV-, WFA-, CR- and GABA-positive cells in V1b layers II-IV of adult *scFvOtx2<sup>tg/o</sup>* and *scFvPax6<sup>tg/o</sup>* mice, 15 days after icv injection of Cre-TAT (in percentage of *scFvPax6<sup>tg/o</sup>* mice, dashed line indicates *scFvPax6<sup>tg/o</sup>* levels). Absolute numbers are provided in [S2 Fig](#). **C**) Quantification of *Arc*, *Fos*, *Nr4a1*, *Egr4* and *HPRT* mRNA content (relative to *GAPDH*) in V1 layer IV extracts from adult *scFvOtx2<sup>tg/o</sup>* and *scFvPax6<sup>tg/o</sup>* mice, 15 d after icv injection of Cre-TAT. (t-tests; 3–12 mice per group; \**p*<0.05, \*\**p*<0.01, \*\*\**p*<0.001; error bars indicate SEM)

doi:10.1371/journal.pgen.1006035.g004

and an enhancement of visual cortex plasticity. The plasticity observed after 4 d of MD in P105 mice corresponds to an increase in ipsilateral visual acuity with no change to the deprived contralateral eye. Indeed, Sato & Stryker [30] previously showed that adult plasticity mainly impacts the response of the non-deprived eye. Furthermore, they showed that 7 d of MD were necessary to induce moderate plasticity in the cortex of adult (P90) mice, while only 4 d were required to induce strong plasticity in juvenile (P30) mice. Thus, Otx2 capture by the scFv antibody in adult (P105) mice accelerates ocular dominance plasticity.

Intercellular transfer has been observed *in vivo* and/or *in vitro* for many HPs and the conservation of the transfer sequences in the DNA-binding domain suggests that this is a general property of this transcription factor family. Our single-chain antibody strategy brings clear genetic evidence for Otx2 signaling and will be generally useful to verify HP transport *in vivo* and to analyze the roles of this novel mode of signal transduction. This same strategy could indeed be applied to the neutralization of any signaling entity within and beyond the nervous system.

This report demonstrates that the extracellular neutralization of Otx2 by the inducible expression of an anti-Otx2 single-chain antibody leads to a reduction in Otx2 capture by PV



**Fig 5. Anti-Otx2 scFv in adult CSF restores ocular dominance plasticity.** **A** *scFvOtx2<sup>tg/o</sup>* adult (P90) mice were injected with NaCl or Cre-TAT and, after 15 d, the left eye was sutured for 4 d. Intrinsic optical imaging was then performed in the right visual cortex to measure visual acuity for each eye. **B** Intrinsic signals recorded for the ipsilateral eye stimulation in *scFvOtx2<sup>tg/o</sup>* adult mice injected with NaCl (top) or Cre-TAT (bottom). Ten spatial frequencies (SFs) ranging from 0.03 to 1 cycle/degree were tested. The binocular zone is delineated in white (A, Anterior; M, Medial; Scale bar, 1 mm). **C** Estimation of the ipsilateral eye visual acuity for the two mice shown in (B). Each point corresponds to the average magnitude in the binocular zone. For each animal, data were normalized by the maximal amplitude among SFs and visual acuity was defined as the intersection of a fitted line segment with the X-axis. Representative stimuli are shown below. **D** Visual acuity of the ipsilateral eye in adult *scFvOtx2<sup>tg/o</sup>* injected with NaCl or Cre-TAT. **E** Same as (D) for the contralateral eye. **F** Ocular dominance index at different SF thresholds in adult *scFvOtx2<sup>tg/o</sup>* mice injected with NaCl or Cre-TAT. Positive values indicate a preference for the contralateral eye. (t-tests; \* $p < 0.05$ ; error bars indicate SEM)

doi:10.1371/journal.pgen.1006035.g005

cells and either delays their maturation or “rejuvenates” them depending on when the antibody is expressed. In both cases, several genes associated with a plastic state are regulated in the expected direction. This provides the genetic evidence for a novel signaling mechanism operating through homeoprotein transfer in the mouse.

## Materials and Methods

### Ethics statement

All animal procedures, including housing, were carried out in accordance with the recommendations of the European Economic Community (86/609/EEC), the French National Committee (87/848) and French bylaws (AGRG1240332A / AGRG1238724A / AGRG1238767A / AGRG1238729A / AGRG1238753A). For surgical procedures, animals were anesthetized with

Xylazine (Rompun 2%, 5mg/kg) and Ketamine (Imalgene 500, 80mg/kg). For biochemical analysis, mice were sacrificed by cervical elongation. This research (project no. 00704.02) was approved by Ethics committee n° 59 of the French Ministry for Research and Higher Education.

### scFv construction

Hybridoma expressing monoclonal antibodies (CD4 and CD7) against Otx2 were generated, and CD7 hybridoma mRNAs were used to construct scFv minigenes as described in [35]. CD7-scFv coding sequence was subcloned as described in [16], with an N-terminal signal sequence and C-terminal 6xMyc and His tags followed by a skipping peptide (P2A)-eGFP cassette for expression of either a fusion protein (scFv-myc-his-P2A-GFP) or two separate proteins, depending on P2A peptide efficiency. Anti-Pax6 scFv [13] was transferred into the same final vector.

### Animals

*scFvOtx2* and *scFvPax6* knock-in mouse lines were generated by the Institut Clinique de la Souris (Strasbourg, France) by transgenesis with targeted insertion in the *Rosa26* allele. PV-Cre mice were obtained from The Jackson Laboratory (stock 8069).

### Cell culture of ear fibroblasts

Fibroblasts were generated from ear biopsies from adult *scFvPax6<sup>tg/o</sup>* and *scFvOtx2<sup>tg/o</sup>* mice and treated with 10  $\mu$ M cell-permeable Cre (Cre-TAT, production described in [6]) in DMEM [11]. Cells and culture media were collected 48 h later and processed for Western blot analysis. Conditioned media were also used as primary antibodies on Western blots.

### Cre-TAT protein injection

Stereotaxic injection (bregma: x = -0.58 mm, y =  $\pm$ 1.28 mm, z = 2 mm) of Cre-TAT in 15% DMSO into the lateral ventricles of anesthetized mice was performed with a Hamilton syringe at a rate of 0.2  $\mu$ l/min. Five or fifteen days after injection, mice were processed for cerebrospinal fluid sampling (described in [6]), cortical layer dissection or immunohistochemistry.

### Layer IV dissection

The dissection of tissue enriched in cortical layer IV was performed in ice cold PBS with micro scalpels. Visual cortex areas were first excised from both brain hemispheres and then cut coronal to produce two thin rectangular strips per hemisphere. These strips were laid on their sides to expose the cortical layers. A lengthwise cut in two equal parts gave the supragranular layer, which was then cut lengthwise in two equal parts to provide enriched layer IV.

### Immunoprecipitation

Whole cerebellum was dissected and suspended in immunoprecipitation lysis buffer (20 mM Tris pH8, 120 mM NaCl, 1% NP-40, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 5% glycerol, Benzonase nuclease and protease inhibitors). Samples were centrifuged (10 min, 20 000 g) at 4°C and the supernatant was incubated overnight at 4°C with rotation with anti-Otx2-coupled Dynabeads (using anti-Otx2 rabbit polyclonal, Abcam ab21990) or with anti-GFP-coupled magnetic beads (Chromotek). The beads were washed with lysis buffer and with 1 M urea before Western blot analysis.

## Western blot

Protein extracts were separated on NuPAGE 4–12% Bis-Tris pre-cast gels (Invitrogen) for 1 h at 200 V and transferred onto a methanol-activated PVDF membrane at 400 mA for 1 h. The following primary antibodies were used: anti-Myc (rabbit polyclonal, 1/4000, Sigma-Aldrich C3956), anti-Otx2 (rabbit monoclonal, 1/2000, Abcam ab92326), anti-RhoA (mouse monoclonal, 1/200, Santa Cruz sc418). Membranes were imaged with a LAS-4000 gel imager (Fujifilm) and quantified by densitometry with ImageJ.

## Immunohistochemistry

Mice were perfused transcardially with PBS followed by 4% paraformaldehyde prepared in PBS. Brains were post-fixed 1 h at 4°C and immunohistochemistry was performed on cryosections (20 µm) encompassing the entire visual cortex. Primary antibodies included anti-Myc (rabbit, 1/400, Sigma-Aldrich C3956), anti-Otx2 (mouse monoclonal, in house), anti-PV (rabbit, 1/500, Swant PV25), anti-CR (mouse monoclonal, 1/500, Swant), anti-GABA (rabbit, 1/300, Sigma), and anti-cFos (rabbit monoclonal, 1/300, Cell Signaling). Secondary antibodies were Alexa Fluor-conjugated (Molecular Probes). Biotinylated WFA (1/100, Sigma-Aldrich L1516) with Alexa Fluor-conjugated streptavidin was used to reveal perineuronal nets. Sections were mounted in Fluoromount (Southern Biotech). Images were acquired with a Leica SP5 confocal microscope and analyzed with ImageJ.

## In situ hybridization

In situ hybridization on cryosections (20 µm) were performed as previously described [36]. Briefly, hybridization was carried out overnight at 70°C with DIG-labeled probes. Sections were washed and incubated with alkaline phosphatase-conjugated anti-DIG (1/2000, Roche) overnight at 4°C. Sections were then washed and the color reaction was carried out at room temperature. Reaction was stopped by PBS washes and sections were mounted with Fluoromount (Southern Biotech). Mosaic images (10x magnification) were acquired with a Nikon 90i microscope.

## Quantitative PCR

Layer IV of visual cortex was manually dissected and RNA was extracted using the RNeasy Lipid Tissue Mini (Qiagen) according to manufacturer's instructions. cDNA was synthesized from 500 ng of total RNA with the QuantiTect Reverse Transcription kit (Qiagen). For real-time PCR, triplicates were analyzed with a LightCycler 480 II (Roche). Gene-to-GAPDH ratios were determined using the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method.

## Monocular deprivation and surgery for optical imaging

For monocular deprivation, mice were anesthetized prior to suturing of the left eye as described in [37]. Animals were checked daily to ensure sutures remained intact. The eye was opened immediately before recording.

For optical imaging, mice were anesthetized with urethane (1.2 g/kg, i.p.) and a sedative (chlorprothixene, 8 mg/kg i.m.). Atropine (0.1 mg/kg) and dexamethasone (2 mg/kg) were injected subcutaneously and body temperature was maintained at 37°C. Mice were placed in a stereotaxic instrument and craniotomy was made over the primary visual cortex in the hemisphere contralateral to the deprived eye. The exposed area was covered by 2.5% agarose and a glass coverslip.

## Visual stimulation

Visual stimuli were randomly displayed on a 21" LCD monitor located 20 cm in front of the animal. Coordinates of the monitor were reprogrammed in order to maintain spatial and temporal frequencies constant across the visual field's eccentricities (See examples in Fig 5C, [38]). Each stimulus consisted of oriented sine-wave gratings drifting in one direction perpendicular to the orientation at a temporal frequency of 1.5 Hz. Ten spatial frequencies (SFs) were tested, ranging from 0.0303 to 1 cycle per degree (cpd) in a logarithmic scale. Monocular stimuli were displayed for 5s. A grey screen was presented between trials for 10s. Each SF was displayed 16 times with a different orientation/direction.

## Intrinsic signal optical imaging

Optical images of intrinsic signals were recorded with a Dalsa 1M60 CCD camera controlled with an Imager 3001 system (Optical Imaging Ltd). Images were acquired after a 2x2 pixels spatial binning with a resolution of  $\sim 10.5 \mu\text{m}/\text{pixel}$  using a 135x50 mm tandem lens (Nikon) configuration. The focal plane was set 400  $\mu\text{m}$  below the cortical surface, and intrinsic signals were acquired with a 700 nm illumination wavelength. The size of the recorded region was  $\sim 2.5 \times 3.6 \text{ mm}$ . Five frames of 1s duration each were stored right after the stimulus onset.

For data analysis, the last three recorded frames, which correspond to the strongest intrinsic signal, were averaged and divided by the first recorded frame. The generalized indicator function method was applied to identify the stimulus-related activity patterns [38]. An additional low-pass filter with a Gaussian kernel of 3 pixels SD was applied to smooth the data. The ipsilateral eye was stimulated, the area of interest was delineated over the primary visual cortex and the SF tuning curve in the binocular zone was calculated by averaging the response for each SF stimulus. This curve was least-square fitted to extract visual acuity. For each eye the response integral (trapezoidal approximation) elicited by SFs was calculated. Ocular dominance values ranged between -1 and 1 (ipsilateral and contralateral eye response, respectively) and calculated for each SF threshold with the contrast formula from the response integral of each eye.

## Statistical analysis

Statistical analysis was performed with Prism software (GraphPad). Pairwise comparison was done using Student t-test.

## Supporting Information

**S1 Fig. Anti-Otx2 scFv expression in V1.** Co-staining for Myc and PV in visual cortex of a P30 *PV::Cre;scFvOtx2<sup>tg/o</sup>* mouse (scale bar: 200 $\mu\text{m}$ ). The third panel shows the immunofluorescence overlap.  
(TIF)

**S2 Fig. Total number of cells in V1b for both scFv strategies.** **A)** Quantification of number of Otx2-, PV-, WFA-, CR- and GABA-positive cells in V1b layers II-IV of P30 *PV::Cre;scFvPax6<sup>tg/o</sup>* and *PV::Cre;scFvOtx2<sup>tg/o</sup>* mice (one-way ANOVAs; 2–9 mice per group; \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ; error bars indicate SEM). **B)** Quantification of number of Otx2-, PV-, WFA, CR- and GABA-positive cells in V1b layers II-IV of adult *scFvOtx2<sup>tg/o</sup>* and *scFvPax6<sup>tg/o</sup>* mice, 15 days after intracerebroventricular injection of Cre-TAT (t-tests; 3–12 mice per group; \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$ ; error bars indicate SEM).  
(TIF)

**S3 Fig. Localization of Arc, Erg4 and Nr4a1 expression in V1b by in situ hybridization.** The left panels show the staining for sense probes and the middle panels the staining for antisense probes. The right panel shows WFA immunostaining in V1b to visualize layer IV. (TIF)

## Acknowledgments

We thank Eliane Ipendey and Anthony Perrot for excellent technical work.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: AP MV AAD. Performed the experiments: CB CV DT EB JR. Analyzed the data: CB CV DT. Wrote the paper: AP AAD.

## References

- del Rio JA, de Lecea L, Ferrer I, Soriano E. The development of parvalbumin-immunoreactivity in the neocortex of the mouse. *Brain Res Dev Brain Res*. 1994; 81(2):247–59. PMID: [7813046](#).
- Hensch T. Critical period plasticity in local cortical circuits. *Nature Reviews Neuroscience*. 2005; 6:877–88. PMID: [16261181](#)
- Bavelier D, Levi DM, Li RW, Dan Y, Hensch TK. Removing brakes on adult brain plasticity: from molecular to behavioral interventions. *J Neurosci*. 2010; 30(45):14964–71. Epub 2010/11/12. doi: [10.1523/JNEUROSCI.4812-10.2010](#) PMID: [21068299](#); PubMed Central PMCID: PMC2992973.
- Hensch TK. Critical period mechanisms in developing visual cortex. *Curr Top Dev Biol*. 2005; 69:215–37. PMID: [16243601](#).
- Sugiyama S, Di Nardo AA, Aizawa S, Matsuo I, Volovitch M, Prochiantz A, et al. Experience-dependent transfer of Otx2 homeoprotein into the visual cortex activates postnatal plasticity. *Cell*. 2008; 134(3):508–20. PMID: [18692473](#). doi: [10.1016/j.cell.2008.05.054](#)
- Spatazza J, Lee HH, Di Nardo AA, Tibaldi L, Joliot A, Hensch TK, et al. Choroid-Plexus-Derived Otx2 Homeoprotein Constrains Adult Cortical Plasticity. *Cell Rep*. 2013; 3:1815–23. Epub 2013/06/19. doi: [10.1016/j.celrep.2013.05.014](#) PMID: [23770240](#).
- Beurdeley M, Spatazza J, Lee H, Sugiyama S, Bernard C, Di Nardo AA, et al. Otx2 binding to perineuronal nets persistently regulates plasticity in the mature visual cortex. *J Neurosci*. 2012; 32(27):9429–37. doi: [10.1523/JNEUROSCI.0394-12.2012](#) PMID: [22764251](#)
- Miyata S, Komatsu Y, Yoshimura Y, Taya C, Kitagawa H. Persistent cortical plasticity by upregulation of chondroitin 6-sulfation. *Nat Neurosci*. 2012; 15:414–22. Epub 2012/01/17. doi: [10.1038/nn.3023](#) PMID: [22246436](#).
- Spatazza J, Di Lullo E, Joliot A, Dupont E, Moya KL, Prochiantz A. Homeoprotein signaling in development, health, and disease: a shaking of dogmas offers challenges and promises from bench to bed. *Pharmacol Rev*. 2013; 65(1):90–104. Epub 2013/01/10. doi: [10.1124/pr.112.006577](#) PMID: [23300132](#).
- Prochiantz A, Di Nardo AA. Homeoprotein Signaling in the Developing and Adult Nervous System. *Neuron*. 2015; 85(5):911–25. Epub 2015/03/06. doi: [10.1016/j.neuron.2015.01.019](#) PMID: [25741720](#).
- Joliot A, Prochiantz A. Transduction peptides: from technology to physiology. *Nat Cell Biol*. 2004; 6(3):189–96. PMID: [15039791](#).
- Bernard C, Kim HT, Torero Ibad R, Lee EJ, Simonutti M, Picaud S, et al. Graded Otx2 activities demonstrate dose-sensitive eye and retina phenotypes. *Hum Mol Genet*. 2013. Epub 2013/11/16. doi: [10.1093/hmg/ddt562](#) PMID: [24234651](#).
- Lesaffre B, Joliot A, Prochiantz A, Volovitch M. Direct non-cell autonomous Pax6 activity regulates eye development in the zebrafish. *Neural Develop*. 2007; 2(1). PMID: [17229313](#).
- Wizenmann A, Brunet I, Lam JSY, Sonnier L, Beurdeley M, Zarbalis K, et al. Extracellular Engrailed participates in the topographic guidance of retinal axons in vivo. *Neuron*. 2009; 64:355–66. doi: [10.1016/j.neuron.2009.09.018](#) PMID: [19914184](#)
- Layalle S, Volovitch M, Mugat B, Bonneaud N, Parmentier ML, Prochiantz A, et al. Engrailed homeoprotein acts as a signaling molecule in the developing fly. *Development*. 2011; 138(11):2315–23. Epub 2011/05/12. doi: [10.1242/dev.057059](#) PMID: [21558379](#).



16. Di Lullo E, Haton C, Le Poupon C, Volovitch M, Joliot A, Thomas JL, et al. Paracrine Pax6 activity regulates oligodendrocyte precursor cell migration in the chick embryonic neural tube. *Development*. 2011; 138(22):4991–5001. Epub 2011/10/27. doi: 138/22/4991 [pii] doi: [10.1242/dev.066282](https://doi.org/10.1242/dev.066282) PMID: [22028031](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22028031/).
17. Logan C, Hanks MC, Noble-Topham S, Nallainathan D, Provart NJ, Joyner AL. Cloning and sequence comparison of the mouse, human, and chicken engrailed genes reveal potential functional domains and regulatory regions. *Dev Genet*. 1992; 13(5):345–58. PMID: [1363401](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1363401/).
18. Runyan CA, Schummers J, Van Wart A, Kuhlman SJ, Wilson NR, Huang ZJ, et al. Response features of parvalbumin-expressing interneurons suggest precise roles for subtypes of inhibition in visual cortex. *Neuron*. 2010; 67(5):847–57. Epub 2010/09/10. doi: S0896-6273(10)00616-1 [pii] doi: [10.1016/j.neuron.2010.08.006](https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.08.006) PMID: [20826315](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20826315/); PubMed Central PMCID: PMC2948796.
19. Frantz GD, Weimann JM, Levin ME, McConnell SK. Otx1 and Otx2 define layers and regions in developing cerebral cortex and cerebellum. *J Neurosci*. 1994; 14(10):5725–40. Epub 1994/10/01. PMID: [7931541](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7931541/).
20. Duan D, Fu Y, Paxinos G, Watson C. Spatiotemporal expression patterns of Pax6 in the brain of embryonic, newborn, and adult mice. *Brain Struct Funct*. 2013; 218(2):353–72. Epub 2012/02/23. doi: doi: [10.1007/s00429-012-0397-2](https://doi.org/10.1007/s00429-012-0397-2) PMID: [22354470](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22354470/).
21. Zeisel A, Munoz-Manchado AB, Codeluppi S, Lonnerberg P, La Manno G, Jureus A, et al. Brain structure. Cell types in the mouse cortex and hippocampus revealed by single-cell RNA-seq. *Science*. 2015; 347(6226):1138–42. Epub 2015/02/24. doi: science.aaa1934 [pii] doi: [10.1126/science.aaa1934](https://doi.org/10.1126/science.aaa1934) PMID: [25700174](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25700174/).
22. Hensch TK. Critical period plasticity in local cortical circuits. *Nat Rev Neurosci*. 2005; 6(11):877–88. PMID: [16261181](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16261181/).
23. Andreasson KI, Kaufmann WE. Role of immediate early gene expression in cortical morphogenesis and plasticity. *Results Probl Cell Differ*. 2002; 39:113–37. Epub 2002/10/02. PMID: [12353466](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12353466/).
24. Kaczmarek L, Chaudhuri A. Sensory regulation of immediate-early gene expression in mammalian visual cortex: implications for functional mapping and neural plasticity. *Brain Res Brain Res Rev*. 1997; 23(3):237–56. Epub 1997/04/01. doi: S0165017397000052 [pii]. PMID: [9164673](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9164673/).
25. Shepherd JD, Bear MF. New views of Arc, a master regulator of synaptic plasticity. *Nat Neurosci*. 2011; 14(3):279–84. Epub 2011/02/01. doi: nn.2708 [pii] doi: [10.1038/nn.2708](https://doi.org/10.1038/nn.2708) PMID: [21278731](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21278731/).
26. Valles A, Boender AJ, Gijsbers S, Haast RA, Martens GJ, de Weerd P. Genomewide analysis of rat barrel cortex reveals time- and layer-specific mRNA expression changes related to experience-dependent plasticity. *J Neurosci*. 2011; 31(16):6140–58. Epub 2011/04/22. doi: 31/16/6140 [pii] doi: [10.1523/JNEUROSCI.6514-10.2011](https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6514-10.2011) PMID: [21508239](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21508239/).
27. Li L, Carter J, Gao X, Whitehead J, Tourtellotte WG. The neuroplasticity-associated arc gene is a direct transcriptional target of early growth response (Egr) transcription factors. *Mol Cell Biol*. 2005; 25(23):10286–300. Epub 2005/11/17. doi: 25/23/10286 [pii] doi: [10.1128/MCB.25.23.10286-10300.2005](https://doi.org/10.1128/MCB.25.23.10286-10300.2005) PMID: [16287845](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16287845/); PubMed Central PMCID: PMC1291244.
28. Tognini P, Napoli D, Tola J, Silingardi D, Della Ragione F, D'Esposito M, et al. Experience-dependent DNA methylation regulates plasticity in the developing visual cortex. *Nat Neurosci*. 2015; 18(7):956–8. Epub 2015/05/26. doi: nn.4026 [pii] doi: [10.1038/nn.4026](https://doi.org/10.1038/nn.4026) PMID: [26005848](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26005848/).
29. Lehmann K, Lowel S. Age-dependent ocular dominance plasticity in adult mice. *PLoS One*. 2008; 3(9):e3120. Epub 2008/09/05. doi: doi: [10.1371/journal.pone.0003120](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003120) PMID: [18769674](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18769674/); PubMed Central PMCID: PMC2518841.
30. Sato M, Stryker MP. Distinctive features of adult ocular dominance plasticity. *J Neurosci*. 2008; 28(41):10278–86. Epub 2008/10/10. doi: 28/41/10278 [pii] doi: [10.1523/JNEUROSCI.2451-08.2008](https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2451-08.2008) PMID: [18842887](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18842887/).
31. Auf der Maur A, Tissot K, Barberis A. Antigen-independent selection of intracellular stable antibody frameworks. *Methods*. 2004; 34(2):215–24. PMID: [15312674](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15312674/).
32. Strube RW, Chen SY. Enhanced intracellular stability of sFv-Fc fusion intrabodies. *Methods*. 2004; 34(2):179–83. PMID: [15312671](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15312671/).
33. Samuel A, Housset M, Fant B, Lamonerie T. Otx2 ChIP-seq reveals unique and redundant functions in the mature mouse retina. *PLoS One*. 2014; 9(2):e89110. Epub 2014/02/22. doi: doi: [10.1371/journal.pone.0089110](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0089110) PONE-D-13-50945 [pii]. PMID: [24558479](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24558479/); PubMed Central PMCID: PMC3928427.
34. Nishida A, Furukawa A, Koike C, Tano Y, Aizawa S, Matsuo I, et al. Otx2 homeobox gene controls retinal photoreceptor cell fate and pineal gland development. *Nat Neurosci*. 2003; 6(12):1255–63. PMID: [14625556](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14625556/).
35. Barbas CF, Burton DR, Scott JK, Silverman GJ. *Phage Display, a Laboratory Manual*. New York: CSHL Press; 2001.

36. Di Nardo AA, Nedelec S, Trembleau A, Volovitch M, Prochiantz A, Montesinos ML. Dendritic localization and activity-dependent translation of Engrailed1 transcription factor. *Mol Cell Neurosci*. 2007; 35(2):230–6. PMID: [17399993](#).
37. Gordon JA, Stryker MP. Experience-dependent plasticity of binocular responses in the primary visual cortex of the mouse. *J Neurosci*. 1996; 16(10):3274–86. Epub 1996/05/15. PMID: [8627365](#).
38. Yokoo T, Knight BW, Sirovich L. An optimization approach to signal extraction from noisy multivariate data. *Neuroimage*. 2001; 14(6):1309–26. doi: [10.1006/nimg.2001.0950](#) PMID: [11707087](#).





## Article 2 : la régulation de la plasticité du cortex visuel par l'activité non-autonome de l'homéoprotéine Otx2 s'effectue via Gadd45b/g

---

### Objectif de l'étude :

L'homéoprotéine Otx2 contrôle la plasticité du cortex visuel par son activité cellulaire non-autonome car son accumulation préférentielle dans les cellules PV engendre leur maturation. En revanche, les mécanismes moléculaires (signalisation, transcription, traduction, etc.) permettant à Otx2 de favoriser la plasticité durant le développement tout en réprimant la plasticité chez l'adulte n'ont pas encore été identifiés. L'objectif de cette étude est d'identifier les cibles transcriptionnelles directes d'Otx2 dans les cellules PV ainsi que les possibles modifications épigénétiques induites par Otx2 et régulant la plasticité du cortex visuel.

### Méthodes :

Une liste de gènes candidats a été obtenue par séquençage d'ARN de la couche IV du cortex visuel de souris hétérozygotes *Otx2*<sup>+GFP</sup> et sauvages, à l'état plastique et non-plastique. L'utilisation de cycloheximide, un inhibiteur de la traduction, a permis de sélectionner les cibles transcriptionnelles directes. L'interaction physique entre Otx2 et le promoteur de ces gènes a été validée biochimiquement par gel retard et immunoprécipitation de la chromatine liée à Otx2. Par stratégie virale, nous avons étudié les effets de la surexpression du meilleur candidat (*Growth Arrest And DNA Damage Inducible Beta (Gadd45b)*) sur la plasticité du cortex visuel, en mesurant l'expression des gènes de plasticité (*Egr2*, *Arc*, *Fos*, *Egr4*) par qRT-PCR et les modifications de dominance oculaire après occlusion monoculaire par imagerie optique. Les modifications du statut épigénétique des cellules PV ont été observées par immunohistochimie d'un marqueur de méthylation de l'ADN (MeCP2) et par analyse de méthylation des îlots CpG des promoteurs des gènes de plasticité après conversion bisulfite.

### Résultats :

- Parmi les 22 gènes candidats de la couche IV du cortex visuel, Otx2 contrôle de manière directe la transcription de *Gadd45b/g*.
- Otx2 se lie physiquement au promoteur de *Gadd45b/g*.
- *Gadd45b/g* est exprimé par 50% des cellules entourées de PNN dans le cortex visuel.
- Otx2 contrôle positivement l'expression de *Gadd45b* pendant le développement postnatal mais réprime son expression chez l'adulte.



- La surexpression de *Gadd45b* dans le cortex visuel de souris adulte est suffisante pour augmenter l'expression des gènes de plasticité et rouvrir une fenêtre de plasticité de dominance oculaire.
- *Gadd45b* modifie le statut épigénétique des cellules PV, notamment par une variation des méthylation de certains îlots CpG de *Egr2*, *Fos* et *Gadd45b*.

#### **Discussion :**


- Le transfert d'Otx2 favorise l'expression de *Gadd45b* pendant le développement postnatal et la réprime chez l'adulte. Ces différences peuvent être dues à l'accessibilité de son promoteur, notamment par des modifications de la condensation de la chromatine, qui pourraient être dictées par la concentration d'Otx2. Une autre hypothèse serait le recrutement de co-facteurs différents pendant la période critique et chez l'adulte.
- La concentration d'Otx2 transféré pourrait avoir une influence sur la structure de la chromatine.
- Une surexpression de *Gadd45b* favorise une déméthylation de son promoteur ce qui lui donnerait la capacité de s'autoréguler.
- La déméthylation de certains îlots CpG des promoteurs d'*Egr2*, *Gadd45b* et *Fos* pourrait être suffisante à la surexpression de ces gènes, favorisant ainsi la plasticité.

## ORIGINAL ARTICLE

# Non-cell Autonomous OTX2 Homeoprotein Regulates Visual Cortex Plasticity Through *Gadd45b/g*

Jessica Apulei<sup>1,†</sup>, Namsuk Kim<sup>1,†</sup>, Damien Testa<sup>1,†</sup>, Jérôme Ribot<sup>1</sup>, David Morizet<sup>1</sup>, Clémence Bernard <sup>1</sup>, Laurent Jourden<sup>2</sup>, Corinne Blugeon<sup>2</sup>, Ariel A. Di Nardo <sup>1</sup> and Alain Prochiantz<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centre for Interdisciplinary Research in Biology (CIRB), Collège de France, CNRS UMR 7241, INSERM U1050, PSL University, Labex MemoLife, 75005 Paris, France and <sup>2</sup>Genomic Core Facility, Institut de Biologie de l'École Normale Supérieure (IBENS), École Normale Supérieure, CNRS, INSERM, PSL University, 75005 Paris, France

Address correspondence to Ariel A. Di Nardo. Email: ariel.dinardo@college-de-france.fr  [orcid.org/0000-0003-2944-488X](https://orcid.org/0000-0003-2944-488X)

<sup>†</sup>Co-first author (alphabetical order).

## Abstract

The non-cell autonomous transfer of OTX2 homeoprotein transcription factor into juvenile mouse cerebral cortex regulates parvalbumin interneuron maturation and critical period timing. By analyzing gene expression in primary visual cortex of wild-type and *Otx2<sup>+/GFP</sup>* mice at plastic and nonplastic ages, we identified several putative genes implicated in *Otx2*-dependent visual cortex plasticity for ocular dominance. Cortical OTX2 infusion in juvenile mice induced *Gadd45b/g* expression through direct regulation of transcription. Intriguingly, a reverse effect was found in the adult, where reducing cortical OTX2 resulted in *Gadd45b/g* upregulation. Viral expression of *Gadd45b* in adult visual cortex directly induced ocular dominance plasticity with concomitant changes in MeCP2 foci within parvalbumin interneurons and in methylation states of several plasticity gene promoters, suggesting epigenetic regulation. This interaction provides a molecular mechanism for OTX2 to trigger critical period plasticity yet suppress adult plasticity.

**Key words:** critical period, epigenetics, ocular dominance, optical imaging, parvalbumin interneuron

## Introduction

Experience-dependent plasticity shapes neural circuits in postnatal life during defined transient windows of heightened plasticity, or critical periods (CP), which generally begin in primary sensory areas and move up to more integrated brain regions, ending with plasticity in cortices involved with higher cognition. The developmental importance of such plasticity is exemplified by the loss of visual acuity following monocular deprivation (MD) during the CP for ocular dominance (OD). Imbalanced visual input reduces visual acuity of the “lazy eye” during infancy and leads to amblyopia, which afflicts 2–5% of the human population (Holmes and Clarke 2006). After CP closure, intrinsic potential for plasticity is

actively dampened resulting in the stabilization of brain circuits (Takesian and Hensch 2013).

CP are influenced by the non-cell autonomous transfer of OTX2 homeoprotein transcription factor, which controls the maturation of GABAergic fast-spiking parvalbumin interneurons (PV cells) and is required in adult mice for the maintenance of a nonplastic state (Sugiyama et al. 2008; Beurdeley et al. 2012; Spatzza et al. 2013; Bernard et al. 2016). The OTX2 homeoprotein possesses conserved sequence features within the homeodomain that permit translocation between cells (Joliot et al. 1991). In the brain, OTX2 is secreted by the choroid plexus, transported to the cortex, and then internalized by PV cells wrapped by extracellular perineuronal

nets (PNNs) (Beurdeley et al. 2012; Spatazza et al. 2013; Kim et al. 2014). Therefore, non-cell autonomous OTX2 has access to the entire cortex and can indeed control the timing of multiple CPs (Lee et al. 2017). Importantly, OTX2 begins to accumulate prior to CP onset and continues to accumulate after CP closure. Thus, Otx2-regulated plasticity can be explained by a 2-threshold model for increased OTX2 accumulation in PV cells: a first concentration threshold triggers CP onset while crossing a second threshold induces and maintains CP closure (Prochiantz and Di Nardo 2015). Furthermore, OTX2 is concentrated by the PNNs that specifically enwrap PV cells, thus, permitting a constant accumulation of OTX2 in certain PV cells throughout the cortex (Bernard and Prochiantz 2016). However, the molecular mechanisms that allow OTX2 to promote cortex plasticity in juvenile mice yet suppress plasticity in adult mice have not been elucidated.

Epigenetic changes are also implicated in cortical plasticity, as CP is regulated by chromatin reorganization through DNA methylation and histone modifications (Putignano et al. 2007; Krishnan et al. 2015, 2017; Lennartsson et al. 2015; Nott et al. 2015; Tognini et al. 2015). DNA methylation can repress transcription by blocking DNA binding of transcription factors or by recruiting repressor complexes containing histone deacetylases to condense chromatin structures (Fagiolini et al. 2009). While several studies have identified differential gene expression implicated in visual cortex plasticity (Majdan and Shatz 2006; Rietman et al. 2012; Tiraboschi et al. 2013; Benoit et al. 2015), we sought targets of OTX2 in plastic and nonplastic cortex. Here, we identify *Gadd45b/g* as direct targets of OTX2 in visual cortex. *Gadd45*-dependent DNA demethylation has been implicated in neurogenesis, long-term memory, and genomic stability (Hollander et al. 1999; Rai et al. 2008; Leach et al. 2012; Niehrs and Schäfer 2012; Sultan et al. 2012). We provide molecular evidence that OTX2 regulates *Gadd45b* expression in either direction, which permits OTX2 to stimulate CP plasticity yet dampen adult plasticity. Increasing expression of *Gadd45b* in adult mouse visual cortex modifies the epigenetic state of PV cells and induces OD plasticity.

## Materials and Methods

### Ethics Statement

All animal procedures were carried out in accordance with the guidelines of the European Economic Community (2010/63/UE) and the French National Committee (2013/118). For surgical procedures, animals were anesthetized with Xylazine (Rompun 2%, 5 mg/kg) and Ketamine (Imalgene 1000, 80 mg/kg) by intraperitoneal injection. This project (no. 00704.02) obtained approval from Ethics committee no. 59 of the French Ministry for Research and Higher Education.

### Animals

Conventionally raised C57Bl/6J mice were purchased from Janvier Laboratories. *Otx2*<sup>+/-GFP</sup> knock-in mice were kindly provided by Drs D. Acampora and A. Simeone (IGB, Naples, Italy). The scFuOtx2<sup>tg/0</sup> and scFuPax6<sup>tg/0</sup> mouse lines were generated through a knock-in approach, as described previously (Bernard et al. 2016).

### Brain Injections and Infusions

Stereotaxic injections into visual cortex (lambda:  $x = 1.7$  mm,  $y = 0$  mm,  $z = 0.5$  mm) of 300 ng of OTX2 protein (Beurdeley et al. 2012) or vehicle (0.9% NaCl), with or without 0.1  $\mu$ g/ $\mu$ L cycloheximide (Sigma C4859) in 2  $\mu$ L were performed with Hamilton syringe

at 0.2  $\mu$ L/min. For conditional choroid plexus expression in scFu mouse lines, intracerebroventricular stereotaxic injections (bregma:  $x = -0.58$  mm,  $y = \pm 1.28$  mm,  $z = 2$  mm) of 40  $\mu$ g of Cre-TAT protein (Spatazza et al. 2013) in 15% DMSO (Sigma D2650), 1.8% NaCl in 2  $\mu$ L were performed with a Hamilton syringe at 0.2  $\mu$ L/min. Two weeks after injection, mice were processed for layer IV dissection or in situ hybridization. For adeno-associated virus (AAV) infection, 2  $\mu$ L ( $3.4 \times 10^{11}$  GC/mL) of either AAV8-Syn-mCherry-2A-mGadd45b (Vector BioLabs) or AAV8-Syn-mCherry (Vector BioLabs) were injected in visual cortex as described above. Two weeks after injection, mice were processed for layer IV dissection, histology or MD.

Stereotaxic infusions into visual cortex (above coordinates) with 3-day osmotic mini pump (Alzet 1003D, Charles River Laboratories) were used to deliver 100  $\mu$ L of either cycloheximide (0.1  $\mu$ g/ $\mu$ L) and/or actinomycin D (0.2  $\mu$ g/ $\mu$ L, Sigma A9415) in 0.9% NaCl.

### Layer IV Dissection

Layer IV dissections were performed as previously described (Bernard et al. 2016). Briefly, visual cortex areas were excised with microscalpels in ice-cold PBS and cut into thin rectangular strips. The strips were laid on their sides to expose the cortical layers and were cut lengthwise in 2 equal parts twice to provide enriched layer IV.

### Analysis of Global Protein Synthesis

L-azidohomoalanine (L-AHA, 50  $\mu$ M, Invitrogen C10102) or vehicle (50% DMSO, 0.9% NaCl) with or without cycloheximide (0.1  $\mu$ g/ $\mu$ L) in 2  $\mu$ L were injected into visual cortex at P17. Mice were sacrificed 6 h after injection and layer IV was dissected for processing and western blot analysis. Biotinylation of L-AHA incorporated in nascent protein was performed by Click-iT Protein Reaction Buffer kit (Invitrogen C10276). Eluted biotinylated proteins were processed for western blot detection with horseradish peroxidase streptavidin (Vector Laboratories SA-5004) and total lane densities were quantified (ImageJ).

### cDNA Libraries and RNA Sequencing

For each genotype and age, samples were processed in duplicate, with each sample containing layer IV dissections pooled from 4 different mice (male and female). Library preparation and Illumina sequencing were performed at the Ecole normale supérieure Genomic Core Facility (Paris, France). Ribosomal RNA depletion was performed with the Ribo-Zero kit (Epicentre MRZH1124), using 2  $\mu$ g of total RNA. Libraries were prepared using the strand specific RNA-Seq library preparation ScriptSeq V2 kit (Epicentre SSV21124). Libraries were multiplexed by 4 on 2 flow cell lane(s). A 50 bp read sequencing was performed on a HiSeq 1500 device (Illumina). A mean of  $47 \pm 6$  million passing Illumina quality filter reads was obtained for each of the 8 samples.

### RNASEq Bioinformatics Analysis

The analyses were performed using the Eoulsan pipeline (Jourdren et al. 2012), including read filtering, mapping, alignment filtering, read quantification, normalization and differential analysis. Before mapping, poly N read tails were trimmed, reads  $\leq 11$  bases were removed, and reads with mean quality  $\leq 12$  were discarded. Reads were then aligned against the *Mus musculus* genome (UCSC) using Bowtie (version 0.12.9) (Langmead et al. 2009). Alignments from reads matching more than once on the reference genome were

removed using Java version of SAMtools (Li et al. 2009). To compute gene expression, *Mus musculus* GFF3 genome annotation from UCSC database was used. All overlapping regions between alignments and referenced exons were counted using HTSeq-count 0.5.3 (Anders et al. 2015). DESeq 1.8.3 (Anders and Huber 2010) was used to normalize sample counts and to perform statistical treatments and differential analyses. The RNASeq gene expression analysis excel files and raw fastq data files are available on the GEO repository ([www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/)) under accession number GSE98258.

### Quantitative RT-PCR

Total RNA was extracted from dissected tissue by using the AllPrep DNA/RNA Mini Kit (Qiagen 80204). cDNA was synthesized from 200 ng of total RNA with QuantiTect Reverse Transcription kit (Qiagen 205313). Quantitative PCR reactions were carried out in triplicate with SYBR Green I Master Mix (Roche S-7563) on a LightCycler 480 system (Roche). Expression was calculated by using the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method with *Gapdh* as a reference. All primers used are listed in Suppl. Figure S1C.

### In Situ Hybridization

In situ hybridization was performed as previously described (Di Nardo et al. 2007). Briefly, cryosections (20  $\mu$ m) were hybridized overnight at 70 °C with a digoxigenin (DIG)-labeled RNA probes (DIG RNA labeling kit, Roche 11277073910) for either *Gadd45b* or *Gadd45g* mRNA or *Gadd45b* pre-mRNA. After washing, sections were incubated with alkaline phosphatase-conjugated anti-DIG (1/2000; Roche 11633716001) overnight at 4 °C. DAB staining (Vector Laboratories SK-4100) was carried out according to manufacturer's instructions.

### Gel Shift Assay

OTX2 protein (in-house; 0.1  $\mu$ g) was incubated at room temperature for 30 min with 40 fmol of biotinylated DNA oligonucleotide (S1, S2, S3, S4, or S5 for *Gadd45b* and S1, S2, or S3 for *Gadd45g*) and 8 pmol of IRBP unbiotinylated probe (Chatelain et al. 2006) in the presence of 50 ng/ $\mu$ L didC in PBS. Complexes were separated on prerun 6% native polyacrylamide gels at 100 V in TBE. Samples were transferred onto a nylon membrane at 380 mA for 45 min, crosslinked with UV and detected using the LightShift Chemiluminescent EMSA Kit (ThermoFisher Scientific P120148), according to manufacturer's instructions. Membranes were imaged using a LAS-4000 gel imager (FUJIFILM).

### Chromatin Immunoprecipitation

Layer IV of primary visual cortices were pooled from 5 P100 WT mice and washed in PBS followed by wash buffer (20 mM HEPES pH 7.4; 150 mM NaCl; 125 mM Glycine, 1 mM PMSF). Nuclei were fixed in 1% formaldehyde (Sigma 252549) in PBS for 15 min at RT, isolated by dounce (pestle B) in lysis buffer (20 mM HEPES pH 7.4; 1 mM EDTA; 150 mM NaCl; 1% SDS; 125 mM Glycine; 1 mM PMSF), and then resuspended in wash buffer. Chromatin was purified by using modified Farnham protocol (<http://famham.genomecenter.ucdavis.edu/protocols/tissues.html>). Chromatin immunoprecipitation (ChIP) were performed by using a mix of 3  $\mu$ g of anti-Otx2 (goat, R&D AF1979) and 3  $\mu$ g of anti-Otx2 (rabbit, abcam 21990). For control ChIP, 6  $\mu$ g of anti-IgG (rabbit, abcam ab27478) were used. Immunoprecipitated DNA was analyzed by qPCR. Primers corresponding to the S2 probes were used for *Gadd45b* and *Gadd45g*, while primers for actin targeted intron-exon junctions.

### Immunohistochemistry

Mice were perfused transcardially with PBS followed by 4% paraformaldehyde prepared in PBS. Brains were postfixed 1 h at 4 °C and immunohistochemistry was performed on cryosections (20  $\mu$ m) encompassing the entire visual cortex. Heat-induced antigen retrieval in 10 mM sodium citrate was performed only for anti-MeCP2 experiments prior to overnight primary antibody incubation at 4 °C. Primary antibodies included anti-MeCP2 (rabbit, 1/200, Millipore MABE328), anti-mCherry (mouse, 1/200, Clontech 632543), anti-parvalbumin (rabbit, 1/200, SWANT PV235), and biotinylated WFA (1/100, Sigma L1516). Secondary antibodies were Alexa Fluor-conjugated (Molecular Probes). Images were acquired with a Leica SP5 confocal microscope and analyzed with ImageJ.

### MD and Surgery for Optical Imaging

For MD, mice were anesthetized prior to suturing of the left eye as previously described (Gordon and Stryker 1996). Animals were checked daily to ensure sutures remained intact. The eye was opened immediately before recording.

For optical imaging, mice were anesthetized with urethane (1.2 g/kg, intraperitoneal) and sedated with chlorprothixene (8 mg/kg, intramuscular). Atropine (0.1 mg/kg) and dexamethasone (2 mg/kg) were injected subcutaneously with body temperature maintained at 37 °C.

### Visual Stimulation and Optical Imaging Recording

Visual cortical responses were recorded using imaging methods based on Fourier transform following periodic stimulation (Kalatsky and Stryker 2003; Cang et al. 2005). A high refresh rate monitor was placed 20 cm in front of stereotaxically restrained mouse. Stimulation consisted of a horizontal bar drifting downwards periodically at 1/8 Hz in the binocular visual field of the recorded hemisphere (from +5° ipsilateral to +15° contralateral). Each eye was stimulated 5 times alternately for 4 min. Intrinsic signals were recorded using a 1M60 CCD camera (Dalsa) with a 135  $\times$  50 mm<sup>2</sup> tandem lens (Nikon) configuration. After acquisition of the surface vascular pattern, the focus of the camera was lowered by 400  $\mu$ m deeper. Intrinsic signals were acquired with a 700 nm illumination wavelength and frames stored at a rate of 10 Hz, after a 2  $\times$  2 pixels spatial binning.

### Data Analysis

Functional maps for each eye were calculated offline. Prior to Fourier transform, slow varying components independent of the stimulation were subtracted by the generalized indicator function (Yokoo et al. 2001). Retinotopic organization and intensity were computed from the phase and magnitude components of the signal at the frequency of stimulation. For each eye, the 5 activity maps were averaged, filtered with a Gaussian kernel low-pass filter (3 pixels s.d.) and set with a cut-off threshold at 50% of the maximum response. The binocular zone was defined as the intersection between the response regions of each eye. For each session, an OD value at each pixel was defined as (C-)/(C+), calculated from the response amplitude from the contralateral (C) eye and the ipsilateral (I) eyes. The OD index was then computed for each session as the average of the OD values in the binocular zone. Consequently, OD index ranged from -1 to 1, with negative values representing an ipsilateral bias, and positive values a contralateral bias.



## Bisulfite Sequencing Analysis

Genomic DNA was processed for bisulfite conversion by using the EpiTect Bisulfite Kit (Qiagen 59104). Converted DNA was amplified with the HotStar Taq Plus Kit (Qiagen 203646) by primers designed with MethPrimer (Li and Dahiya 2002). Primers are listed in Suppl. Fig. S3E. PCR was run with 50 ng converted DNA and 20  $\mu$ M of each primer in 40  $\mu$ L total reaction volume: 14  $\times$  (30 s 94  $^{\circ}$ C; 30 s 62–55  $^{\circ}$ C; 60 s 72  $^{\circ}$ C), 36  $\times$  (30 s 94  $^{\circ}$ C; 30 s 55  $^{\circ}$ C; 60 s 72  $^{\circ}$ C), 1  $\times$  17 min 72  $^{\circ}$ C. Gel-purified products were ligated in the pCR2.1-TOPO vector by using the TOPO-TA cloning kit (Thermo Fischer K4600-01) and then transformed into DH5 $\alpha$  cells. Positive clones were sequenced and percent methylation was analyzed with QUMA (Kumaki et al. 2008).

## Statistical Analysis

Statistical analysis was performed with Prism 6 (GraphPad). Pairwise comparison was performed with Student t-test (with Sidak–Bonferroni correction), while multiple group analyses were done with ANOVA (one- or two-way) followed by Bonferroni correction. To assess the methylation frequency, two-way ANOVA with Fisher's LSD test was applied at individual CpG sites.

## Results

### Non-cell Autonomous Regulation of Gene Expression by OTX2 in the Visual Cortex

A better understanding of how OTX2 regulates plasticity in the visual cortex requires that its non-cell autonomous transcription targets be identified. We dissected layer IV of the visual cortex and used RNA-sequencing to analyze gene expression at postnatal day 30 (P30) and P100 in wild-type (WT) and *Otx2*<sup>+/*GFP*</sup> heterozygous mice. Layer IV dissections provide lysates enriched in PV cells that drive CP plasticity and capture OTX2. These ages were chosen because CP plasticity is opened at P30 in WT but not in *Otx2*<sup>+/*GFP*</sup> mice, given that *Otx2* genetic deletion delays CP opening (Sugiyama et al. 2008), and that the CP is closed at P100 in WT but not yet in *Otx2*<sup>+/*GFP*</sup> mice. Thus, genes with similar expression at P30 in *Otx2*<sup>+/*GFP*</sup> and at P100 in WT mice but with a different level of expression during the CP (P30 in WT or P100 *Otx2*<sup>+/*GFP*</sup> mice) were considered as potential genes involved in plasticity. After applying cut-offs for significance (adjusted *P* < 0.05) and fold change (>1.5) in expression between P30 and P100 for both genotypes, we identified 20 candidate genes, all of them upregulated during CP (Fig. 1A,B). No significantly downregulated genes were identified. This small list contains several immediate early genes, including *Arc*, *Fos*, *Egr1/2/4*, and *Nr4a*, already implicated in cerebral cortex plasticity (Kaczmarek and Chaudhuri 1997; Andreasson and Kaufmann 2002; Li et al. 2005; Shepherd and Bear 2011; Vallès et al. 2011; Tognini et al. 2015; Bernard et al. 2016).

However, while this approach revealed potential “plasticity genes” within layer IV, it did not identify genes directly regulated by non-cell autonomous OTX2 in PV cells. In the mouse visual cortex, CP for binocular vision opens at P20 once internalized OTX2 has reached a first concentration threshold (Spatazza et al. 2013). We reasoned that direct OTX2 transcriptional targets are not dependent on protein synthesis (do not require an intermediate target) and thus that their transcripts might still be upregulated in the presence of cycloheximide (CHX), a blocking agent for protein translation in vivo (Sharma et al. 2012). The activity of CHX was validated by the decrease of the nascent protein measured by L-azidohomoalanine incorporation (Suppl. Fig. S1A, B).

Low-dose CHX, or vehicle, was infused in the visual cortex between P20 and P23. Upon CHX infusion, only *Gadd45b/g*, and *Pvr* were still significantly upregulated (Fig. 1C), suggesting that the transcription of all the other candidate genes between P20 and P23 was either not direct or required translation of a cofactor. Because CHX has been reported to stabilize some transcripts (Ooi et al. 1993), we verified whether the upregulation of these 3 genes is indeed transcription-dependent by coinfusion of CHX and actinomycin D, a transcription inhibitor. This cocktail eliminated *Pvr* (Fig. 1C), suggesting that *Gadd45b/g* are the best candidates for direct regulation by OTX2. To exclude OTX2-independent effects, CHX was infused between P20 and P23 in the visual cortex of WT and *Otx2*<sup>+/*GFP*</sup> mice, which have low endogenous OTX2 levels. Indeed, *Gadd45b* was significantly upregulated only in WT mice (Fig. 1D).

We have previously shown that cortical injection or infusion of OTX2 protein result in its specific uptake by PV cells (Sugiyama et al. 2008; Beurdeley et al. 2012) and anticipates CP opening (Sugiyama et al. 2008). To confirm direct *Gadd45b/g* regulation by non-cell autonomous OTX2, we injected recombinant OTX2 protein at P17 with or without CHX. Six hours after injection, exogenous OTX2 increased the expression of *Gadd45b/g* and *Pvr*, but only that of *Gadd45b/g* in the presence of CHX (Fig. 1E). This finding further suggests that *Gadd45b/g* are direct OTX2 targets, given that the effect requires only OTX2 and is translation-independent. *Gadd45b/g* may therefore directly relay OTX2 activity to regulate plasticity in the visual cortex.

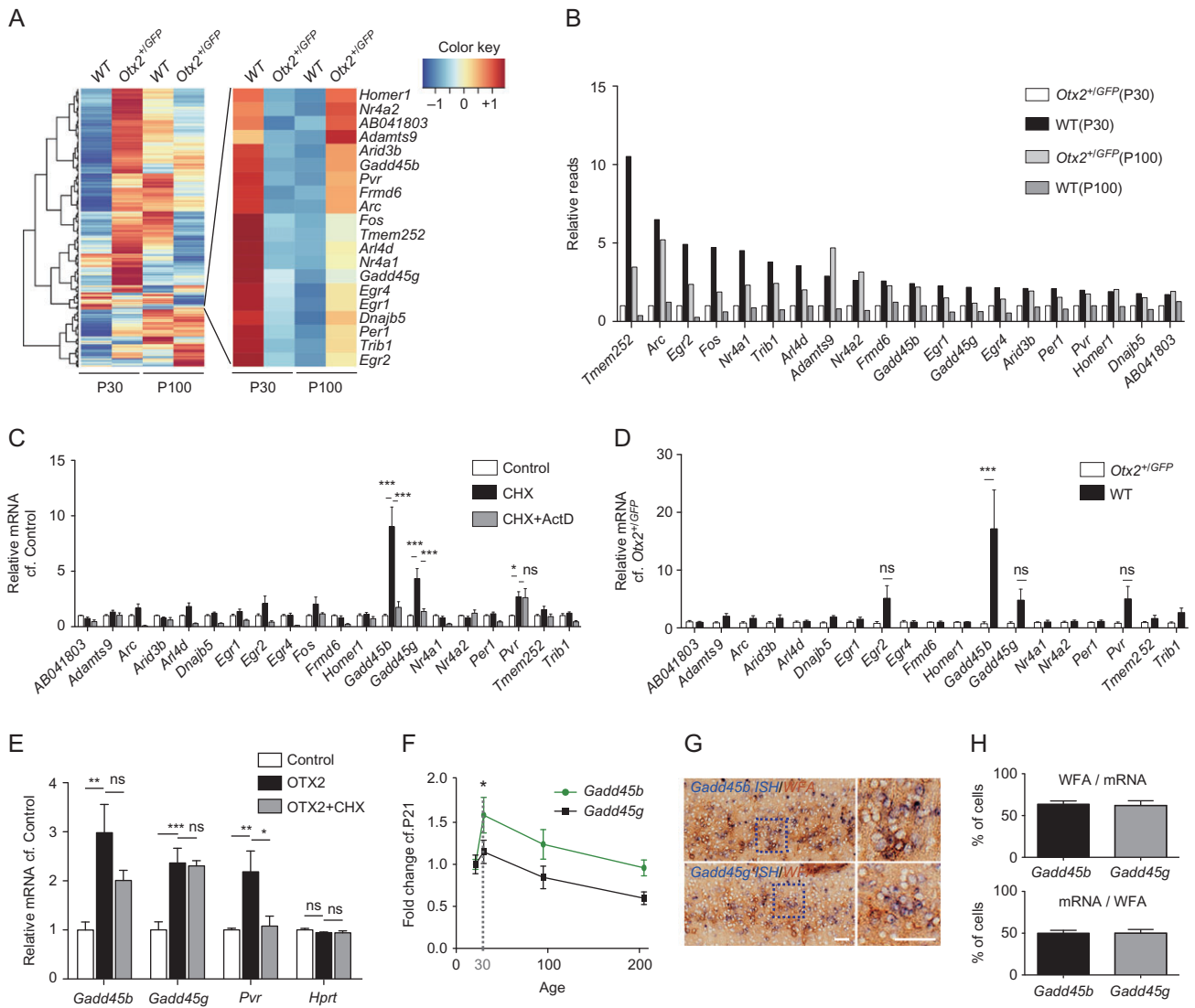
Before exploring this hypothesis further, we confirmed that *Gadd45b/g* cortical expression not only increases between P21 and P30, but also declines as plasticity is turned off (Fig. 1F) and that the 2 genes are expressed in the cells that internalize OTX2 (Fig. 1G). Extracortical OTX2 is primarily internalized by PV cells through their PNNs, which can be stained by the lectin *Wisteria Floribunda Agglutinin* (WFA). Both *Gadd45b/g* are expressed within WFA-stained neurons (Fig. 1G), even though the overlap is only 50% (Fig. 1H), demonstrating expression in other cell types.

### *Gadd45b/g* Genes Contains OTX2 Binding Sequences

Direct regulation of *Gadd45b/g* expression should involve binding of OTX2 to elements within their genes. Based on known *Otx2* consensus sequence (Samuel et al. 2014; Hoch et al. 2015), we identified 5 potential sites in *Gadd45b* and 3 in *Gadd45g* for which probes were synthesized (Fig. 2A and Suppl. Fig. S2A). Gel shift experiments identified at least 2 probes per gene as most promising (Fig. 2B and Suppl. Fig. S2B), and these probes were chased by IRBP (Fig. 2C and Suppl. Fig. S2C), which is known to interact with the DNA-binding site in OTX2 (Chatelain et al. 2006). We then performed ChIP-qPCR analysis with primers for the *Gadd45b* and *Gadd45g* S2 motifs and for actin negative control and detected enrichment for both *Gadd45b* and *Gadd45g* from lysates of P100 mouse V1 layer IV (Fig. 2D). The use of layer IV dissection avoids interference from OTX1, as ChIP antibodies are typically pan-OTX (Kim et al. 2014).

### *Gadd45b* Regulates the Expression of Plasticity Genes in the Mouse Visual Cortex

To further verify the correlation between OTX2 internalization and the expression of *Gadd45b/g*, we took advantage of 2 conditional mouse lines carrying anti-*Otx2* or anti-*Pax6* single chain antibodies (scFv): scFv*Otx2*<sup>tg/o</sup> and scFv*Pax6*<sup>tg/o</sup>. The expression and secretion of these antibodies (scFv-*Otx2* and scFv-*Pax6*)

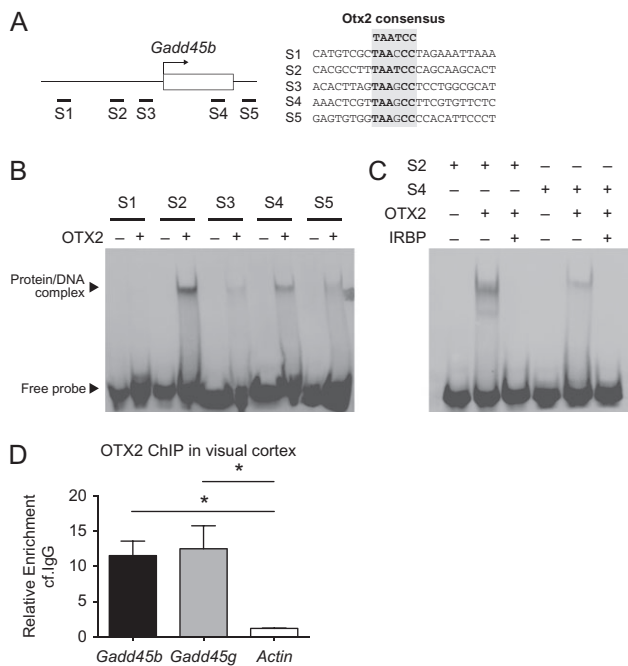


**Figure 1.** *Gadd45b/g* are direct targets of OTX2 in the visual cortex of juvenile mice. (A) Heat map of RNA deep sequencing of visual cortex layer IV from *Otx2*<sup>+/+</sup> (WT) and *Otx2*<sup>+/GFP</sup> mice at P30 and P100. Identified OTX2-dependent plasticity-associated genes are shown in the expanded panel (right). (B) Relative read values for OTX2-dependent plasticity-associated genes normalized to values for *Otx2*<sup>+/GFP</sup> mice at P30. (C) Visual cortex layer IV expression of candidate genes measured by RT-qPCR following 3-day infusion of cycloheximide (CHX) or CHX with actinomycin D (ActD) from P20 to P23. Values are average fold ratios compared with vehicle-infused samples (Control), averaged from 4 independent experiments. Error bars,  $\pm$ SEM (standard error of the mean); \* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$  by two-way ANOVA with Bonferroni post hoc test; mice, Control  $n = 11$ , CHX  $n = 10$ , CHX+ActD  $n = 7$ . (D) Visual cortex layer IV expression of candidate genes measured by RT-qPCR following 3-day infusion of CHX from P20 to P23 in *Otx2*<sup>+/+</sup> (WT) and *Otx2*<sup>+/GFP</sup> mice. Values are average fold ratios compared with *Otx2*<sup>+/GFP</sup>. Error bars,  $\pm$ SEM; \*\*\* $P < 0.001$  by two-way ANOVA with Bonferroni post hoc test; mice, WT  $n = 3$ , *Otx2*<sup>+/GFP</sup>  $n = 3$ . (E) *Gadd45b*, *Gadd45g*, *Pvr*, and *Hpvt* expression measured by RT-qPCR 6 hours after visual cortex injection of OTX2 recombinant protein with or without CHX. Values are averages of fold ratios compared with vehicle-injected samples (Control). Error bars,  $\pm$ SEM; \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  by one-way ANOVA with Bonferroni post hoc test; mice, Control  $n = 8$ , OTX2  $n = 4$ , OTX2+CHX  $n = 4$ . (F) *Gadd45b* and *Gadd45g* expression as function of age as measured by RT-qPCR. Values are averages of fold ratios compared with P21. Error bars,  $\pm$ SEM; \* $P < 0.05$  by one-way ANOVA with Bonferroni post hoc test; mice,  $n = 4$ –6 per age group. (G, H) In situ hybridization (G) of *Gadd45b* and *Gadd45g* combined with DAB staining of *Wisteria floribunda agglutinin* (WFA) to label PNNs in WT P30 visual cortex. Dotted boxes are magnified in the right-side panels. Co-staining was quantified (H) by number of cells measured in a  $600 \times 350 \mu\text{m}^2$  area covering the supragranular layers of the binocular zone of adult visual cortex. Scale bars,  $50 \mu\text{m}$ ; mice,  $n = 7$ .

can be induced specifically in the adult choroid plexus by injecting a cell-permeable Cre bacterial recombinase Cre-TAT in the lateral ventricles (Bernard et al. 2016). Secreted scFv-Otx2 neutralizes OTX2 in the cerebrospinal fluid (CSF), reduces the amount of OTX2 internalized by PV cells, induces a strong expression of *Arc*, *Fos*, *Egr4*, and *Nr4a1* in supragranular layers of the visual cortex, and reopens a period of physiological plasticity in the adult (Bernard et al. 2016). We now show that induction of scFv-Otx2 but not scFv-Pax6 increased *Gadd45b* and *Gadd45g* expression in the adult visual cortex (Fig. 3A). This

increase of *Gadd45b* and *Gadd45g* is correlated with the increase of plasticity genes (Fig. 3B). Given its stronger correlation with plasticity gene expression, we privileged analysis of *Gadd45b* for our subsequent experiments. To visualize the increase of the *Gadd45b* expression, we performed in situ hybridization with *Gadd45b* intronic probe to recognize the newly synthesized precursor mRNA (pre-mRNA) (Fig. 3C). Interestingly, induction of scFv-Otx2 but not scFv-Pax6 leads to a significant increase in newly synthesized *Gadd45b* specifically in layer IV (Fig. 3D). These findings reinforce the correlation between *Gadd45b/g*





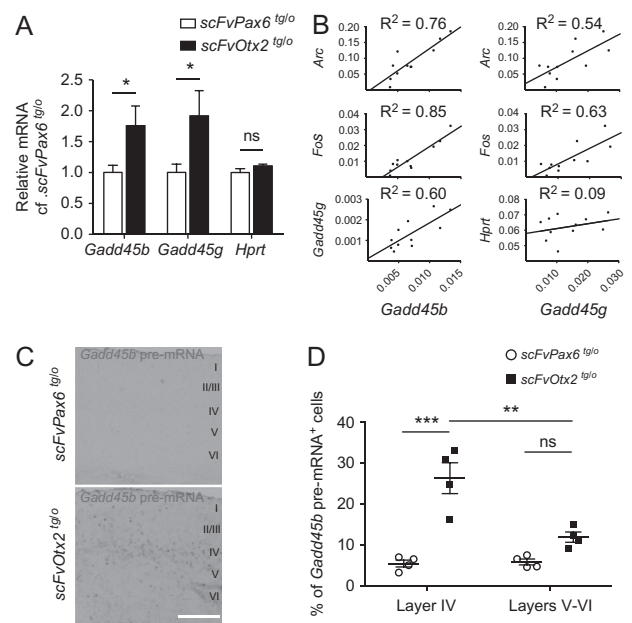
**Figure 2.** *Gadd45b* gene has a sequence recognized by OTX2. (A) Oligonucleotides (S1, S2, S3, S4, S5) mapping on *Gadd45b* gene (left) were chosen based on the Otx2 consensus motif (right). Identical bases are highlighted in grey. (B, C) Gel shift assays with biotinylated DNA probes (S1, S2, S3, S4, S5) in the presence (+) or absence (-) of OTX2 protein (B). Competition assay of the DNA/protein complex is obtained with IRBP unbiotinylated probe (C). (D) qRT-qPCR analysis of OTX2 chromatin-immunoprecipitation performed on chromatin extracted from layer IV of V1 lysates with endogenous OTX2. Error bars,  $\pm$ SEM; \* $P$  < 0.05 by one-way ANOVA with Bonferroni post hoc test;  $n$  = 3.

expression and plasticity, not only during juvenile development but also in the adult mouse.

A consequence of *Gadd45b/g* being direct targets of OTX2, in contrast with *bona fide* “plasticity genes” (Fig. 1C), is that some of these genes may be controlled by GADD45b. To verify this possibility, their expression was measured after low-titer viral expression of *Gadd45b* (AAV8-Syn-mCherry-2A-*Gadd45b*) in the visual cortex of adult (3-month-old) mice, which results in overexpression mainly in PV cells (Fig. 4A,B). Similar to what was observed during juvenile development (Fig. 1F) and after induced adult plasticity (Fig. 3A), *Gadd45b* expression was increased 2-fold on average, which resulted in upregulation of *Gadd45g* and other “plasticity genes” including *Egr2*, *Arc*, *Fos*, and *Egr4* (Fig. 4C). Furthermore, the expression level of these genes was directly correlated with that of *Gadd45b* (Fig. 4D).

### Gadd45b Gain of Function Reopens Physiological Plasticity in the Adult Visual Cortex

The ability of *Gadd45b* to reactivate the expression of “plasticity genes” in the adult suggested that it may also reopen physiological plasticity. OD bias index was evaluated with intrinsic optical imaging by comparing retinotopic map amplitude of contralateral and ipsilateral eyes (Fig. 5). Control adult mice (injected with AAV8-Syn-mCherry) did not reopen physiological plasticity as no difference in OD index was observed after 4-day MD of the contralateral eye (Fig. 5B,C,F). However, viral overexpression of *Gadd45b* (injected with AAV8-Syn-mCherry-2A-*Gadd45b*) induced a general decrease in response strength for both eyes (Fig. 5G)



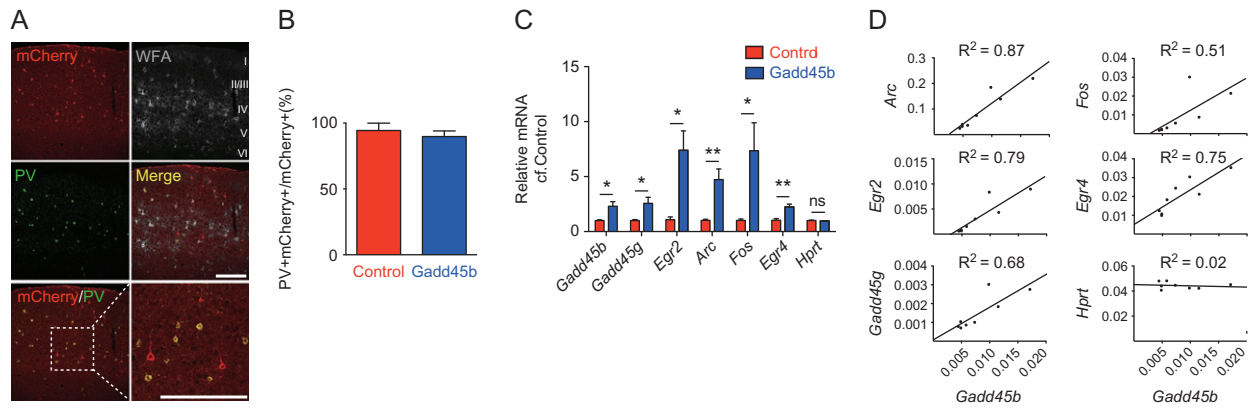
**Figure 3.** Reopening plasticity in the adulthood by blocking OTX2 transfer increases *Gadd45b/g* expression. (A) *Gadd45b* and *Gadd45g* expression in visual cortex layer IV of scFvPax6<sup>tg/o</sup> and scFvOtx2<sup>tg/o</sup> adult mice 2 weeks after intraventricular Cre-TAT protein injection. Error bars,  $\pm$ SEM; \* $P$  < 0.05 by Student *t*-test; 2 independent experiments; mice, scFvPax6<sup>tg/o</sup>  $n$  = 6, scFvOtx2<sup>tg/o</sup>  $n$  = 5. (B) Correlation between expression levels of *Gadd45b*, *Gadd45g* and plasticity genes in the scFv-Otx2 paradigm of reopening plasticity. (C, D) In situ hybridization (C) of *Gadd45b* intronic probes (pre-mRNA) on scFvOtx2<sup>tg/o</sup> or scFvPax6<sup>tg/o</sup> adult mice 2 weeks after intraventricular Cre-TAT protein injection. Quantification of the percentage of *Gadd45b* pre-mRNA positive cells in layer IV or layers V-VI (D). Scale bar, 500  $\mu$ m; Error bars,  $\pm$ SEM; \*\* $P$  < 0.01, \*\*\* $P$  < 0.001 by two-way ANOVA with Bonferroni post hoc test; mice, scFvPax6<sup>tg/o</sup>  $n$  = 4, scFvOtx2<sup>tg/o</sup>  $n$  = 4.

and led to a reopening of physiological plasticity (Fig. 5D–F). The reduction in OD index is mediated by an increase of the open eye response (Fig. 5G), which is in accordance with induced adult V1 plasticity in scFvOtx2<sup>tg/o</sup> mice (Bernard et al. 2016).

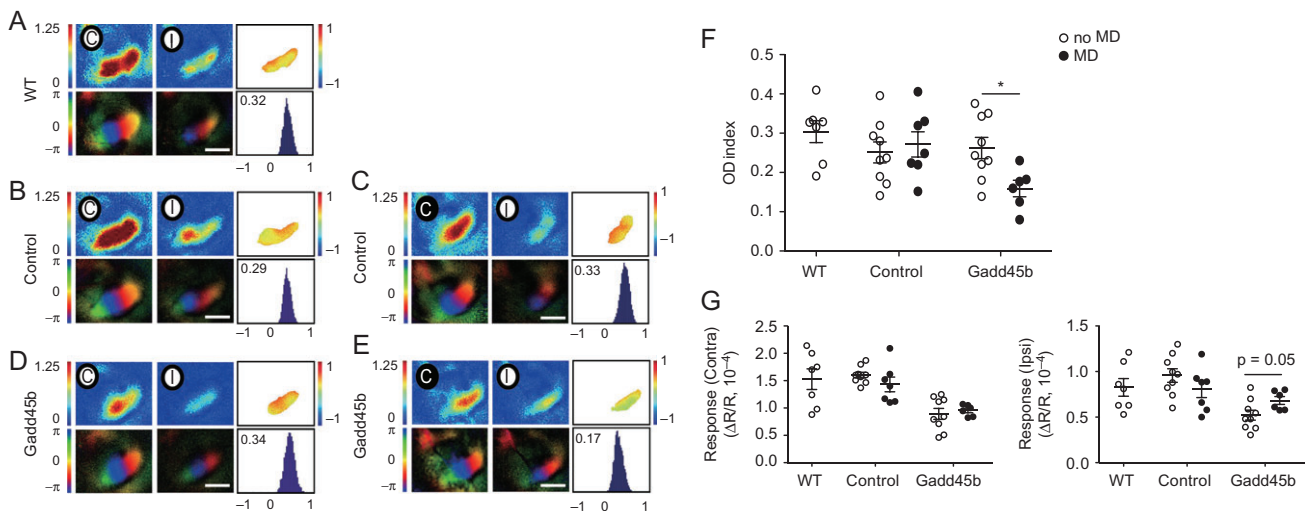
### Gadd45b Controls the Methylation State of Visual Cortex

Given that *Gadd45b* actively participates in DNA demethylation (directly or indirectly), we assessed global methylation patterns of visual cortex layer IV by evaluating the localization of Methyl CpG Binding Protein 2 (MeCP2), a marker for DNA methylation, at different ages (P20, P30, P60, P100). Quantification of the number of MeCP2 foci revealed a decrease during postnatal development specifically in WFA-positive cells in V1 (Fig. 6A,B). To assess whether changes occur in other sensory cortices that undergo CP, we measured foci number in primary auditory cortex and found a similar decrease (Fig. 6C). The observed changes in expression of plasticity genes could happen through rearrangement of the chromatin structure towards a heterochromatic state, or by accumulation of MeCP2 protein within promoters of these genes. We observed the same intensity for MeCP2 protein staining but an increase in the area of foci in V1 of adult mice (Fig. 6D,E), suggesting changes in methylation pattern (and not necessarily total DNA methylation) that lead to a more compact chromatin.

The reduction of MeCP2 foci specifically in V1 WFA-positive cells during postnatal development follows the kinetics of WFA intensity (Lee et al. 2017), suggesting it reflects a consolidated state of mature PV cells. While PNN assembly takes several



**Figure 4.** Overexpression of *Gadd45b/g* in visual cortex induces plasticity gene expression in the adult. (A) Immunohistochemistry of mCherry (red), PV (green), WFA (grey) in visual cortex of adult mice injected with AAV8-Syn-mCherry-2A-*Gadd45b*. Scale bars, 200  $\mu$ m. Enlargement is shown in bottom right panel. (B) Proportion of infected cells (mCherry+) that also express PV (PV+) in visual cortex of adult mice 2 weeks after injection of AAV8-Syn-mCherry (Control) or AAV8-Syn-mCherry-2A-*Gadd45b* (*Gadd45b*). Error bars,  $\pm$ SEM; mice, Control  $n = 3$ , *Gadd45b*  $n = 3$ . (C) Expression of plasticity genes measured by RT-qPCR following viral overexpression of *Gadd45b* in adult mouse visual cortex. Values are averages of fold ratios compared with AAV8-Syn-mCherry injected mice (control). Error bars,  $\pm$ SEM; \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  by Student *t*-test; mice,  $n = 4$  per condition. (D) Correlation between expression levels of *Gadd45b* and plasticity genes shown in (C).

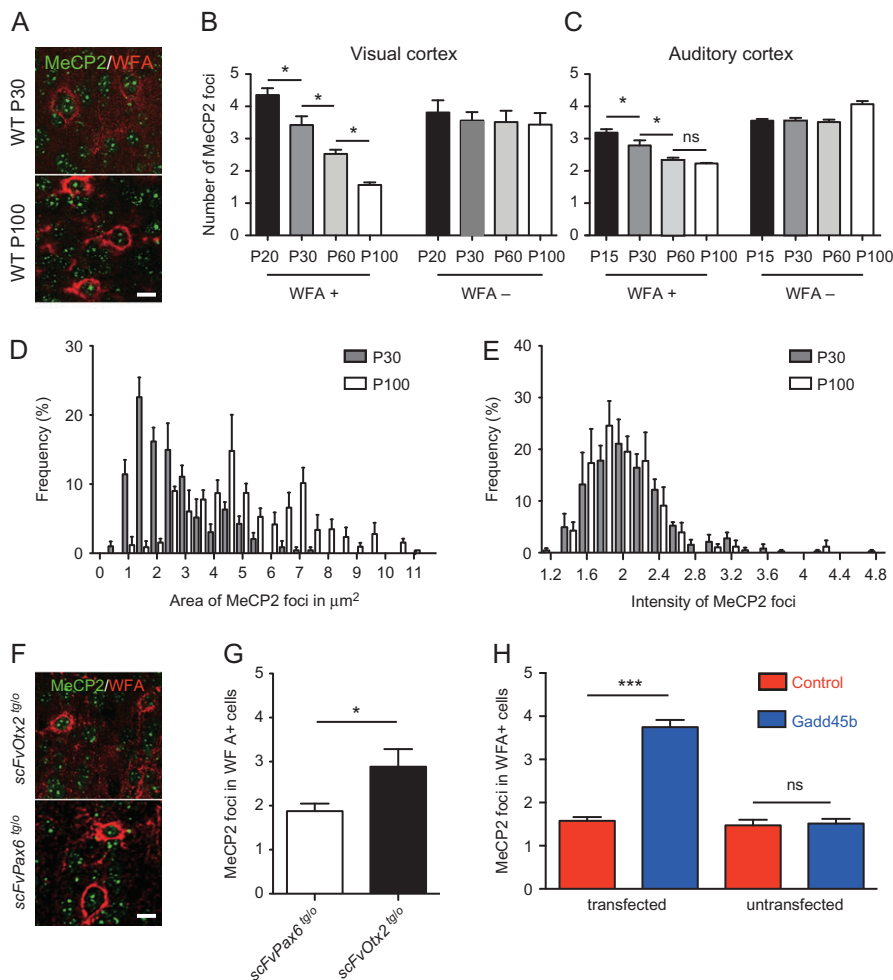


**Figure 5.** Overexpression of *Gadd45b* in visual cortex reopens the ocular dominance plasticity in the adult. (A-E) Optical imaging maps of responses to the ipsilateral (I) and contralateral (C) eye in the binocular region of V1 in adult wild-type (WT) mice, either (A) un-injected, (B, C) injected with AAV8-Syn-mCherry (Control), and (D, E) injected with AAV8-Syn-mCherry-2A-*Gadd45b* (*Gadd45b*). Monocular deprivation (MD) was performed 2 weeks after virus injection (C, E). Stimulated contralateral and ipsilateral eyes are indicated with a white (open) or black (closed) circle. Top left and middle panels represent the signal magnitude for the retinotopic maps ( $\Delta R/R$ ,  $\times 10^{-4}$ ) for each eye; bottom left and middle panels indicate corresponding map regularity. Top right panel shows the normalized ocular dominance (OD) map, and bottom right panel shows the OD histogram, with average value inset. Scale bars, 1 mm. (F) Average OD indices determined in WT mice, AAV8-Syn-mCherry (Control) or AAV8-Syn-mCherry-2A-*Gadd45b* (*Gadd45b*) injected mice without MD (white circle) and after 4 days of MD (black circle). Error bars,  $\pm$ SEM; \* $P < 0.05$  by multiple *t*-tests corrected with Sidak-Bonferroni method; mice,  $n = 6-9$  for each group. (G) Average V1-activation of the contralateral (Contra) response (top panel) and of the ipsilateral (Ipsi) response (bottom panel). Error bars,  $\pm$ SEM; multiple *t*-tests corrected with Sidak-Bonferroni method; mice,  $n = 6-9$  for each group.

weeks to reach maximum, it remains surprisingly dynamic in adult V1 when OTX2 levels are reduced (Beurdeley et al. 2012; Spatazza et al. 2013; Bernard et al. 2016). We find MeCP2 foci show similar dynamics, as reopening adult plasticity by blocking OTX2 in CSF of *scFvOtx2<sup>tg/o</sup>* mice at P90 led to an increase of the number of MeCP2 foci in visual cortex WFA-positive PV cells compared with *scFvPax6<sup>tg/o</sup>* mice (Fig. 6F,G). This increase is similar to the number of foci observed in WT mice at the peak of plasticity (Fig. 6B). We also observed an increase in MeCP2 foci in visual cortex WFA-positive PV cells of adult mice when *Gadd45b* was overexpressed by viral injection (Fig. 6H). This effect was cell-autonomous given that WFA-positive cells not over-expressing *Gadd45b* (i.e., mCherry negative) showed

no change in MeCP2 foci number (Fig. 6H). Thus, both OTX2 and *GADD45b* levels impact chromatin structure in PV cells.

To determine whether *Gadd45b* regulates plasticity gene expression via DNA demethylation, we performed bisulfite assays on V1 layer IV after viral *Gadd45b* overexpression. We targeted for analysis promoter regions enriched in CpG islands of known plasticity genes (*Arc*, *Egr2*, and *Fos*), along with *Gadd45b* (Fig. 7 and Suppl. Fig. S3). We observed a significant change in at least one methylation site in *Egr2*, *Fos* and *Gadd45b*, but no changes in *Arc* (Fig. 7A-D). Interestingly, while PV cells express *Egr2*, *Fos*, and *Gadd45b*, they do not express *Arc*. Given that changes in MeCP2 foci are specific to PV cells (Fig. 6H) and that viral *Gadd45b* overexpression occurs mainly in PV cells



**Figure 6.** Gadd45b affects the epigenetic state of PNN-enwrapped neurons of the visual cortex. (A) Immunohistochemistry (IHC) of MeCP2 (green) and WFA (red) in visual cortex layer IV of WT mice at P30 and P100. Scale bar, 10  $\mu$ m. (B, C) Average number of MeCP2 foci in WFA-positive (WFA+) and WFA-negative (WFA-) cells during postnatal development in visual cortex layer IV (B) and in auditory cortex layer IV (C). Error bars,  $\pm$ SEM; \* $P$  < 0.05 by one-way ANOVA with Bonferroni post hoc test; mice,  $n$  = 3–7 per age group. (D, E) Distribution of MeCP2 foci area (D) and intensity (E) of WFA+ cells of visual cortex in WT mice at P30 (grey) and P100 (white). Error bars,  $\pm$ SEM; mice,  $n$  = 4 per age group. (F) IHC of MeCP2 (green) and WFA (red) in visual cortex of scFvPax6<sup>tg/0</sup> and scFvOtx2<sup>tg/0</sup> mice 2 weeks after intraventricular Cre-TAT protein injection. Scale bar, 10  $\mu$ m. (G) Average number of MeCP2 foci in WFA+ cells in scFvPax6<sup>tg/0</sup> and scFvOtx2<sup>tg/0</sup> mice measured by IHC 2 weeks after intraventricular Cre-TAT protein injection. Error bars,  $\pm$ SEM; \* $P$  < 0.05 by Student t-test; mice,  $n$  = 3 for each genotype. (H) Average number of MeCP2 foci in WFA+ cells 2 weeks after injection of either AAV8-Syn-mCherry (Control) or AAV8-Syn-mCherry-2A-Gadd45b (Gadd45b) in adult visual cortex. MeCP2 foci number are compared for transfected and untransfected cells. Error bars,  $\pm$ SEM; \*\*\* $P$  < 0.001 by one-way ANOVA with Bonferroni post hoc test; mice,  $n$  = 3 for each group.

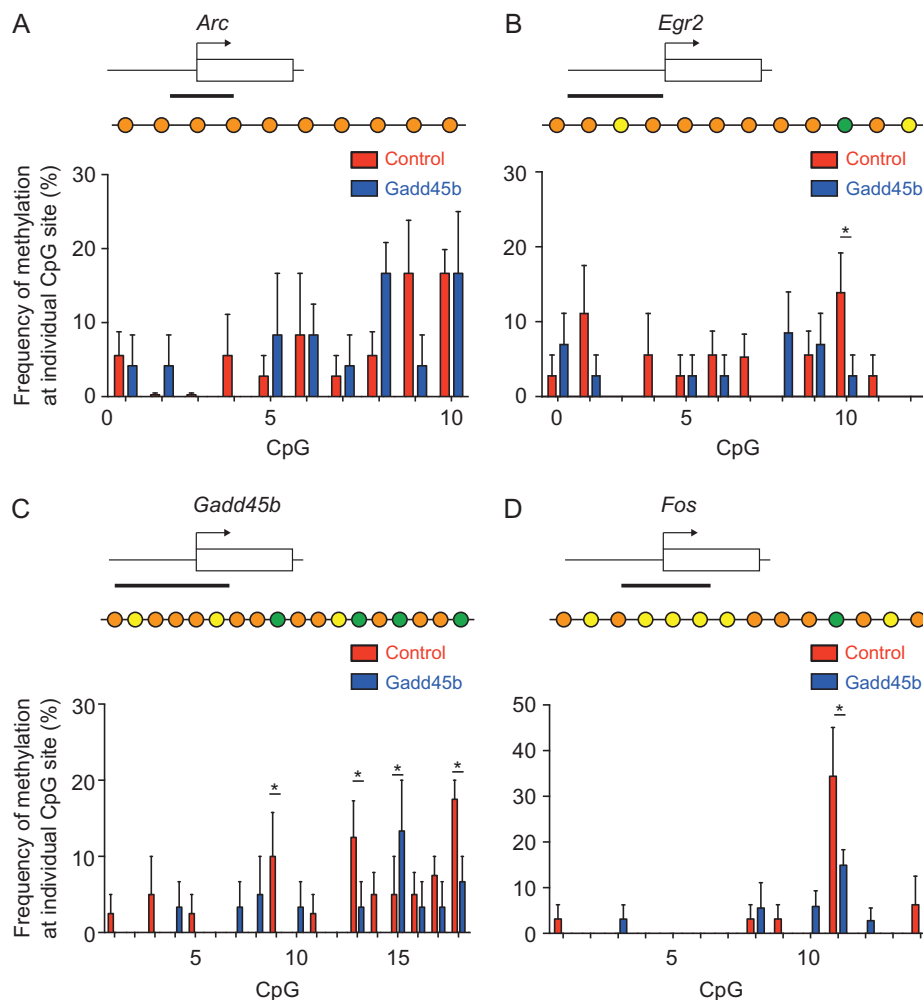
(Fig. 4A), changes in DNA methylation are likely triggered by increasing GADD45b in PV cells.

## Discussion

The Gadd45 family has been implicated in epigenetic gene activation (Barreto et al. 2007; Ma et al. 2009; Gavin et al. 2012), which can impact synaptic plasticity, long-term memory and ultimately animal behavior (Leach et al. 2012; Sultan et al. 2012). Furthermore, Gadd45 genes have altered expression in mouse visual cortex after MD (Majdan and Shatz 2006; Tognini et al. 2015). Thus, changes in Gadd45b/g activity could have a broad impact on gene regulation during PV cell maturation for CP timing, consistent with expression that is highest during CP, as we show here and as has been previously shown in mouse somatosensory cortex (Matsunaga et al. 2015). We find that when OTX2 protein levels are transiently increased in PV cells prior to CP onset, Gadd45b/g levels are rapidly increased in a translation-independent manner. Furthermore,

when Gadd45b expression is increased in PV cells of adult cortex, we find juvenile-like MeCP2 foci along with increased layer IV plasticity gene expression and reactivated OD plasticity. This suggests that OTX2 signaling impacts PV cell maturation and function through GADD45b/g, which can control the expression of a swath of genes and leave epigenetic marks that would eventually stabilize during CP closure and be maintained into adulthood.

It is intriguing that OTX2 regulates Gadd45b/g oppositely in the juvenile and adult cortex. MeCP2 foci number and size gradually change in PV cells over the course of the CP and through to adulthood. In comparison, the state of MeCP2 foci in PV cells rapidly reverses when OTX2 signaling is compromised in adult, a paradigm that reactivates cortical plasticity (Bernard et al. 2016), suggesting that OTX2 impacts the epigenetic state of PV cells by regulating chromatin structure. Increasing levels of OTX2 may affect chromatin accessibility differently in juvenile and adult mice via a cohort of different cofactors and subtly change PV cell activity. We hypothesize that the OTX2 target sites on Gadd45b/g



**Figure 7.** Gadd45b modifies methylation of CpG islands of plasticity genes. (A–D) Schematic representation of *Arc* (A), *Egr2* (B), *Gadd45b* (C), and *Fos* (D) genes showing the transcription initiation site (arrow) and the CpG island (black bar) targeted for bisulfite PCR assay. Methylation frequency is calculated at individual CpG sites for each gene, 2 weeks after viral injection of AAV8-Syn-mCherry (Control) or AAV8-Syn-mCherry-2A-Gadd45b (Gadd45b) in adult visual cortex (Suppl. Fig. S3). Bead representations of the CpG sites are shown above each plot and are color-coded for correlation type: yellow, no methylation; orange, similar methylation; green, differential methylation. Error bars,  $\pm$ SEM; \* $P < 0.05$  by two-way ANOVA with Fisher's LSD test; mice,  $n = 4$  for each group.

are differentially accessible based on OTX2 concentration, whereby certain levels activate while other levels repress transcription. Concentration-dependent accessibility has been recently reported for transcription targets of bicoid (Bcd) homeoprotein in *Drosophila* development (Hannon et al. 2017). Bcd was found to influence chromatin structure to gain access to concentration-sensitive targets at high concentration while insensitive targets are bound at lower Bcd concentrations. While the impact of Otx2 on chromatin structure has yet to be investigated, other homeoproteins including engrailed and Cdx have been implicated in DNA damage response and chromatin remodeling (Rekaik et al. 2015; Amin et al. 2016). The critical importance of homeoprotein concentration is also revealed by their concentration-dependent morphogenic activity for the precise guidance of axons or the formation of regional boundaries during brain development (Prochiantz and Di Nardo 2015). The correlation between *Gadd45b* and plasticity gene expression even at low levels of *Gadd45b* (Fig. 4D) suggests that without fully reopening plasticity, small fluctuations of adult OTX2 and GADD45b/g within PV cells may affect physiological activity.

It must be kept in mind that the mechanisms or circuits of OD plasticity are different between juvenile and adult (Sato and

Stryker 2008; Takesian and Hensch 2013; Hübener and Bonhoeffer 2014; Hattori et al. 2017). For example, short term MD transiently reduces PV firing rates in juvenile mice V1 but not in adult V1 even though reducing PV-specific inhibition restores OD plasticity in adult (Ranson et al. 2012; van Versendaal et al. 2012; Kuhlman et al. 2013). Adult plasticity takes longer to induce and can involve different disinhibitory circuits through experience-dependent myelination, acetylcholine or serotonin pathways, including other cortical areas (Kruglikov and Rudy 2008; Sato and Stryker 2008; Pi et al. 2013; Fu et al. 2014; Yotsumoto et al. 2014; Mount and Monje 2017). Indeed, there are significant differences in gene expression, either when cortical plasticity is induced (Rietman et al. 2012; Tiraboschi et al. 2013), or between juvenile and adult cortex (Majdan and Shatz 2006; Benoit et al. 2015).

Similar to bicoid (Hannon et al. 2017), we hypothesize that OTX2 determines PV activity through chromatin state changes in a concentration-sensitive manner leading to differential gene expression and neuronal responses between juvenile and adult. Thus, it is possible that OTX2-induced alterations in chromatin structure are proportional to the amount of non-cell autonomous OTX2 protein. To investigate this hypothesis, it will be necessary to compare the chromatin structure of PV cells before, during,



and after the CP, and after inducing adult plasticity. Another nonexclusive possibility is that OTX2 interacts with other factors that may differ during the CP and post-CP. Such physiological interactions between homeoprotein signal transduction and classical signaling pathways has been demonstrated for engrailed and PAX6 (Wizenmann et al. 2009; Di Lullo et al. 2011; Stettler et al. 2012). This does not preclude that some genes are induced (or repressed) continuously by OTX2 activity in juvenile and adult such as PNN regulating genes (Lee et al. 2017). Regardless, the change in epigenetic context between juvenile and adult PV cells, as revealed by MeCP2 foci, provides a compelling explanation for differential *Gadd45b/g* regulation by OTX2 activity. As *Gadd45b/g* are epigenetic modifiers (Niehrs and Schäfer 2012), their gradual decrease in expression from CP to adulthood may also be directly implicated in changing chromatin structure within PV cells.

When adult non-cell autonomous OTX2 levels are reduced or when *Gadd45b* is overexpressed in PV cells, the induction of plasticity genes occurs across V1 layer IV. Some of these changes occur in PV cells, while others are more global. Indeed, *Arc* is not transcribed in PV cells yet its expression is increased, and *Gadd45b* expression is increased in layer IV cells though not restricted to PV cells. This suggests that changes in PV cell gene expression impact other layer IV cells. While demethylation is not widespread on the promoters of *Egr2*, *Fos* and *Gadd45b* upon *Gadd45b* overexpression in PV cells, it could be sufficient to induce changes in the expression of these genes. Demethylation is more widespread on the *Gadd45b* promoter itself, which could account for the increase in endogenous *Gadd45b* expression and suggests *Gadd45b* self-regulates. Increased *Gadd45b* expression in adult V1 leads to subsequent DNA demethylation of PV cell plasticity genes and their increased transcription.

The differential kinetics in MeCP2 foci number we observed during postnatal visual and auditory primary cortex development suggest differential recruitment in pyramidal cells and PV cells. Indeed, distinct phenotypes are observed in mice with either general or cell-specific removal of MeCP2 expression. In *MeCP2-null* mice, PV cell maturation is premature and CP timing is also accelerated (Durand et al. 2012; Tomassy et al. 2014; Krishnan et al. 2015, 2017), which could be explained by the fact that MeCP2 normally represses brain-derived neurotrophic factor expressed in pyramidal cells (Chen et al. 2003; Sampathkumar et al. 2016). Mice lacking MeCP2 only in excitatory neurons experience tremors and anxiety-like behaviors (Meng et al. 2016), whereas mice lacking MeCP2 only in PV cells do not show such phenotypes yet have completely abolished CP plasticity (He et al. 2014). Clearly, MeCP2 recruitment is dependent on the type of neuron and likely its context, impacting a wide variety of mouse phenotypes (Gogolla et al. 2014; He et al. 2014; Krishnan et al. 2015; Meng et al. 2016; Sampathkumar et al. 2016). Interestingly, MeCP2 binds not only methylated CpG but also methylated CpH (H = A/C/T) (Guo et al. 2014; Chen et al. 2015; Gabel et al. 2015), and PV cell specific enhancement of methyl-CpH content (nearly 50% of total methyl-C) has been reported (Mo et al. 2015). In this context, it is rather noteworthy that we find age-dependent changes in MeCP2 foci only in PV cells (in both A1 and V1). Reducing OTX2 levels in adult V1 directly impacted MeCP2 foci number in PNN-enwrapped cells, suggesting that OTX2 plays a role in differential MeCP2 recruitment. It will be important to determine the foci identity and the epigenetic fingerprint of PV cells, since it has been suggested that MeCP2 is implicated in cell-specific epigenetic mechanisms for regulation of gene expression and chromatin structure (Mellén et al. 2012).

While homeoproteins are well-characterized as transcription factors, they also actively control DNA replication and repair,

mRNA export and translation, and protein degradation (Prochiantz and Di Nardo 2015). As non-cell autonomous signaling factors, they have direct access to cytoplasm and nucleus with the potential to broadly impact function of the target cell. By regulating *Gadd45b/g* activity, OTX2 in PV cells could engage epigenetic programs that control the balance between plastic and nonplastic states.

## Supplementary Material

Supplementary material is available at *Cerebral Cortex* online.

## Funding

Fondation Bettencourt Schueller, by the Global Research Laboratory Program (NRF-2009-00424 to A.P.), and by an European Research Council Advanced Grant (HOMEOSIGN, ERC-2013-ADG-339379 to A.P.). N.K. was supported by the Basic Science Research Program from the National Research Foundation of Korea (NRF) funded by the Ministry of Education (2015R1A6A3A03016806). The École normale supérieure Genomic Core facility was supported by the France Génomique national infrastructure, funded as part of the “Investissements d’Avenir” program managed by the Agence Nationale de la Recherche (contract ANR-10-INBS-09).

## Notes

*Conflict of Interest:* None declared.

## References

- Amin S, Neijts R, Simmini S, van Rooijen C, Tan SC, Kester L, van Oudenaarden A, Creighton MP, Deschamps J. 2016. Cdx and T brachyury co-activate growth signaling in the embryonic axial progenitor niche. *Cell Rep.* 17:3165–3177.
- Anders S, Huber W. 2010. Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biol.* 11:R106.
- Anders S, Pyl PT, Huber W. 2015. HTSeq—a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics.* 31:166–169.
- Andreasson KI, Kaufmann WE. 2002. Role of immediate early gene expression in cortical morphogenesis and plasticity. *Results Probl Cell Differ.* 39:113–137.
- Barreto G, Schäfer A, Marhold J, Stach D, Swaminathan SK, Handa V, Döderlein G, Maltry N, Wu W, Lyko F, et al. 2007. *Gadd45a* promotes epigenetic gene activation by repair-mediated DNA demethylation. *Nature.* 445:671–675.
- Benoit J, Ayoub AE, Rakic P. 2015. Transcriptomics of critical period of visual cortical plasticity in mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 112:8094–8099.
- Bernard C, Prochiantz A. 2016. Otx2-PNN interaction to regulate cortical plasticity. *Neural Plast.* 2016:1–7.
- Bernard C, Vincent C, Testa D, Bertini E, Ribot J, Di Nardo AA, Volovitch M, Prochiantz A. 2016. A mouse model for conditional secretion of specific single-chain antibodies provides genetic evidence for regulation of cortical plasticity by a non-cell autonomous homeoprotein transcription factor. *PLoS Genet.* 12:e1006035.
- Beurdeley M, Spatzza J, Lee HHC, Sugiyama S, Bernard C, Di Nardo AA, Hensch TK, Prochiantz A. 2012. Otx2 binding to perineuronal nets persistently regulates plasticity in the mature visual cortex. *J Neurosci.* 32:9429–9437.

- Cang J, Kalatsky VA, Löwel S, Stryker MP. 2005. Optical imaging of the intrinsic signal as a measure of cortical plasticity in the mouse. *Vis Neurosci*. 22:685–691.
- Chatelain G, Fossat N, Brun G, Lamonerie T. 2006. Molecular dissection reveals decreased activity and not dominant negative effect in human OTX2 mutants. *J Mol Med*. 84:604–615.
- Chen WG, Chang Q, Lin Y, Meissner A, West AE, Griffith EC, Jaenisch R, Greenberg ME. 2003. Derepression of BDNF transcription involves calcium-dependent phosphorylation of MeCP2. *Science*. 302:885–889.
- Chen L, Chen K, Lavery LA, Baker SA, Shaw CA, Li W, Zoghbi HY. 2015. MeCP2 binds to non-CG methylated DNA as neurons mature, influencing transcription and the timing of onset for Rett syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA*. 112:5509–5514.
- Di Lullo E, Haton C, Le Poupon C, Volovitch M, Joliot A, Thomas J-L, Prochiantz A. 2011. Paracrine Pax6 activity regulates oligodendrocyte precursor cell migration in the chick embryonic neural tube. *Development*. 138:4991–5001.
- Di Nardo AA, Nedelec S, Trembleau A, Volovitch M, Prochiantz A, Montesinos ML. 2007. Dendritic localization and activity-dependent translation of Engrailed1 transcription factor. *Mol Cell Neurosci*. 35:230–236.
- Durand S, Patrizi A, Quast KB, Hachigian L, Pavlyuk R, Saxena A, Caminci P, Hensch TK, Fagiolini M. 2012. NMDA receptor regulation prevents regression of visual cortical function in the absence of Mecp2. *Neuron*. 76:1078–1090.
- Fagiolini M, Jensen CL, Champagne FA. 2009. Epigenetic influences on brain development and plasticity. *Curr Opin Neurobiol*. 19:207–212.
- Fu Y, Tucciarone JM, Espinosa JS, Sheng N, Darcy DP, Nicoll RA, Huang ZJ, Stryker MP. 2014. A cortical circuit for gain control by behavioral state. *Cell*. 156:1139–1152.
- Gabel HW, Kinde B, Stroud H, Gilbert CS, Harmin DA, Kastan NR, Hemberg M, Ebert DH, Greenberg ME. 2015. Disruption of DNA-methylation-dependent long gene repression in Rett syndrome. *Nature*. 522:89–93.
- Gavin DP, Sharma RP, Chase KA, Matrisciano F, Dong E, Guidotti A. 2012. Growth arrest and DNA-damage-inducible, beta (GADD45b)-mediated DNA demethylation in major psychosis. *Neuropsychopharmacology*. 37:531–542.
- Gogolla N, Takesian AE, Feng G, Fagiolini M, Hensch TK. 2014. Sensory integration in mouse insular cortex reflects GABA circuit maturation. *Neuron*. 83:894–905.
- Gordon JA, Stryker MP. 1996. Experience-dependent plasticity of binocular responses in the primary visual cortex of the mouse. *J Neurosci*. 16:3274–3286.
- Guo JU, Su Y, Shin JH, Shin J, Li H, Xie B, Zhong C, Hu S, Le T, Fan G, et al. 2014. Distribution, recognition and regulation of non-CpG methylation in the adult mammalian brain. *Nat Neurosci*. 17:215–222.
- Hannon CE, Blythe SA, Wieschaus EF. 2017. Concentration dependent chromatin states induced by the bicoid morphogen gradient. *Elife*. 6:3165.
- Hattori R, Kuchibhotla KV, Froemke RC, Komiyama T. 2017. Functions and dysfunctions of neocortical inhibitory neuron subtypes. *Nat Neurosci*. 20:1199–1208.
- He L-J, Liu N, Cheng T-L, Chen X-J, Li Y-D, Shu Y-S, Qiu Z-L, Zhang X-H. 2014. Conditional deletion of Mecp2 in parvalbumin-expressing GABAergic cells results in the absence of critical period plasticity. *Nat Commun*. 5:5036.
- Hoch RV, Lindtner S, Price JD, Rubenstein JLR. 2015. OTX2 transcription factor controls regional patterning within the medial ganglionic eminence and regional identity of the septum. *Cell Rep*. 12:482–494.
- Hollander MC, Sheikh MS, Bulavin DV, Lundgren K, Augeri-Henmueller L, Shehee R, Molinaro TA, Kim KE, Tolosa E, Ashwell JD, et al. 1999. Genomic instability in Gadd45a-deficient mice. *Nat Genet*. 23:176–184.
- Holmes JM, Clarke MP. 2006. Amblyopia. *Lancet*. 367:1343–1351.
- Hübener M, Bonhoeffer T. 2014. Neuronal plasticity: beyond the critical period. *Cell*. 159:727–737.
- Joliot AH, Triller A, Volovitch M, Pernelle C, Prochiantz A. 1991. Alpha-2,8-polysialic acid is the neuronal surface receptor of antennapedia homeobox peptide. *New Biol*. 3:1121–1134.
- Jourdren L, Bernard M, Dillies M-A, Le Crom S. 2012. Eoulsan: a cloud computing-based framework facilitating high throughput sequencing analyses. *Bioinformatics*. 28:1542–1543.
- Kaczmarek L, Chaudhuri A. 1997. Sensory regulation of immediate-early gene expression in mammalian visual cortex: implications for functional mapping and neural plasticity. *Brain Res Brain Res Rev*. 23:237–256.
- Kalatsky VA, Stryker MP. 2003. New paradigm for optical imaging: temporally encoded maps of intrinsic signal. *Neuron*. 38:529–545.
- Kim N, Acampora D, Dingli F, Loew D, Simeone A, Prochiantz A, Di Nardo AA. 2014. Immunoprecipitation and mass spectrometry identify non-cell autonomous Otx2 homeoprotein in the granular and supragranular layers of mouse visual cortex. *F1000Res*. 3:178.
- Krishnan K, Lau BYB, Ewall G, Huang ZJ, Shea SD. 2017. MECP2 regulates cortical plasticity underlying a learned behaviour in adult female mice. *Nat Commun*. 8:14077.
- Krishnan K, Wang B-S, Lu J, Wang L, Maffei A, Cang J, Huang ZJ. 2015. MeCP2 regulates the timing of critical period plasticity that shapes functional connectivity in primary visual cortex. *Proc Natl Acad Sci USA*. 112:E4782–E4791.
- Kruglikov I, Rudy B. 2008. Perisomatic GABA release and thalamocortical integration onto neocortical excitatory cells are regulated by neuromodulators. *Neuron*. 58:911–924.
- Kuhlman SJ, Olivas ND, Tring E, Ikrar T, Xu X, Trachtenberg JT. 2013. A disinhibitory microcircuit initiates critical-period plasticity in the visual cortex. *Nature*. 501:543–546.
- Kumaki Y, Oda M, Okano M. 2008. QUMA: quantification tool for methylation analysis. *Nucleic Acids Res*. 36:W170–W175.
- Langmead B, Trapnell C, Pop M, Salzberg SL. 2009. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biol*. 10:R25.
- Leach PT, Poplawski SG, Kenney JW, Hoffman B, Liebermann DA, Abel T, Gould TJ. 2012. Gadd45b knockout mice exhibit selective deficits in hippocampus-dependent long-term memory. *Learn Mem*. 19:319–324.
- Lee HHC, Bernard C, Ye Z, Acampora D, Simeone A, Prochiantz A, Di Nardo AA, Hensch TK. 2017. Genetic Otx2 mislocalization delays critical period plasticity across brain regions. *Mol Psychiatry*. 22:680–688.
- Lennartsson A, Arner E, Fagiolini M, Saxena A, Andersson R, Takahashi H, Noro Y, Sng J, Sandelin A, Hensch TK, et al. 2015. Remodeling of retrotransposon elements during epigenetic induction of adult visual cortical plasticity by HDAC inhibitors. *Epigenetics Chromatin*. 8:55.
- Li L, Carter J, Gao X, Whitehead J, Tourtellotte WG. 2005. The neuroplasticity-associated arc gene is a direct transcriptional target of early growth response (Egr) transcription factors. *Mol Cell Biol*. 25:10286–10300.
- Li L-C, Dahiya R. 2002. MethPrimer: designing primers for methylation PCRs. *Bioinformatics*. 18:1427–1431.
- Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, Marth G, Abecasis G, Durbin R, 1000 Genome Project Data

- Processing Subgroup. 2009. The sequence alignment/map format and SAMtools. *Bioinformatics*. 25:2078–2079.
- Ma DK, Jang M-H, Guo JU, Kitabatake Y, Chang M-L, Pow-Anpongkul N, Flavell RA, Lu B, Ming G-L, Song H. 2009. Neuronal activity-induced Gadd45b promotes epigenetic DNA demethylation and adult neurogenesis. *Science*. 323:1074–1077.
- Majdan M, Shatz CJ. 2006. Effects of visual experience on activity-dependent gene regulation in cortex. *Nat Neurosci*. 9:650–659.
- Matsunaga E, Nambu S, Oka M, Iriki A. 2015. Comparative analysis of developmentally regulated expressions of Gadd45a, Gadd45b, and Gadd45g in the mouse and marmoset cerebral cortex. *Neuroscience*. 284:566–580.
- Mellén M, Ayata P, Dewell S, Kriaucionis S, Heintz N. 2012. MeCP2 binds to 5hmC enriched within active genes and accessible chromatin in the nervous system. *Cell*. 151:1417–1430.
- Meng X, Wang W, Lu H, He L-J, Chen W, Chao ES, Fiorotto ML, Tang B, Herrera JA, Seymour ML, et al. 2016. Manipulations of MeCP2 in glutamatergic neurons highlight their contributions to Rett and other neurological disorders. *Elife*. 5:185.
- Mo A, Mukamel EA, Davis FP, Luo C, Henry GL, Picard S, Urich MA, Nery JR, Sejnowski TJ, Lister R, et al. 2015. Epigenomic signatures of neuronal diversity in the mammalian brain. *Neuron*. 86:1369–1384.
- Mount CW, Monje M. 2017. Wrapped to adapt: experience-dependent myelination. *Neuron*. 95:743–756.
- Niehrs C, Schäfer A. 2012. Active DNA demethylation by Gadd45 and DNA repair. *Trends Cell Biol*. 22:220–227.
- Nott A, Cho S, Seo J, Tsai L-H. 2015. HDAC2 expression in parvalbumin interneurons regulates synaptic plasticity in the mouse visual cortex. *Neuroepigenetics*. 1:34–40.
- Ooi GT, Brown DR, Suh DS, Tseng LY, Rechler MM. 1993. Cycloheximide stabilizes insulin-like growth factor-binding protein-1 (IGFBP-1) mRNA and inhibits IGFBP-1 transcription in H4-II-E rat hepatoma cells. *J Biol Chem*. 268:16664–16672.
- Pi H-J, Hangya B, Kvitsiani D, Sanders JL, Huang ZJ, Kepecs A. 2013. Cortical interneurons that specialize in disinhibitory control. *Nature*. 503:521–524.
- Prochiantz A, Di Nardo AA. 2015. Homeoprotein signaling in the developing and adult nervous system. *Neuron*. 85:911–925.
- Putignano E, Lonetti G, Cancedda L, Ratto G, Costa M, Maffei L, Pizzorusso T. 2007. Developmental downregulation of histone posttranslational modifications regulates visual cortical plasticity. *Neuron*. 53:747–759.
- Rai K, Huggins IJ, James SR, Karpf AR, Jones DA, Cairns BR. 2008. DNA demethylation in zebrafish involves the coupling of a deaminase, a glycosylase, and gadd45. *Cell*. 135:1201–1212.
- Ranson A, Cheetham CEJ, Fox K, Sengpiel F. 2012. Homeostatic plasticity mechanisms are required for juvenile, but not adult, ocular dominance plasticity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 109:1311–1316.
- Rekaik H, Blaudin de Thé F-X, Fuchs J, Massiani-Beaudoin O, Prochiantz A, Joshi RL. 2015. Engrailed homeoprotein protects mesencephalic dopaminergic neurons from oxidative stress. *Cell Rep*. 13:242–250.
- Rietman ML, Sommeijer J-P, Neuro-Bsik Mouse Phenomics Consortium. Levelt CN, Heimel JA. 2012. Candidate genes in ocular dominance plasticity. *Front Neurosci*. 6:11.
- Sampathkumar C, Wu Y-J, Vadivani M, Trimbuch T, Eickholt B, Rosenmund C. 2016. Loss of MeCP2 disrupts cell autonomous and autocrine BDNF signaling in mouse glutamatergic neurons. *Elife*. 5:214.
- Samuel A, Housset M, Fant B, Lamonerie T. 2014. Otx2 ChIP-seq reveals unique and redundant functions in the mature mouse retina. *PLoS One*. 9:e89110.
- Sato M, Stryker MP. 2008. Distinctive features of adult ocular dominance plasticity. *J Neurosci*. 28:10278–10286.
- Sharma AV, Nargang FE, Dickson CT. 2012. Neurosilence: profound suppression of neural activity following intracerebral administration of the protein synthesis inhibitor anisomycin. *J Neurosci*. 32:2377–2387.
- Shepherd JD, Bear MF. 2011. New views of Arc, a master regulator of synaptic plasticity. *Nat Neurosci*. 14:279–284.
- Spatazza J, Lee HHC, Di Nardo AA, Tibaldi L, Joliot A, Hensch TK, Prochiantz A. 2013. Choroid-plexus-derived Otx2 homeoprotein constrains adult cortical plasticity. *Cell Rep*. 3:1815–1823.
- Stettler O, Joshi RL, Wizenmann A, Reingruber J, Holcman D, Bouillot C, Castagner F, Prochiantz A, Moya KL. 2012. Engrailed homeoprotein recruits the adenosine A1 receptor to potentiate ephrin A5 function in retinal growth cones. *Development*. 139:215–224.
- Sugiyama S, Di Nardo AA, Aizawa S, Matsuo I, Volovitch M, Prochiantz A, Hensch TK. 2008. Experience-dependent transfer of Otx2 homeoprotein into the visual cortex activates postnatal plasticity. *Cell*. 134:508–520.
- Sultan FA, Wang J, Tront J, Liebermann DA, Sweatt JD. 2012. Genetic deletion of Gadd45b, a regulator of active DNA demethylation, enhances long-term memory and synaptic plasticity. *J Neurosci*. 32:17059–17066.
- Takesian AE, Hensch TK. 2013. Balancing plasticity/stability across brain development. *Prog Brain Res*. 207:3–34.
- Tiraboschi E, Guirado R, Greco D, Auvinen P, Maya Vetencourt JF, Maffei L, Castrén E. 2013. Gene expression patterns underlying the reinstatement of plasticity in the adult visual system. *Neural Plast*. 2013:605079.
- Tognini P, Napoli D, Tola J, Silingardi D, Ragione Della F, D’Esposito M, Pizzorusso T. 2015. Experience-dependent DNA methylation regulates plasticity in the developing visual cortex. *Nat Neurosci*. 18:956–958.
- Tomassy GS, Morello N, Calcagno E, Giustetto M. 2014. Developmental abnormalities of cortical interneurons precede symptoms onset in a mouse model of Rett syndrome. *J Neurochem*. 131:115–127.
- Vallès A, Boender AJ, Gijsbers S, Haast RAM, Martens GJM, de Weerd P. 2011. Genomewide analysis of rat barrel cortex reveals time- and layer-specific mRNA expression changes related to experience-dependent plasticity. *J Neurosci*. 31:6140–6158.
- van Versendaal D, Rajendran R, Saiepour MH, Klooster J, Smit-Rigter L, Sommeijer J-P, De Zeeuw CI, Hofer SB, Heimel JA, Levelt CN. 2012. Elimination of inhibitory synapses is a major component of adult ocular dominance plasticity. *Neuron*. 74:374–383.
- Wizenmann A, Brunet I, Lam JSY, Sonnier L, Beurdeley M, Zarbalis K, Weisenhorn-Vogt D, Weinl C, Dwivedy A, Joliot A, et al. 2009. Extracellular Engrailed participates in the topographic guidance of retinal axons in vivo. *Neuron*. 64:355–366.
- Yokoo T, Knight BW, Sirovich L. 2001. An optimization approach to signal extraction from noisy multivariate data. *Neuroimage*. 14:1309–1326.
- Yotsumoto Y, Chang L-H, Ni R, Pierce R, Andersen GJ, Watanabe T, Sasaki Y. 2014. White matter in the older brain is more plastic than in the younger brain. *Nat Commun*. 5:5504.

## Article 3 : utilisation de peptides enrichis en acide cystéique comme mimes bioactifs de glycosaminoglycanes

---

### Objectif de l'étude :

Les glycosaminoglycanes (GAG) sont des longues chaînes de polysaccharides retrouvées à la surface des cellules et dans la matrice extracellulaire et interagissant avec une large variété de protéines. Un de ces GAG, le chondroïtine sulfate disulfaté de type E (CS-E), interagit avec deux acteurs cruciaux de la régulation de la plasticité corticale : l'homéoprotéine Otx2 et la semaphorine-3A (Sema3A). Ces deux facteurs possèdent une séquence riche en arginines et lysines nécessaire à leur interaction avec les GAG. Cette interaction protéine-sucre est électrostatique mais implique aussi une structure stéréochimique comme le montre l'inactivité d'une forme brouillée du RK-pep (Beurdeley et al., 2012). Cela suppose l'existence d'une disposition spatiale spécifique des charges négatives des GAG. Chez des souris adultes, bloquer l'interaction entre Otx2 et PNN entraîne une réouverture de plasticité. Otx2 reconnaissant préférentiellement le CS-E de ces PNN, des analogues du CS-E pourraient donc être utilisés comme outil thérapeutique pour modifier l'état de plasticité. Malheureusement, l'extraction, la purification et la synthèse du CS-E sont difficiles, puisque près d'un an de synthèse est nécessaire à l'obtention d'un hexasaccharide synthétique de type CS-E (hexaCSE). L'objectif de cette étude était donc de synthétiser des peptides sulfatés pouvant mimer le CS-E par une représentation spatiale des charges négatives.

### Méthodes :

Les acides aminés ont été choisis afin de garder une chimie simple : le glutamate (E) pour mimer l'uronic carboxylate, des acides cystéiques (C') pour mimer les sulfates et une alanine (A) pour favoriser l'hélicité. Deux motifs à  $n$  répétitions ont été ainsi générés :  $(EC'AC')_n$  et  $(EC'C'A)_n$ , avec  $n$  compris entre 3 et 6. La synthèse de ces peptides a été réalisée par stratégie Fmoc sur résine. Leur capacité et spécificité de liaison à Otx2 *in vitro* ont été quantifiées par dot blot, par immunoprécipitation et gel retard, respectivement. L'importance de ces peptides *in vivo* a été testée par infusion intracorticale suivie par immunohistochimie de marqueurs de maturation des cellules PV (PV, WFA).



**Résultats :**

- La liaison d'Otx2 *in vitro* n'est pas dépendante du motif (EC'AC' ou EC'C'A) mais de son degré de polymérisation ( $n$ ).
- Les peptides de  $n = 6$  ont une meilleure interaction avec Otx2 que l'hexaCSE.
- La séquence (EC'AC') interagit d'une manière spécifique avec le domaine de reconnaissance aux sucres d'Otx2.
- Sema3A reconnaît d'une manière préférentielle le motif (EC'AC') par rapport à (EC'C'A)
- Le motif (EC'AC') interfère avec le transfert d'Otx2 *in vivo*.

**Discussion :**

- La conformation des peptides en solution est difficile à prédire, mais elle est supposée hélicale pour permettre une bonne représentation spatiale des charges négatives.
- La première génération de peptide est linéaire. Une façon d'augmenter la spécificité serait de synthétiser des peptides assemblant différents motifs et pouvant ainsi interagir avec la signature spatiale des charges positives de chaque protéine. En effet, il existe déjà une différence de spécificité de reconnaissance des deux motifs entre les protéines Otx2 et Sema3A, et il serait donc possible de créer des peptides spécifiques pour chacun afin de distinguer leurs rôles dans la plasticité du cortex visuel.

# Cysteic acid-rich peptides as bioactive glycosaminoglycan mimics

Rodrigue Marquand<sup>§,†</sup>, Damien Testa<sup>§,†</sup>, Solange Lavielle<sup>‡</sup>, Alain Prochiantz<sup>†</sup>, Ariel A. Di Nardo<sup>\*,†</sup>, Jean-Maurice Mallet<sup>\*,‡</sup>

<sup>†</sup>Centre for Interdisciplinary Research in Biology (CIRB), Collège de France, CNRS UMR 7241 / INSERM U1050, PSL University, Labex Memolife, 11 place Marcelin Berthelot, 75005 Paris, France.

<sup>‡</sup>Laboratoire des BioMolécules (LBM), Département de Chimie, École Normale Supérieure, PSL University, Sorbonne Université, CNRS UMR 7203, 24 rue Lhomond, 75005 Paris, France. 12/3/2018

*Supporting Information Placeholder*

---

**ABSTRACT:** Glycosaminoglycans (GAGs) form important extracellular interactions that impact brain physiology. However, there is a lack of synthetic GAG mimics with high biological specificity to probe GAG physiological functions. Here, we report the synthesis of peptides with oxidized cysteines leading to sulfonated analogues of chondroitin sulfates. These GAG mimics interact with Otx2 homeoprotein transcription factor and Sema-3A specifically through their GAG-binding motifs. These proteins are key actors of visual cortex critical period plasticity that function through extracellular GAG interactions. Indeed, GAG mimic infusion in adult mouse visual cortex simultaneously reduced perineuronal net assembly and parvalbumin expression, which are hallmarks of reopened cortical plasticity.

---

Glycosaminoglycans (GAGs) are sulfated polysaccharides found on cell surfaces and in the extracellular matrix (ECM) where they interact with a large number of proteins (cytokines, growth factors, serpins, etc). The biologically important chondroitin sulfate (CS) proteoglycan consists of a protein backbone to which is linked chains containing hundreds of disaccharide repeats. A fascinating characteristic of GAGs is that their polysaccharide units are modified through epimerisation, *N*- and *O*-sulfation, and deacetylation, and thus can be finely tuned for interactions. Consequently, they present non-regular sequences with specific affinity.

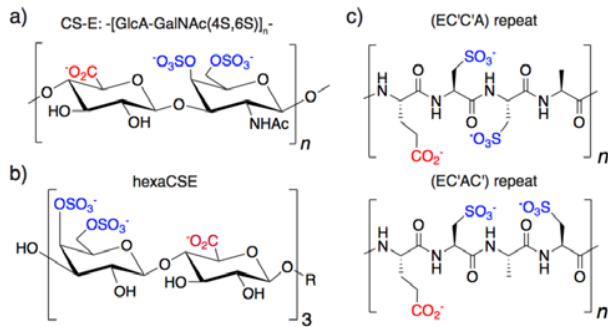
In postnatal brain development, specific sulfation patterns are crucial for the timing of critical periods, which are short windows in time during which a given neural circuit is highly plastic.<sup>1</sup> These periods are necessary for proper environmental adaptation and arise from the maturation of cortical inhibitory GABAergic parvalbumin neurons (PV cells). This maturation is driven by non-cell autonomous activity of the Otx2 homeoprotein transcription factor: Otx2 is synthesized out-

side the cerebral cortex, transported in the extracellular milieu, and internalized specifically by PV cells.<sup>2,3</sup> This internalization specificity is mediated by disulfated CS (type D (CS-D) or type E (CS-E, Figure 1a) contained within a specialized ECM called perineuronal net (PNN) enveloping these cells.<sup>4,5</sup> Thus, plasticity timing is controlled in part by the interaction of GAGs with Otx2. Interfering with Otx2-GAG interactions provides an approach to disrupt critical periods for fundamental research and therapeutic applications.<sup>6</sup>

To unravel the extraordinary complexity of GAG-protein interactions, defined compounds are necessary. Unfortunately, both extraction of pure compounds from natural sources and chemical or enzymatic synthesis of GAG fragments remain difficult and inefficient. However, interactions between proteins and GAGs are electrostatic with the most critical aspect being the correct space distribution of charges.<sup>7</sup> Therefore, an effective strategy could involve a scaffold approach allowing for spatial presentation of sulfates and carboxylates. Modified natural and synthetic polymers have been proposed as GAG surrogates, but they lack sequence modulations and show only non-specific electrostatic interactions with proteins.<sup>8-10</sup>

Previously, we used an approach based on a poly-lactose scaffold whereby the D-GalNAc in natural CS was replaced by D-Gal and the number of synthetic steps was reduced by half by starting from a lactose disaccharide.<sup>11</sup> While a hexasaccharide (hexaCSE, Figure 1b) showed promising mimicry, longer and more diverse oligosaccharides mimics are now required and require alternative scaffolds. One promising approach that permits structure modulation involves peptides with either sulfated tyrosines<sup>12</sup> or sulfated serines<sup>13</sup>, even though they show limited stability. Given that GAGs have an extended helical structure (e.g. heparin, 1hpn) with sulfates and carboxylates aligned along the main axis, we

hypothesized that peptide analogues are ideal candidates for GAGs mimics as they have the potential for high helical propensity and are relatively easy to synthesize by solid phase strategy.



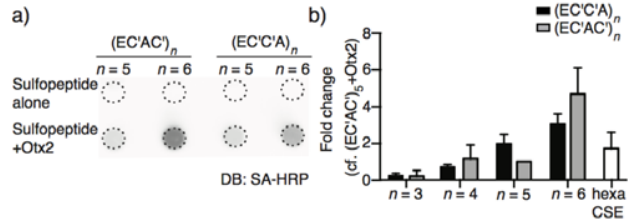
**Figure 1.** Chemical structure of repeat units. a) Chondroitin-4,6-sulfate, CS-E. b) poly-lactose scaffold, hexaCSE. c) GAG mimics peptide scaffold: EC'C'A and EC'AC', where C' represents cysteine acid.

A tetrapeptide in helix conformation is similar in length (0.8 nm) to a CS disaccharide. We chose to mimic disulfated CS, such as a CS-E (Figure 1a), by replacing each disaccharide unit with a tetrapeptide while keeping the chemistry as simple as possible: glutamate to mimic uronic carboxylate; two cysteine acids to mimic sulfates; and alanine to favor helicity and introduce some hydrophobicity. Thus, repeating units each present a carboxylate group and two sulfonate groups (same as 2:1 sulfate:carboxylate ratio for CS-E).

The sequences (ECCA)<sub>n</sub> and (ECAC)<sub>n</sub> (*n*=3-6) were synthesized by Fmoc strategy on a Rink amide MBHA resin. A 6-aminohexanoic acid (Ahx) spacer was introduced at the N-terminus and the peptidyl resins were either acetylated (Ac) or acylated with a biotin sulfone (Biot(SO<sub>2</sub>)). The peptides were cleaved from the resin by TFA and precipitated in diethyl ether to give either Ac-Ahx-(ECAC)<sub>n</sub>-NH<sub>2</sub>, Ac-Ahx-(ECCA)<sub>n</sub>-NH<sub>2</sub>, Biot(SO<sub>2</sub>)-Ahx-(ECAC)<sub>n</sub>-NH<sub>2</sub>, or Biot(SO<sub>2</sub>)-Ahx-(ECCA)<sub>n</sub>-NH<sub>2</sub>. These precursors were oxidized with performic acid<sup>14,15</sup> to give cysteine acid (C') peptides, then neutralized with aqueous ammonia resulting in GAG mimics (EC'AC')<sub>n</sub> and (EC'C'A)<sub>n</sub> (Figure 1c), with either an acetyl or a biotin sulfone at the N-terminus and an amide at the C-terminus. Crude sulfopeptides were desalted on Sephadex G25, purified by reverse phase HPLC and characterized by mass spectroscopy. Attempts to purify the precursors prior to oxidation were unsuccessful due to insolubility. These GAG mimic peptides can be stored for months at -20°C as sodium salts.

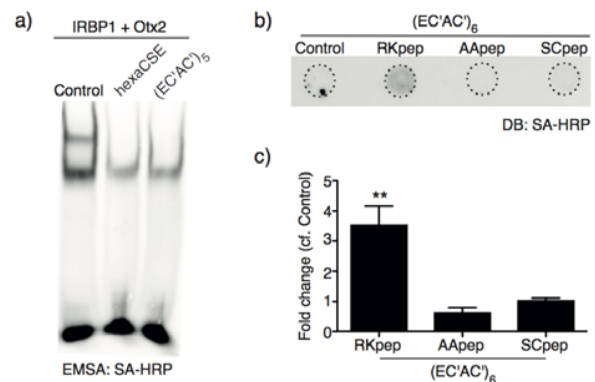
To evaluate affinity of the biotinylated (EC'C'A)<sub>n</sub> and (EC'AC')<sub>n</sub> libraries to Otx2 protein, we performed dot blots with nitrocellulose membranes for which sulfopeptide retention requires interaction with protein (Figure 2a). While Otx2 binding did not favor one motif over the other, there was a clear increase in affinity as a function of *n* repeats (Fig-

ure 2b). For comparison, dot blots were performed with hexaCSE, which was previously shown to bind Otx2 and interfere with its *in vivo* activity in the mouse brain.<sup>11</sup> Sequences with *n* = 4 or 5 repeats were found to bind to Otx2 equally as well as hexaCSE, while those with *n* = 6 were found to bind 2- to 3-fold better.



**Figure 2.** GAG mimics interact with Otx2. (a) Example dot blot (DB) of biotinylated sulfopeptides incubated or not with Otx2 protein. (b) Quantification of DB chemiluminescence with at least 3 duplicate experiments per data point.

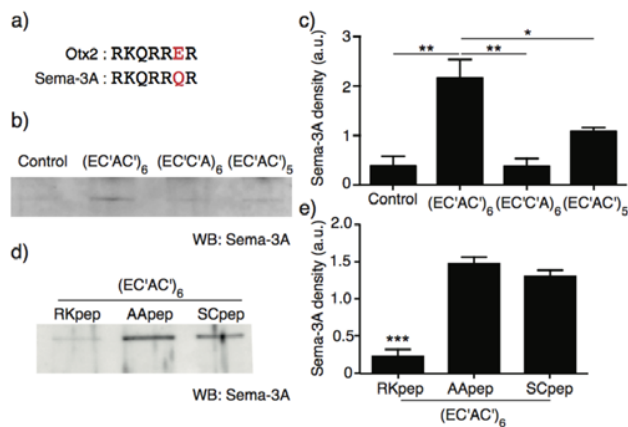
To confirm the biotinylated sulfopeptides interact with Otx2 through its previously identified GAG-binding site, we performed DNA chase and peptide binding experiments (Figure 3). In Otx2, a GAG-binding motif is located in the first helix of its DNA-binding domain,<sup>5</sup> thus specific binding of GAG molecules may interfere with DNA binding. Assays show the (EC'AC')<sub>5</sub> mimic is able to chase the *IRBP1* DNA probe from Otx2 to the same extent as biotinylated hexaCSE positive control (Figure 3a). The GAG-binding site in Otx2 (RKQRRER) contains an arginine-lysine doublet (RK) which when mutated to an alanine doublet (AA), no longer binds ECM<sup>5</sup> and causes critical period defects in the *Otx2*<sup>+/-AA</sup> mouse model.<sup>16</sup> Dot blot assays with peptides (15-mer) based on this motif were used to assess whether (EC'AC')<sub>6</sub> binds specifically (Figure 3b). While the wild type peptide (RKpep: RKQRRERTTFTRAQL) retained the GAG mimic, the mutated peptide (AApep: AAQRRERTTFTRAQL) did not; neither did a scrambled peptide (SCpep: RTQTRFRTRARLEQK) containing the same residues as the RKpep but in random order (Figure 3c). These assays confirm the interaction is not simply electrostatic but requires a specific residue sequence.



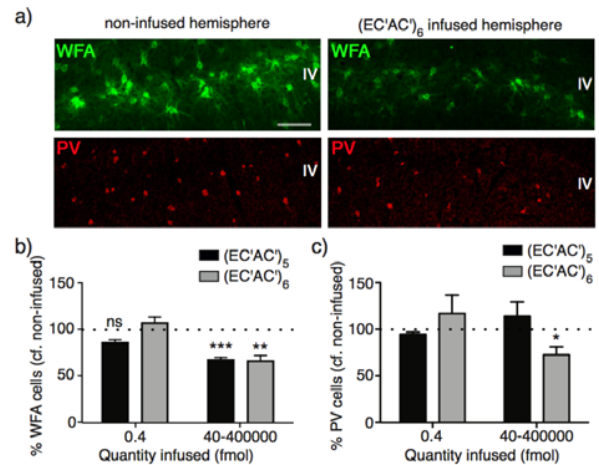
**Figure 3.** GAG mimics interact with the GAG-binding site of Otx2. (a) Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) with biotinylated *IRBP1* DNA probe and Otx2 protein shows loss of shift when incubated with hexaCSE and (EC'AC')<sub>5</sub>. (b) Dot blot (DB) of (EC'AC')<sub>6</sub> incubated with GAG motif peptide (RKpep) or control peptides (AApep, SCpep). (c) Quantification of DBs. All values: *N*=3; mean ± SEM; one-way ANOVA with Bonferonni posthoc test; \*\**P*<0.01.

To measure the *in vivo* activity and specificity of biotinylated GAG mimics, we performed biochemical and immunohistochemical analyses. Otx2 and Semaphorin-3A (Sema-3A) are both keys actors of visual cortex plasticity and share a similar motif for binding CS-E (Figure 4a).<sup>5,17</sup> We first focused on Sema-3A, as cortical Otx2 levels are too low to be reliably detected biochemically. By using GAG mimics in pull-down experiments with lysates of adult mouse visual cortex, we found that (EC'AC')<sub>5</sub> and (EC'AC')<sub>6</sub> but not (EC'C'A)<sub>6</sub> interact with Sema-3A (Figure 4b-c). The RKpep specifically disrupts Sema-3A interaction with (EC'AC')<sub>6</sub> in these lysates (Figure 4d-e), suggesting involvement of Sema-3A GAG-binding motif.

After 7-day infusion of either (EC'AC')<sub>5</sub> or (EC'AC')<sub>6</sub> in adult mouse visual cortex, 40 fmol caused a reduction in PNN assembly (Figure 5a-b). Infusion with up to 10<sup>5</sup>-fold more of either mimic provided the same reduction. A feedback loop exists between Otx2 accumulation in PV cells and assembly of surrounding PNNs; PNNs attract extracellular Otx2 while Otx2 activity in PV cells increases PNN expression.<sup>18,19</sup> These results suggest that these GAG mimics interfere with Otx2 signaling enough to break this feedback loop and diminish PNN assembly. Furthermore, interfering with Otx2 signaling in the adult visual cortex has been shown to reverse PV cell maturation state and induce plasticity.<sup>2,5,20</sup> Here, only infusion of (EC'AC')<sub>6</sub> (>40 fmol) resulted in significantly reduced PV expression (Figure 5c). This modest reduction (>25%) has been previously shown to be sufficient for re-opening brain plasticity.<sup>20</sup>



**Figure 4.** GAG mimic pull-down experiments with lysates of adult mouse visual cortex. (a) Comparison of GAG-binding motifs. (b) Western blot (WB) for Sema-3A after pull-down with GAG mimics retained on streptavidin beads (Control is beads alone). (c) Quantification of WBs. (d) WB for Sema-3A after pull-down with (EC'AC')<sub>6</sub> incubated with GAG motif peptide (RKpep) or control peptides (AApep, SCpep). (e) Quantification of WBs. All values: *N*=3; mean ± SEM; one-way ANOVA with Bonferonni posthoc test; \**P*<0.05, \*\**P*<0.01, \*\*\**P*<0.001.



**Figure 5.** GAG mimics have *in vivo* activity. (a) Representative images of staining for *Wisteria floribunda* agglutinin (WFA), which labels PNNs, and parvalbumin (PV) in adult mouse primary visual cortex layer IV infused or not with 40 fmol (EC'AC')<sub>6</sub>. (b) Quantification of WFA+ cell numbers. (c) Quantification of PV cell numbers. Scale bar = 100 μm. All values: *N*=3-6; mean ± SEM; t-test; \**P*<0.05, \*\**P*<0.01, \*\*\**P*<0.001.

These pull-down and infusion experiments confirm *in vitro* findings that the longer GAG mimics have higher affinity for GAG-binding proteins; only when *n*=6 for the (EC'AC')<sub>*n*</sub> mimic do we observe full effects on PV cell maturation (Figure 5c). They also suggest that (EC'AC')<sub>*n*</sub> and (EC'C'A)<sub>*n*</sub> mimics can provide specificity and selectivity. While Otx2 shows no preference for either motif *in vitro* (Figure 2b), Sema-3A interacts with the (EC'AC')<sub>*n*</sub> motif but not the (EC'C'A)<sub>*n*</sub> motif in brain lysates (Figure 4c). Thus, these GAG mimics contain valid electrostatic patterns to recapitulate specific sulfation patterns present in natural GAGs. They could be used to construct more complete libraries and screen a set of proteins to generate an interaction matrix with biological relevance. For example, given that the 300-strong homeoprotein family contains a large variety of GAG-binding motifs, such an approach could unlock the hypothesized sugar code for homeoprotein *in vivo* internalization specificity.<sup>6</sup>

The problem of selectivity between GAG and protein remains paramount. CS chains are known to interact with many ECM proteins mainly through electrostatic interac-

tions such that weak or non-productive bindings may interfere with selectivity. Our GAG mimics have a putative alpha-helical form with different carboxylate and sulfonate charge patterns, allowing to explore charge pattern recognition. Extended structure or induced conformations may also be present, though the final (or major) conformation (in solution or induced through protein interaction) is difficult to predict at this stage. To improve GAG mimic selectivity, different charge-patterned motifs could be assembled along with neutral spacer motifs, while also modifying the repeating motif and length.

Homeoproteins have a high therapeutic potential and their intercellular transfer properties make them particularly interesting.<sup>6</sup> Otx2 has been shown to act in a non-cell autonomous manner in various brain areas,<sup>2,16</sup> making it theoretically possible to design various brain plasticity therapies through direct delivery of GAG mimics that alter PV cell maturation state. More generally, GAGs have important and specific physiological functions but are not developed for therapeutic use owing to the difficulty of chemical synthesis. Alternative efforts have focused on peptides and peptidomimetics,<sup>5,21</sup> while others have developed small molecules that disrupt sulfation enzymes.<sup>22</sup> The development of easy to synthesize GAG mimics with high biological specificity may lead to a new and important class of pharmacological tools.

## ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

Experimental procedures. This material is available free of charge on the ACS Publications website.

## AUTHOR INFORMATION

### Corresponding Authors

\*E-mail: ariel.dinardo@college-de-france.fr

\*E-mail: Jean-Maurice.Mallet@ens.fr

### Author Contributions

§These authors contributed equally.

### ORCID

AA Di Nardo: [0000-0003-2944-488X](https://orcid.org/0000-0003-2944-488X)

JM Mallet: 0000-0001-8570-9542

## Funding Sources

No competing financial interests have been declared.

## REFERENCES

- (1) Hensch, T. K. *Nat Rev Neurosci* **2005**, *6* (11), 877.
- (2) Spatazza, J.; Lee, H. H. C.; Di Nardo, A. A.; Tibaldi, L.; Joliot, A.; Hensch, T. K.; Prochiantz, A. *Cell Rep* **2013**, *3* (6), 1815.
- (3) Sugiyama, S.; Di Nardo, A. A.; Aizawa, S.; Matsuo, I.; Volovitch, M.; Prochiantz, A.; Hensch, T. K. *Cell* **2008**, *134* (3), 508.
- (4) Miyata, S.; Komatsu, Y.; Yoshimura, Y.; Taya, C.; Kitagawa, H. *Nat Neurosci* **2012**, *15* (3), 414.
- (5) Beurdeley, M.; Spatazza, J.; Lee, H. H. C.; Sugiyama, S.; Bernard, C.; Di Nardo, A. A.; Hensch, T. K.; Prochiantz, A. *Journal of Neuroscience* **2012**, *32* (27), 9429.
- (6) Prochiantz, A.; Di Nardo, A. A. *Neuron* **2015**, *85* (5), 911.
- (7) Johnson, D. J. D.; Li, W.; Adams, T. E.; Huntington, J. A. *EMBO J* **2006**, *25* (9), 2029.
- (8) Henry, B. L.; Desai, U. R. *Thromb. Res.* **2014**, *134* (5), 1123.
- (9) Malineni, J.; Singh, S.; Tillmann, S.; Keul, H.; Möller, M. *Macromol Biosci* **2017**, *17* (5), 1117.
- (10) Sangaj, N.; Kyriakakis, P.; Yang, D.; Chang, C.-W.; Arya, G.; Varghese, S. *Biomacromolecules* **2010**, *11* (12), 3294.
- (11) Despras, G.; Bernard, C.; Perrot, A.; Cattiaux, L.; Prochiantz, A.; Lortat-Jacob, H.; Mallet, J.-M. *Chemistry* **2013**, *19* (2), 531.
- (12) Kim, S. H.; Kiick, K. L. *Peptides* **2007**, *28* (11), 2125.
- (13) Vázquez-Campos, S.; St Hilaire, P. M.; Damgaard, D.; Meldal, M. *QSAR Comb. Sci.* **2005**, *24* (8), 923.
- (14) Hirs, C. H. W. *J Biol Chem* **1956**, *219* (2), 611.
- (15) Moore, S. *Journal of Biological Chemistry* **1963**, *238* (1), 235.
- (16) Lee, H. H. C.; Bernard, C.; Ye, Z.; Acampora, D.; Simeone, A.; Prochiantz, A.; Di Nardo, A. A.; Hensch, T. K. *Mol Psychiatry* **2017**, *22* (5), 680.
- (17) Dick, G.; Tan, C. L.; Alves, J. N.; Ehlert, E. M. E.; Miller, G. M.; Hsieh-Wilson, L. C.; Sugahara, K.; Oosterhof, A.; van Kuppevelt, T. H.; Verhaagen, J.; Fawcett, J. W.; Kwok, J. C. F. *J Biol Chem* **2013**, *288* (38), 27384.
- (18) Bernard, C.; Prochiantz, A. *Neural Plast.* **2016**, *2016* (22, article rc40), 1.
- (19) Hou, X.; Yoshioka, N.; Tsukano, H.; Sakai, A.; Miyata, S.; Watanabe, Y.; Yanagawa, Y.; Sakimura, K.; Takeuchi, K.; Kitagawa, H.; Hensch, T. K.; Shibuki, K.; Igarashi, M.; Sugiyama, S. *Sci Rep* **2017**, *7* (1), 12646.
- (20) Bernard, C.; Vincent, C.; Testa, D.; Bertini, E.; Ribot, J.; Di Nardo, A. A.; Volovitch, M.; Prochiantz, A. *PLoS Genet* **2016**, *12* (5), e1006035.
- (21) Corredor, M.; Bonet, R.; Moure, A.; Domingo, C.; Bujons, J.; Alfonso, I.; Pérez, Y.; Messeguer, À. *Biophys J* **2016**, *110* (6), 1291.
- (22) Cheung, S. T.; Miller, M. S.; Pacoma, R.; Roland, J.; Liu, J.; Schumacher, A. M.; Hsieh-Wilson, L. C. *ACS Chem. Biol.* **2017**, *acschembio.7b00885*

## **DISCUSSION**



Les discussions de chaque article ne seront pas reprises dans cette partie. Dans un premier temps, nous nous intéresserons à l'importance de la composition de la matrice extracellulaire pour le développement et la physiologie du cortex, ainsi qu'au développement d'outils permettant le contrôle de cette composition. Dans un second temps, nous discuterons l'interdépendance de la matrice extracellulaire condensée en PNN et d'Otx2.

## **I. Les PNN, un composant clé pour la physiologie du cerveau**

---

### **A. Le dysfonctionnement des PNN à l'origine de pathologies**

Les PNN jouent un rôle fondamental pour la maturation et l'activité des cellules PV. En effet il a été démontré *in vitro* que la présence de PNN modifie l'excitabilité des interneurons, sans pour autant modifier la distribution de leurs synapses. Inversement, la structure du PNN entourant le soma et les dendrites des cellules PV influe sur les contacts synaptiques reçus par ces cellules. Par exemple, les cellules PV entourées par des PNN enrichis en brevican reçoivent plus de synapses sur leurs somas que les cellules non entourées par cette matrice (Favuzzi et al., 2017). Les cellules PV sont indispensables à la régulation de l'activité des neurones pyramidaux et des oscillations gamma nécessaires à la synchronisation des différentes régions cérébrales (Hu et al., 2014). Un dysfonctionnement du contrôle de la balance excitation-inhibition et des oscillations gamma est observé dans de nombreuses maladies psychiatriques (Shin et al., 2011; Karch et al., 2012; Rojas and Wilson, 2014). Les PNN étant majoritairement associés aux cellules PV, l'étude de cette matrice extracellulaire a pris une place de plus en plus importante dans l'étude de nombreux états pathologiques tels que l'épilepsie, l'autisme, la schizophrénie, les syndromes bipolaires, les addictions ou encore les séquelles d'un accident vasculaire cérébral. Il est néanmoins difficile de savoir si les modifications de la structure des PNN sont une cause ou une conséquence de ces pathologies. Pour cela prenons l'exemple de la schizophrénie. Dans le mPFC la densité des PNN augmente lors de la puberté. Dans le cas de patients schizophrènes, la densité de PNN est réduite dans cette région du cortex. De nombreuses analyses soulignent l'association de cette maladie avec l'expression de certains gènes nécessaires à la formation des PNN, comme *Neurocan*, *Hapln4*, *PTPR* (Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium, 2014), mais aussi la présence de certaines protéines comme Otx2 (Sabunciyany et al., 2007), MMP-9 (Lepeta et al., 2017) et Grin2A (Cardis et al., 2018). Des modèles de souris transgéniques pour certains de ces facteurs présentent des altérations de comportement,



**Tableau 1 : Méthodes de déstabilisation de la matrice extracellulaire**

Méthode	Outil	Action	Précision d'action	Source
<b>Cible les PNN</b>				
Chondroitinase ABC	Hydrolyse des CS	Dégradation de la matrice	Global (matrice PNN + diffuse)	Pizzorusso et al., 2002
Hyaluronidase	Hydrolyse des HA	Dégradation de la matrice	Global (matrice PNN + diffuse)	Frischknecht et al., 2009
(E)-3-(3-Bromo-4-hydroxy-5-methoxyphenyl)-2-cyano-N-(2,4-dichlorophenyl)acrylamide	Inhibiteur Chst15	Diminue la quantité de CS-E	Intermédiaire	Cheung et al., 2017
<b>Cible l'interaction protéine - GAG</b>				
Cat-316	Anticorps reconnaissant le -4S des CS	Bloque interaction GAG - Sema3A	Intermédiaire	Yang et al., 2017
hexaCSE	Analogue synthétique du CS-E	Séquestre Otx2 dans le milieu extracellulaire	Intermédiaire	Despras et al., 2012
RK-pep	Motif d'Otx2 reconnaissant les GAG	Mise en compétition du RK-pep et Otx2 pour CS-E	Intermédiaire	Beurdeley et al., 2012
SICHI	Peptide chargé positivement	Bloque interaction GAG - Sema3A	Intermédiaire	Corredor et al., 2017
anti-Otx2 scFv	Anticorps scFv dirigé contre Otx2	Séquestre Otx2 dans le milieu extracellulaire	Spécifique pour Otx2	Bernard et al., 2016
GAG mimes	Peptide mimant le CS-E	Séquestre Otx2 dans le milieu extracellulaire	Spécifique pour Otx2	Marquant et al. (in prep)

rappelant certains symptômes observés chez les patients schizophrènes. Ces études suggèrent donc que des modifications de la structure des PNN ne sont pas seulement une conséquence d'un dysfonctionnement neuronal mais peuvent aussi être à l'origine de ces dysfonctionnements et de leurs conséquences dans le champ de diverses pathologies.

## **B. Développement d'outils permettant de cibler directement la matrice extracellulaire**

Les premières études visant à altérer les PNN ont été réalisées à l'aide d'enzymes qui permettent l'hydrolyse de la matrice extracellulaire. Ces enzymes, la ChABC ou la hyaluronidase, permettent de dégrader les CS et HA respectivement. L'hydrolyse de ce squelette clé de la condensation en PNN entraîne une déstructuration totale de la matrice. L'utilisation de ces enzymes a, entre autres, permis de guérir des souris amblyopes, de retarder la diminution de la mémoire dans des modèles de souris Alzheimer et de favoriser la reconnaissance d'objet chez des modèles de tauopathie (Pizzorusso et al., 2006; Beurdeley et al., 2012; Végh et al., 2014; Yang et al., 2015). La ChABC est aussi très utilisée dans le modèle de lésion de la moelle épinière puisqu'elle favorise la régénération axonale. Cette enzyme pourrait donc aussi être efficace dans la réparation des circuits neuronaux après traumatisme cérébral. Ces études soulignent l'importance de la matrice pour de nombreuses fonctions cérébrales. Malgré les injections locales, l'action de ces enzymes ne se limite pas à la dégradation des PNN condensés et s'étend à celle de la matrice diffuse. Afin d'interagir plus précisément sur les sous-types de CS, d'autres études ont cherché à modifier directement les motifs de sulfatation. Par exemple, un inhibiteur de la Chst15 cellule-perméable a été mis en place, permettant d'inhiber la sulfatation à la 6<sup>ème</sup> position du GalNAc (Cheung et al., 2017). L'utilisation de ce type de molécule permet d'empêcher l'inhibition de la croissance axonale médiée par les CSPG dans un modèle *in vitro* (Tableau 1).

## **C. Développement d'outils permettant de modifier l'interaction protéine-GAG**

Pour développer des traitements pouvant être utilisés chez l'humain, il est nécessaire d'avoir des molécules spécifiques, pures et en quantité suffisante. Des molécules interférant spécifiquement avec l'interaction protéine-GAG représentent une piste prometteuse. Par exemple, il existe des anticorps spécifiques pour des motifs de sulfatation de certains GAG. Une étude récente du laboratoire de James Fawcett a démontré que l'anticorps monoclonal

Cat-316 est spécifique de certains CS et que son injection dans le cortex perirhinal pourrait bloquer la diminution de mémoire (Yang et al., 2017). Cet anticorps bloquant le -4S du CS pourrait interférer avec la reconnaissance de Sema3A et Otx2, ce qui a une portée thérapeutique possiblement importante. D'autres outils permettant de bloquer cette reconnaissance, comme l'hexaCSE et le RK-pep ont été décrits précédemment (Tableau 1) (Beurdeley et al., 2012; Despras et al., 2013). L'interaction étant en partie électrostatique, il est aussi possible de bloquer les charges négatives des PNN par des molécules chargées positivement, comme SICHI qui *in vitro* bloque l'interaction Sema3A-GAG, mais aucune étude *in vivo* n'a encore été réalisée (Corredor et al., 2016).

Aucune de ces méthodes ne permet de différencier l'effet d'Otx2 de celui d'autres protéines possédant un domaine de reconnaissance aux GAG similaire, comme Sema3A qui, comme Otx2, se lie au CS-E. Les études menées durant ma thèse, ont conduit à développer des outils permettant la séparation de ces différents rôles. Tout d'abord en interférant uniquement avec l'activité non-autonome d'Otx2 par l'action d'un anticorps sécrété anti-Otx2 scFv (Tableau 1). Cet anticorps spécifique pour Otx2, dont la sécrétion spatiotemporelle est contrôlable, permet de séquestrer l'homéoprotéine dans le milieu extracellulaire. Nos études avec les mimes de GAG montrent que leurs interactions avec Sema3A ou Otx2 ne sont pas identiques. En effet, tandis qu'Otx2 ne présente pas de préférence entre les motifs (EC'C'A) et (EC'AC'), Sema3A possède une interaction plus forte avec le motif (EC'AC'). Ces premiers peptides sont linéaires, et une synthèse de peptides favorisant les interactions avec d'autres sites que le RK-pep présent dans Otx2 et Sema3A permettrait probablement de gagner en spécificité. Il serait alors possible de bloquer Otx2 sans modifier l'action de Sema3A, et vice-versa. Cela permettrait de disséquer le mécanisme de signalisation de chaque acteur extracellulaire sur la période critique de plasticité corticale. Les effets de Sema3A une fois lié aux PNN du cortex ne sont pas encore connus. L'hypothèse repose sur un effet inhibiteur de Sema3A sur le remodelage présynaptique et sur la formation de nouvelles synapses sur ces neurones avec, pour effet, la fermeture de la période critique. Comme Otx2 contrôle la condensation de la matrice extracellulaire et la maturation des cellules PV, on peut proposer que les deux molécules interagissent dans le contrôle de la fermeture de la période critique (deuxième seuil de la Figure 18). Des mimes de GAG plus spécifiques pourraient permettre de séparer les activités de Sema3A et Otx2 et donc de vérifier, puis de comprendre le cas échéant, leur interaction physiologique.

On peut alors s'interroger sur l'existence d'une ou plusieurs autres molécules interagissant avec Otx2 pour l'ouverture de cette période critique (premier seuil), le BDNF constituant un candidat potentiel intéressant (Huang et al., 1999). Cette question de la coopération entre Otx2 et d'autres facteurs est à replacer dans ce qui a été observé pour l'homéoprotéine Engrailed chez le poulet et la mouche drosophile. En effet, le rôle joué par Engrailed dans le guidage axonal implique une coopération avec la signalisation EphrinA5 (Wizenmann et al., 2009) et son effet sur la morphogenèse de la veine transverse antérieure de l'aile de Drosophile implique une interaction avec decapentaplegic (Layalle et al., 2011).

		<u>GAG-motif</u>														
Chx10	134	R	K	K	R	R	H	R	T	I	F	T	S	Y	Q	L
Dlx-1	114	K	K	I	R	K	P	R	T	I	Y	S	S	L	Q	L
Dlx-4	108	R	K	L	R	K	P	R	T	I	Y	S	S	L	Q	L
Gsc	152	R	R	K	R	R	H	R	T	I	F	T	D	E	Q	L
Hox-A13	310	R	R	G	R	K	K	R	V	P	Y	T	K	V	Q	L
Nkx-2.5	129	R	R	R	R	K	P	R	V	L	F	S	Q	A	Q	V
Otx2	36	R	K	Q	R	R	E	R	T	T	F	T	R	A	Q	L
Pitx2	77	K	R	Q	R	R	Q	R	T	H	F	T	S	Q	Q	L
Pitx3	54	K	K	Q	R	R	Q	R	T	H	F	T	S	Q	Q	L
Prx-2	84	K	K	K	Q	R	R	N	R	T	T	F	N	S	S	Q

**Figure 20 : Motifs des domaines de reconnaissance aux glycosaminoglycanes**

Le domaine de reconnaissance aux glycosaminoglycanes est conservé au sein de la famille des homéoprotéines. Les résidus basiques sont surlignés en bleu (Extrait de (Prochiantz and Di Nardo, 2015)).

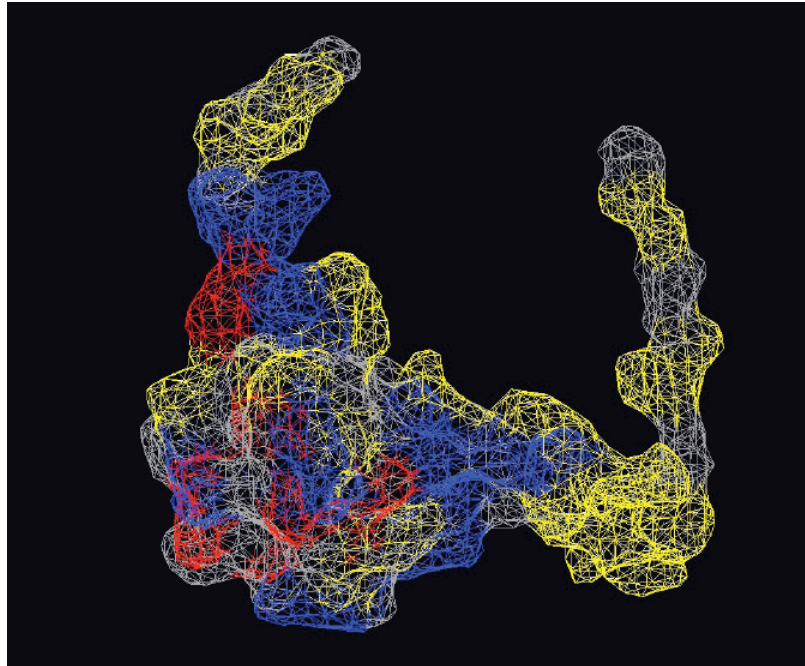
## II. Régulation mutuelle des homéoprotéines et des PNN

---

### A. Hypothèse d'un code sucre pour le transfert d'homéoprotéines

L'hypothèse d'un code sucre pour la reconnaissance de la matrice extracellulaire par les homéoprotéines a été proposée à la suite d'expériences d'injections intracorticales. Tandis qu'*in vitro* les homéoprotéines sont internalisées par tout type cellulaire, *in vivo* on constate une spécificité d'internalisation. Ces protéines, Otx2 dans le cortex visuel ou Engrailed dans le mésencéphale, ne diffusent peu ou pas lorsqu'elles sont injectées *in vivo*. En revanche, l'association de ces homéoprotéines avec du PSA favorise leur diffusion et leur capture préférentielle par les cellules cibles. Otx2 reconnaît principalement les cellules PV dans la couche IV par interaction avec les motifs CS-D et CS-E présents dans les PNN tandis qu'Engrailed injectée dans le cortex n'a pas cette reconnaissance préférentielle et s'accumule dans la couche VI (Sugiyama et al., 2008). Le PSA, de par sa structure hélicale et ses charges, pourrait mimer la structure de la double hélice d'ADN et ainsi interagir avec les homéoprotéines au niveau de leur homéodomaine avec une faible affinité (Joliot et al., 1991b). Une fois proche de sites à fortes affinités (CS-D / CS-E pour Otx2), un changement de partenaire s'opèrerait, permettant une internalisation préférentielle. Ces expériences suggèrent que la diffusion des homéoprotéines pourrait être possible grâce à une association avec des sucres de faible affinité et que la spécificité d'internalisation demanderait la rencontre d'un site de fixation, ici un GAG, de plus forte affinité. Si tel est le cas, il en irait des homéoprotéines comme de nombreux autres morphogènes dont la diffusion est limitée, sauf s'ils sont associés à des transporteurs comme des sucres complexes ou des lipides (Sonnier et al., 2007; Sugiyama et al., 2008; Beurdeley et al., 2012).

La majorité des membres de la famille des homéoprotéines possèdent des domaines putatifs de reconnaissance des sucres (Figure 20). La caractérisation et la validation de ces sites nécessitent le développement d'outils adéquats. En effet, si la synthèse de ces différents domaines de reconnaissance des GAG est réalisable, la caractérisation des sucres reconnus par ces domaines est plus complexe. En effet, les sucres commercialisés présentent en majorité un taux de pureté faible et sont en réalité constitués d'un mélange de plusieurs sous-types. Par exemple, le CS-E commercialisé contient plusieurs sous-types de CS et la forme disulfatée CS-E compte seulement pour 70% du total. Dans cet échantillon commercial, la sulfatation, la longueur et la masse moléculaire de ces CS ne sont pas fixées.



**Figure 21 : Structure de l'homéoprotéine Otx2**

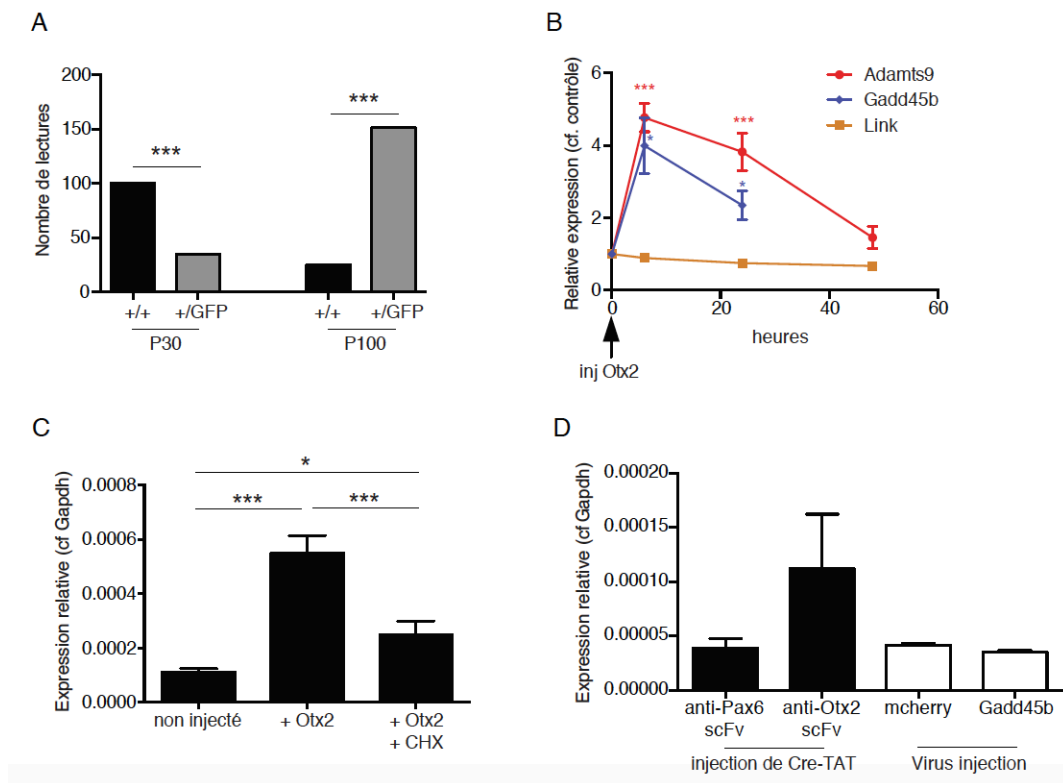
Représentation d'Otx2; code couleur : bleu pour les résidus chargés positivement, rouge pour les résidus anioniques, jaune pour les résidus polaires et neutres, gris pour les résidus hydrophobes.

Ces outils sont donc utiles pour tester l'interaction des homéoprotéines et des sucres, mais ne permettent pas de comprendre avec précision la nature des interactions physiologiques entre homéoprotéines et sucres complexes. Rappelons que l'interaction entre les protéines et les sucres est dictée par l'arrangement spatial des charges électrostatiques. Il est donc nécessaire de développer des analogues ayant une longueur et une distribution de charges déterminées. La synthèse de mimes synthétiques permet d'avoir un contrôle de ces deux paramètres. L'utilisation d'une librairie de mimes présentant des variations de longueurs et de charges permettrait d'identifier les préférences de chaque domaine de reconnaissance aux sucres pour de nombreuses homéoprotéines. L'identification de ce code sucre permettra d'interagir spécifiquement avec chaque homéoprotéine lors de son transfert afin de distinguer l'activité cellulaire autonome de l'activité non-autonome. En revanche, les domaines de reconnaissance étant similaires, il est possible que l'utilisation de mimes linéaires présentés dans l'article ne soit pas suffisante pour obtenir un peptide « mime » spécifique de chaque homéoprotéine. Pour cela, il faut revenir à l'organisation de ces homéoprotéines, en prenant l'exemple mieux connu d'Otx2. La représentation spatiale d'Otx2 (pdb 2DMS) montre qu'il existe dans l'espace deux domaines possédant de nombreuses charges positives, dont l'un constitue le domaine de reconnaissance aux sucres (RK-pep) quand l'autre n'a pas été étudié jusqu'à présent (Figure 21). Les zones secondaires de contacts sont sûrement nécessaires à la sélectivité de l'interaction protéines-sucres. Pour gagner en spécificité, il serait possible de lier différents motifs de peptides linéaires par un espaceur aux propriétés spécifiées (hydrophobicité, charges) pour chaque homéoprotéine.

## **B. Otx2 modifie la matrice extracellulaire**

Les mécanismes par lesquels Otx2 modifie la matrice extracellulaire sont mal connus. Les expériences de perte et de gain de fonction montrent qu'Otx2 est un signal clé dans la mise en place des PNN. Un mécanisme possible d'action serait une interaction avec le complexe eIF4e et l'initiation de la traduction du CSPG aggrecan (Hou et al., 2017). Il a aussi été démontré qu'Otx2 se lie au promoteur de *GalNAcT1*, ce qui permettrait le contrôle de la synthèse des CS (Sakai et al., 2017). La diminution de l'internalisation spécifique d'Otx2 dans les cellules PV dans le cortex préfrontal induit une réduction des PNN et une augmentation de l'expression de *brevican*, *Hapln4*, *RTN4R*, *PTP $\sigma$* , *Adamts8* et *MMP15* (Lee et al., 2017). Otx2 pourrait donc modifier l'expression de certains composants essentiels de la matrice





**Figure 22 : *Adamts9* est une cible d'*Otx2* dans le cortex visuel**

(A) Expression d'*Adamts9* par séquençage profond d'ARN de la couche IV du cortex visuel de souris sauvages (+/+) ou *Otx2*<sup>+/*GFP*</sup> (+/GFP) à P30 et P100.

(B) Expression d'*Adamts9*, *Gadd45b* et *Link* par qRT-PCR d'ARN de couche IV du cortex visuel à 6h, 24h et 48h après injection d'*Otx2* dans ce cortex. ±SEM, t-test \*p<0,05 ; \*\*\*p<0,001.

(C) Expression d'*Adamts9* par qRT-PCR d'ARN de couche IV du cortex visuel après aucune injection (non injecté), injecté avec *Otx2* (+*Otx2*) ou injecté avec *Otx2* et cycloheximide (*Otx2* + CHX). ±SEM; ANOVA \*p<0,05 ; \*\*\*p<0,001.

(D) Expression d'*Adamts9* par qRT-PCR d'ARN de couche IV du cortex visuel 15 jours après injection de Cre-TAT dans les ventricules latéraux de souris *scFvOtx2*<sup>tg/o</sup> (anti-*Otx2* scFv) ou *scFvPax6*<sup>tg/o</sup> (anti-*Pax6* scFv). L'expression d'*Adamts9* est aussi mesurée chez des souris sauvages deux semaines après injection par AAV8-Syn-mcherry (mcherry) ou AAV8-Syn-mcherry-2A-Gadd45b (*Gadd45b*) dans le cortex visuel.

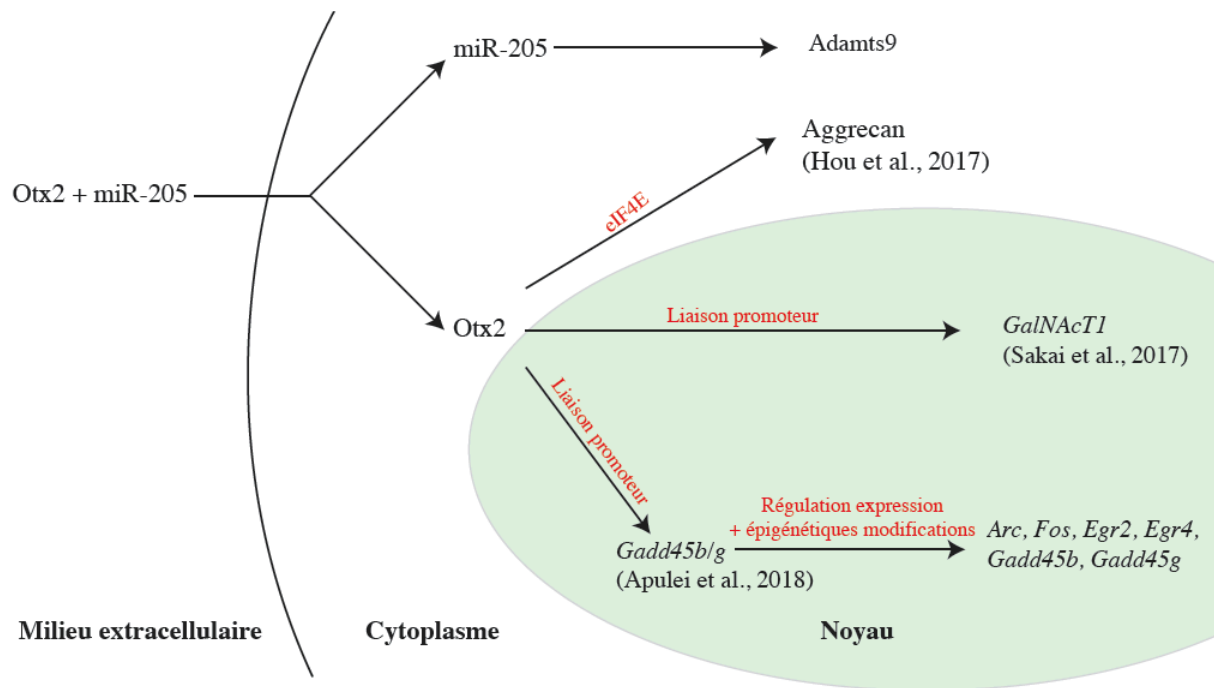
**Tableau 2 : Liste des miRNA ciblant des gènes ayant un changement d'expression pendant la période critique.**

Analyse réalisée avec Pathway Studio des miRNA qui peuvent expliquer les différences d'expressions des gènes issus du séquençage profond d'ARN de couches IV extraits de cortex visuel de souris *Otx2*<sup>+/*GFP*</sup> ou *Otx2*<sup>+/*+*</sup> à P30 et P100.

miRNA ; <i>Otx2</i> <sup>+/<i>GFP</i></sup> vs <i>Otx2</i> <sup>+/<i>+</i></sup> ; P30		miRNA ; <i>Otx2</i> <sup>+/<i>GFP</i></sup> vs <i>Otx2</i> <sup>+/<i>+</i></sup> ; P100	
Cibles ↑	Cibles ↓	Cibles ↑	Cibles ↓
-	205, 23a, 24-1, 141, 181a1	205	-

extracellulaire et des PNN, en même temps que celle d'enzymes impliqués dans leur dégradation. Un des candidats de notre étude de cibles d'Otx2 est *Adamts9*. *Adamts9* est sécrétée et a une action de dégradation des aggrecans. L'étude du séquençage d'ARN de couche IV de souris sauvages ou hétérozygotes pour Otx2 (*Otx2<sup>+GFP</sup>*) montre que la transcription d'*Adamts9* est plus importante pendant les périodes de plasticité (Figure 22A). Pour déterminer s'il s'agit d'une cible d'Otx2, nous avons injecté la protéine Otx2 dans le cortex visuel de souris à P17 et réalisé des qRT-PCR sur l'ARN extrait de la couche IV de ces souris 6h, 24h et 48h après injection (Figure 22B). L'expression d'*Adamts9* augmente dès 6h après injection et ne diminue qu'après 48h. Pour savoir si *Adamts9* est une cible directe ou non d'Otx2, nous avons réalisé la même expérience avec un inhibiteur de la traduction. Bloquer la traduction empêche l'augmentation de l'expression d'*Adamts9* après injection d'Otx2 (Figure 22C), ce qui suggère qu'Otx2 nécessite un intermédiaire pour réguler l'expression d'*Adamts9*. La surexpression virale de *Gadd45b* chez l'adulte, qui entraîne une augmentation des gènes de plasticité et une réouverture de plasticité, ne modifie pas l'expression d'*Adamts9* dans la couche IV du cortex visuel (Figure 22D). En revanche, la réouverture de plasticité obtenue en bloquant Otx2 dans le milieu extracellulaire semble augmenter l'expression d'*Adamts9*, ici d'une manière non significative du fait de la variabilité importante entre souris (Figure 22D).

Des études préliminaires avec Engrailed ont montré qu'Engrailed pouvait se lier à certains miRNA (miR) et les internaliser dans les cellules cibles. Une des hypothèses commune pour l'action des homéoprotéines est leur rôle potentiel en tant que protéines argonautes. L'analyse plus précise du séquençage profond d'ARN de la couche IV du cortex visuel de souris sauvages et *Otx2<sup>+GFP</sup>* à P30 et P100 a été réalisée à l'aide de Pathway Studio. Pour cela, nous voulions connaître quels sont les miRNA qui pourraient expliquer les variations d'expressions observées (Tableau 2). Nous remarquons que miR-205 pourrait expliquer les différences de plasticités entre les deux lignées aussi bien à P30 qu'à P100. Or ce miRNA serait capable de contrôler l'expression d'*Adamts9*. Ainsi nous pouvons proposer un modèle dans lequel Otx2 est transféré lié à certains miR, dont miR-205, induit leur internalisation dans les cellules PV, et tandis que miR-205 modifie l'expression d'*Adamts9*, Otx2 se lie au promoteur de *Gadd45b* et *GalNAcT1* (Figure 23). Ces différentes cibles d'Otx2 permettraient la régulation dynamique de la condensation de la matrice extracellulaire, de la synthèse de ses constituants à ses modulateurs extracellulaires.



**Figure 23 : Modèle de la régulation de la mise en place des PNN par Otx2**

Hypothèse d'Otx2 en tant que protéine argonaute, pouvant se lier avec miR-205 et permettre son internalisation dans la cellule cible. Une fois internalisée, Otx2 régule la traduction d'aggrecan par le complexe eIF4E et régule la transcription de *GalNAcT1* et *Gadd45b/g*. Ces activités contrôlent la maturation des cellules PV et la condensation de la matrice extracellulaire. miR-205 internalisé pourrait avoir une activité sur l'expression d'Adamts9. Adamts9 pourrait avoir une action sur le remodelage de la matrice extracellulaire en clivant les aggrecans.

### C. Otx2 régulateur global des PNN corticaux

Les expériences avec le PSA décrites précédemment ont permis d'émettre l'hypothèse qu'Otx2 voyage dans le CSF lié à un sucre de plus faible affinité que les CS-D / CS-E. Cela permettrait à Otx2 de s'accumuler spécifiquement dans certains neurones du cortex, et ainsi de contrôler la mise en place de la période critique. Otx2 a été décrit comme contrôlant les fenêtres de plasticité de deux régions corticales (V1 et A1) et d'un cortex plus associatif (mPFC) (Lee et al., 2017). Il serait aussi intéressant d'étudier ce transfert dans des régions corticales pour lesquelles la plasticité reste élevée chez l'adulte. Des études préliminaires du laboratoire ont démontré que le cortex piriforme possède des cellules PV avec une matrice extracellulaire moins condensée et que l'homéoprotéine Otx2 y est présente. Le cortex piriforme est un paléocortex (ne possédant que trois couches) nécessaire à la mémorisation olfactive. La MEC se condense en PNN uniquement autour de quelques cellules et cela d'une manière tardive (P400). Etant donné qu'il y a une boucle de rétro-contrôle positive entre Otx2 et les PNN, l'hydrolyse de la matrice extracellulaire modifie la quantité de PNN mais aussi la reconnaissance d'Otx2. Pour distinguer ces deux effets, il est possible de réaliser par stratégie virale des gains de fonction d'Otx2 spécifiquement dans les cellules PV après hydrolyse des PNN. A l'inverse, pour étudier uniquement l'effet d'Otx2 transféré, nous pouvons utiliser la construction anti-Otx2 scFv qui a été validée au cours de ma thèse. Les études préliminaires faites au laboratoire ont démontré que bloquer le transfert d'Otx2 grâce à la sécrétion d'un anti-Otx2 scFv par les cellules PV (souris *PV::Cre;scFvOtx2<sup>tg/o</sup>*) entraîne une décondensation de la matrice extracellulaire dans le cortex piriforme. A l'inverse, un gain de fonction d'Otx2 spécifiquement dans les cellules PV du cortex piriforme favorise la condensation de la matrice extracellulaire. Ces deux expériences soulignent le rôle d'Otx2 dans la régulation de la condensation de la matrice dans le cortex piriforme. Il serait intéressant de faire des analyses biochimiques de la matrice extracellulaire du cortex piriforme et de les comparer à celles du cortex visuel. Nous pouvons émettre l'hypothèse que l'analyse biochimique comparée entre ces deux cortex soulignera une différence de quantité de CS ou une différence de sulfatation de ces CS. Il est aussi possible que l'accessibilité des CS de la matrice soit différente entre ces deux cortex, et l'expression des métalloprotéases devra aussi être étudiée. Une telle étude permettrait de mettre en lumière les différences responsables du fait qu'Otx2 s'accumule plus lentement dans ce cortex, ce qui retarde la formation des PNN et permet un maintien de la plasticité chez l'adulte.



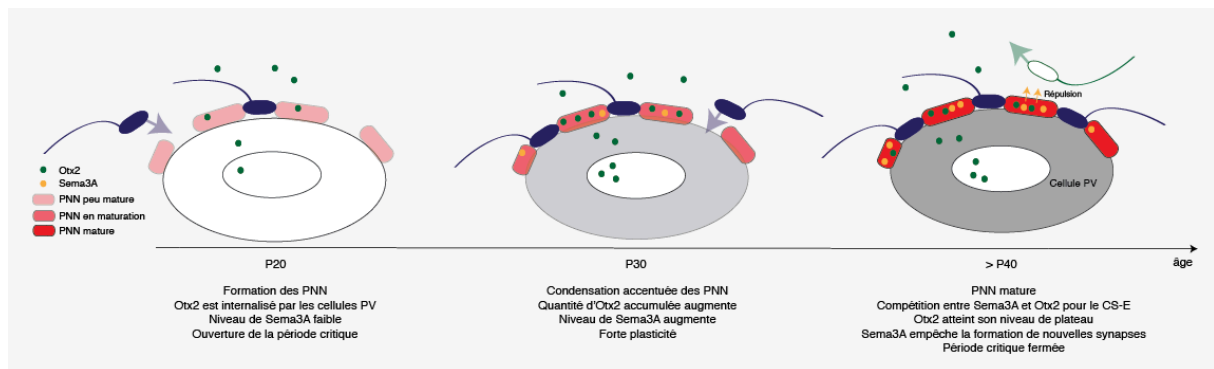
## **PERSPECTIVES - CONCLUSION**



Le phénomène de transfert des homéoprotéines, longtemps débattu, est aujourd'hui reconnu grâce aux nombreuses preuves *in vitro* et *in vivo* accumulées dans différents modèles. Notre étude sur le développement de la souris *scFvOtx2<sup>tg/o</sup>*, fournit la première preuve génétique de l'activité non-autonome de l'homéoprotéine Otx2 chez le mammifère. La même preuve génétique avait été apportée pour Engrailed, par une approche similaire, chez la Drosophile (Layalle et al., 2011). Cette séparation précise et localisée de l'activité autonome et non-autonome des homéoprotéines est nécessaire à la compréhension de leurs rôles respectifs. A l'heure actuelle les lignées de souris *scFvOtx2<sup>tg/o</sup>*, *scFvPax6<sup>tg/o</sup>* et *scFvEn1/2<sup>tg/o</sup>* ont été générées et sont en cours de caractérisation. Dans ces lignées les homéoprotéines Otx2, Pax6 et Engrailed peuvent être séquestrées dans le milieu extracellulaire par induction par la Cre-recombinase. En réalisant les croisements adéquats avec des souris exprimant la Cre-recombinase sous le contrôle de promoteurs choisis, nous pouvons décider où et quand bloquer l'activité non-autonome des homéoprotéines. Nos études ont été réalisées durant le développement postnatal mais les homéoprotéines, ne l'oublions pas, possèdent un rôle majeur au cours de l'embryogénèse. La part de l'activité cellulaire autonome et non-autonome à ce stade de développement n'est pas élucidée mais des travaux en cours s'appuyant sur la souris *scFvPax6<sup>tg/o</sup>* ont permis de démontrer que Pax6 extracellulaire régule la migration des cellules de Cajal-Retzius au jour 11 du développement embryonnaire, ainsi que la neurogenèse (collaboration avec le laboratoire d'Alessandra Pierani). Evidemment, nous n'avons développé l'outil que pour 3 homéoprotéines, mais la même approche pourrait être étendue à d'autres membres de la famille, voir à d'autres familles de morphogènes.

Au niveau du cortex, Otx2 contrôle la maturation des cellules PV et la condensation en PNN, deux étapes qui déterminent la temporalité de la période critique. Le second projet de ma thèse a permis de mettre en lumière un mécanisme d'action d'Otx2 dans le contrôle de la plasticité du cortex visuel. Otx2 régule l'expression de *Gadd45b* en se liant physiquement à son promoteur. L'expression de *Gadd45b* est fortement corrélée à celle des gènes de plasticité (*Arc*, *Egr2*, *Egr4*, *Fos*) et *Gadd45b*, exprimé chez l'adulte est suffisant à la réouverture d'une fenêtre de plasticité. Nous avons démontré que les modifications de méthylation de certains îlots CpG des promoteurs de gènes de plasticité étaient régulées par *Gadd45b*. Cette modification de l'état de compaction de la chromatine pourrait expliquer la double action d'Otx2, en tant qu'activateur de la plasticité à P20 et répresseur à partir de P40. Cette étude des méthylations des promoteurs a été réalisée par conversion bisulfite suivie de qPCR ce qui





**Figure 24 : Modèle de compétition de Sema3A et Otx2**

L'accumulation d'Otx2 dans les cellules PV engendre une condensation en PNN. Les modifications synaptiques sont possibles pendant la plasticité. Après cette fenêtre de plasticité, Otx2 atteint un plateau et Sema3A empêche la formation de nouvelles synapses.

limite à certains promoteurs choisis et ne prend pas en compte la conformation spatiale de la chromatine. Afin d'accéder à l'action d'Otx2 dans la restructuration globale de la chromatine des cellules PV, il sera nécessaire de réaliser un séquençage sur génome entier (whole genome sequencing) après conversion bisulfite, et pour connaître les régions spatialement proches, de réaliser des expériences de Chromosome Conformation Capture (3C). Je crois qu'obtenir la signature épigénétique des cellules PV à différentes étapes de leur développement sera une étape clé dans notre compréhension des mécanismes d'action d'Otx2 dans le contexte plus large de la plasticité du cortex cérébral.

Pour revenir sur un point déjà abordé, certaines activités des homéoprotéines nécessitent une synergie avec des co-facteurs. Par exemple, Engrailed, EphrinA5 et le récepteur Adénosine A1 sont en synergie dans la guidance axonale (Wizenmann et al., 2009; Stettler et al., 2012). Dans notre modèle d'étude, nous pouvons émettre l'hypothèse que le double rôle d'Otx2, en tant qu'activateur de plasticité à P20 et répresseur à P40, implique la présence de différents co-facteurs. A l'ouverture de plasticité, Otx2 pourrait être en synergie avec BDNF ou BMP et favoriser la maturation des cellules PV et, 20 jours plus tard entrer en synergie avec Sema3A pour la fermeture de la période critique. Ces changements de partenaire pourraient être liés à l'augmentation de la concentration d'Otx2 entre P20 et P40 et l'induction qui s'ensuit de modifications épigénétiques de la chromatine, comme Jessica Apulei a commencé de le démontrer dans le laboratoire.

Pour conclure de façon plus pragmatique et ponctuelle, je proposerai que Sema3A et Otx2 entre en compétition, du fait qu'ils ont un domaine presque identique de reconnaissance aux sucres, pour une interaction avec les PNN. Dans ce modèle compétitif, les premiers stimuli visuels entraînent le début de condensation de la MEC autour des cellules PV, ce qui permet à Otx2 de s'accumuler dans ces cellules. A cette période la formation des synapses est favorisée. Au pic de plasticité, Sema3A commence à s'accumuler au sein d'un PNN plus mature. Ensuite, Otx2 atteint un plateau et Sema3A empêche la formation de nouvelles synapses (Figure 24). Jusqu'ici l'étude distincte d'Otx2 et de Sema3A n'était pas possible par manque d'outils spécifiques à chaque acteur (comme je l'ai discuté plus haut). Le troisième pan de mon projet de thèse, les peptides enrichis en acide cystéique, pourrait apporter les briques nécessaires à la validation (ou invalidation) du modèle impliquant Otx2 et Sema3A dans le contrôle de la période critique.

Il reste évidemment beaucoup à faire et cette thèse ouvre sur de multiples questions. Mais j'espère qu'en mettant en place un modèle génétique de la modulation de la concentration extracellulaire d'Otx2, en identifiant des cibles transcriptionnelles non cellulaire autonome exprimées dans les cellules PV et en commençant à développer des outils susceptibles de percer le mystère du « code sucre » et de distinguer les activités d'Otx2 de celles de ses cofacteurs, elle permettra à ceux qui me suivront d'aller plus loin que moi dans la compréhension d'une voie nouvelle de signalisation dont les conséquences en physiologie n'ont sans doute pas fini de nous étonner.

## **RÉFÉRENCES**



- Acampora D, Gulisano M, Broccoli V, Simeone A (2001) Otx genes in brain morphogenesis. *Prog Neurobiol* 64:69–95.
- Acampora D, Mazan S, Lallemand Y, Avantaggiato V, Maury M, Simeone A, Brûlet P (1995) Forebrain and midbrain regions are deleted in Otx2<sup>-/-</sup> mutants due to a defective anterior neuroectoderm specification during gastrulation. *Development* 121:3279–3290.
- Ashikari-Hada S, Habuchi H, Kariya Y, Itoh N, Reddi AH, Kimata K (2004) Characterization of growth factor-binding structures in heparin/heparan sulfate using an octasaccharide library. *J Biol Chem* 279:12346–12354.
- Ashikari-Hada S, Habuchi H, Sugaya N, Kobayashi T, Kimata K (2009) Specific inhibition of FGF-2 signaling with 2-O-sulfated octasaccharides of heparan sulfate. *Glycobiology* 19:644–654.
- Berlose JP, Convert O, Derossi D, Brunissen A, Chassaing G (1996) Conformational and associative behaviours of the third helix of antennapedia homeodomain in membrane-mimetic environments. *Eur J Biochem* 242:372–386.
- Bernard C, Kim H-T, Ibad RT, Lee EJ, Simonutti M, Picaud S, Acampora D, Simeone A, Di Nardo AA, Prochiantz A, Moya KL, Kim JW (2014) Graded Otx2 activities demonstrate dose-sensitive eye and retina phenotypes. *Human Molecular Genetics* 23:1742–1753.
- Bernard C, Vincent C, Testa D, Bertini E, Ribot J, Di Nardo AA, Volovitch M, Prochiantz A (2016) A Mouse Model for Conditional Secretion of Specific Single-Chain Antibodies Provides Genetic Evidence for Regulation of Cortical Plasticity by a Non-cell Autonomous Homeoprotein Transcription Factor. *PLoS Genet* 12:e1006035.
- Beurdeley M, Spatazza J, Lee HHC, Sugiyama S, Bernard C, Di Nardo AA, Hensch TK, Prochiantz A (2012) Otx2 binding to perineuronal nets persistently regulates plasticity in the mature visual cortex. *J Neurosci* 32:9429–9437.
- Billeter M, Qian Y, Otting G, Müller M, Gehring WJ, Wüthrich K (1990) Determination of the three-dimensional structure of the Antennapedia homeodomain from *Drosophila* in solution by 1H nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J Mol Biol* 214:183–197.
- Billeter M, Qian YQ, Otting G, Müller M, Gehring W, Wüthrich K (1993) Determination of the nuclear magnetic resonance solution structure of an Antennapedia homeodomain-DNA complex. *J Mol Biol* 234:1084–1093.
- Brunet I, Weint C, Piper M, Trembleau A, Volovitch M, Harris W, Prochiantz A, Holt C (2005) The transcription factor Engrailed-2 guides retinal axons. *Nature* 438:94–98.
- Brückner G, Brauer K, Härtig W, Wolff JR, Rickmann MJ, Derouiche A, Delpech B, Girard N, Oertel WH, Reichenbach A (1993) Perineuronal nets provide a polyanionic, glia-associated form of microenvironment around certain neurons in many parts of the rat brain. *Glia* 8:183–200.
- Brückner G, Grosche J, Schmidt S, Härtig W, Margolis RU, Delpech B, Seidenbecher CI, Czaniara R, Schachner M (2000) Postnatal development of perineuronal nets in wild-type mice and in a mutant deficient in tenascin-R. *J Comp Neurol* 428:616–629.

- Cabungcal J-H, Steullet P, Morishita H, Kraftsik R, Cuenod M, Hensch TK, Do KQ (2013) Perineuronal nets protect fast-spiking interneurons against oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:9130–9135.
- Cardis R, Cabungcal J-H, Dwir D, Do KQ, Steullet P (2018) A lack of GluN2A-containing NMDA receptors confers a vulnerability to redox dysregulation: Consequences on parvalbumin interneurons, and their perineuronal nets. *Neurobiol Dis* 109:64–75.
- Cheung ST, Miller MS, Pacoma R, Roland J, Liu J, Schumacher AM, Hsieh-Wilson LC (2017) Discovery of a Small-Molecule Modulator of Glycosaminoglycan Sulfation. *ACS Chem Biol* 12:3126–3133.
- Christiaens B, Symoens S, Verheyden S, Engelborghs Y, Joliot A, Prochiantz A, Vandekerckhove J, Rosseneu M, Vanloo B, Vanderheyden S (2002) Tryptophan fluorescence study of the interaction of penetratin peptides with model membranes. *Eur J Biochem* 269:2918–2926.
- Cohen S, Jürgens G (1991) *Drosophila* headlines. *Trends Genet* 7:267–272.
- Corredor M, Bonet R, Moure A, Domingo C, Bujons J, Alfonso I, Pérez Y, Messeguer À (2016) Cationic Peptides and Peptidomimetics Bind Glycosaminoglycans as Potential Sema3A Pathway Inhibitors. *Biophys J* 110:1291–1303.
- Cragg B (1979) Brain extracellular space fixed for electron microscopy. *Neurosci Lett* 15:301–306.
- Day JM, Olin AI, Murdoch AD, Canfield A, Sasaki T, Timpl R, Hardingham TE, Asperg A (2004) Alternative splicing in the aggrecan G3 domain influences binding interactions with tenascin-C and other extracellular matrix proteins. *J Biol Chem* 279:12511–12518.
- de Winter F, Kwok JCF, Fawcett JW, Vo TT, Carulli D, Verhaagen J (2016) The Chemorepulsive Protein Semaphorin 3A and Perineuronal Net-Mediated Plasticity. *Neural Plasticity* 2016:3679545–14.
- Derossi D, Calvet S, Trembleau A, Brunissen A, Chassaing G, Prochiantz A (1996) Cell internalization of the third helix of the Antennapedia homeodomain is receptor-independent. *J Biol Chem* 271:18188–18193.
- Derossi D, Chassaing G, Prochiantz A (1998) Trojan peptides: the penetratin system for intracellular delivery. *Trends Cell Biol* 8:84–87.
- Derossi D, Joliot AH, Chassaing G, Prochiantz A (1994) The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes. *J Biol Chem* 269:10444–10450.
- Despras G, Bernard C, Perrot A, Cattiaux L, Prochiantz A, Lortat-Jacob H, Mallet J-M (2013) Toward libraries of biotinylated chondroitin sulfate analogues: from synthesis to in vivo studies. *Chemistry* 19:531–540.
- Di Cristo G, Chattopadhyaya B, Kuhlman SJ, Fu Y, Bélanger M-C, Wu CZ, Rutishauser U, Maffei L, Huang ZJ (2007) Activity-dependent PSA expression regulates inhibitory maturation and onset of critical period plasticity. *Nat Neurosci* 10:1569–1577.

- Di Lullo E, Haton C, Le Poupon C, Volovitch M, Joliot A, Thomas J-L, Prochiantz A (2011) Paracrine Pax6 activity regulates oligodendrocyte precursor cell migration in the chick embryonic neural tube. *Development* 138:4991–5001.
- Di Nardo AA, Fuchs J, Joshi RL, Moya KL, Prochiantz A (2018) The Physiology of Homeoprotein Transduction. *Physiological Reviews*, in press.
- Dick G, Tan CL, Alves JN, Ehlert EME, Miller GM, Hsieh-Wilson LC, Sugahara K, Oosterhof A, van Kuppevelt TH, Verhaagen J, Fawcett JW, Kwok JCF (2013) Semaphorin 3A binds to the perineuronal nets via chondroitin sulfate type E motifs in rodent brains. *J Biol Chem* 288:27384–27395.
- Dubnau J, Struhl G (1996) RNA recognition and translational regulation by a homeodomain protein. *Nature* 379:694–699.
- Dupont E, Prochiantz A, Joliot A (2007) Identification of a signal peptide for unconventional secretion. *J Biol Chem* 282:8994–9000.
- Espinosa JS, Stryker MP (2012) Development and plasticity of the primary visual cortex. *Neuron* 75:230–249.
- Fagiolini M, Fritschy J-M, Löw K, Möhler H, Rudolph U, Hensch TK (2004) Specific GABAA circuits for visual cortical plasticity. *Science* 303:1681–1683.
- Favuzzi E, Marques-Smith A, Deogracias R, Winterflood CM, Sánchez-Aguilera A, Mantoan L, Maeso P, Fernandes C, Ewers H, Rico B (2017) Activity-Dependent Gating of Parvalbumin Interneuron Function by the Perineuronal Net Protein Brevican. *Neuron* 95:639–655.e10.
- Finkelstein R, Perrimon N (1990) The orthodenticle gene is regulated by bicoid and torso and specifies *Drosophila* head development. *Nature* 346:485–488.
- Frantz GD, Weimann JM, Levin ME, McConnell SK (1994) Otx1 and Otx2 define layers and regions in developing cerebral cortex and cerebellum. *J Neurosci* 14:5725–5740.
- Frischknecht R, Heine M, Perrais D, Seidenbecher CI, Choquet D, Gundelfinger ED (2009) Brain extracellular matrix affects AMPA receptor lateral mobility and short-term synaptic plasticity. *Nat Neurosci* 12:897–904.
- Gehring W (1967) Clonal analysis of determination dynamics in cultures of imaginal disks in *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol* 16:438–456.
- Gordon JA, Stryker MP (1996) Experience-dependent plasticity of binocular responses in the primary visual cortex of the mouse. *J Neurosci* 16:3274–3286.
- Hannon CE, Blythe SA, Wieschaus EF (2017) Concentration dependent chromatin states induced by the bicoid morphogen gradient. *Elife* 6:3165.
- Harauzov A, Spolidoro M, DiCristo G, De Pasquale R, Cancedda L, Pizzorusso T, Viegi A, Berardi N, Maffei L (2010) Reducing intracortical inhibition in the adult visual cortex promotes ocular dominance plasticity. *J Neurosci* 30:361–371.



- Härtig W, Derouiche A, Welt K, Brauer K, Grosche J, Mäder M, Reichenbach A, Brückner G (1999) Cortical neurons immunoreactive for the potassium channel Kv3.1b subunit are predominantly surrounded by perineuronal nets presumed as a buffering system for cations. *Brain Research* 842:15–29.
- He L-J, Liu N, Cheng T-L, Chen X-J, Li Y-D, Shu Y-S, Qiu Z-L, Zhang X-H (2014) Conditional deletion of *Mecp2* in parvalbumin-expressing GABAergic cells results in the absence of critical period plasticity. *Nat Commun* 5:5036.
- Hensch TK (2005) Critical period plasticity in local cortical circuits. *Nat Rev Neurosci* 6:877–888.
- Hensch TK, Fagiolini M, Mataga N, Stryker MP, Baekkeskov S, Kash SF (1998) Local GABA circuit control of experience-dependent plasticity in developing visual cortex. *Science* 282:1504–1508.
- Hirth F, Therianos S, Loop T, Gehring WJ, Reichert H, Furukubo-Tokunaga K (1995) Developmental defects in brain segmentation caused by mutations of the homeobox genes *orthodenticle* and *empty spiracles* in *Drosophila*. *Neuron* 15:769–778.
- Horton JC, Hocking DR (1997) Timing of the critical period for plasticity of ocular dominance columns in macaque striate cortex. *J Neurosci* 17:3684–3709.
- Hou X, Yoshioka N, Tsukano H, Sakai A, Miyata S, Watanabe Y, Yanagawa Y, Sakimura K, Takeuchi K, Kitagawa H, Hensch TK, Shibuki K, Igarashi M, Sugiyama S (2017) Chondroitin Sulfate Is Required for Onset and Offset of Critical Period Plasticity in Visual Cortex. *Nature Publishing Group* 7:12646.
- Hu H, Gan J, Jonas P (2014) Interneurons. Fast-spiking, parvalbumin<sup>+</sup> GABAergic interneurons: from cellular design to microcircuit function. *Science* 345:1255263–1255263.
- Huang ZJ, Kirkwood A, Pizzorusso T, Porciatti V, Morales B, Bear MF, Maffei L, Tonegawa S (1999) BDNF regulates the maturation of inhibition and the critical period of plasticity in mouse visual cortex. *Cell* 98:739–755.
- Issa NP, Trachtenberg JT, Chapman B, Zahs KR, Stryker MP (1999) The critical period for ocular dominance plasticity in the Ferret's visual cortex. *J Neurosci* 19:6965–6978.
- Joliot A, Maizel A, Rosenberg D, Trembleau A, Dupas S, Volovitch M, Prochiantz A (1998) Identification of a signal sequence necessary for the unconventional secretion of Engrailed homeoprotein. *Curr Biol* 8:856–863.
- Joliot A, Pernelle C, Deagostini-Bazin H, Prochiantz A (1991a) Antennapedia homeobox peptide regulates neural morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:1864–1868.
- Joliot AH, Triller A, Volovitch M, Pernelle C, Prochiantz A (1991b) alpha-2,8-Polysialic acid is the neuronal surface receptor of antennapedia homeobox peptide. *New Biol* 3:1121–1134.
- Joyner AL (1996) Engrailed, Wnt and Pax genes regulate midbrain–hindbrain development. *Trends Genet* 12:15–20.

- Karch S, Segmiller F, Hantschk I, Cerovecki A, Opgen-Rhein M, Hock B, Dargel S, Leicht G, Hennig-Fast K, Riedel M, Pogarell O (2012) Increased  $\gamma$  oscillations during voluntary selection processes in adult patients with attention deficit/hyperactivity disorder. *J Psychiatr Res* 46:1515–1523.
- Kelwick R, Desanlis I, Wheeler GN, Edwards DR (2015) The ADAMTS (A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin motifs) family. *Genome Biol* 16:113.
- Kissinger CR, Liu BS, Martin-Blanco E, Kornberg TB, Pabo CO (1990) Crystal structure of an engrailed homeodomain-DNA complex at 2.8 Å resolution: a framework for understanding homeodomain-DNA interactions. *Cell* 63:579–590.
- Koike C, Nishida A, Ueno S, Saito H, Sanuki R, Sato S, Furukawa A, Aizawa S, Matsuo I, Suzuki N, Kondo M, Furukawa T (2007) Functional roles of Otx2 transcription factor in postnatal mouse retinal development. *Mol Cell Biol* 27:8318–8329.
- Kwok JCF, Carulli D, Fawcett JW (2010) In vitro modeling of perineuronal nets: hyaluronan synthase and link protein are necessary for their formation and integrity. *Journal of Neurochemistry* 114:1447–1459.
- Layalle S, Volovitch M, Mugat B, Bonneaud N, Parmentier M-L, Prochiantz A, Joliot A, Maschat F (2011) Engrailed homeoprotein acts as a signaling molecule in the developing fly. *Development* 138:2315–2323.
- Lee HHC, Bernard C, Ye Z, Acampora D, Simeone A, Prochiantz A, Di Nardo AA, Hensch TK (2017) Genetic Otx2 mis-localization delays critical period plasticity across brain regions. *Mol Psychiatry* 22:680–688.
- Lepeta K, Purzycka KJ, Pachulska-Wieczorek K, Mitjans M, Begemann M, Vafadari B, Bijata K, Adamiak RW, Ehrenreich H, Dziembowska M, Kaczmarek L (2017) A normal genetic variation modulates synaptic MMP-9 protein levels and the severity of schizophrenia symptoms. *EMBO Mol Med* 9:1100–1116.
- Lesaffre B, Joliot A, Prochiantz A, Volovitch M (2007) Direct non-cell autonomous Pax6 activity regulates eye development in the zebrafish. *Neural Dev* 2:2.
- Lewis EB (1978) A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. *Nature* 276:565–570.
- Maizel A, Tassetto M, Filhol O, Cochet C, Prochiantz A, Joliot A (2002) Engrailed homeoprotein secretion is a regulated process. *Development* 129:3545–3553.
- Marín O (2012) Interneuron dysfunction in psychiatric disorders. *Nat Rev Neurosci* 13:107–120.
- Martinez-Morales JR, Signore M, Acampora D, Simeone A, Bovolenta P (2001) Otx genes are required for tissue specification in the developing eye. *Development* 128:2019–2030.
- McGinnis W, Hart CP, Gehring WJ, Ruddle FH (1984) Molecular cloning and chromosome mapping of a mouse DNA sequence homologous to homeotic genes of *Drosophila*. *Cell* 38:675–680.

- Mellén M, Ayata P, Dewell S, Kriaucionis S, Heintz N (2012) MeCP2 binds to 5hmC enriched within active genes and accessible chromatin in the nervous system. *Cell* 151:1417–1430.
- Miyata S, Komatsu Y, Yoshimura Y, Taya C, Kitagawa H (2012) Persistent cortical plasticity by upregulation of chondroitin 6-sulfation. *Nat Neurosci* 15:414–22–S1–2.
- Miyata S, Nishimura Y, Nakashima T (2007) Perineuronal nets protect against amyloid beta-protein neurotoxicity in cultured cortical neurons. *Brain Research* 1150:200–206.
- Morgan TH, Bridges CB (1923) *The Third-Chromosome Group of Mutant Characters of Drosophila Melanogaster*. Sagwan Press.
- Morishita H, Cabungcal J-H, Chen Y, Do KQ, Hensch TK (2015) Prolonged Period of Cortical Plasticity upon Redox Dysregulation in Fast-Spiking Interneurons. *Biol Psychiatry* 78:396–402.
- Nédélec S, Foucher I, Brunet I, Bouillot C, Prochiantz A, Trembleau A (2004) Emx2 homeodomain transcription factor interacts with eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E) in the axons of olfactory sensory neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:10815–10820.
- Oohashi T, Edamatsu M, Bekku Y, Carulli D (2015) The hyaluronan and proteoglycan link proteins: Organizers of the brain extracellular matrix and key molecules for neuronal function and plasticity. *Experimental Neurology* 274:134–144.
- Ornitz DM (2000) FGFs, heparan sulfate and FGFRs: complex interactions essential for development. *Bioessays* 22:108–112.
- Otting G, Qian YQ, Billeter M, Müller M, Affolter M, Gehring WJ, Wüthrich K (1990) Protein–DNA contacts in the structure of a homeodomain–DNA complex determined by nuclear magnetic resonance spectroscopy in solution. *EMBO J* 9:3085–3092.
- Pizzorusso T, Medini P, Berardi N, Chierzi S, Fawcett JW, Maffei L (2002) Reactivation of ocular dominance plasticity in the adult visual cortex. *Science* 298:1248–1251.
- Pizzorusso T, Medini P, Landi S, Baldini S, Berardi N, Maffei L (2006) Structural and functional recovery from early monocular deprivation in adult rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:8517–8522.
- Prasad SS, Kojic LZ, Li P, Mitchell DE, Hachisuka A, Sawada J, Gu Q, Cynader MS (2001) Gene expression patterns during enhanced periods of visual cortex plasticity. *Neuroscience* 111:35–45.
- Prochiantz A, Di Nardo AA (2015) Homeoprotein signaling in the developing and adult nervous system. *Neuron* 85:911–925.
- Putignano E, Lonetti G, Cancedda L, Ratto G, Costa M, Maffei L, Pizzorusso T (2007) Developmental downregulation of histone posttranslational modifications regulates visual cortical plasticity. *Neuron* 53:747–759.
- Qian YQ, Billeter M, Otting G, Müller M, Gehring WJ, Wüthrich K (1989) The structure of

- the Antennapedia homeodomain determined by NMR spectroscopy in solution: comparison with prokaryotic repressors. *Cell* 59:573–580.
- Rauch U, Clement A, Retzler C, Fröhlich L, Fässler R, Göhring W, Faissner A (1997) Mapping of a defined neurocan binding site to distinct domains of tenascin-C. *J Biol Chem* 272:26905–26912.
- Rekaik H, Blaudin de Thé F-X, Fuchs J, Massiani-Beaudoin O, Prochiantz A, Joshi RL (2015) Engrailed Homeoprotein Protects Mesencephalic Dopaminergic Neurons from Oxidative Stress. *Cell Rep* 13:242–250.
- Rojas DC, Wilson LB (2014)  $\gamma$ -band abnormalities as markers of autism spectrum disorders. *Biomark Med* 8:353–368.
- Rossier J, Bernard A, Cabungcal J-H, Perrenoud Q, Savoye A, Gallopin T, Hawrylycz M, Cuénod M, Do K, Urban A, Lein ES (2015) Cortical fast-spiking parvalbumin interneurons enwrapped in the perineuronal net express the metallopeptidases Adamts8, Adamts15 and Neprilysin. *Mol Psychiatry* 20:154–161.
- Sabunciyar S, Yolken R, Ragan CM, Potash JB, Nimgaonkar VL, Dickerson F, Llenos IC, Weis S (2007) Polymorphisms in the homeobox gene OTX2 may be a risk factor for bipolar disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 144B:1083–1086.
- Sakai A, Nakato R, Ling Y, Hou X, Hara N, Iijima T, Yanagawa Y, Kuwano R, Okuda S, Shirahige K, Sugiyama S (2017) Genome-Wide Target Analyses of Otx2 Homeoprotein in Postnatal Cortex. *Front Neurosci* 11:307.
- Sasisekharan R, Venkataraman G (2000) Heparin and heparan sulfate: biosynthesis, structure and function. *Curr Opin Chem Biol* 4:626–631.
- Scheiman MM, Hertle RW, Beck RW, Edwards AR, Birch E, Cotter SA, Crouch ER, Cruz OA, Davitt BV, Donahue S, Holmes JM, Lyon DW, Repka MX, Sala NA, Silbert DI, Suh DW, Tamkins SM, Pediatric Eye Disease Investigator Group (2005) Randomized trial of treatment of amblyopia in children aged 7 to 17 years. *Arch Ophthalmol* 123:437–447.
- Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium (2014) Biological insights from 108 schizophrenia-associated genetic loci. *Nature* 511:421–427.
- Seidenbecher CI, Richter K, Rauch U, Fässler R, Garner CC, Gundelfinger ED (1995) Brevican, a chondroitin sulfate proteoglycan of rat brain, occurs as secreted and cell surface glycosylphosphatidylinositol-anchored isoforms. *J Biol Chem* 270:27206–27212.
- Shin Y-W, O'Donnell BF, Youn S, Kwon JS (2011) Gamma oscillation in schizophrenia. *Psychiatry Investig* 8:288–296.
- Silbert JE, Sugumaran G (2002) Biosynthesis of chondroitin/dermatan sulfate. *IUBMB Life* 54:177–186.
- Simeone A, Acampora D, Gulisano M, Stornaiuolo A, Boncinelli E (1992) Nested expression domains of four homeobox genes in developing rostral brain. *Nature* 358:687–690.
- Simeone A, Acampora D, Mallamaci A, Stornaiuolo A, D'Apice MR, Nigro V, Boncinelli E

- (1993) A vertebrate gene related to orthodenticle contains a homeodomain of the bicoid class and demarcates anterior neuroectoderm in the gastrulating mouse embryo. *EMBO J* 12:2735–2747.
- Sonnier L, Le Pen G, Hartmann A, Bizot J-C, Trovero F, Krebs M-O, Prochiantz A (2007) Progressive loss of dopaminergic neurons in the ventral midbrain of adult mice heterozygote for *Engrailed1*. *J Neurosci* 27:1063–1071.
- Southwell DG, Froemke RC, Alvarez-Buylla A, Stryker MP, Gandhi SP (2010) Cortical plasticity induced by inhibitory neuron transplantation. *Science* 327:1145–1148.
- Spatazza J, Di Lullo E, Joliot A, Dupont E, Moya KL, Prochiantz A (2013a) Homeoprotein signaling in development, health, and disease: a shaking of dogmas offers challenges and promises from bench to bed. *Pharmacological Reviews* 65:90–104.
- Spatazza J, Lee HHC, Di Nardo AA, Tibaldi L, Joliot A, Hensch TK, Prochiantz A (2013b) Choroid-plexus-derived *Otx2* homeoprotein constrains adult cortical plasticity. *Cell Rep* 3:1815–1823.
- Spicer AP, Joo A, Bowling RA (2003) A hyaluronan binding link protein gene family whose members are physically linked adjacent to chondroitin sulfate proteoglycan core protein genes: the missing links. *J Biol Chem* 278:21083–21091.
- Stettler O, Joshi RL, Wizenmann A, Reingruber J, Holcman D, Bouillot C, Castagner F, Prochiantz A, Moya KL (2012) *Engrailed* homeoprotein recruits the adenosine A1 receptor to potentiate ephrin A5 function in retinal growth cones. *Development* 139:215–224.
- Sugiyama S, Di Nardo AA, Aizawa S, Matsuo I, Volovitch M, Prochiantz A, Hensch TK (2008) Experience-dependent transfer of *Otx2* homeoprotein into the visual cortex activates postnatal plasticity. *Cell* 134:508–520.
- Suttkus A, Rohn S, Weigel S, Glöckner P, Arendt T, Morawski M (2014) Aggrecan, link protein and tenascin-R are essential components of the perineuronal net to protect neurons against iron-induced oxidative stress. *Cell Death Dis* 5:e1119–e1119.
- Topisirovic I, Borden KLB (2005) Homeodomain proteins and eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E): an unexpected relationship. *Histol Histopathol* 20:1275–1284.
- Végh MJ, Heldring CM, Kamphuis W, Hijazi S, Timmerman AJ, Li KW, van Nierop P, Mansvelder HD, Hol EM, Smit AB, van Kesteren RE (2014) Reducing hippocampal extracellular matrix reverses early memory deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol Commun* 2:76.
- Wen TH, Afroz S, Reinhard SM, Palacios AR, Tapia K, Binder DK, Razak KA, Ethell IM (2017) Genetic Reduction of Matrix Metalloproteinase-9 Promotes Formation of Perineuronal Nets Around Parvalbumin-Expressing Interneurons and Normalizes Auditory Cortex Responses in Developing *Fmr1* Knock-Out Mice. *Cereb Cortex*:1–14.
- Wizenmann A, Brunet I, Lam J, Sonnier L, Beurdeley M, Zarbališ K, Weisenhorn-Vogt D, Weigl C, Dwivedy A, Joliot A, Würst W, Holt C, Prochiantz A (2009) Extracellular

Engrailed participates in the topographic guidance of retinal axons in vivo. *Neuron* 64:355–366.

Yamaguchi Y (2000) Lecticans: organizers of the brain extracellular matrix. *Cell Mol Life Sci* 57:276–289.

Yang S, Cacquevel M, Saksida LM, Bussey TJ, Schneider BL, Aebischer P, Melani R, Pizzorusso T, Fawcett JW, Spillantini MG (2015) Perineuronal net digestion with chondroitinase restores memory in mice with tau pathology. *Experimental Neurology* 265:48–58.

Yang S, Hilton S, Alves JN, Saksida LM, Bussey T, Matthews RT, Kitagawa H, Spillantini MG, Kwok JCF, Fawcett JW (2017) Antibody recognizing 4-sulfated chondroitin sulfate proteoglycans restores memory in tauopathy-induced neurodegeneration. *Neurobiol Aging* 59:197–209.



## **ANNEXE**





## **Perineuronal nets in brain physiology and disease**

---

*Soumis à Seminars in cells and developmental biology*



## **Perineuronal nets in brain physiology and disease**

Damien Testa, Alain Prochiantz, Ariel A. Di Nardo

Centre for Interdisciplinary Research in Biology (CIRB), Collège de France, CNRS UMR 7241, INSERM U1050, PSL University, Labex MemoLife, 75005 Paris, France.

Correspondence: ariel.dinardo@college-de-france.fr

### **Abstract**

Perineuronal nets (PNNs) in the brain are condensed glycosaminoglycan-rich extracellular matrix structures with heterogeneous composition yet specific organization. They typically assemble around a subset of fast-spiking interneurons that are implicated in learning and memory. Owing to their unique structural organization, PNNs have neuroprotective capacities but also participate in signal transduction and in controlling neuronal activity and plasticity. In this review, we define PNN structure in detail and describe its various biochemical and physiological functions. We further discuss the role of PNNs in brain disorders such as schizophrenia, bipolar disorder, Alzheimer disease and addictions. Lastly, we describe therapeutic approaches that target PNNs to alter brain physiology and counter brain dysfunction.

Keywords: parvalbumin; glycosaminoglycan; proteoglycan; plasticity; psychiatric disorder.

## 1. Introduction

The extracellular matrix (ECM) represents 10 to 20% of the brain volume [1]. In this matrix, glycosaminoglycans (GAGs) play a crucial structural role with hyaluronan (HA) being the major component [2]. Three different ECM compartments exist in the central nervous system (CNS): basement membrane, diffuse matrix and condensed matrix [3]. Basement membrane is a sheet-like layer made with collagen and laminin that forms a border between endothelial and parenchymal tissue. Diffuse matrix is present in the neural interstitials of brain parenchyma while condensed matrix called perineuronal nets (PNNs) forms around a subset of neurons. These two matrices are further enriched in proteoglycans (PGs).

PNNs were discovered over a century ago by Camillo Golgi but their components and organization are still not fully understood. They are rather heterogeneous structures that enwrap cell bodies and dendrites leaving holes for synaptic contacts. The most common histological technique to detect PNNs is by using the lectin *Wisteria floribunda* agglutinin (WFA) which recognizes the N-acetylgalactosamine of sugar chains present in the majority (>80%) of PNNs. WFA histology has revealed PNNs throughout the brain but mostly around fast-spiking parvalbumin interneurons (PV cells), which are highly active neurons that need a specialized microenvironment. In order to probe PNN function, loss of function experiments typically use chondroitinase ABC (ChABC), which is an enzyme that degrades chondroitin sulfate GAGs down to their disaccharide building blocks. This enzyme can be injected directly into the brain and has revealed the importance of PNNs in PV cell activity, in learning and memory and in certain pathologies.

In this review, we provide a description of known PNN components and subsequent variations that lead to its great heterogeneity. We illustrate how PNNs act as a physical barrier, interact with signaling molecules and regulate neuronal activity. We also describe its role in various brain functions and its ensuing implication in several brain disorders. Finally, we survey approaches to change PNN expression, which include not only ChABC but also genetic models and more precise molecular tools. Ongoing research into PNNs promises to further our understanding of brain physiology and animal behavior and provide us with novel therapeutics.

## 2. PNN structure

### 2.1 Overview of PNN components

Cerebral ECM is composed of highly diverse GAGs, PGs and proteins that condense through specific interactions around certain neurons to form PNNs. The backbone of PNNs is formed by long GAG chains of HA to which are attached hyaluronan- and proteoglycan-binding link proteins (Hapln) that mediate interaction with PGs. These PGs are further connected by tenascin family proteins. While these numerous interactions form a condensed mesh, PNNs remain dynamic through modulations notably by secreted metalloproteinases that locally degrade PGs. The GAG polysaccharides found within PNNs have varied sequences composed of repeating disaccharide units. Further complexity arises from post-synthesis modifications of the polysaccharides which occur both within source cells and in the ECM.

PNNs are built with diverse components originating not only from the neuron itself but also from surrounding astrocytes and oligodendrocytes (Figure 1). A key aspect of PNN structure is the unique microenvironment determined by the activity-dependent secretion of ECM components by enwrapped neurons and surrounding cells. As such, PNNs do not have defined compositions and structure and are highly heterogeneous

throughout the brain. For example, histochemical analysis with three different PG antibodies shows every possible combination of labeling although with some brain-region specificity [4]. These antibodies along with WFA are directed mainly towards aggrecan, a chondroitin sulfate proteoglycan (CSPG), and they are taken to reveal PNN assembly. While other PGs, such as heparin sulfate proteoglycans (HSPGs), might be associated with PNNs, they are not considered integral to the PNN scaffold and will not be reviewed here.

## 2.2 Hyaluronan

Hyaluronic acid (or hyaluronan, HA) is a polymer with hundreds of GlcA-GlcNAc disaccharide repeats and is the only GAG in PNNs that is not sulfated nor attached to a core protein [5]. Hyaluronan synthases (HAS) are transmembrane proteins that make HA from the neuron directly into the extracellular space through an extrusion process [6]. There are three different isoforms of HAS: HAS1, HAS2, and HAS3. In general, HAS3 synthesizes HA at a slower rate (~10-fold less) and produces shorter polymers (~10<sup>5</sup> Da) than HAS1 and HAS2 (~10<sup>6</sup> Da) [7]. These enzymes can be differentially distributed in the brain and at the subcellular level. For example, all three isoforms are expressed in hippocampal neurons but only HAS2 and HAS3 are expressed by cerebellum neurons [8]. While all three are expressed in the neuron soma, only HAS1 is located in the membranes of axons [9]. HA is a key component that orchestrates PNNs by providing the primary scaffold on which PGs attach; HEK cells transfected with HAS3 (and Hapln1) are able to condense ECM to form PNN-like structures [10]. Due to their large size, HA polymers can bind simultaneously up to a hundred proteins. As HA polymers are extruded with differing lengths, numerous ECM structures and organization lead to differing mechanical properties among PNNs. HA itself provides hydration sites that impact ECM viscosity. While HA can bind various signaling molecules and proteins (CD44, RHAMM, etc.), such interactions have not been observed in PNNs [8] and other interactions have yet to be documented.

## 2.3 Proteoglycans

### 2.3.1 GAGs

PGs consist in a core protein to which GAGs are attached, and each GAG is composed of repeated disaccharide units. Each unit contains an amine sugar derived from either galactose (N-acetylgalactosamine, GalNAc) or glucose (N-acetylglucosamine, GlcNAc) coupled to either galactose (Gal) or a uronic acid (glucuronic acid, GlcA, or iduronic acid, IdoA) (Figure 2A). The GAG chondroitin sulfate (CS) is made of GlcA and GalNAc repeats; dermatan sulfate (DS) is made of IdoA and GalNAc; heparan sulfate (HS) is made of GlcA or IdoA and GlcNAc; and keratan sulfate (KS) is made of Gal and GlcNAc (Figure 2B). These GAGs form long homogeneous polymers of disaccharide repeats synthesized by a battery of enzymes. A tetrasaccharide linkage region of xylose-galactose-galactose-glucuronate is first synthesized by the xylosyltransferase, GalT-I, GalT-II and GlcAT-I (reviewed in [11]). Polymer elongation is carried out by GalNAcT-II and GlcAT-II which add GalNAc and GlcA, respectively. Here, sources of variability are the number of disaccharide repeats, from approximately 20 to 200, and the ratio between different GAGs. In the CNS the ratio of HS:CS is 9:1, but CS are more present in PNNs, which have a ratio of 7:3 to provide specific properties that will be discussed below [12]. GAGs are linked by the xylose of their tetrasaccharide to a serine of the core protein by  $\beta$ -D-xylosyltransferase [13].

### 2.3.2 Core protein

CSPG core proteins are made of two distinct domains: a globular domain G3 in their C-terminus and one or two globular domains (G1 and G2) in their N-terminus (Figure 3). These domains interact with proteins that participate in condensing the ECM into PNNs. The G1 domain contains one immunoglobulin fold module and two PG tandem repeats. The G2 domain is only found in aggrecan and contains two PG tandem repeats. The PG repeats in the G1 domain mediate binding to HA through interaction with Hapln protein family (reviewed in [14]). The G3 domain contains an EGF domain, a lectin domain and a complement regulatory protein (CRP)-like domain [15]. ECM condensation is mediated by a calcium-dependent interaction of the G3 lectin domain with Tenascin-R (Tn-R) [16] and Tenascin-C (Tn-C) [17,18]. The G3 domain contains an EGF domain, a lectin domain and a CRP-like domain [15].

### 2.4 Tenascins and Haplns

While the tenascin family is composed of four different glycoproteins, only Tn-R and Tn-C are found in the CNS. Tenascins are expressed in neurons and glial cells [19] and are highly heterogeneous due to splicing events and metalloprotease modifications. Tn-C forms a quaternary structure of two homotrimers, and thus form a hexamer termed hexabrachion, while Tn-R forms either homodimers or homotrimers [20]. Tn-R associates with the G3 lectin domain of CSPGs through its fibronectin type III repeats 3-5 and is essential for PNN assembly as confirmed by Tn-R KO mice [21]. See accompanying review by L. Roll and A. Faissner.

Hapln proteins, first characterized in cartilage ECM, stabilize the non-covalent link between HA and lectican G1 domains thus preventing the diffusion of lecticans in the ECM. The Hapln family is composed of four members of which three are found in the CNS: Hapln1 (Crt11), Hapln2 (brain-specific hyaluronan-binding protein (Bral1)) and Hapln4 (Bral2). Hapln1 and Hapln4 are expressed by neurons that have PNNs, while Hapln2 is expressed by oligodendrocytes and is most commonly found in the ECM of the node of Ranvier bound with versican V2 [14]. In the CNS, Hapln1 interacts with most lecticans and Hapln4 with brevican leading to a tripartite complex with CSPG and HA. Hapln1 is necessary and sufficient for PNN assembly, as shown in cell cultures over-expressing HAS3 and Hapln1 [10] and in Hapln1 KO mice [22].

### 2.5 Variability of the CSPG family

CSPGs are widely expressed in the CNS and provide diversity and complexity in the ECM through variations in core protein structure and length, in GAG chain length, type and quantity. The CSPG family consists of secreted lecticans and of membrane-bound phosphacan and NG2 (CSPG4). The lectican family contains four CSPGs: aggrecan (CSPG1), versican (CSPG2), neurocan (CSPG3) and brevican (CSPG7), which have differing core proteins and varying numbers of associated GAG chains (Figure 3).

#### 2.5.1 Modifications during assembly

The aggrecan core protein is the only lectican that contains both G1 and G2 domains and that is decorated by hundreds of GAG chains. Aggrecan is found in almost all PNN-positive neurons and is linked to HA by Hapln1 [23,24]. Versican has two central domains, GAG $\alpha$  and GAG $\beta$ , that can be spliced differentially to provide isoforms V0, V1, V2 and V3. In the rat brain, versican V0 and V1 disappear by 2

weeks after birth [12]. The V2 isoform is only found in CNS and is expressed by oligodendrocytes. Versican has a G1 and G3 domain and can have the longest core domain of all CSPGs, with V0 isoform having ~1700 amino acids. The various versican isoforms contain between zero and twenty GAG chains and are linked to HA by either Hapln1 or Hapln2. Neurocan is expressed in neurons and astrocytes and is linked to HA by either Hapln1 or Hapln2, and its core protein can be decorated by up to seven GAG chains. Brevican has two different forms [25] that are either secreted (mainly by neurons) or attached to the membrane by a GPI anchor (mainly by glia) [26]. Brevicans are linked to HA by Hapln4 in PNNs [27] and have the shortest central domain (~300 amino acids) with only up to three associated GAG chains.

### 2.5.2 Modifications of chondroitin sulfate

Variability is also observed in the number of disaccharide repeats and in the sulfation patterns of the GAG chains. In the CS disaccharide GlcA-GalNAc, differences in sulfation lead to several subtypes of CSPGs. Type A (CS-A) contains one sulfation on the 4<sup>th</sup> position of GalNAc (GlcA-4SGalNAc) and is the most abundant subtype in the CNS [28]. CS-A is modified by chondroitin 4-O-sulfotransferases type C4ST-1/2/3 (Chst11/12/13). The CS-C subtype is sulfated at the 6<sup>th</sup> position (GlcA-6SGalNAc) by the chondroitin 6-O-sulfotransferase C6ST-1 (Chst3). These two monosulfated CS can be sulfated a second time to provide either CS-D or CS-E. The CS-E subtype (GlcA-4S,6SGalNAc) is made by GalNAc 4-sulfate 6-O-sulfotransferase GalNac4S-6ST (Chst15) which sulfates the 6<sup>th</sup> position of GalNAc in CS-A. The CS-D subtype (2SGlcA-6SGalNAc) is derived from CS-C by sulfation of the 2<sup>nd</sup> position of GlcA by the CS2S/UST enzyme.

The proportion of CS subtypes in the CNS changes during development. As rodents age, the 4S/6S ratio in CSPG sulfation patterns increases despite there being no significant changes in chondroitin sulfotransferase expression [29]. In early development, CS-C is the major form and decreases progressively while in parallel CS-A becomes more and more expressed and predominates in the adult. The increase of 4S/6S ratio also favors the formation of PNNs [30,31]. During early postnatal brain development, as 6S sulfation is gradually overtaken by 4S sulfation, CS-E also becomes enriched. Changing sulfation patterns provides enormous diversity to the GAG chains. For example, if we tally sulfation patterns on an octasaccharide, up to 1,000,000 combinations are possible [32].

### 2.5.3 Degradation of the matrix

The ECM is modified continuously by the microenvironment of which secreted proteases are key components. We shall focus on two main classes of proteases from the metzincin metalloproteinase family. The term metzincin is derived from the conserved methionine close to the zinc binding region that is essential for enzymatic activity. The ADAMTS family contains 19 members which are secreted into the ECM, although only some are known to degrade PGs: ADAMTS-1/-4/-5/-8/-9/-15/-20 [33]. These proteoglycanases are expressed by astrocytes throughout the CNS [34,35], but whether they are also expressed by neurons under physiological conditions is not clear. However, single-cell PCR analysis of somatosensory cortex identified ADAMTS-8 and -15 as being expressed in PV cells [36]. These two secreted proteases degrade aggrecan, while only ADAMTS-15 degrades versican [37,38].

MMP family contains 25 known MMPs of which only three (MMP-2/-3/-9) are found in the CNS (reviewed in [39,40]). MMPs are proteoglycanases that cleave



aggrecan between the G1 and G2 domains and brevican near the G1 domain. Among these MMPs, only MMP-9 has been reported to play a key role in PNN turnover. In the auditory cortex of Fmr1 KO mice, PNN staining is decreased while MMP-9 levels are elevated; PNN assembly around PV cells can be rescued by decreasing MMP-9 expression [41]. MMP-9 is secreted by neurons as well as astrocytes and oligodendrocytes.

### **3. PNN functions**

#### **3.1 PNNs as a physical barrier**

##### *3.1.1 Ion buffering*

PNNs are composed of a combination of negative charges which form a polyanionic environment around neurons [6]. This particular microenvironment interacts more precisely with positive ions and can act as a reservoir. PNNs are typically found around highly active neurons and are thought to facilitate high neuron spike frequencies by providing ion sorting on the neuronal surface [42]. Negative charges at the extracellular surface can generate an ion concentration gradient across the membrane and contribute to the high resting membrane potential [43]. PNNs also modify ion diffusion properties from isotropic to anisotropic such that diffusion is not equal in all directions, leading to specificity in ion accumulation. Calcium has been shown to specifically diffuse through PNNs due to the bivalency of calcium and the negative charges of the CSPGs [44]. PNNs that contain aggrecan but not brevican help prevent iron-induced oxidative stress by trapping  $Fe^{3+}$  [45]. PNNs in general help protect PV cells from oxidative stress. In Glcm KO mice, which have compromised glutathione synthesis resulting in higher oxidative stress, neurons with PNNs are less sensitive to oxidative stress [46].

##### *3.1.2 Physical protection*

PNNs completely surround neurons as they condense and provide protective effects as a physical barrier. They have been shown to mediate neuron survival against amyloid beta neurotoxicity [47], and their reduced expression has been implicated in Alzheimer disease (AD). Neurons associated with aggrecan-based PNNs are protected against tau pathology [48]. The association between PNNs and AD will be further discussed below. PNNs are also involved in water homeostasis due to hydrophilic properties of HA and aggrecan. This benefit is evidenced by the inverse correlation between the distribution of PNNs and the water channel aquaporin-4 [49].

##### *3.1.3 Synaptic plasticity*

PNNs form a barrier that decreases the lateral diffusion of several receptors. In hippocampal neuron cultures, PNNs influence the lateral diffusion of AMPA glutamate receptor [50]. By using hyaluronidase to disassemble PNNs, it was found that receptor subunits have increased access to neurite surface and almost double the diffusion coefficient. These results suggest PNNs impact neuronal surface microenvironment and compartmentalization with the potential to impact synaptic function. Indeed, *in vitro* ChABC treatment of hippocampus cultures enhanced dendritic spine motility, although these effects were due in part to non-PNN CSPGs and were dependent on integrin activation [51]. After *in vivo* ChABC treatment, cortical spines become more motile and express a larger degree of structural and functional plasticity resulting in increased spine turnover [52,53]. These changes were found to favor the accumulation of gephyrin, which anchors inhibitory

neurotransmitter receptors, in presynaptic inputs onto PV cells [53]. Furthermore, sulfation patterns of CSPGs can affect plasticity, with 4S GAGs being inhibitory and 6S GAGs being permissive [54]. Thus, subtle changes or removal of PNNs can enhance local circuit plasticity and reduce PV cell inhibitory output.

### 3.2 PNNs in signalization

PNNs and their GAGs are key actors in several signaling pathways. Interactions with basic amino acids of signaling proteins are specified mainly by the topology and the spatial distribution of charges on the GAGs (carboxylate and sulfate). Two protein motifs have been implicated in GAG binding: XBBXB and XBBBXXB, where X is a hydrophilic residue and B a basic residue (for example arginine (R), lysine (K) and histidine (H)) [55]. The binding affinity is dependent on the number of GAG disaccharide repeats, with a required minimum chain length between 4 and 12 monosaccharides units [56]. In this review, we will focus on one specific CS, the disulfated CS-E, which plays a crucial role in PNN condensation and binding to the signaling proteins Otx2 and Semaphorin-3A (Sema3A) [57-59].

#### 3.2.1 Otx2

Otx2 is a homeoprotein transcription factors with highly conserved sequences that permit its secretion and internalization *in vitro* [60,61] and *in vivo* [62]. In postnatal mouse brain development, Otx2 protein is found in PV cells throughout the cortex and it plays a key role in visual cortex plasticity [58,63,64] and in the plasticity of other cortical regions [65]. However, this activity is non-cell autonomous as the Otx2 locus is silent in postnatal cortex [63]. Otx2 protein is secreted by the choroid plexus into the cerebrospinal fluid (CSF) and diffuses into the parenchyma where it is specifically taken up by PV cells [63]. This preferential internalization is mediated by the PNNs which surround PV cells. The N-terminal region of Otx2 has a GAG-binding domain (**RKQRRER**) that has high affinity for disulfated CS-D and CS-E but not monosulfated CS-A, and Otx2 accumulation is abolished in brain treated with ChABC [58]. A knock-in mouse line expressing Otx2-AA, which has a disrupted GAG-binding domain, showed reduced specific accumulation of non-cell autonomous Otx2-AA protein in PV cells, resulting in delayed PV cell maturation and CP plasticity timing [66]. Genetic evidence suggests an *in vivo* preference of Otx2 for CS-E, since mice overexpressing C6ST-1 maintain lower 4S/6S ratios and have impaired Otx2 accumulation [31]. Interestingly, there is a positive feedback loop between Otx2 and PNNs (reviewed in [67]). After internalization of Otx2, PNN assembly around PV cells is increased [63], while reduction of cortical Otx2 levels leads to lower PNN staining [58,64,68]. It has been recently suggested that Otx2 can regulate aggrecan translation [69]. Otx2 accumulation in PV cells via PNN interaction is required to maintain a non-plastic state of adult cerebral cortex [58].

#### 3.2.2 Sema3A

Semaphorins are chemorepulsive molecules that are transmembrane or secreted and that signal by binding to plexin receptors. This signal transduction mechanism is facilitated by neuropilin 1 (NP1) which stabilizes the semaphorin-plexin complex [70]. In the cerebral cortex, Sema3A is concentrated around PV cells and colocalizes with various PNN components such as aggrecan, versican, and Tn-R [71]. Sema3A localization in the adult cerebral cortex is highly dependent on well-condensed PNNs given the fact that it is absent around PV cells after ChABC treatment or in Hapln1-KO mice which lack PNNs [71]. While Sema3A mRNA is found in neurons, there is

not a direct correlation between neurons that express Sema3A and neurons that contain Sema3A in their PNNs, and it has been proposed that choroid plexus Sema3A is secreted into the CSF [72]. In the C-terminus of Sema3A there is an arginine-rich domain (**RKQRRQR**) highly similar to the GAG-binding domain of Otx2, although it has yet to be confirmed as the GAG-binding sequence of Sema3A. However, Sema3A has been shown to interact with CS [73] and more precisely with CS-E [59]. While plexin is highly localized to PV cell membranes, NP1 has yet to be found in these neurons. It has been suggested that CS-E might stabilize the Sema3A-plexin complex and lead to transduction without involving NP1 [72].

### **3.3 PNNs in activity regulation**

#### *3.3.1 PNNs control PV cell activity*

*In vitro* experiments on hippocampal culture have shown that PNNs do not modify the distribution of GABAergic contacts but decrease the excitability of interneurons [74]. Conversely, inputs impinging on PV cell soma can be influenced by PNNs, as PV cells with brevican-positive PNNs receive more inputs [75]. Experiments involving ChABC to degrade CSPGs have shown that PNNs have a key role in balancing excitatory and inhibitory neuron output [74,76]. Disruption of PNNs in the mPFC leads to a decrease in inhibition of pyramidal cells due to decreased PV cell output [77]. PNNs can also impact brain-wide activity, as shown by removal of cingulate cortex PNNs resulting in altered gamma band oscillations [78]. Finally, the high activity of mature PV cells is maintained by the buffering and protective properties of PNNs mentioned above.

#### *3.3.2 Cerebral cortex activity controls PNN assembly*

In the cerebral cortex, the formation of PNNs is experience-dependent as was first shown by the absence of PNNs in the visual cortex in dark-reared animals [79]. The condensation of PNNs is due in part to the activity-dependent increase in *Hapln1* expression. In dark reared mice, *Hapln1* expression is reduced by over 80 % [22]. It has also been shown that thalamic inputs are needed for the formation of PNNs in barrel cortex [80]. The removal of one row of whiskers results in reduced PNNs around the corresponding somatosensory PV cells. *In vitro* experiments on hippocampal cultures show that a decrease in PV cell spiking leads to an impaired condensation of PNNs [74]. In the same experimental conditions, blocking non-NMDA glutamate receptors, L-type Ca<sup>2+</sup> channels or AMPA receptors leads to a decrease in PNN assembly, which underlines the importance of Ca<sup>2+</sup> in PNN condensation [74].

### **3.4 PNNs in brain functions**

#### *3.4.1 Critical period plasticity*

In postnatal development, everything is not learnt at the same time. There are precise windows of heightened plasticity during juvenile development that occur throughout the brain allowing animals to adapt their learning and behavior to their environmental context. These critical periods were first studied for binocular vision and it has since been shown that PNNs are implicated in critical period closure by providing a brake that dampens plasticity and helps consolidate circuitry around PV cells (reviewed in [81]). The timecourse of PNN expression loosely follows that of PV cell maturation, which drives critical period onset and is maintained in part by PNNs. Genetic evidence comes from mouse lines in which PNN components have been knocked-out. In *Hapln1* KO mice, PNNs do not properly form and visual cortex

plasticity is maintained beyond the regular critical period [22]. In GalNAcT1 KO mice, abnormal PNN assembly slows PV cell maturation and leads to a delay in both critical period onset and closure [69]. In transgenic mice that overexpress C6ST-1, the 4S/6S sulfation ratio is maintained in its juvenile state and PV cells do not fully mature resulting in persistent cortical plasticity [31].

Removal of PNNs by ChABC treatment of visual cortex in adult rats and mice confirms their importance for maintaining a non-plastic state [58,82]. PNN removal not only impacts PV cell activity, but also disrupts signaling by Otx2 and Sema3A which play a role in sustaining PV cell maturation. Other critical period signaling molecules also require PNNs. Neuronal activity-regulated pentraxin (Narp) regulates GluR4-containing AMPA receptor levels and requires PNNs to build up at excitatory synapses onto PV cells [83]. Narp enhances excitatory drive onto PV cells and plays an important role in opening critical periods [84]. Nogo receptor (NgR) is expressed in PNN-labeled cells in mouse visual cortex and interacts with CSPGs [85,86]. NgR also interacts with myelin proteins involved in critical period consolidation and closure although precise mechanisms are still unclear (reviewed in [87]).

### *3.4.2 Memory storage*

Given that PNNs dampen plasticity, it has been proposed that they participate in memory storage. Injections of ChABC and/or hyaluronidase in brain regions known to play a role in memory have confirmed this hypothesis. The amygdala is notably involved in long-term memories of fear conditioning events [88]. In foot-shock conditioning, it has been shown that PNN removal leads to a normal fear response but the fear memory is not consolidated [89]. Similarly in the hippocampus, it has been shown that PNNs are needed to convert short-term memory to long-term memory of fear learning [90,91]. In the medial prefrontal cortex (mPFC), PNN removal disrupts long-term memories as well as fear-conditioned memories [91]. PNNs also limit the ability to learn. For example, removal of PNNs in the perirhinal cortex leads to an improved ability to recognize a new object [92]. Removal of ECM in the auditory cortex of adult gerbils promoted synaptic plasticity and resulted in enhanced relearning without erasure of established memories [93]. The findings of these studies are consistent with the role of PNNs in the timing of the critical period. Interestingly, PNNs in the hippocampus may be associated with specific PV cell subtypes that impact information acquisition rather than subtypes involved in memory consolidation [94].

## **4. PNNs in disease and therapy**

### **4.1 Brain disorders**

As they are often associated with PV cells vital for proper brain development and function, PNNs have become the subject of intense focus for understanding disease mechanisms and for repairing dysfunction (reviewed in [95,96]). PV cells not only drive plasticity critical periods needed for processing sensory information but also periods during which complex motor and cognitive functions are instilled. They regulate firing of local principal neurons but also drive  $\gamma$ -band oscillations between regions important for brain synchrony [97]. Dysfunction of PV cells can lead to epilepsy, autism spectrum disorders, schizophrenia and other complex psychiatric diseases [98]. In human patients and animal disease models, abnormal PNN assembly is often observed. However, it is usually not clear whether abnormal PNNs are a cause or a result of PV cell dysfunction. Nevertheless, given their potential role in

such diseases as well as their implication in memory storage and brain plasticity, PNNs merit attention.

#### 4.1.1 Schizophrenia and bipolar disorder

PNNs influence PV cell function, synaptic assembly, and circuit plasticity which can lead to changes in cognitive function and possibly to developmental disorders such as schizophrenia (reviewed in [99]). Recent evidence shows that PNN assembly may be linked to such diseases. The mPFC of human subjects with schizophrenia has reduced levels of PV expression and PNNs while cell density is maintained [100]. In the amygdala of both schizophrenia and bipolar disorder patients, PNN clusters were reduced and certain glial cell populations showed reduced aggrecan immunoreactivity [101]. PNN densities were also found to be reduced in the mPFC of schizophrenia patients [102]. From prepubertal periods until early adulthood, the number of PNNs increase in the mPFC, consistent with the period when schizophrenia symptoms emerge. Thus, PNNs may contribute to disease onset. Interestingly, glycosylation may also be dysregulated in human subjects with schizophrenia, as evidenced by decreased expression of certain GlcNAcT glycosylating enzymes in their mPFC [103].

In a recent multi-stage schizophrenia genome-wide association study (~37,000 patients and ~113,000 controls), 128 genetic associations were identified. Among the implicated genes were three coding for PNN-related proteins: *NCAN*, *HAPLN4*, and *PTPRF* [104]. *NCAN* was also identified in a bipolar disorder genome-wide association study (~6,000 patients and ~32,000 controls) [105]. In a follow-up study of bipolar disorder, major depression and schizophrenia patients, *NCAN* was associated with an overactivity phenotype [106]. Consistent with this finding, *Ncan* KO mice were found to be hyperactive with repetitive behaviors that could be normalized by lithium administration [106]. However, a previous study focusing on PNN genes, including *NCAN* and *HAPLN4*, did not detect association with schizophrenia susceptibility in a Scandinavian population (~800 patients) [107]. The PTPR family was identified in another genome-wide association study of schizophrenia patients (~700 patients and 700 controls) that focused on the role of PTPRZ1 in neuregulin/ERBB4 signaling, which is functionally and genetically implicated in the disorder [108]. In PTPRZ1 mice that overexpress the receptor, altered neuronal activity was observed along with schizophrenia-like behavior [109]. While these PTPR-related studies focused on neuregulin signaling, it would be interesting to analyze impact on PNNs given their ability to interact with PNNs through CSPG binding. Together, these studies suggest that altered PNNs may not only be a consequence of neuronal dysfunctions but can also be a source of schizophrenia and bipolar disorder phenotypes.

A recent study of human postmortem schizophrenia and bipolar disorder samples analyzed PNNs within the thalamic reticular nucleus, which gates thalamo-cortical circuitry and is implicated in functions that ultimately affect sleep, sensory processing, attention and hallucinations [110]. The number of PV cells and PNNs were markedly decreased in both groups regardless of illness duration or age of onset. In a mouse model for redox dysregulation, PV cell numbers and PNNs were reduced in the thalamic reticular nucleus of juvenile mice, and neuronal activity was altered [110]. While this study suggests oxidative stress may impact PV cells in this brain region during early stages of susceptibility, mouse model behavioral analysis and more fine-tuned redox dysregulation are needed to confirm this hypothesis.

Polymorphisms in *Otx2* have been associated with bipolar disorder but not schizophrenia [111]. *Otx2* regulates PV cell maturation throughout the cortex and

impacts critical period timing of not only primary sensory cortices but also higher-order cortices such as the mPFC [66]. Subtle reduction in Otx2 levels in PV cells (~90% compared to normal level) is sufficient to induce delays in critical period timing that impacts complex behaviors such as acoustic preference in a nesting behavior paradigm [66]. As described earlier, Otx2 can affect PNN dynamics by regulating aggrecan translation and GlcNAcT transcription. In adult mice with reduced mPFC Otx2 levels, reduced PNN staining was observed along with increased expression of *brevican*, *Hapln4*, CSPG receptors (*RTN4R* and *PTPo*), and proteases (*Adamts8* and *MMP15*) [66]. Interestingly, the impact of Otx2 on PV cell function in relation to psychiatric disorder may not be only related to PNN assembly dynamics. Otx2 has been shown to bind the promoter of *oxidative resistance-1 (Oxr1)* and upregulate its expression in PV cells suggesting it can confer protection against oxidative stress-induced damage [112]. Furthermore, in this study disease ontology analysis revealed enrichment in Otx2-binding sites near transcription start sites of schizophrenia-related genes.

Several animal models have reinforced the association between PNNs and brain disorders. MMP-9 plasma levels are significantly increased in patients with schizophrenia [113] and MMP-9 gene polymorphisms have been associated with a schizophrenia phenotype [114]. MMP-9 was found to regulate dendritic spine morphology [114]. Although these studies did not make mention of PNNs, a recent study showed that reducing MMP-9 normalizes auditory cortex responses in an autism mouse model and restores the formation of PNNs around PV cells [41]. Polymorphisms in *GRIN2A* are linked to mental retardation, epilepsy and schizophrenia. *GRIN2A* codes for the NMDA receptor subunit GluN2A involved in the maturation and maintenance of PV cells. In *GRIN2A* KO mice, PNN maturation is delayed and PV cells are more susceptible to oxidative insults during early postnatal development [115]. In a mouse model for schizophrenia-like behavior by maternal immune activation, reduction in PNNs in mPFC and amygdala was observed [116]. Polymorphisms in collagen XIX have also been associated with schizophrenia; in *COL19A1* KO mice, a reduction of PNNs is observed in adult cortex and hippocampus attributed to an increase in ECM protease expression (*ADAMTS* and *MMP* families) [117]. These mice also show altered formation of synapses on PV cells, which recalls phenotypes observed in MMP-9 models [114]. Finally, removal of PNNs in mouse hippocampus has been shown to increase neuronal activity provoking enhanced responses to psychomotor stimulants consistent with schizophrenia patients [118]. These results suggest PNN loss is sufficient to induce aberrant function.

#### 4.1.2 Alzheimer disease

While polymorphisms in PNN-related genes have not been reported in AD patients, many studies have revealed correlations between GAGs, PNNs and AD biology. Sulfated heparin GAG associates with both tau and A $\beta$  amyloid fibrils [119,120], suggesting a mechanism by which sulfated GAGs contribute to the formation of neurofibrillary lesions in AD [121]. Tau binding to HSPG is necessary for intracellular formation and transcellular propagation of tau fibrils [122] and it requires specific heparin 6-O-sulfation [123]. In keeping with these finding, overexpression of heparanase in A $\beta$  amyloid transgenic mice was found to limit amyloid plaque formation [124].

Changes in PNNs have also been observed in AD patients, at both the histological level and proteomic level (reviewed in [125]). In several histological studies, cortical areas with PNNs were found to be largely void of tau neurofibrillary tangles, although

PNN-enriched areas did contain amyloid plaques [48,126,127]. These findings suggest that PNNs provide some level of neuroprotection from propagation of tau fibrils. Remarkably, HA was found to be enriched in amyloid plaques and brevican loss was found to associate with the loss of synapses in these plaques [127]. In another study, reduced PNNs were observed in AD patients without loss of PV cells, yet this reduction was not topographically related to plaques or neurofibrillary pathology [128]. Interestingly, there appears to be a tug-of-war between PNNs and tau pathology. Axonal distribution of HAS1 in the hippocampus was found to be abolished in human AD patient and in a tauopathy mouse model [9]. Furthermore, HAS3 levels were increased at the expense of HAS1 in this mouse model, suggesting that ECM is modified to contain more shorter-chain HA. Thus, while PNNs afford neuroprotection from tau propagation, tau pathology can modify PNN contents and potentially inhibit PNN formation and alter synaptic plasticity.

The association between GAGs, PNNs and AD pathology have led to treatments based on ChABC in animal models with the aim to improve performance in memory-related tasks. Some of these studies are discussed in section 4.2 below.

#### *4.1.3 Addictions*

The link between PNNs and learning and memory have led to investigations into their role in addiction behaviors (reviewed in [129]). Indeed, MMP-9 and Tn-R human polymorphisms have been linked with alcohol dependence [130,131], and MMP-9 activity was found to be decreased in the hippocampus of cocaine abusers [132]. Several studies have focused on PNNs in animal models of addiction. For example, in a rat nicotine self-administration model, PNNs were found to be reduced in ventral tegmental area after several weeks of addictive behavior [133]. In a rat heroin self-administration model, long-term abstinence resulted in reduced PNN-related ECM molecules, such as Hapln1, Tn-R and brevican, in mPFC [134]. Weaker PNNs translated into altered inhibitory tone in response to heroin re-exposure; treatment with metalloproteinase inhibitor FN-439 recovered ECM levels and attenuated heroin seeking. These studies suggest PNNs counter response sensitivity to drug-conditioned cues. However, when PNNs were completely degraded by ChABC in rat mPFC, inhibitory tone was decreased and cocaine-induced memories were impaired [77]. Similar results were found in other reward-related brain regions [135]. Thus, it would seem that fine adjustments in PNN levels allow for acquiring addictive behaviors and for intensifying later episodes.

## **4.2 Development of therapeutic tools**

Given the involvement of PNNs in memory, plasticity, neuroprotection and brain disorders, there have been increasing efforts to unlock their therapeutic potential. Reducing PNNs in the adult brain removes brakes that lead to reopened adult plasticity [136] and offers a way to potentially correct development-related pathologies, such as amblyopia (“lazy-eye”), epilepsy and psychiatric disorders. Reducing PNNs also holds promise in attenuating addiction and in improving recovery after brain injury due to stroke or trauma. Increasing PNNs in the adult brain can help protect weakened PV cells and reduce the impact of neurological insults. However, tampering with brakes on plasticity throughout the brain may not necessarily be beneficial given its potential to impact brain-wide networks and cause abnormal behavior [137]. Thus, it must be kept in mind that interfering with brain chemistry needs to be ultimately precise and balanced towards positive behavioral outcomes.

The most common brute-force approach to reducing PNNs is to inject ChABC directly in the brain. This endolyase dissolves PNNs by degrading GAGs decorating the CSPGs but it also degrades GAGs throughout the ECM, which may complicate interpretation. One of the first experiments to use local cerebral ChABC injections showed functional and anatomical recovery from amblyopia in adult rats [82]. While functional recovery was also confirmed in the mouse [58], ChABC failed to rescue amblyopic cats [138]. The role of PNNs in memory processes has led to the use of ChABC in Alzheimer mouse models. In an amyloid model, treatment of hippocampus reversed early memory deficits [139]. A possible mechanism is that ChABC removes brevican which induces synaptic plasticity and reverses synaptic density loss [140]. In a tauopathy model, treatment of perirhinal cortex restored object recognition memory [141]. While these models showed some functional recovery, it was only temporary and disease progression was not slowed. Given the need for repeated injections indefinitely, ChABC is likely not the most suitable approach for human treatment [142]. Given its wide use to stimulate axon regeneration in spinal cord injury models, it has been hypothesized that ChABC might help in repairing neuronal connections after stroke or traumatic brain injury (TBI) (reviewed in [96]). While initial axon sprouting is enhanced in TBI rat models, lasting anatomical or functional recovery was not achieved, suggesting ChABC is not sufficient on its own [143]. Alternatively, injection of ChABC in the spinal cord of rats after stroke does promote recovery of limb function [144].

Approaches for disrupting PNNs *in vivo* more precisely have used either GAG-binding molecules or GAG surrogates. To target CSPGs for treatment in a mouse tauopathy model, injection of Cat-316, which is a CS-specific monoclonal antibody, into perirhinal cortex was found to reverse early memory deficits [145]. This approach is hypothesized to block interactions between PNN GAGs and signaling proteins such as Sema3A or Otx2. Blocking Otx2-PNN interaction by another approach has been shown to reverse amblyopia in adult mice: infusion into visual cortex of a small 15-residue peptide based on the Otx2 GAG-binding motif results in transiently reduced PNN assembly with permanent functional recovery [58]. GAG mimics are an alternative approach for sequestering signaling proteins or disrupting PNN structure. A synthetic CS-E hexasaccharide was found to reduce Otx2 and PNN levels when infused in mouse visual cortex [57]. The peptide SICHI binds to polyanionic GAGs and was found to block GAG-Sema3A interactions, although *in vivo* activity has yet to be demonstrated [146].

TBIs are often accompanied by increased sensitivity of PV cells to oxidative stress often coupled with reduced PNNs resulting in reduced inhibitory tone [147-149]. This suggests treatment with antioxidants or PNN-inducing molecules, such as Otx2, may provide a neuroprotective role to reduce post-TBI symptoms [147]. Stroke recovery has also been showed to involve decreased PNNs through subtle changes in metzincins and their inhibitors in both rat models and human patients [150]. Interestingly, these changes were enhanced by multi-sensory stimulation in the rat model and occurred in both injury site and throughout the brain, suggesting systemic treatment may be beneficial. On the other hand, the potential side-effects of too much plasticity is observed in rat models of epilepsy [151]. PNN degradation accompanies anatomical reorganization and the development of seizures. Treatment with doxycycline, which broadly inhibits MMP activity, prevented PNN breakdown and rewiring and attenuated seizures. It is highly likely that specific components of PNNs are implicated. Finally, a promising approach to specifically target GAG-protein interactions is the use of cell-permeable small-molecule modulators of



sulfotransferase activity: an inhibitor of Chst15 decreased CS-E levels *in vitro* and reversed CSPG-mediated inhibition of axon growth [152].

## **5. Concluding remarks**

PNNs exert several physiological functions such as ion buffering, physical barrier and signal transduction that influence synaptic plasticity and neuronal activity. Attesting to their vital importance, environmental or genetic disruption of PNN assembly may lead to pathologies such as schizophrenia, bipolar disorder and addictions. On the other hand, changes in PNN assembly can happen in response to altered brain activity as a consequence of brain injury, addiction behaviors or neurodegenerative diseases. In either case, PNNs are an attractive therapeutic target. While enzymatic disruption of PNNs has provided valuable insights, there is a need for more precise tools that target specific PNN components or PNN interactors. Indeed, greater understanding of the mechanisms behind PNN heterogeneity will provide fundamental insight into PNN functions at the cellular level, in neuronal circuits and in brain physiology.

## **Funding**

This work was supported by the European Research Council (ERC-2013-ADG-339379; HOMEOSIGN) and by the Agence Nationale de la Recherche (ANR-15-CE16-0010; P2N2).

## Figure Legends

**Figure 1: Sources of PNN components.** Neurons, oligodendrocytes, astrocytes, and cerebrospinal fluid (CSF) provide PNN build blocks and interacting proteins: GAGs and PGs (green), linkage proteins (red), metalloproteases (blue) and signaling proteins (purple). Each cellular source provides specific molecules (unique or shared) which converge as a PNN surrounding the neuron.

**Figure 2: GAG composition and modification.** A. GAGs can contain galactose (Gal), iduronic acid (IdoA), glucuronic acid (GlcA), N-acetylgalactosamine (GalNAc) and N-acetylglucosamine (GlcNAc). B. The various paired combinations of these units provide the disaccharide building blocks for the named GAGs. C. The chondroitin sulfate motif repeated  $n$  times has three possible sulfation sites (blue) that require specific enzymes (labeled blue arrow). Enzymes required for add either glucuronic acid or N-acetylgalactosamine are indicated.

**Figure 3. Complexity and variability of the lectican family.** Members of the lectican family include aggrecan, versican (with splice variants V0, V1, V2 and V3), neurocan and brevican. They are composed of a core protein that contains three possible globular domains (G1, G2 and G3) and is decorated with covalently attached chondroitin sulfate GAGs, which can be few or hundreds in number. Keratan sulfate GAG can also be attached to aggrecan. Non-covalent linkage between core protein and hyaluronan is mediated by Hapln family proteins. Hyaluronan is synthesized by three different transmembrane hyaluronan synthases (HAS1/2/3) that have different properties (indicated on the left side). The proteoglycans can be modified at several sites through cleavage by metalloproteinases (ADAMTS and MMP families).

## References

- [1] B. Cragg, Brain extracellular space fixed for electron microscopy, *Neurosci Lett.* 15 (1979) 301–306.
- [2] A. Bignami, M. Hosley, D. Dahl, Hyaluronic acid and hyaluronic acid-binding proteins in brain extracellular matrix, *Anat. Embryol.* 188 (1993) 419–433.
- [3] L.W. Lau, R. Cua, M.B. Keough, S. Haylock-Jacobs, V.W. Yong, Pathophysiology of the brain extracellular matrix: a new target for remyelination, *Nat Rev Neurosci.* 14 (2013) 722–729. doi:10.1038/nrn3550.
- [4] R.T. Matthews, G.M. Kelly, C.A. Zerillo, G. Gray, M. Tiemeyer, S. Hockfield, Aggrecan glycoforms contribute to the molecular heterogeneity of perineuronal nets, *Journal of Neuroscience.* 22 (2002) 7536–7547.
- [5] K.E. Rhodes, J.W. Fawcett, Chondroitin sulphate proteoglycans: preventing plasticity or protecting the CNS? *J Anat.* 204 (2004) 33–48. doi:10.1111/j.1469-7580.2004.00261.x.
- [6] G. Brückner, K. Brauer, W. Härtig, J.R. Wolff, M.J. Rickmann, A. Derouiche, et al., Perineuronal nets provide a polyanionic, glia-associated form of microenvironment around certain neurons in many parts of the rat brain, *Glia.* 8 (1993) 183–200. doi:10.1002/glia.440080306.
- [7] N. Itano, T. Sawai, M. Yoshida, P. Lenas, Y. Yamada, M. Imagawa, et al., Three isoforms of mammalian hyaluronan synthases have distinct enzymatic properties, *J Biol Chem.* 274 (1999) 25085–25092.
- [8] D. Carulli, K.E. Rhodes, D.J. Brown, T.P. Bonnert, S.J. Pollack, K. Oliver, et al., Composition of perineuronal nets in the adult rat cerebellum and the cellular origin of their components, *J Comp Neurol.* 494 (2006) 559–577. doi:10.1002/cne.20822.
- [9] Y. Li, Z.-X. Li, T. Jin, Z.-Y. Wang, P. Zhao, Tau Pathology Promotes the Reorganization of the Extracellular Matrix and Inhibits the Formation of Perineuronal Nets by Regulating the Expression and the Distribution of Hyaluronic Acid Synthases, *J. Alzheimers Dis.* 57 (2017) 395–409. doi:10.3233/JAD-160804.
- [10] J.C.F. Kwok, D. Carulli, J.W. Fawcett, In vitro modeling of perineuronal nets: hyaluronan synthase and link protein are necessary for their formation and integrity, *J Neurochem.* 114 (2010) 1447–1459. doi:10.1111/j.1471-4159.2010.06878.x.
- [11] T. Mikami, H. Kitagawa, Biosynthesis and function of chondroitin sulfate, *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects.* 1830 (2013) 4719–4733. doi:10.1016/j.bbagen.2013.06.006.
- [12] S.S. Deepa, D. Carulli, C. Galtrey, K. Rhodes, J. Fukuda, T. Mikami, et al., Composition of perineuronal net extracellular matrix in rat brain: a different disaccharide composition for the net-associated proteoglycans, *J Biol Chem.* 281 (2006) 17789–17800. doi:10.1074/jbc.M600544200.
- [13] N.B. Schwartz, Regulation of chondroitin sulfate synthesis. Effect of beta-xylosides on synthesis of chondroitin sulfate proteoglycan, chondroitin sulfate chains, and core protein, *J Biol Chem.* 252 (1977) 6316–6321.
- [14] T. Oohashi, M. Edamatsu, Y. Bekku, D. Carulli, The hyaluronan and proteoglycan link proteins: Organizers of the brain extracellular matrix and key molecules for neuronal function and plasticity, *Exp Neurol.* (2015). doi:10.1016/j.expneurol.2015.09.010.

- [15] Y. Yamaguchi, Lecticans: organizers of the brain extracellular matrix, *Cellular and Molecular Life Sciences*. 57 (2000) 276–289. doi:10.1007/PL00000690.
- [16] A. Aspberg, C. Binkert, E. Ruoslahti, The versican C-type lectin domain recognizes the adhesion protein tenascin-R, *Pnas*. 92 (1995) 10590–10594. <http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=7479846&retmode=ref&cmd=prlinks>.
- [17] J.M. Day, A.I. Olin, A.D. Murdoch, A. Canfield, T. Sasaki, R. Timpl, et al., Alternative Splicing in the Aggrecan G3 Domain Influences Binding Interactions with Tenascin-C and Other Extracellular Matrix Proteins, *J Biol Chem*. 279 (2004) 12511–12518. doi:10.1074/jbc.M400242200.
- [18] U. Rauch, A. Clement, C. Retzler, L. Fröhlich, R. Fässler, W. Göhring, et al., Mapping of a defined neurocan binding site to distinct domains of tenascin-C, 272 (1997) 26905–26912. <http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=9341124&retmode=ref&cmd=prlinks>.
- [19] D. Carulli, T. Laabs, H.M. Geller, J.W. Fawcett, Chondroitin sulfate proteoglycans in neural development and regeneration, *Curr Opin Neurobiol*. 15 (2005) 116–120. doi:10.1016/j.conb.2005.01.014.
- [20] A. Lundell, A.I. Olin, M. Mörgelin, S. al-Karadaghi, A. Aspberg, D.T. Logan, Structural Basis for Interactions between Tenascins and Lectican C-Type Lectin Domains, *Structure*. 12 (2004) 1495–1506. doi:10.1016/j.str.2004.05.021.
- [21] G. Brückner, J. Grosche, S. Schmidt, W. Härtig, R.U. Margolis, B. Delpech, et al., Postnatal development of perineuronal nets in wild-type mice and in a mutant deficient in tenascin-R, *J Comp Neurol*. 428 (2000) 616–629.
- [22] D. Carulli, T. Pizzorusso, J.C.F. Kwok, E. Putignano, A. Poli, S. Forostyak, et al., Animals lacking link protein have attenuated perineuronal nets and persistent plasticity, *Brain*. 133 (2010) 2331–2347. doi:10.1093/brain/awq145.
- [23] C.M. Galtrey, J.C.F. Kwok, D. Carulli, K.E. Rhodes, J.W. Fawcett, Distribution and synthesis of extracellular matrix proteoglycans, hyaluronan, link proteins and tenascin-R in the rat spinal cord, *Eur J Neurosci*. 27 (2008) 1373–1390. doi:10.1111/j.1460-9568.2008.06108.x.
- [24] K.A. Giamanco, R.T. Matthews, Deconstructing the perineuronal net: cellular contributions and molecular composition of the neuronal extracellular matrix, *Neuroscience*. 218 (2012) 367–384. doi:10.1016/j.neuroscience.2012.05.055.
- [25] C.I. Seidenbecher, K. Richter, U. Rauch, R. Fässler, C.C. Garner, E.D. Gundelfinger, Brevican, a chondroitin sulfate proteoglycan of rat brain, occurs as secreted and cell surface glycosylphosphatidylinositol-anchored isoforms, *J Biol Chem*. 270 (1995) 27206–27212.
- [26] U. Novak, U. Novak, A.H. Kaye, A.H. Kaye, Extracellular matrix and the brain: components and function, *Journal of Clinical Neuroscience*. 7 (2000) 280–290. doi:10.1054/jocn.1999.0212.
- [27] Y. Bekku, M. Saito, M. Moser, M. Fuchigami, A. Maehara, M. Nakayama, et al., Bral2 is indispensable for the proper localization of brevican and the structural integrity of the perineuronal net in the brainstem and cerebellum, *J Comp Neurol*. 520 (2012) 1721–1736. doi:10.1002/cne.23009.

- [28] R.J. Gilbert, R.J. McKeon, A. Darr, A. Calabro, V.C. Hascall, R.V. Bellamkonda, CS-4,6 is differentially upregulated in glial scar and is a potent inhibitor of neurite extension, *Molecular and Cellular Neuroscience*. 29 (2005) 545–558. doi:10.1016/j.mcn.2005.04.006.
- [29] S. Foscarin, R. Raha-Chowdhury, J.W. Fawcett, J.C.F. Kwok, Brain ageing changes proteoglycan sulfation, rendering perineuronal nets more inhibitory, *Aging (Albany NY)*. 9 (2017) 1607–1622. doi:10.18632/aging.101256.
- [30] S. Miyata, H. Kitagawa, Chondroitin 6-Sulfation Regulates Perineuronal Net Formation by Controlling the Stability of Aggrecan, *Neural Plast.* 2016 (2016) 1305801–13. doi:10.1155/2016/1305801.
- [31] S. Miyata, Y. Komatsu, Y. Yoshimura, C. Taya, H. Kitagawa, Persistent cortical plasticity by upregulation of chondroitin 6-sulfation, *Nat Neurosci*. 15 (2012) 414–422. doi:10.1038/nn.3023.
- [32] R. Sasisekharan, G. Venkataraman, Heparin and heparan sulfate: biosynthesis, structure and function, *Curr Opin Chem Biol*. 4 (2000) 626–631.  
<http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=11102866&retmode=ref&cmd=prlinks>.
- [33] R. Kelwick, I. Desanlis, G.N. Wheeler, D.R. Edwards, The ADAMTS (A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin motifs) family, *Genome Biol.* 16 (2015) 15. doi:10.1186/s13059-015-0676-3.
- [34] A.K. Cross, G. Haddock, C.J. Stock, S. Allan, J. Surr, R.A.D. Bunning, et al., ADAMTS-1 and -4 are up-regulated following transient middle cerebral artery occlusion in the rat and their expression is modulated by TNF in cultured astrocytes, *Brain Res.* 1088 (2006) 19–30. doi:10.1016/j.brainres.2006.02.136.
- [35] M.G. Hamel, J.M. Ajmo, C.C. Leonardo, F. Zuo, J.D. Sandy, P.E. Gottschall, Multimodal signaling by the ADAMTSs (a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs) promotes neurite extension, *Exp Neurol*. 210 (2008) 428–440. doi:10.1016/j.expneurol.2007.11.014.
- [36] J. Rossier, A. Bernard, J.-H. Cabungcal, Q. Perrenoud, A. Savoye, T. Gallopin, et al., Cortical fast-spiking parvalbumin interneurons enwrapped in the perineuronal net express the metalloproteinases Adamts8, Adamts15 and Nephrilysin, *Mol Psychiatry*. 20 (2014) 154–161. doi:10.1038/mp.2014.162.
- [37] L.A. Collins-Racie, C.R. Flannery, W. Zeng, C. Corcoran, B. Annis-Freeman, M.J. Agostino, et al., ADAMTS-8 exhibits aggrecanase activity and is expressed in human articular cartilage, *Matrix Biol.* 23 (2004) 219–230. doi:10.1016/j.matbio.2004.05.004.
- [38] C.M. Dancevic, F.W. Fraser, A.D. Smith, N. Stupka, A.C. Ward, D.R. McCulloch, Biosynthesis and expression of a disintegrin-like and metalloproteinase domain with thrombospondin-1 repeats-15: a novel versican-cleaving proteoglycanase, *J Biol Chem*. 288 (2013) 37267–37276. doi:10.1074/jbc.M112.418624.
- [39] J. Dzwonek, M. Rylski, L. Kaczmarek, Matrix metalloproteinases and their endogenous inhibitors in neuronal physiology of the adult brain, *FEBS Lett.* 567 (2004) 129–135. doi:10.1016/j.febslet.2004.03.070.

- [40] I.M. Ethell, D.W. Ethell, Matrix metalloproteinases in brain development and remodeling: synaptic functions and targets, *J Neurosci Res.* 85 (2007) 2813–2823. doi:10.1002/jnr.21273.
- [41] T.H. Wen, S. Afroz, S.M. Reinhard, A.R. Palacios, K. Tapia, D.K. Binder, et al., Genetic Reduction of Matrix Metalloproteinase-9 Promotes Formation of Perineuronal Nets Around Parvalbumin-Expressing Interneurons and Normalizes Auditory Cortex Responses in Developing *Fmr1* Knock-Out Mice, *Cerebral Cortex.* (2017) 1–14. doi:10.1093/cercor/bhx258.
- [42] M. Morawski, T. Reinert, W. Meyer-Klaucke, F.E. Wagner, W. Tröger, A. Reinert, et al., Ion exchanger in the brain: Quantitative analysis of perineuronally fixed anionic binding sites suggests diffusion barriers with ion sorting properties, *Sci Rep.* 5 (2015) 16471. doi:10.1038/srep16471.
- [43] W. Härtig, A. Derouiche, K. Welt, K. Brauer, J. Grosche, M. Mäder, et al., Cortical neurons immunoreactive for the potassium channel Kv3.1b subunit are predominantly surrounded by perineuronal nets presumed as a buffering system for cations, *Brain Res.* 842 (1999) 15–29.
- [44] S. Hrabětová, D. Masri, L. Tao, F. Xiao, C. Nicholson, Calcium diffusion enhanced after cleavage of negatively charged components of brain extracellular matrix by chondroitinase ABC, *The Journal of Physiology.* 587 (2009) 4029–4049. doi:10.1113/jphysiol.2009.170092.
- [45] A. Suttkus, S. Rohn, S. Weigel, P. Glöckner, T. Arendt, M. Morawski, Aggrecan, link protein and tenascin-R are essential components of the perineuronal net to protect neurons against iron-induced oxidative stress, *Cell Death Dis.* 5 (2014) e1119. doi:10.1038/cddis.2014.25.
- [46] J.-H. Cabungcal, P. Steullet, H. Morishita, R. Kraftsik, M. Cuenod, T.K. Hensch, et al., Perineuronal nets protect fast-spiking interneurons against oxidative stress, *Proc Natl Acad Sci USA.* 110 (2013) 9130–9135. doi:10.1073/pnas.1300454110.
- [47] S. Miyata, Y. Nishimura, T. Nakashima, Perineuronal nets protect against amyloid beta-protein neurotoxicity in cultured cortical neurons, *Brain Res.* 1150 (2007) 200–206. doi:10.1016/j.brainres.2007.02.066.
- [48] M. Morawski, G. Brückner, C. Jäger, G. Seeger, T. Arendt, Neurons associated with aggrecan-based perineuronal nets are protected against tau pathology in subcortical regions in Alzheimer's disease, *Neuroscience.* 169 (2010) 1347–1363. doi:10.1016/j.neuroscience.2010.05.022.
- [49] C. Costa, R. Tortosa, A. Domènech, E. Vidal, M. Pumarola, A. Bassols, Mapping of aggrecan, hyaluronic acid, heparan sulphate proteoglycans and aquaporin 4 in the central nervous system of the mouse, *J Chem Neuroanat.* 33 (2007) 111–123. doi:10.1016/j.jchemneu.2007.01.006.
- [50] R. Frischknecht, M. Heine, D. Perrais, C.I. Seidenbecher, D. Choquet, E.D. Gundelfinger, Brain extracellular matrix affects AMPA receptor lateral mobility and short-term synaptic plasticity, *Nat Neurosci.* 12 (2009) 897–904. doi:10.1038/nn.2338.
- [51] C. Orlando, J. Ster, U. Gerber, J.W. Fawcett, O. Raineteau, Perisynaptic chondroitin sulfate proteoglycans restrict structural plasticity in an integrin-dependent manner, *Journal of Neuroscience.* 32 (2012) 18009–18017. doi:10.1523/JNEUROSCI.2406-12.2012.
- [52] L. de Vivo, S. Landi, M. Panniello, L. Baroncelli, S. Chierzi, L. Mariotti, et al., Extracellular matrix inhibits structural and functional plasticity of

- dendritic spines in the adult visual cortex, *Nat Comms*. 4 (2013) 1484. doi:10.1038/ncomms2491.
- [53] F. Donato, S.B. Rompani, P. Caroni, Parvalbumin-expressing basket-cell network plasticity induced by experience regulates adult learning, *Nature*. 504 (2013) 272–276. doi:10.1038/nature12866.
- [54] S. Miyata, H. Kitagawa, Mechanisms for modulation of neural plasticity and axon regeneration by chondroitin sulphate, *J. Biochem*. 157 (2015) 13–22. doi:10.1093/jb/mvu067.
- [55] A.D. Cardin, H.J. Weintraub, Molecular modeling of protein-glycosaminoglycan interactions, *Arteriosclerosis*. 9 (1989) 21–32. doi:10.1161/01.ATV.9.1.21.
- [56] N.S. Gandhi, R.L. Mancera, The Structure of Glycosaminoglycans and their Interactions with Proteins, *Chemical Biology & Drug Design*. 72 (2008) 455–482. doi:10.1111/j.1747-0285.2008.00741.x.
- [57] G. Despras, C. Bernard, A. Perrot, L. Cattiaux, A. Prochiantz, H. Lortat-Jacob, et al., Toward libraries of biotinylated chondroitin sulfate analogues: from synthesis to in vivo studies, *Chemistry*. 19 (2013) 531–540. doi:10.1002/chem.201202173.
- [58] M. Beurdeley, J. Spatazza, H.H.C. Lee, S. Sugiyama, C. Bernard, A.A. Di Nardo, et al., Otx2 binding to perineuronal nets persistently regulates plasticity in the mature visual cortex, *Journal of Neuroscience*. 32 (2012) 9429–9437. doi:10.1523/JNEUROSCI.0394-12.2012.
- [59] G. Dick, C.L. Tan, J.N. Alves, E.M.E. Ehlert, G.M. Miller, L.C. Hsieh-Wilson, et al., Semaphorin 3A Binds to the Perineuronal Nets via Chondroitin Sulfate Type E Motifs in Rodent Brains, *J Biol Chem*. 288 (2013) 27384–27395. doi:10.1074/jbc.M111.310029.
- [60] A. Joliot, C. Pernelle, H. Deagostini-Bazin, A. Prochiantz, Antennapedia homeobox peptide regulates neural morphogenesis, *Proc Natl Acad Sci USA*. 88 (1991) 1864–1868.
- [61] I. Le Roux, A.H. Joliot, E. Bloch-Gallego, A. Prochiantz, M. Volovitch, Neurotrophic activity of the Antennapedia homeodomain depends on its specific DNA-binding properties, *Proc Natl Acad Sci USA*. 90 (1993) 9120–9124.
- [62] A. Prochiantz, A.A. Di Nardo, Homeoprotein Signaling in the Developing and Adult Nervous System, *Neuron*. 85 (2015) 911–925. doi:10.1016/j.neuron.2015.01.019.
- [63] S. Sugiyama, A.A. Di Nardo, S. Aizawa, I. Matsuo, M. Volovitch, A. Prochiantz, et al., Experience-dependent transfer of Otx2 homeoprotein into the visual cortex activates postnatal plasticity, *Cell*. 134 (2008) 508–520. doi:10.1016/j.cell.2008.05.054.
- [64] C. Bernard, C. Vincent, D. Testa, E. Bertini, J. Ribot, A.A. Di Nardo, et al., A Mouse Model for Conditional Secretion of Specific Single-Chain Antibodies Provides Genetic Evidence for Regulation of Cortical Plasticity by a Non-cell Autonomous Homeoprotein Transcription Factor, *PLoS Genet*. 12 (2016) e1006035. doi:10.1371/journal.pgen.1006035.
- [65] H.H.C. Lee, C. Bernard, Z. Ye, D. Acampora, A. Simeone, A. Prochiantz, et al., Erratum: Genetic Otx2 mis-localization delays critical period plasticity across brain regions, *Mol Psychiatry*. 22 (2017) 785–785. doi:10.1038/mp.2017.83.

- [66] H.H.C. Lee, C. Bernard, Z. Ye, D. Acampora, A. Simeone, A. Prochiantz, et al., Genetic Otx2 mis-localization delays critical period plasticity across brain regions, *Mol Psychiatry*. 22 (2017) 680–688. doi:10.1038/mp.2017.1.
- [67] C. Bernard, A. Prochiantz, Otx2-PNN Interaction to Regulate Cortical Plasticity, *Neural Plast.* 2016 (2016) 1–7. doi:10.1155/2016/7931693.
- [68] J. Spatazza, H.H.C. Lee, A.A. Di Nardo, L. Tibaldi, A. Joliot, T.K. Hensch, et al., Choroid-plexus-derived Otx2 homeoprotein constrains adult cortical plasticity, *Cell Rep.* 3 (2013) 1815–1823. doi:10.1016/j.celrep.2013.05.014.
- [69] X. Hou, N. Yoshioka, H. Tsukano, A. Sakai, S. Miyata, Y. Watanabe, et al., Chondroitin Sulfate Is Required for Onset and Offset of Critical Period Plasticity in Visual Cortex, *Sci Rep.* 7 (2017) 12646. doi:10.1038/s41598-017-04007-x.
- [70] T. Takahashi, A. Fournier, F. Nakamura, L.H. Wang, Y. Murakami, R.G. Kalb, et al., Plexin-neuropilin-1 complexes form functional semaphorin-3A receptors, *Cell.* 99 (1999) 59–69.
- [71] T. Vo, D. Carulli, E.M.E. Ehlert, J.C.F. Kwok, G. Dick, V. Mecollari, et al., The chemorepulsive axon guidance protein semaphorin3A is a constituent of perineuronal nets in the adult rodent brain, *Mol Cell Neurosci.* 56 (2013) 186–200. doi:10.1016/j.mcn.2013.04.009.
- [72] F. de Winter, J.C.F. Kwok, J.W. Fawcett, T.T. Vo, D. Carulli, J. Verhaagen, The Chemorepulsive Protein Semaphorin 3A and Perineuronal Net-Mediated Plasticity, *Neural Plast.* 2016 (2016) 3679545–14. doi:10.1155/2016/3679545.
- [73] J. De Wit, F. de Winter, J. Klooster, J. Verhaagen, Semaphorin 3A displays a punctate distribution on the surface of neuronal cells and interacts with proteoglycans in the extracellular matrix, *Mol Cell Neurosci.* 29 (2005) 40–55. doi:10.1016/j.mcn.2004.12.009.
- [74] A. Dityatev, G. Brückner, G. Dityateva, J. Grosche, R. Kleene, M. Schachner, Activity-dependent formation and functions of chondroitin sulfate-rich extracellular matrix of perineuronal nets, *Developmental Neurobiology.* 67 (2007) 570–588. doi:10.1002/dneu.20361.
- [75] E. Favuzzi, A. Marques-Smith, R. Deogracias, C.M. Winterflood, A. Sánchez-Aguilera, L. Mantoan, et al., Activity-Dependent Gating of Parvalbumin Interneuron Function by the Perineuronal Net Protein Brevican, *Neuron.* 95 (2017) 639–655. doi:10.1016/j.neuron.2017.06.028.
- [76] T.S. Balmer, Perineuronal Nets Enhance the Excitability of Fast-Spiking Neurons, *eNeuro.* 3 (2016) ENEURO.0112–16.2016. doi:10.1523/ENEURO.0112-16.2016.
- [77] M. Slaker, L. Churchill, R.P. Todd, J.M. Blacktop, D.G. Zuloaga, J. Raber, et al., Removal of perineuronal nets in the medial prefrontal cortex impairs the acquisition and reconsolidation of a cocaine-induced conditioned place preference memory, *Journal of Neuroscience.* 35 (2015) 4190–4202. doi:10.1523/JNEUROSCI.3592-14.2015.
- [78] P. Steullet, J.-H. Cabungcal, M. Cuenod, K.Q. Do, Fast oscillatory activity in the anterior cingulate cortex: dopaminergic modulation and effect of perineuronal net loss, *Front Cell Neurosci.* 8 (2014) 244. doi:10.3389/fncel.2014.00244.



- [79] T. Pizzorusso, P. Medini, N. Berardi, S. Chierzi, J.W. Fawcett, L. Maffei, Reactivation of ocular dominance plasticity in the adult visual cortex, *Science*. 298 (2002) 1248–1251. doi:10.1126/science.1072699.
- [80] M. Nakamura, K. Nakano, S. Morita, T. Nakashima, A. Oohira, S. Miyata, Expression of chondroitin sulfate proteoglycans in barrel field of mouse and rat somatosensory cortex, *Brain Res.* 1252 (2009) 117–129. doi:10.1016/j.brainres.2008.11.022.
- [81] A.E. Takesian, T.K. Hensch, Balancing plasticity/stability across brain development, *Prog Brain Res.* 207 (2013) 3–34. doi:10.1016/B978-0-444-63327-9.00001-1.
- [82] T. Pizzorusso, P. Medini, S. Landi, S. Baldini, N. Berardi, L. Maffei, Structural and functional recovery from early monocular deprivation in adult rats, *Proc Natl Acad Sci USA.* 103 (2006) 8517–8522. doi:10.1073/pnas.0602657103.
- [83] M.C. Chang, J.M. Park, K.A. Pelkey, H.L. Grabenstatter, D. Xu, D.J. Linden, et al., Narp regulates homeostatic scaling of excitatory synapses on parvalbumin-expressing interneurons, *Nat Neurosci.* 13 (2010) 1090–1097. doi:10.1038/nn.2621.
- [84] Y. Gu, S. Huang, M.C. Chang, P. Worley, A. Kirkwood, E.M. Quinlan, Obligatory role for the immediate early gene NARP in critical period plasticity, *Neuron.* 79 (2013) 335–346. doi:10.1016/j.neuron.2013.05.016.
- [85] T.L. Dickendesher, K.T. Baldwin, Y.A. Mironova, Y. Koriyama, S.J. Raiker, K.L. Askew, et al., NgR1 and NgR3 are receptors for chondroitin sulfate proteoglycans, *Nat Neurosci.* 15 (2012) 703–712. doi:10.1038/nn.3070.
- [86] Q. Ye, Q.-L. Miao, Experience-dependent development of perineuronal nets and chondroitin sulfate proteoglycan receptors in mouse visual cortex, *Matrix Biol.* 32 (2013) 352–363. doi:10.1016/j.matbio.2013.04.001.
- [87] C.-É. Stephany, M.G. Frantz, A.W. McGee, Multiple Roles for Nogo Receptor 1 in Visual System Plasticity, *Neuroscientist.* 22 (2016) 653–666. doi:10.1177/1073858415614564.
- [88] M.S. Fanselow, J.E. LeDoux, Why we think plasticity underlying Pavlovian fear conditioning occurs in the basolateral amygdala, *Neuron.* 23 (1999) 229–232.
- [89] N. Gogolla, P. Caroni, A. Lüthi, C. Herry, Perineuronal nets protect fear memories from erasure, *Science.* 325 (2009) 1258–1261. doi:10.1126/science.1174146.
- [90] G. Kochlamazashvili, C. Henneberger, O. Bukalo, E. Dvoretzkova, O. Senkov, P.M.J. Lievens, et al., The Extracellular Matrix Molecule Hyaluronic Acid Regulates Hippocampal Synaptic Plasticity by Modulating Postsynaptic L-Type Ca<sup>2+</sup> Channels, *Neuron.* 67 (2010) 116–128. doi:10.1016/j.neuron.2010.05.030.
- [91] M.J. Hylin, S.A. Orsi, A.N. Moore, P.K. Dash, Disruption of the perineuronal net in the hippocampus or medial prefrontal cortex impairs fear conditioning, *Learn Mem.* 20 (2013) 267–273. doi:10.1101/lm.030197.112.
- [92] C. Romberg, S. Yang, R. Melani, M.R. Andrews, A.E. Horner, M.G. Spillantini, et al., Depletion of perineuronal nets enhances recognition memory and long-term depression in the perirhinal cortex, *Journal of*

- Neuroscience. 33 (2013) 7057–7065. doi:10.1523/JNEUROSCI.6267-11.2013.
- [93] M.F.K. Happel, H. Niekisch, L.L. Castiblanco Rivera, F.W. Ohl, M. Deliano, R. Frischknecht, Enhanced cognitive flexibility in reversal learning induced by removal of the extracellular matrix in auditory cortex, *Proc Natl Acad Sci USA*. 111 (2014) 2800–2805. doi:10.1073/pnas.1310272111.
- [94] F. Donato, A. Chowdhury, M. Lahr, P. Caroni, Early- and late-born parvalbumin basket cell subpopulations exhibiting distinct regulation and roles in learning, *Neuron*. 85 (2015) 770–786. doi:10.1016/j.neuron.2015.01.011.
- [95] B.A. Sorg, S. Berretta, J.M. Blacktop, J.W. Fawcett, H. Kitagawa, J.C.F. Kwok, et al., Casting a Wide Net: Role of Perineuronal Nets in Neural Plasticity, *Journal of Neuroscience*. 36 (2016) 11468–11459. doi:10.1523/JNEUROSCI.2351-16.2016.
- [96] S. Soleman, M.A. Filippov, A. Dityatev, J.W. Fawcett, Targeting the neural extracellular matrix in neurological disorders, *Neuroscience*. 253 (2013) 194–213. doi:10.1016/j.neuroscience.2013.08.050.
- [97] H. Hu, J. Gan, P. Jonas, Interneurons. Fast-spiking, parvalbumin<sup>+</sup> GABAergic interneurons: from cellular design to microcircuit function, *Science*. 345 (2014) 1255263–1255263. doi:10.1126/science.1255263.
- [98] O. Marin, Interneuron dysfunction in psychiatric disorders, *Nat Rev Neurosci*. 13 (2012) 107–120. doi:10.1038/nrn3155.
- [99] B.K.Y. Bitanhirwe, S.A. Mauney, T.-U.W. Woo, Weaving a Net of Neurobiological Mechanisms in Schizophrenia and Unraveling the Underlying Pathophysiology, *Biol. Psychiatry*. 80 (2016) 589–598. doi:10.1016/j.biopsych.2016.03.1047.
- [100] J.F. Enwright, S. Sanapala, A. Foglio, R. Berry, K.N. Fish, D.A. Lewis, Reduced Labeling of Parvalbumin Neurons and Perineuronal Nets in the Dorsolateral Prefrontal Cortex of Subjects with Schizophrenia, *Neuropsychopharmacology*. 41 (2016) 2206–2214. doi:10.1038/npp.2016.24.
- [101] H. Pantazopoulos, M. Markota, F. Jaquet, D. Ghosh, A. Wallin, A. Santos, et al., Aggrecan and chondroitin-6-sulfate abnormalities in schizophrenia and bipolar disorder: a postmortem study on the amygdala, *Transl Psychiatry*. 5 (2015) e496.
- [102] S.A. Mauney, K.M. Athanas, H. Pantazopoulos, N. Shaskan, E. Passeri, S. Berretta, et al., Developmental pattern of perineuronal nets in the human prefrontal cortex and their deficit in schizophrenia, *Biol. Psychiatry*. 74 (2013) 427–435. doi:10.1016/j.biopsych.2013.05.007.
- [103] J.M. Kippe, T.M. Mueller, V. Haroutunian, J.H. Meador-Woodruff, Abnormal N-acetylglucosaminyltransferase expression in prefrontal cortex in schizophrenia, *Schizophr. Res.* 166 (2015) 219–224. doi:10.1016/j.schres.2015.06.002.
- [104] Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium, Biological insights from 108 schizophrenia-associated genetic loci, *Nature*. 511 (2014) 421–427. doi:10.1038/nature13595.
- [105] S. Cichon, T.W. Mühleisen, F.A. Degenhardt, M. Mattheisen, X. Miró, J. Strohmaier, et al., Genome-wide association study identifies genetic variation in neurocan as a susceptibility factor for bipolar disorder, *Am J Hum Genet*. 88 (2011) 372–381. doi:10.1016/j.ajhg.2011.01.017.

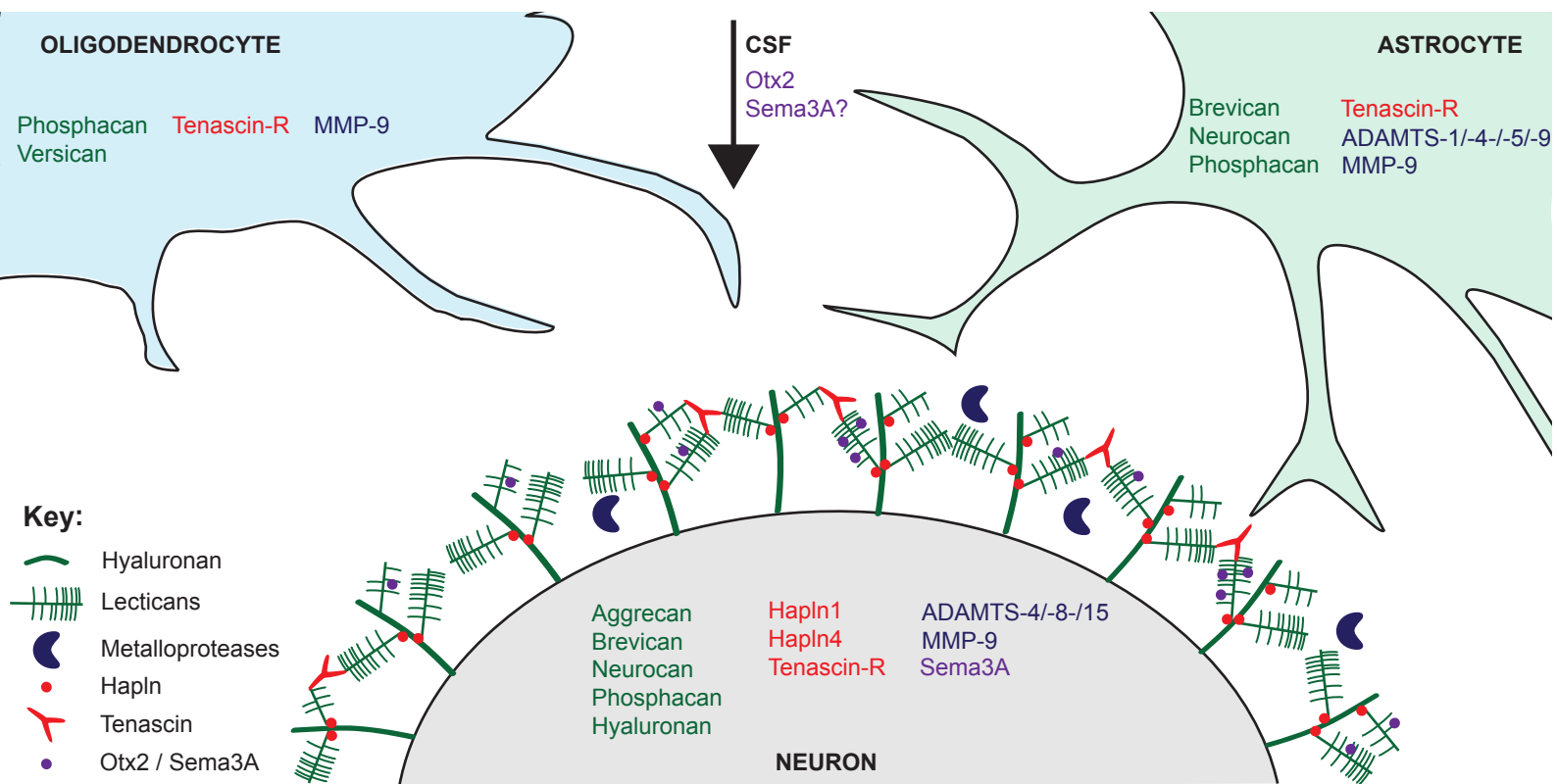
- [106] X. Miró, S. Meier, M.L. Dreisow, J. Frank, J. Strohmaier, R. Breuer, et al., Studies in humans and mice implicate neurocan in the etiology of mania, *Am J Psychiatry*. 169 (2012) 982–990. doi:10.1176/appi.ajp.2012.11101585.
- [107] A.K. Kähler, S. Djurovic, L.M. Rimol, A.A. Brown, L. Athanasiu, E.G. Jönsson, et al., Candidate gene analysis of the human natural killer-1 carbohydrate pathway and perineuronal nets in schizophrenia: B3GAT2 is associated with disease risk and cortical surface area, *Biol. Psychiatry*. 69 (2011) 90–96. doi:10.1016/j.biopsych.2010.07.035.
- [108] J.D. Buxbaum, L. Georgieva, J.J. Young, C. Plescia, Y. Kajiwara, Y. Jiang, et al., Molecular dissection of NRG1-ERBB4 signaling implicates PTPRZ1 as a potential schizophrenia susceptibility gene, *Mol Psychiatry*. 13 (2008) 162–172. doi:10.1038/sj.mp.4001991.
- [109] N. Takahashi, T. Sakurai, O. Bozdagi-Gunal, N.P. Dorr, J. Moy, L. Krug, et al., Increased expression of receptor phosphotyrosine phosphatase- $\beta/\zeta$  is associated with molecular, cellular, behavioral and cognitive schizophrenia phenotypes, *Transl Psychiatry*. 1 (2011) e8–e8. doi:10.1038/tp.2011.8.
- [110] P. Steullet, J.-H. Cabungcal, S.A. Bukhari, M.I. Ardelt, H. Pantazopoulos, F. Hamati, et al., The thalamic reticular nucleus in schizophrenia and bipolar disorder: role of parvalbumin-expressing neuron networks and oxidative stress, *Mol Psychiatry*. 79 (2017) 474. doi:10.1038/mp.2017.230.
- [111] S. Sabunciyan, R. Yolken, C.M. Ragan, J.B. Potash, V.L. Nimgaonkar, F. Dickerson, et al., Polymorphisms in the homeobox gene OTX2 may be a risk factor for bipolar disorder, *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* 144B (2007) 1083–1086. doi:10.1002/ajmg.b.30523.
- [112] A. Sakai, R. Nakato, Y. Ling, X. Hou, N. Hara, T. Iijima, et al., Genome-Wide Target Analyses of Otx2 Homeoprotein in Postnatal Cortex, *Front Neurosci*. 11 (2017) 307. doi:10.3389/fnins.2017.00307.
- [113] H. Yamamori, R. Hashimoto, T. Ishima, F. Kishi, Y. Yasuda, K. Ohi, et al., Plasma levels of mature brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in treatment-resistant schizophrenia treated with clozapine, *Neurosci Lett*. 556 (2013) 37–41. doi:10.1016/j.neulet.2013.09.059.
- [114] K. Lepeta, K.J. Purzycka, K. Pachulska-Wieczorek, M. Mitjans, M. Begemann, B. Vafadari, et al., A normal genetic variation modulates synaptic MMP-9 protein levels and the severity of schizophrenia symptoms, *EMBO Mol Med*. 9 (2017) 1100–1116. doi:10.15252/emmm.201707723.
- [115] R. Cardis, J.-H. Cabungcal, D. Dwir, K.Q. Do, P. Steullet, A lack of GluN2A-containing NMDA receptors confers a vulnerability to redox dysregulation: Consequences on parvalbumin interneurons, and their perineuronal nets, *Neurobiol Dis*. 109 (2018) 64–75. doi:10.1016/j.nbd.2017.10.006.
- [116] J.W. Paylor, B.R. Lins, Q. Greba, N. Moen, R.S. de Moraes, J.G. Howland, et al., Developmental disruption of perineuronal nets in the medial prefrontal cortex after maternal immune activation, *Sci Rep*. 6 (2016) 37580. doi:10.1038/srep37580.
- [117] J. Su, J. Cole, M.A. Fox, Loss of Interneuron-Derived Collagen XIX Leads to a Reduction in Perineuronal Nets in the Mammalian Telencephalon, *ASN Neuro*. 9 (2017) 1759091416689020. doi:10.1177/1759091416689020.

- [118] A. Shah, D.J. Lodge, A loss of hippocampal perineuronal nets produces deficits in dopamine system function: relevance to the positive symptoms of schizophrenia, *Transl Psychiatry*. 3 (2013) e215–e215. doi:10.1038/tp.2012.145.
- [119] M. Goedert, R. Jakes, M.G. Spillantini, M. Hasegawa, M.J. Smith, R.A. Crowther, Assembly of microtubule-associated protein tau into Alzheimer-like filaments induced by sulphated glycosaminoglycans, *Nature*. 383 (1996) 550–553. doi:10.1038/383550a0.
- [120] G.M. Castillo, W. Lukito, T.N. Wight, A.D. Snow, The sulfate moieties of glycosaminoglycans are critical for the enhancement of beta-amyloid protein fibril formation, *J Neurochem*. 72 (1999) 1681–1687.
- [121] N. Quittot, M. Sebastiao, S. Bourgault, Modulation of amyloid assembly by glycosaminoglycans: from mechanism to biological significance, *Biochem. Cell Biol*. 95 (2017) 329–337. doi:10.1139/bcb-2016-0236.
- [122] B.B. Holmes, S.L. Devos, N. Kfoury, M. Li, R. Jacks, K. Yanamandra, et al., Heparan sulfate proteoglycans mediate internalization and propagation of specific proteopathic seeds, *Proc Natl Acad Sci USA*. 110 (2013) E3138–47. doi:10.1073/pnas.1301440110.
- [123] J.N. Rauch, J.J. Chen, A.W. Sorum, G.M. Miller, T. Sharf, S.K. See, et al., Tau Internalization is Regulated by 6-O Sulfation on Heparan Sulfate Proteoglycans (HSPGs), *Sci Rep*. 8 (2018) 6382. doi:10.1038/s41598-018-24904-z.
- [124] C.B. Jendresen, H. Cui, X. Zhang, I. Vlodaysky, L.N.G. Nilsson, J.-P. Li, Overexpression of heparanase lowers the amyloid burden in amyloid- $\beta$  precursor protein transgenic mice, *J Biol Chem*. 290 (2015) 5053–5064. doi:10.1074/jbc.M114.600569.
- [125] M.K. Sethi, J. Zaia, Extracellular matrix proteomics in schizophrenia and Alzheimer's disease, *Anal Bioanal Chem*. 409 (2017) 379–394. doi:10.1007/s00216-016-9900-6.
- [126] G. Brückner, D. Hausen, W. Härtig, M. Drlicek, T. Arendt, K. Brauer, Cortical areas abundant in extracellular matrix chondroitin sulphate proteoglycans are less affected by cytoskeletal changes in Alzheimer's disease, *Neuroscience*. 92 (1999) 791–805.
- [127] M. Morawski, G. Brückner, C. Jäger, G. Seeger, R.T. Matthews, T. Arendt, Involvement of perineuronal and perisynaptic extracellular matrix in Alzheimer's disease neuropathology, *Brain Pathol*. 22 (2012) 547–561. doi:10.1111/j.1750-3639.2011.00557.x.
- [128] S. Baig, G.K. Wilcock, S. Love, Loss of perineuronal net N-acetylgalactosamine in Alzheimer's disease, *Acta Neuropathologica*. 110 (2005) 393–401. doi:10.1007/s00401-005-1060-2.
- [129] A.W. Lasek, H. Chen, W.-Y. Chen, Releasing Addiction Memories Trapped in Perineuronal Nets, *Trends Genet*. 34 (2018) 197–208. doi:10.1016/j.tig.2017.12.004.
- [130] A. Samochowiec, A. Grzywacz, L. Kaczmarek, P. Bienkowski, J. Samochowiec, P. Mierzejewski, et al., Functional polymorphism of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) gene in alcohol dependence: Family and case control study, *Brain Res*. 1327 (2010) 103–106. doi:10.1016/j.brainres.2010.02.072.
- [131] L. Zuo, J. Gelernter, C.K. Zhang, H. Zhao, L. Lu, H.R. Kranzler, et al., Genome-Wide Association Study of Alcohol Dependence Implicates

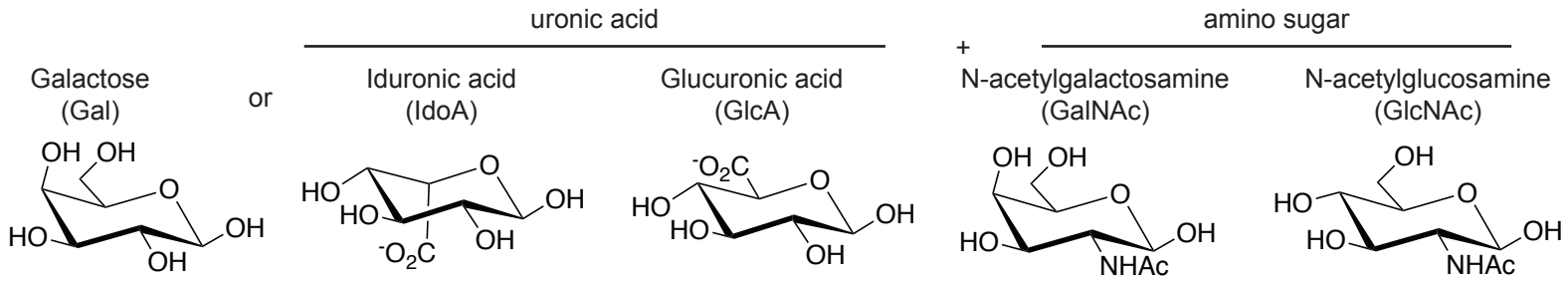
- KIAA0040* on Chromosome 1q, *Neuropsychopharmacology*. 37 (2012) 557–566. doi:10.1038/npp.2011.229.
- [132] D.C. Mash, J. French-Mullen, N. Adi, Y. Qin, A. Buck, J. Pablo, Gene Expression in Human Hippocampus from Cocaine Abusers Identifies Genes which Regulate Extracellular Matrix Remodeling, *PLoS ONE*. 2 (2007) e1187. doi:10.1371/journal.pone.0001187.
- [133] D.B. Vazquez-Sanroman, R.D. Monje, M.T. Bardo, Nicotine self-administration remodels perineuronal nets in ventral tegmental area and orbitofrontal cortex in adult male rats, *Addict Biol*. 22 (2017) 1743–1755. doi:10.1111/adb.12437.
- [134] M.C. Van den Oever, B.R. Lubbers, N.A. Goriounova, K.W. Li, R.C. van der Schors, M. Loos, et al., Extracellular matrix plasticity and GABAergic inhibition of prefrontal cortex pyramidal cells facilitates relapse to heroin seeking, *Neuropsychopharmacology*. 35 (2010) 2120–2133. doi:10.1038/npp.2010.90.
- [135] J.M. Blacktop, R.P. Todd, B.A. Sorg, Role of perineuronal nets in the anterior dorsal lateral hypothalamic area in the acquisition of cocaine-induced conditioned place preference and self-administration, *Neuropharmacology*. 118 (2017) 124–136. doi:10.1016/j.neuropharm.2017.03.018.
- [136] D. Bavelier, D.M. Levi, R.W. Li, Y. Dan, T.K. Hensch, Removing brakes on adult brain plasticity: from molecular to behavioral interventions, *Journal of Neuroscience*. 30 (2010) 14964–14971. doi:10.1523/JNEUROSCI.4812-10.2010.
- [137] A. Pascual-Leone, A. Amedi, F. Fregni, L.B. Merabet, The plastic human brain cortex, *Annu Rev Neurosci*. 28 (2005) 377–401. doi:10.1146/annurev.neuro.27.070203.144216.
- [138] V. Vorobyov, J.C.F. Kwok, J.W. Fawcett, F. Sengpiel, Effects of digesting chondroitin sulfate proteoglycans on plasticity in cat primary visual cortex, *Journal of Neuroscience*. 33 (2013) 234–243. doi:10.1523/JNEUROSCI.2283-12.2013.
- [139] M.J. Végh, C.M. Heldring, W. Kamphuis, S. Hijazi, A.J. Timmerman, K.W. Li, et al., Reducing hippocampal extracellular matrix reverses early memory deficits in a mouse model of Alzheimer's disease, *Acta Neuropathol Commun*. 2 (2014) 76. doi:10.1186/s40478-014-0076-z.
- [140] M.D. Howell, L.A. Bailey, M.A. Cozart, B.M. Gannon, P.E. Gottschall, Hippocampal administration of chondroitinase ABC increases plaque-adjacent synaptic marker and diminishes amyloid burden in aged APP<sup>swe</sup>/PS1<sup>dE9</sup> mice, *Acta Neuropathol Commun*. 3 (2015) 54. doi:10.1186/s40478-015-0233-z.
- [141] S. Yang, M. Cacquevel, L.M. Saksida, T.J. Bussey, B.L. Schneider, P. Aebischer, et al., Perineuronal net digestion with chondroitinase restores memory in mice with tau pathology, *Exp Neurol*. 265 (2015) 48–58. doi:10.1016/j.expneurol.2014.11.013.
- [142] J.W. Fawcett, The extracellular matrix in plasticity and regeneration after CNS injury and neurodegenerative disease, *Prog Brain Res*. 218 (2015) 213–226. doi:10.1016/bs.pbr.2015.02.001.
- [143] N.G. Harris, Y.A. Mironova, D.A. Hovda, R.L. Sutton, Chondroitinase ABC enhances pericontusion axonal sprouting but does not confer robust

- improvements in behavioral recovery, *J. Neurotrauma*. 27 (2010) 1971–1982. doi:10.1089/neu.2010.1470.
- [144] S. Soleman, P.K. Yip, D.A. Duricki, L.D.F. Moon, Delayed treatment with chondroitinase ABC promotes sensorimotor recovery and plasticity after stroke in aged rats, *Brain*. 135 (2012) 1210–1223. doi:10.1093/brain/aws027.
- [145] S. Yang, S. Hilton, J.N. Alves, L.M. Saksida, T. Bussey, R.T. Matthews, et al., Antibody recognizing 4-sulfated chondroitin sulfate proteoglycans restores memory in tauopathy-induced neurodegeneration, *Neurobiol. Aging*. 59 (2017) 197–209. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2017.08.002.
- [146] M. Corredor, R. Bonet, A. Moure, C. Domingo, J. Bujons, I. Alfonso, et al., Cationic Peptides and Peptidomimetics Bind Glycosaminoglycans as Potential Sema3A Pathway Inhibitors, *Biophys J*. 110 (2016) 1291–1303. doi:10.1016/j.bpj.2016.01.033.
- [147] T.-H. Hsieh, H.H.C. Lee, M.Q. Hameed, A. Pascual-Leone, T.K. Hensch, A. Rotenberg, Trajectory of Parvalbumin Cell Impairment and Loss of Cortical Inhibition in Traumatic Brain Injury, *Cerebral Cortex*. 27 (2017) 5509–5524. doi:10.1093/cercor/bhw318.
- [148] S.Y. Kim, V.V. Senatorov, C.S. Morrissey, K. Lippmann, O. Vazquez, D.Z. Milikovsky, et al., TGF $\beta$  signaling is associated with changes in inflammatory gene expression and perineuronal net degradation around inhibitory neurons following various neurological insults, *Sci Rep*. 7 (2017) 7711. doi:10.1038/s41598-017-07394-3.
- [149] W. Härtig, B. Mages, S. Aleithe, B. Nitzsche, S. Altmann, H. Barthel, et al., Damaged Neocortical Perineuronal Nets Due to Experimental Focal Cerebral Ischemia in Mice, Rats and Sheep, *Front Integr Neurosci*. 11 (2017) 15. doi:10.3389/fnint.2017.00015.
- [150] M.J. Quattromani, M. Pruvost, C. Guerreiro, F. Backlund, E. Englund, A. Aspberg, et al., Extracellular Matrix Modulation Is Driven by Experience-Dependent Plasticity During Stroke Recovery, *Mol Neurobiol*. 55 (2018) 2196–2213. doi:10.1007/s12035-017-0461-2.
- [151] E. Pollock, M. Everest, A. Brown, M.O. Poulter, Metalloproteinase inhibition prevents inhibitory synapse reorganization and seizure genesis, *Neurobiol Dis*. 70 (2014) 21–31. doi:10.1016/j.nbd.2014.06.003.
- [152] S.T. Cheung, M.S. Miller, R. Pacoma, J. Roland, J. Liu, A.M. Schumacher, et al., Discovery of a Small-Molecule Modulator of Glycosaminoglycan Sulfation, *ACS Chem. Biol.* (2017) acschembio.7b00885. doi:10.1021/acschembio.7b00885.

# Figure 1



## A. Base units



## B. Combination of GAGs

GAG	Repeated units	
Hyaluronan (HA)	GlcA	+ GlcNAc
Chondroitin sulfate (CS)	GlcA	+ GalNAc
Heparan sulfate (HS)	GlcA or IdoA	+ GlcNAc
Keratan sulfate (KS)	Gal	+ GlcNAc
Dermatan sulfate (DS)	IdoA	+ GalNAc

## C. Enzymes for synthesis and modification of CS

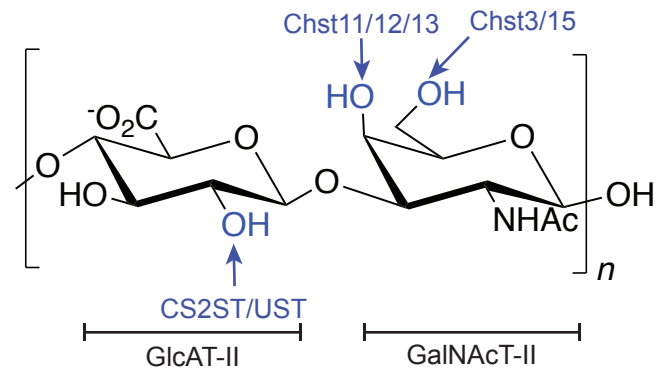
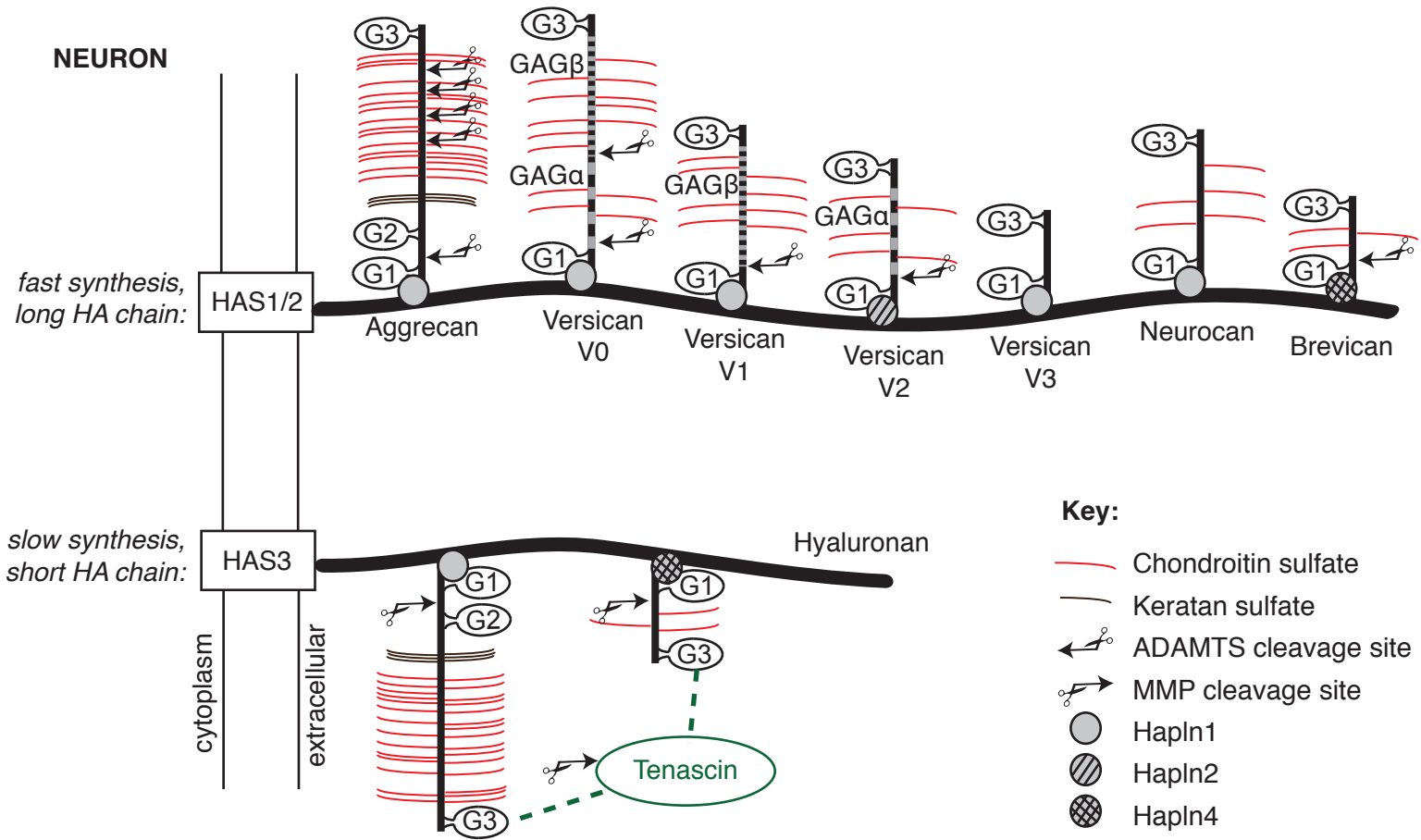




Figure 3





Les homéoprotéines sont des facteurs de transcription qui ont la capacité de transférer entre cellules, présentant ainsi une activité non-autonome directe. En période postnatale, Otx2 n'est pas exprimé dans le cortex visuel mais la protéine est présente et retrouvée très majoritairement dans les interneurons à parvalbumine (PV) de ce cortex. Otx2 reconnaît ces cellules grâce à leur matrice extracellulaire en se liant à un glycosaminoglycane (GAG), le chondroïtine sulfate disulfaté de type E (CS-E). Une fois internalisé Otx2 contribue à la maturation des cellules PV, ce qui accompagne la mise en place et la fermeture d'une période de forte plasticité d'apprentissage de la vision binoculaire. Une constante accumulation d'Otx2 est nécessaire au maintien de l'état non-plastique du cortex cérébral adulte.

Durant ma thèse, je me suis attelé à comprendre les mécanismes par lesquelles Otx2 régule la maturation des cellules PV. Pour cela, il était nécessaire de développer un outil permettant la séparation des actions autonome et non-autonome d'Otx2. La stratégie développée a été de neutraliser Otx2 directement dans le milieu extracellulaire grâce à un anticorps simple chaîne (scFv) dirigé contre la protéine. La génération de lignées de souris transgéniques, à sécrétion inductible du scFv, a permis de valider cet outil dans deux paradigmes (i) en retardant la plasticité au cours du développement, (ii) en rouvrant une fenêtre de plasticité chez l'adulte. La deuxième partie de ma thèse visait à comprendre comment Otx2 permet la maturation des cellules PV. Les cibles potentielles d'Otx2 ont été identifiées et parmi ces cibles Otx2 régule de façon directe l'expression de *Gadd45b/g* en se liant physiquement à ses promoteurs. Nos résultats suggèrent que *Gadd45b* contrôle la plasticité et pourrait avoir une influence sur l'état de méthylation de l'ADN et ainsi sur le statut épigénétique des cellules PV. Dans un dernier temps, nous avons développé de nouveaux peptides ayant une distribution spatiale de charges négatives similaire au CS-E. Cette distribution de charges électrostatiques est fondamentale à l'interaction protéine-GAG. Ces peptides sont faciles à synthétiser, interagissent avec Otx2 et permettent de bloquer son transfert *in vivo* entraînant une baisse de maturation des cellules PV.

Ces différents projets convergent pour offrir une meilleure compréhension de l'action non-autonome d'Otx2 dans le contrôle de la plasticité du cortex visuel. Les outils de neutralisation d'Otx2 dans le milieu extracellulaire pourraient avoir un pouvoir thérapeutique important dans le traitement de certaines maladies ou un état impliquant un défaut de plasticité du cortex cérébral au cours du développement ou chez l'adulte.