UNIVERSITE DE LILLE : SCIENCES ET TECHNOLOGIES ECOLE DOCTORALE BIOLOGIE-SANTE (446)

THESE

Présentée par

Julie FOURNEAU

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LILLE

SPECIALITE : NEUROSCIENCES

Conséquences d'une perturbation de l'expérience sensorimotrice sur la plasticité synaptique du cortex cérébral :

Implication de deux modifications post-traductionnelles, la phosphorylation et la O-GlcNAcylation

Soutenue le 15 octobre 2018 devant le jury composé de :

M Thomas FRERET, Professeur, Université de Caen	Rapporteur
Mme Yoh'i ZENNOU-AZOGUI, Maitre de Conférences, Université de Ma	rseille Rapporteur
Mme Malika HAMDANE, Maitre de Conférences, Université de Lille	Examinateur
M Jean-René CAZALETS, Professeur, Université de Bordeaux	Examinateur
M Erwan DUPONT, Maitre de Conférences, Université de Lille,	Examinateur et co-encadrant
Mme Marie-Hélène CANU, Professeure, Université de Lille,	Directeur de Thèse

Travail réalisé au sein de l'EA7369 de l'Unité de Recherche Pluridisciplinaire Sport, Santé, Société.

TABLE DES MATIERES

TAB	BLE DES MATIERES 2
REN	/ERCIEMENTS
ABF	REVIATIONS
LIST	'E DES FIGURES
LIST	E DES TABLEAUX
RES	UME
ABS	TRACT
INT	RODUCTION GENERALE
REV	UE BIBLIOGRAPHIQUE
١.	Les situations de perturbation de l'experience sensorimotrice
A.	Les situations de perturbation sensorimotrice dans « la vie courante »
В.	Les effets néfastes d'une période de perturbation sensorimotrice sur le corps 25
C.	Les différents modèles expérimentaux
II.	PLASTICITE DU SYSTEME SOMESTHESIQUE APRES UNE PERIODE DE PERTURBATION SENSORIMOTRICE
A.	Organisation anatomofonctionnelle du système somesthésique
В.	Plasticité du système somesthésique après une période de perturbation sensorimotrice 46
III.	PLASTICITE DU SYSTEME MOTEUR APRES UNE PERIODE DE PERTURBATION SENSORIMOTRICE
A.	Organisation anatomofonctionnelle du système moteur
В.	Plasticité du système moteur après une période de perturbation sensorimotrice
C.	Perturbation sensorimotrice et conséquences sur les performances motrices
D.	Le contrôle posturo-locomoteur après une période de perturbation sensorimotrice
IV.	LA BALANCE PHOSPHORYLATION/O-GLCNACYLATION DANS LA PLASTICITE SYNAPTIQUE
A.	Mécanismes moléculaires de la plasticité synaptique79
В.	La O-GlcNAcylation, une glycosylation atypique94

C.	O-GlcNAcylation et système nerveux	102
D.	L'implication de la O-GlcNAcylation dans le fonctionnement synaptique	106
PA	RTIE 1 : ANALYSE PROTEOMIQUE	111
<u>Ετι</u>	JDE 1 : CHANGEMENTS DES PROTEINES SYNAPTIQUES APRES UNE PERIODE DE PSM : IMPLICATION DE LA	
РНС	DSPHORYLATION ET DE LA O-GLCNACYLATION	112
I.	INTRODUCTION	112
١١.	Materiels et Methodes	113
A.	Animaux et modèle de PSM	113
В.	Prélèvements des échantillons cérébraux	114
C.	Extraction protéique	115
D.	Dosage protéique de Bradford	116
E.	Immunoprécipitation	116
F.	SDS-PAGE et western blot	117
G.	Immunohistochimie	119
н.	Analyse statistique	121
III.	Resultats	122
A.	Validation du fractionnement synaptosomal	122
В.	Une période de PSM induit des variations d'activation et d'expression de marqueurs pré- et	
pos	stsynaptiques	123
C.	Effet d'une période de PSM sur les voies de signalisation phosphorylation / O-GlcNAcylation	. 126
IV.	Conclusions	132
V.	Article	134
<u>Ετι</u>	JDE 2 : IDENTIFICATION DE PROTEINES SYNAPTOSOMALES PRESENTANT UNE VARIATION DE O-GLCNACYLATIO	ON, DE
РНС	DSPHORYLATION OU D'EXPRESSION APRES UNE PERIODE DE PSM	135
١.	INTRODUCTION	135
١١.	Materiels et Methodes	136
A.	Animaux et prélèvements	136
В.	Fractionnement synaptosomal	136
C.	Électrophorèse bidimensionnelle (IEF – SDS - PAGE)	137
D.	Colorations et marquages	140
E.	Visualisation des protéines	142
F.	Analyse différentielle avec le logiciel SameSpots	142
G.	Coloration au bleu colloïdal	143

Н.	Digestion trypsique « in gel »	144
I.	Extraction des protéines d'intérêts	144
J.	Analyse par spectrométrie de masse de type nano-LC-MS (nano liquid chromatography – mas	S
spe	ectrometry)	144
III.	Resultats	146
A.	Optimisation du fractionnement synaptosomal	146
В.	Optimisation de la 2-DE sur les protéines synaptosomales	147
C.	Optimisation de la détection du O-GlcNAcome, du phosphoprotéome et du protéome total d	es
pro	téines synaptosomales	152
D.	Conclusion de l'optimisation 2-DE et des différents marquages et colorations des protéines	
syn	aptosomales	154
E.	Analyse protéomique différentielle sur le logiciel SameSpots	155
F.	Identification par spectrométrie de masse	158
IV.	Conclusions	161
<u>Ет</u>	ide <u>3 :</u> Analyse cinetique de la plasticite synaptique au cours d'une periode de PSM et d'une phas	E DE
REC	UPERATION « NORMOGRAVITAIRE »	.164
١.	INTRODUCTION	164
١١.	Materiels et Methodes	165
A.	Animaux et traitements	165
В.	SDS-PAGE et Western blot	166
C.	Analyse statistique	167
III.	RESULTATS	167
IV.	Conclusions	173
<u>Res</u>	SULTATS COMPLEMENTAIRES DE L'ETUDE 3 : EVOLUTION DU PROFIL DE O-GLCNACYLATION DE PROTEINES	
SYN	APTIQUES AU COURS D'UNE PERIODE DE PSM ET D'UNE PHASE DE RECUPERATION « NORMOGRAVITAIRE »	.177
١.	INTRODUCTION	177
١١.	Materiels et Methodes	177
A.	Electrophorèse SDS-PAGE en présence de WGA : séparation des différentes formes	
0-0	GlcNAcylées	177
В.	Electrophorèse SDS-PAGE en présence de Phos-Tag [™] : séparation des différentes formes	
pho	osphorylées	178
III.	RESULTATS	179
V.	Conclusions	183

ΡΑ	PARTIE 2 : ANALYSE FONCTIONNELLE184		
<u>Ет</u> ц	JDE 4 : MODULATION DES TAUX DE O-GLCNACYLATION DANS LE CORTEX SENSORIMOTEUR	185	
١.	INTRODUCTION	185	
١١.	Materiels et Methodes	185	
A.	Animaux et traitements	185	
В.	Perfusion corticale chronique de Thiamet G	185	
C.	SDS-PAGE et Western blot et immunohistochimie	186	
III.	Resultats	187	
<u>Ετι</u>	JDE 5 : EFFETS D'UNE MODULATION CORTICALE DES TAUX DE O-GLCNACYLATION SUR LA CARTOGRAPHIE		
CO	RTICALE SENSORIELLE (ANALYSE ELECTROPHYSIOLOGIQUE <i>IN VIVO</i>)	190	
I.	INTRODUCTION	190	
١١.	MATERIELS ET METHODES	191	
A.	Les animaux	191	
В.	Procédure chirurgicale	191	
C.	Enregistrements électrophysiologiques de l'activité cellulaire corticale	192	
D.	Représentation de l'aire corticale de la patte postérieure	192	
E.	Taille des champs récepteurs cutanés	193	
F.	Le seuil d'excitation neuronale	193	
G.	Analyse statistique	193	
III.	RESULTATS	194	
IV.	Conclusions	198	
<u>Ετι</u>	JDE 6 : EFFETS D'UNE MODULATION CORTICALE DES TAUX DE O-GLCNACYLATION SUR LES PERFORMANCES		
мо	TRICES (ANALYSE COMPORTEMENTALE)	199	
١.	INTRODUCTION	199	
II.	MATERIELS ET METHODES	200	
A.	Les animaux	200	
В.	Les tests moteurs	201	
C.	Analyse statistique	202	
III.	RESULTATS	202	
IV.	Conclusions	214	
<u>Ετι</u>	JDE 7 : EFFET D'UNE MODULATION CORTICALE DU TAUX DE O-GLCNACYLATION SUR LE PHENOTYPAGE DES		
MU	SCLES DE LA PATTE POSTERIEURE (RESULTATS PRELIMINAIRES)	215	
١.	INTRODUCTION	215	
II.	MATERIELS ET METHODES	216	

A.	Les animaux	216
B.	Prélèvement musculaire	216
C.	Immunohistochimie	216
III.	RESULTATS	217
IV.	CONCLUSIONS	224

DISCUSSION GENERALE	
---------------------	--

Les acteurs de la plasticite synaptique induite par une PSM	.228
DYNAMIQUE MOLECULAIRE DE LA PLASTICITE SYNAPTIQUE INDUITE PAR UNE PSM	.232
PLASTICITE SYNAPTIQUE INDUITE PAR UNE PSM, UN ROLE POTENTIEL DE LA O-GLCNACYLATION ?	.234
VERS UNE REGULATION SUBTILE DE LA O-GLCNACYLATION AU COURS D'UNE PSM ?	.237
LA O-GLCNACYLATION PEUT-ELLE INFLUENCER LA REORGANISATION CORTICALE INDUITE PAR UNE PSM ?	.239
LA PREVENTION DE LA REORGANISATION CORTICALE PAR LA O-GLCNACYLATION PEUT-ELLE PREVENIR LA	
DEGRADATION DES PERFORMANCES MOTRICES ?	.242
LA O-GLCNACYLATION, UN ESPOIR THERAPEUTIQUE ?	.245

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES248

REMERCIEMENTS

Je remercie :

Le Pr Thomas Freret, le Dr Yoh'i Zennou-Azogui, le Pr Jean-René Cazalets, le Dr Malika Hamdane, le Dr Erwan Dupont et le Pr Marie-Hélène Canu de faire partie de mon jury; particulièrement le Pr Thomas Freret et le Dr Yoh'i Zennou-Azogui d'avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse.

Le **Pr Serge Berthoin**, directeur de l'EA7369, Unité de Recherche Pluridisciplinaire Sport, Santé et Société, pour m'avoir permis d'effectuer une grande partie de ma thèse dans les locaux neufs d'EURASPORT. Je le remercie également pour sa gentillesse et son accessibilité.

Le **Pr Bruno Bastide**, co-directeur de l'équipe 1 de l'EA7369, pour m'avoir acceptée dans l'équipe depuis mon stage de licence 3.

Le **Pr Marie-Hélène Canu** et le **Dr Erwan Dupont**, pour m'avoir encadrée tout au long de cette thèse. Je vous remercie sincèrement pour votre gentillesse, votre patience, votre disponibilité et vos encouragements dans les bons comme les mauvais moments. Vous m'avez permis d'acquérir une rigueur et un esprit scientifique au cours de ces années, que j'espère appliquer aussi bien pour la suite grâce à vos conseils. Outre le travail scientifique, vous avez tous deux été très accessibles humainement et m'avez beaucoup soutenue. Ces quelques lignes ne seront jamais assez suffisantes pour vous témoigner toute la gratitude et le respect que je vous porte...

Le **Dr Caroline Cieniewski-Bernard**, pour les nombreux conseils techniques sur la protéomique et la O-GlcNAcylation, et pour les gâteaux !

Encore une fois, le **Dr Yoh'i Zennou-Azogui** et le **Dr Malika Hamdane** pour avoir accepté de faire partie de mon Comité de Suivi Individuel, pour vos conseils précieux et vos remarques pertinentes qui ont fait avancer cette thèse.

Le Dr **Sophie Duban-Deweer** et **Elodie Richard** pour leur aide concernant les nombreuses analyses en spectrométrie de masse et les images en microscopie confocale.

La team du RDC, **Emilie**, **Justine**, **Sylvain**, **Virginie**, **Adrien**, pour votre aide dans les démarches administratives, et surtout les cafés, les rires et les bons moments... merci beaucoup ! Avec le temps vous êtes devenus plus que des collègues de travail, vous êtes pour moi de vrais amis. J'espère avoir de vos nouvelles pendant encore longtemps !

Les **étudiants de notre laboratoire**, pour votre présence et votre bonne humeur. Aux anciens qui m'ont bien manqués pendant ces 2-3 dernières années : Julien Mysoet et Matthias Lambert. Et à l'ensemble de la team étudiante STAPS : Samir, Medhi, Baptiste, Agathe, Elodie....

Les techniciennes, merci à **Laëtitia** pour les nombreuses heures que tu as passées à analyser les muscles, **Valérie** et **Julie** pour m'avoir autant aidée dans l'animalerie et **Annie** pour sa grande gentillesse et son aide précieuse dans la vie du laboratoire.

Celles et ceux qui me sont chers et que j'ai quelque peu délaissés ces derniers mois pour achever cette thèse. Je suis redevable à mes parents, **Corinne et Pierre Fourneau**, ainsi qu'à ma sœur, **Delphine Fourneau**, pour avoir été à mon écoute et m'avoir soutenue jusqu'au bout. Je souhaite remercier aussi mes amis, **Alice** et **Antonin**, **Doëtte** et **Florian**, **Ondine**, ... heureusement que vous étiez là ! Enfin, mes remerciements ne vont pas à Johnny H., qui a bien démoralisé les étudiants doctorants du labo avec sa chanson « J'ai oublié de vivre »...

ABREVIATIONS

2-DE: Electrophorèse bidimensionnelle, 134 ACh: acétylcholine, 46 ACN: Acétonitrile, 143 AMPA: acide α-amino-3-hydroxy-5-méthyl-4isoxazolepropionique, 44 APS: Persulfate d'ammonium, 176 ASB-14: Amino-sulfobetaine-14, 135 BSA: Albumine de sérum bovin, 115 C: Contrôle, 111 CaMK: Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase, 78 CHAPS: 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1propanesulfonate, 135 CPG: central pattern generator, 71 CREB: C-AMP Response Element-binding protein, 88 DAPI: 4',6-diamidino-2-phénylindole, 118 DTT: Dithiothréitol, 134 ECL: Enhanced chemiluminescence, 116 EDL: extenseur long des doigts, 54 EDTA: acide éthylène diamine tétraacétique, 112 GABA: acide y-aminobutyrique, 45 GAD: acide glutamique décarboxylase, 45 HEPES: acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique, 113 HH: hypodynamie-hypokinésie, 41 HU: Hindlimb unloading, 41 IEF: Isoélectrofocalisation, 135 IGF-1: Insulin-Like Growth Factor-1, 46 IRMf: Imagerie par résonance magnétique fonctionnelle, 41 KO: Knockout, 102 LTD: Dépression à long terme, 44 LTP: Potentialisation à long terme, 44 M1: Cortex moteur primaire, 49 MAPK/ERK1/2: Mitogen-Activated Protein Kinases/Extracellular signal-Regulated Kinases 1/2, 47 MGEA5: meningioma-expressed antigen 5, 93 mOGT: OGT mitochondriale, 93 MS: Spectrométrie de masse, 144

nano-LC-MS: nano liquid chromatography - mass spectrometry, 144 ncOGT: OGT nucléocytoplasmique, 92 NGF: Nerve Growth Factor, 46 NMDA: acide N-méthyl-D-aspartique, 44 OGA: O-GlcNAcase, 9 O-GlcNAc: N-acétyl-D-glucosamine, 90 OGT: O-GlcNAc transférase, 90 PFA: Paraformaldéhyde, 117 PI3K: PhosphoInositide 3-Kinase, 47 PKA: Protein Kinase A, 78 PSD-95: « postsynaptic density protein-95 », 44 PSM: Perturbation sensorimotrice, 18 PUGNAc: O-(2-Acetamido-2-deoxy-Dglucopyranosylidenamino) N-phenylcarbamate, 112 S1: Cortex somesthésique primaire, 49 SAI: « Slow Adapting I », 28 SAII: Slow Adapting II, 29 SDS: Dodécylsulfate de sodium, 114 SEM: Ecart standard à la moyenne, 165 SNARE: soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor receptor, 78 TBP: Tributylphosphine, 135 TEMED: Tetraméthyléthylènediamine, 176 TFA: Acide trifluoroacétique, 143 TNE: tampon Tris Sodium EDTA, 114 TPR: tetratricopeptide repeat, 92 UDP-GlcNAc: uridine diphosphate-N-acétylglucosamine, 91 WGA: Wheat germ agglutinin, 176

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Illustration des principaux risques liés à une période d'inactivité physique.

Figure 2 : Les différents modèles de PSM chez l'Homme.

Figure 3 : Les différents modèles de PSM chez l'animal.

Figure 4 : Représentation schématique des différents mécanorécepteurs cutanés.

Figure 5 : Représentation schématique d'un fuseau neuromusculaire et d'un organe tendineux de Golgi et de leurs innervations sensorimotrices associées.

Figure 6 : Innervation sensorielle de la patte postérieure de rat par les nerfs sciatique et saphène, du pied à la cheville.

Figure 7 : Organisation anatomofonctionnelle de la moelle épinière.

Figure 8 : Localisation des zones de projection des afférences cutanées et proprioceptives au niveau des noyaux des colonnes dorsales, du thalamus somesthésique et du cortex somesthésique primaire.

Figure 9: Organisation somatotopique des noyaux des colonnes dorsales, du thalamus somesthésique et du cortex somesthésique primaire.

Figure 10 : Représentation schématique des 6 couches corticales caractéristiques du cortex cérébral et des populations de neurones qui les composent réalisée à partir de colorations de Golgi et de Nissl.

Figure 11 : Illustration de la diminution de la représentation corticale sensorielle de la patte postérieure et de l'élargissement des champs récepteurs cutanés chez les rats HH.

Figure 12 : Illustrations schématiques des mécanismes de la plasticité dépendant de l'expérience dans le cortex somesthésique.

Figure 13 : Organisation anatomofonctionnelle du cortex moteur primaire du rat.

Figure 14 : Représentation corticale de la patte postérieure et de ses différentes articulations (hanche, genou, cheville et doigts).

Figure 15 : Représentation schématique simplifiée des différentes voies motrices directe et indirectes chez le rat.

Figure 16 : Schéma récapitulatif des projections des motoneurones des muscles de la patte postérieure du rat dans les différentes colonnes motrices.

Figure 17 : Propriétés des différents types de fibres musculaires.

Figure 18 : Coupes transversales de muscles soléaires avec une coloration de l'ATPase de myosine d'un rat contrôle et d'un rat HH.

Figure 19 : Illustration des représentations corticales motrices de la patte postérieure d'un rat contrôle et d'un rat HH.

Figure 20 : Dynamique des épines dendritiques après un apprentissage moteur ou une période de 14 jours d'HH chez le rat.

Figure 21 : Schéma simplifié du traitement spinal de la composante monosynaptique du réflexe H.

Figure 22 : Altération du patron locomoteur après une période de PSM.

Figure 23 : Représentation schématique du compartiment présynaptique et du cycle exo-endocytose des vésicules synaptiques.

Figure 24 : Structure de la synapsine 1 et localisation de ses différents sites de phosphorylation.

Figure 25 : Structure et fonction de la synaptotagmine 1.

Figure 26 : Structure des sous-unités GluA1 et GluA2 des AMPAR et localisation des sites de différentes modifications post-traductionnelles.

Figure 27 : Illustration des acteurs moléculaires et des mécanismes impliqués dans la LTD et la LTP.

Figure 28 : Arrangement et structure des sous-unités GluN1 et GluN2 des NMDAR.

Figure 29: Structure de PSD-95 et sites de liaison à différentes protéines de la densité postsynaptique.

Figure 30 : Activation des voies de signalisation CaMKII et MAPK/ERK1/2 et leurs différents rôles au niveau de la synapse.

Figure 31 : Mécanisme de la O-GlcNAcylation d'une protéine.

Figure 32 : Voie de biosynthèse des hexosamines menant à la synthèse de l'UDP-GlcNAc, nécessaire à la O-GlcNAcylation des protéines.

Figure 33 : Structure des différentes isoformes de l'OGT.

Figure 34 : Structure des deux isoformes de l'OGA.

Figure 35 : Principales fonctions cellulaires régulées par la O-GlcNAcylation.

Figure 36 : Différentes possibilités d'interaction entre la phosphorylation et la O-GlcNAcylation au sein d'une même protéine.

Figure 37 : Localisation des protéines O-GlcNAcylées et de l'OGT au niveau de différentes régions cérébrales et types neuronaux.

Figure 38 : Les différentes fonctions de la O-GlcNAcylation au niveau synaptique.

Figure 39 : Localisation des structures cérébrales étudiées.

Figure 40: Enrichissement de protéines synaptiques dans les synaptosomes du cortex sensorimoteur.

Figure 41 : Validation de l'enrichissement de protéines synaptiques dans les synaptosomes du cortex sensorimoteur.

Figure 42 : Phosphorylation et expression totale des protéines présynaptiques après une période de PSM.

Figure 43 : Phosphorylation et expression totale des protéines postsynaptiques après une période de PSM.

Figure 44 : Phosphorylation et expression des voies de signalisation après une période de PSM.

Figure 45 : Expression et localisation de protéines O-GlcNAcylées dans le cerveau de rat.

Figure 46 : Taux d'expression des protéines O-GlcNAcylées et des enzymes OGT/OGA après une période de PSM.

Figure 47 : Taux de O-GlcNAcylation de la synapsine 1 et de CaMKII dans différentes fractions du cortex sensorimoteur après une période de PSM.

Figure 48 : Schéma hypothétique des changements induits par une période de PSM de 14 jours.

Figure 49: Représentation schématique des principales étapes et validations du protocole en gradient de Percoll.

Figure 50 : Détermination de la quantité de protéines synaptosomales.

Figure 51 : Optimisation de l'étape de réhydratation.

Figure 52 : Protocoles testés pour l'optimisation IEF et SDS-PAGE de l'échantillon de protéines synaptosomales.

Figure 53 : Détermination du tampon de migration optimal.

Figure 54 : Marquage des résidus O-GlcNAc par l'Alexa Fluor[®] 488 et coloration des protéines synaptosomales phosphorylées.

Figure 55 : Optimisation de la détection du protéome total.

Figure 56 : Détection multiple du protéome total, de l'O-GlcNAcome et du phosphoprotéome de protéines synaptosomales.

Figure 57 : Résumé des résultats de l'analyse protéomique différentielle obtenus avec le logiciel SameSpots.

Figure 58 : Diagramme représentant la proportion des différents types de protéines identifiées par spectrométrie de masse, au sein des synaptosomes du cortex sensorimoteur.

Figure 59 : Analyse cinétique de la plasticité corticale au cours d'une période de PSM de 1, 7 et 14 jours, suivi d'une phase de récupération « normogravitaire » de 6 h (R+6 h) ou 1 jour (R+1J).

Figure 60 : Phosphorylation et expression totale de protéines présynaptiques après 1, 7 et 14 jours de PSM et après 6 h et 1 jour de récupération « normogravitaire ».

Figure 61 : Phosphorylation et expression totale des protéines postsynaptiques après 1, 7 et 14 jours de PSM et après 6 h et 1 jour de récupération « normogravitaire ».

Figure 62 : Expression totale des protéines d'échafaudage après 1, 7 et 14 jours de PSM et après 6 h et 1 jour de récupération « normogravitaire ».

Figure 63 : Expression totale d'une protéine d'adhésion trans-synaptique après 1, 7 et 14 jours de PSM et après 6 h et 1 jour de récupération « normogravitaire ».

Figure 64 : Taux d'expression totale des protéines du cytosquelette après 1, 7 et 14 jours de PSM et après 6 h et 1 jour de récupération « normogravitaire ».

Figure 65: Résumé des changements pré- et postsynaptiques, ainsi que du cytosquelette et de la protéine trans-synaptique (N-cadhérine) au cours d'une phase « d'induction » de J1 à J7 et d'une phase de « maintien » représentée à J14 d'une période de PSM, et au cours d'une période de récupération « normogravitaire » de 6 h et 1 jour.

Figure 66 : Schéma du principe d'une électrophorèse SDS-PAGE en présence de WGA.

Figure 67 : Représentation schématique de l'électrophorèse SDS-PAGE en présence de Phos-tag[™].

Figure 68 : Taux d'expression des protéines O-GlcNAcylées et de l'enzyme OGT après 1, 7 et 14 jours de PSM et après 6 h et 1 jour de récupération « normogravitaire ».

Figure 69 : Etude des profils de phosphorylation et de O-GlcNAcylation par l'utilisation de gels Phos-Tag et WGA.

Figure 70 : Taux de O-GlcNAcylation de la synapsine 1 après 1, 7 et 14 jours de PSM et après 6 h et 1 jour de récupération « normogravitaire ».

Figure 71 : Effet de différentes concentrations de Thiamet G (0, 50, 100, 250 et 500 μ M) sur les taux de O-GlcNAcylation et de l'OGT au niveau des protéines synaptosomales des cortex sensorimoteurs droit et gauche chez des rats contrôles.

Figure 72 : Localisation des mosaïques d'images réalisées sur les coupes longitudinales de l'hémisphère droit du cerveau de rat.

Figure 73 : Mosaïques d'images du cortex droit des rats recevant du Thiamet G à des doses de 0 μ M, 50 μ M, 100 μ M, 250 μ M et 500 μ M après un marquage de la O-GlcNAcylation.

Figure 74 : Effets d'une période de PSM et/ou d'une perfusion chronique de ThG sur la plasticité des cartes corticales sensorielles.

Figure 75 : Effets d'une période de PSM et/ou d'une perfusion chronique de ThG sur la taille des champs récepteurs cutanés de la patte postérieure.

Figure 76 : Effet d'une période de PSM et ou d'une perfusion chronique de ThG sur le seuil d'excitabilité.

Figure 77 : Cinétique d'évaluation des performances motrices au cours d'une période de perturbation sensorimotrice de 3, 7 et 14 jours, suivie d'une phase de récupération « normogravitaire » de 3 (R+3J) ou 7 jours (R+7J).

Figure 78 : Effet d'une période de PSM et d'une perfusion chronique de ThG sur l'activité spontanée et le nombre de redressements chez le rat, et conséquences sur la phase de récupération fonctionnelle.

Figure 79 : Effet d'une période de PSM et d'une perfusion chronique de ThG sur le réflexe de retrait de la patte postérieure chez le rat testé avec un filament de von Frey électronique, et conséquences sur la phase de récupération fonctionnelle.

Figure 80 : Effet d'une période de PSM et d'une perfusion chronique de ThG sur la coordination motrice et la fatigabilité chez le rat testées avec le Rotarod, et conséquences sur la phase de récupération fonctionnelle.

Figure 81 : Représentations des phases d'appui et de transfert lors d'un cycle et diagramme pour le couplage temporel entre la patte avant (RF) et la patte arrière (RH) droites.

Figure 82 : Effet d'une période de PSM, d'une perfusion chronique de ThG et d'une période de récupération fonctionnelle sur les paramètres temporels de la marche, tels que la phase d'appui, la phase de transfert, le cycle de marche et la vitesse moyenne de passage.

Figure 83 : Effet d'une période de PSM, d'une perfusion chronique de ThG et d'une période de récupération fonctionnelle sur les paramètres spatiaux de la marche, tels que la distance entre les pattes postérieures et la longueur de l'enjambée.

Figure 84 : Effet d'une période de PSM, d'une perfusion chronique de ThG et d'une période de récupération fonctionnelle sur les paramètres des empreintes des pattes postérieures, tels que la surface des empreintes des pattes postérieures et l'intensité maximale au contact maximal.

Figure 85 : Effet d'une période de PSM, d'une perfusion chronique de ThG et d'une période de récupération fonctionnelle sur les paramètres permettant d'analyser la coordination lors de la marche, tels que le couplage temporel des pattes droites ou gauches et l'index de régularité.

Figure 86 : Evolution du poids des muscles soléaires et EDL par rapport au poids du corps, au cours d'une période de PSM ou de récupération de 6h et 1J et lors d'une perfusion chronique de ThG au niveau du cortex sensorimoteur.

Figure 87 : Evolution de la surface des différents types de fibres musculaires (I, IIA, IIX et IIB) du muscle soléaire et de l'EDL au cours d'une période de PSM ou de récupération de 6 h et 1J et lors d'une perfusion chronique de ThG au niveau du cortex sensorimoteur.

Figure 88 : Caractérisation des différents isoformes de chaînes lourdes de myosine (MHC I, IIA, IIB) sur des coupes transversales de muscle soléaire de rat par immunohistochimie.

Figure 89 : Evolution de l'expression des différents isoformes de chaînes lourdes de myosine (MHC I, IIA, IIX et IIB) du muscle soléaire et de l'EDL au cours d'une période de PSM ou de récupération de 6 h et 1J et lors d'une perfusion chronique de ThG au niveau du cortex sensorimoteur.

Figure 90 : Synthèse des effets d'une PSM sur la plasticité synaptique et de la modulation des taux de O-GlcNAcylation sur la réorganisation corticale du cortex somesthésique et la dégradation des performances motrices induites par une PSM.

Figure 91 : Résumé du rôle de la O-GlcNAcylation dans la régulation des fonctions cérébrales.

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Liste des principales protéines neuronales O-GlcNAcylées découvertes, de leurs fonctions et de leurs rôles.

Tableau 2: Liste des anticorps primaires utilisés pour l'étude 1 en western blot.

Tableau 3 : Liste des anticorps primaires utilisés pour l'étude 1 immunohistochimique.

Tableau 4: Protocoles testés pour l'optimisation des étapes d'IEF et de SDS-PAGE sur des échantillons protéiques de synaptosomes.

Tableau 5 : Protocoles testés en SDS-PAGE – optimisation du tampon de migration pour des échantillons de protéines synaptosomales.

Tableau 6 : Liste des protéines identifiées par spectrométrie de masse, au sein des synaptosomes du cortex sensorimoteur.

Tableau 7 : Liste des anticorps primaires utilisés dans l'étude 3.

Tableau 8 : Liste des anticorps primaires utilisés pour analyser l'expression des isoformes de chaînes lourdes de la myosine.

RESUME

La sédentarité, un alitement prolongé, ou plus rarement un séjour en microgravité, sont des situations ayant en commun une perturbation de l'expérience sensorimotrice (PSM), se caractérisant par une forte réduction de l'activité motrice (hypokinésie) et une diminution de la charge corporelle s'exerçant sur les membres inférieurs (hypodynamie). Toutes ces situations conduisent à une dégradation de la posture et la locomotion, dont l'origine est à la fois musculaire et nerveuse. Des études réalisées sur un modèle de PSM chez le rat ont notamment montré des modifications au niveau du cortex sensorimoteur telles que des changements biochimiques, une réorganisation des cartes somatotopiques, des changements de morphologie des épines dendritiques... Cependant, les mécanismes sous-jacents ne sont pas tous élucidés.

Il est bien connu que la phosphorylation régule un large champ d'activités synaptiques conduisant à la neuroplasticité. Une autre modification post-traductionnelle qui interagit avec la phosphorylation est une glycosylation atypique, appelée O-GlcNAcylation. Cette glycosylation est réversible et dynamique, et intervient dans des processus neuronaux essentiels tels que l'activité synaptique, la morphogenèse neuronale, l'apprentissage et la mémoire. L'objectif principal de cette thèse a été d'étudier les mécanismes moléculaires de la plasticité synaptique du cortex sensorimoteur et d'examiner l'implication potentielle de la O-GlcNAcylation au cours d'une période de PSM.

Pour cela, un compartiment subcellulaire enrichi en protéines impliquées dans les fonctions synaptiques, le synaptosome, a été isolé. Tout d'abord, nous avons constaté qu'une période de PSM induit une variation d'expression (synaptophysine, PSD-95, AMPAR GluA2) et de phosphorylation (synapsine1, AMPAR GluA2) de protéines synaptiques, ainsi que de voies de signalisation (MAPK) dans le cortex sensorimoteur. La O-GlcNAcylation semble également être impliquée dans cette plasticité synaptique en régulant finement l'activité de protéines spécifiques telles que la synaspine1. Une étude complémentaire a permis de mettre en évidence que l'expression et l'activation de différentes catégories de protéines (protéines présynaptiques, récepteurs AMPA et NMDA, protéines d'échafaudage, cytosquelette) varient rapidement au cours des phases d'induction et de maintien de la plasticité corticale induite par une période de PSM, ainsi que lors d'une phase de récupération fonctionnelle. Pour compléter ces résultats, nous avons détecté les protéines O-GlcNAcylées, les phosphoprotéines et le protéome total sur un gel d'électrophorèse bidimensionnelle, et effectué une analyse protéomique différentielle des protéines synaptosomales dont les taux de O-GlcNAcylation et/ou phosphorylation et/ou expression totale sont modifiés suite à des changements de l'expérience sensorimotrice. Cette méthode a permis d'identifier par spectrométrie de masse des marqueurs importants de la plasticité corticale induite par une période de PSM.

Enfin, nous voulions étudier si une augmentation des taux corticaux de O-GlcNAcylation pendant la période de PSM grâce à l'administration de thiamet G, un inhibiteur très spécifique de la O-GlcNAcase, pouvait avoir des conséquences fonctionnelles (activité neuronale, comportement moteur...). Nous avons montré que cela permet de prévenir la réorganisation du cortex somesthésique, mais n'a que peu d'effet sur les performances motrices, ainsi que sur le phénotype musculaire.

En conclusion, l'ensemble de ces études montre que la O-GlcNAcylation, en interaction avec la phosphorylation, participe activement à la plasticité synaptique induite par une période de PSM.

ABSTRACT

Sensorimotor perturbation (SMP) is frequently encountered in various situations, such as a sedentary lifestyle, prolonged bed rest, or more rarely spaceflight, situations which are characterized by a strong reduction in motor activity (hypokinesia) and a decrease of weight-bearing of lower limbs (hypodynamia). They all lead to postural and locomotor issues, whose origin is both muscular and nervous. Studies performed in a SMP rat model have shown changes in the sensorimotor cortex such as biochemical changes, somatotopic maps reorganization, morphological modifications of dendritic spines.... However, the underlying mechanisms are still unclear.

It is well known that phosphorylation regulates a wide field of synaptic activity leading to neuroplasticity. Another posttranslational modification that interplays with phosphorylation is an atypical glycosylation, termed O-GlcNAcylation. This glycosylation is reversible and dynamic, and is involved in essential nervous processes such as synaptic activity, neuronal morphogenesis, learning and memory. The main objective of this thesis was to study the molecular mechanisms of synaptic plasticity of the sensorimotor cortex and to examine the potential involvement of O-GlcNAcylation during a SMP period.

For this purpose, a subcellular compartment enriched in proteins involved in synaptic functions, the synaptosome, was isolated. A period of SMP induces changes in expression (synaptophysin, PSD-95, AMPAR GluA2) and phosphorylation (synapsin1, AMPAR GluA2) of synaptic proteins, as well as MAPK phosphorylation. O-GlcNAcylation also appears to be involved in this synaptic plasticity by finely regulating the activity of specific proteins such as synaspin1. A complementary study showed that expression and activation of different categories of proteins (presynaptic proteins, AMPA and NMDA receptors, scaffolding proteins, cytoskeletal proteins) change during the induction and maintenance phases of cortical plasticity induced by a period of SMP, as well as during a functional recovery phase. To complete these results, we detected O-GlcNAcylated proteins, phosphoproteins and whole proteome on the same two-dimensional electrophoresis gel, and made a differential proteomic analysis of synaptosomal proteins whose O-GlcNAcylation and/or phosphorylation and/or total expression levels are modified following SMP. This method has allowed the identification by mass spectrometry of key markers of synaptic plasticity induced by a period of SMP.

Finally, we wanted to examine if a modulation of cortical O-GlcNAcylation by means of the highly selective O-GlcNAcase inhibitor thiamet-G, has functional consequences during SMP period (neuronal activity, motor behavior...). We have shown that this treatment prevents somatosensory cortex reorganization, but has only few effects on motor performances, as well as on the muscular phenotype.

In conclusion, all of these studies suggest that O-GlcNAcylation, in interaction with phosphorylation, participates actively in synaptic plasticity induced by SMP period.

INTRODUCTION GENERALE

Notre environnement a une influence déterminante sur notre mode de vie, nos comportements et sur notre état de santé (Booth et al 2001). Par exemple, la pratique d'une activité physique régulière à tout âge est reconnue comme un déterminant essentiel de l'état de santé des individus (Miles 2007). Or, notre société actuelle est organisée de telle sorte que la plupart des individus n'a pas besoin d'être physiquement actif au quotidien et développe un mode de vie sédentaire. La vie urbaine favorise la dépendance vis-à-vis de la voiture, mais elle décourage l'utilisation des modes de transports plus actifs comme la marche ou le vélo. Par ailleurs, alors que les opportunités d'activité physique dans la vie de tous les jours diminuent, l'offre de loisirs (télévision, jeux vidéo...), les progrès technologiques et l'automatisation des activités et tâches de nombreux métiers favorisent les comportements inactifs. En conséquence, ces comportements sédentaires augmentent d'année en année et sont associés à une mortalité plus élevée et au développement de pathologies chroniques, telles que le diabète de type 2, l'obésité, l'hypertension artérielle, l'ostéoporose et certains cancers (Tremblay et al 2010).

Le mode de vie sédentaire ne touche pas que les personnes adultes. En effet, différentes études indiquent de manière inquiétante que les comportements sédentaires débutent de plus en plus précocement, dans l'enfance ou l'adolescence (Simon et al 2005). Or, c'est à cet âge que se mettent en place les habitudes du futur adulte, en particulier celles relatives à l'activité physique. La situation des personnes âgées est encore différente, puisqu'avec le temps, des déficiences sensorielles, motrices et cognitives se développent naturellement. La dégradation de l'état de santé fragilise l'individu et peut ainsi induire une perte d'autonomie pour réaliser les activités du quotidien (Larras & Praznoczy 2018).

D'autres situations, indépendantes du mode de vie, peuvent conduire à une diminution de l'activité physique, voire à une **inactivité physique**. Plusieurs maladies neurologiques, telles que les lésions de la moelle épinière ou la sclérose en plaques, sont associées ou sont à l'origine de **troubles du mouvement**. De même, il est bien connu que les missions spatiales de longue durée et l'alitement prolongé induisent des altérations fonctionnelles dans de nombreux organes du corps humain, notamment des modifications de la fonction neuromusculaire. La sédentarité, l'inactivité physique, un alitement prolongé, ou plus rarement un séjour en microgravité, sont des situations qui peuvent progressivement conduire à un **déconditionnement physique**. Il s'agit d'un processus complexe de changements physiologiques à la suite d'une période d'inactivité ou d'une réduction de l'activité physique (Hughson & Shoemaker 2015). Le déconditionnement entraîne une perte de la capacité fonctionnelle à accomplir les activités de la vie quotidienne ; l'individu devient plus vulnérable physiquement, psychiquement voire socialement et plonge petit à petit dans le cercle vicieux du déconditionnement, dégrade sa qualité de vie et entraîne parfois des situations de handicap

précoces qui peuvent aboutir à une diminution de l'espérance de vie. La compréhension des processus délétères induits par une réduction de l'activité physique devient donc un enjeu majeur de la société actuelle, afin de permettre le développement des stratégies de prévention ou de récupération fonctionnelle pour améliorer la qualité de vie des patients.

De nombreuses études ont mis en évidence que les personnes incapables de faire de l'activité physique, comme les patients alités ou même les spationautes en voyage prolongé, perdent non seulement de la masse musculaire, mais leur système nerveux est également affecté. Toutefois, les effets d'une réduction de l'activité physique sur la **plasticité cérébrale**, cette incroyable capacité qu'a le cerveau à se réorganiser tout au long de la vie, sont encore mal connus à ce jour. Le point commun entre un violoniste, une personne plâtrée ou alitée ou une personne sédentaire est que tous ces individus présentent une **réorganisation profonde des représentations sensorielle et motrice de leur corps (somatotopie)** au niveau du cortex cérébral. Une étude révèle notamment que l'aire de représentation corticale de notre main (pouce) est réorganisée par l'usage du smartphone (Gindrat et al 2015). A l'inverse, une immobilisation ou un alitement prolongé, entraine une forte réduction de la surface de représentation du membre impliqué (Lissek et al 2009). Ainsi, la capacité fondamentale du système nerveux. Cette plasticité peut permettre une meilleure adaptation à son environnement (perceptions et discriminations tactiles, performances et habiletés motrices), mais elle peut aussi avoir des effets néfastes.

Depuis la découverte de la plasticité corticale chez l'adulte, différents mécanismes ont été avancés pour expliquer ces phénomènes (Buonomano & Merzenich 1998). Le cortex sensorimoteur est en effet constitué de réseaux neuronaux interconnectés en constante compétition. La neuroplasticité dépendante de l'expérience est finement régulée par des **mécanismes synaptiques** qui favorisent ou limitent l'activité neuronale. La dynamique de la plasticité cérébrale est alors possible à court et long termes grâce à des modifications d'activité neuronale et d'efficacité synaptique, au démasquage de synapses silencieuses, ou encore à des modifications morphologiques des épines dendritiques (Xerri 2008). Cependant, la compréhension des processus complexes et dynamiques qui contribuent à la plasticité synaptique reste très parcellaire.

La plupart des études de neuroplasticité moléculaire se sont portées sur une modification post-traductionnelle fondamentale et omniprésente : **la phosphorylation**. Pourtant, cette modification post-traductionnelle n'est pas la seule à moduler les différents aspects de la mécanistique cellulaire. Depuis une vingtaine d'années a émergé le concept d'une dynamique étroitement régulée entre la phosphorylation et une glycosylation atypique : **la O-GlcNAcylation**

Introduction générale

(Zeidan & Hart 2010). Comme pour la phosphorylation, cette modification post-traductionnelle est dynamique et réversible. La O-GlcNAcylation intervient, entre autres, dans l'expression des gènes, de la transcription à la traduction, la régulation de la signalisation intracellulaire ou le turn-over protéique (Hart et al 2011). Des études ont démontré récemment que des protéines neuronales peuvent être modifiées par la O-GlcNAcylation (Trinidad et al 2012). Toutefois, les investigations sur le rôle de la O-GlcNAcylation dans le système nerveux central concernent principalement l'hippocampe avec l'étude des processus d'apprentissage et de mémoire (Tallent et al 2009, Taylor et al 2014) ou des processus de dérégulation puisque la O-GlcNAcylation contribue à la physiopathologie de différentes maladies neurodégénératives (Ma et al 2017). Ainsi, dans le cadre de cette thèse, nous avons exploré l'importance de **ces deux modifications post-traductionnelles, la phosphorylation et la O-GlcNAcylation, dans la plasticité synaptique et les réorganisations corticales induites par une période de perturbation de l'expérience sensorimotrice. Nous avons en outre tenté d'évaluer les conséquences fonctionnelles d'une modulation de la O-GlcNAcylation au niveau cérébral sur les performances motrices.**

La première section de ce manuscrit est une revue de la bibliographie. Le premier chapitre correspond à la description des différentes situations induisant une perturbation de l'expérience sensorimotrice rencontrées « dans la vie courante » chez l'Homme et leurs conséquences physiologiques. Les différents modèles, humains comme animaux, permettant l'étude de ces phénomènes sont également décrits. Les *deuxième* et *troisième chapitres* présentent une description de l'organisation du système somesthésique, permettant la transmission et le traitement des informations sensorielles, et du système moteur, impliqué dans la réalisation de la commande motrice. Les données concernant les effets d'une perturbation sensorimotrice sur le système nerveux et le système musculaire, et leurs conséquences fonctionnelles sur les performances motrices sont exposées à la fin de chacune de ces parties. Le *quatrième chapitre* concerne les mécanismes moléculaires impliqués dans la plasticité synaptique. Une description de la O-GlcNAcylation et de son implication dans le système nerveux y est également détaillée.

La seconde section concerne les résultats expérimentaux. Elle est divisée en deux grandes parties, contenant respectivement trois et quatre études. Pour chaque étude, un résumé introductif, les groupes d'animaux et les techniques utilisés, les résultats et une brève conclusion de ces travaux seront présentés.

 La première partie correspond à une analyse protéomique de la plasticité synaptique du cortex sensorimoteur suite à une période de perturbation sensorimotrice. La première étude met en évidence les mécanismes moléculaires impliqués dans cette plasticité synaptique. Les résultats relatifs à ces travaux sont exposés dans l'article intitulé « Synaptic protein changes after a chronic period of sensorimotor perturbation in adult rats : a potential role of phosphorylation/O-GlcNAcylation interplay » publié en 2018 dans Journal of Neurochemistry. La deuxième étude consiste à identifier des marqueurs synaptiques, phosphorylés et/ou O-GlcNAcylés, jouant un rôle important dans la plasticité corticale induite par une période de perturbation sensorimotrice. La troisième étude apporte des données complémentaires aux deux premières études sur une cinétique des mécanismes moléculaires impliqués dans la plasticité synaptique au cours d'une période de perturbation sensorimotrice et d'une période de récupération.

✓ La deuxième partie est consacrée à l'analyse des conséquences corticales et comportementales d'une modulation des taux de O-GlcNAcylation pendant la durée de perturbation sensorimotrice. Ainsi, la quatrième étude de cette thèse permet de déterminer comment moduler précisément le taux de O-GlcNAcylation au niveau du cortex sensorimoteur. La cinquième étude concerne les effets d'une variation des taux corticaux de O-GlcNAcylation sur la plasticité du cortex somesthésique. Les effets de la modulation de la O-GlcNAcylation sur les performances motrices sont étudiés dans *la sixième étude.* Enfin, la *septième étude* apporte des résultats préliminaires quant à l'effet d'une modulation corticale de O-GlcNAcylation sur différentes propriétés musculaires.

La dernière section de ce manuscrit est consacrée à une discussion générale, dans laquelle nous avons tenté d'apporter une analyse critique de ces travaux de thèse. Des perspectives de ce projet seront également proposées dans cette section.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Les situations de perturbation de l'expérience sensorimotrice

A. Les situations de perturbation sensorimotrice dans « la vie courante »

La sédentarité, l'inactivité physique, un alitement prolongé, ou plus rarement un séjour en microgravité, sont des situations ayant en commun une **perturbation de l'expérience sensorimotrice** (PSM), se caractérisant par une forte réduction de l'activité motrice (hypokinésie) et une diminution de la charge corporelle s'exerçant sur les membres inférieurs (hypodynamie). Toutes ces situations entrainent l'apparition de modifications importantes des systèmes musculaire et somesthésique, qui conduisent à une dégradation des performances motrices, et notamment de la posture et la locomotion. Elles engendrent également des répercussions sur l'ensemble des fonctions physiologiques de l'organisme et peuvent entrainer de nombreuses complications cardiovasculaires, métaboliques ou encore musculosquelettiques (Brower 2009, Hamburg et al 2007, Warren et al 2010).

1. La sédentarité et l'inactivité physique

La sédentarité est aujourd'hui considérée comme une menace à part entière qui pèse sur notre santé au quotidien. En effet, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a estimé en 2002 que 60 à 85 % de la population mondiale était sédentaire. Le **comportement sédentaire** est défini, par l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses), comme « une situation d'éveil caractérisée par une dépense énergétique inférieure ou égale à la dépense de repos en position assise ou allongée ». La sédentarité ne ferait que s'accroître en raison du changement de notre mode de vie : que ce soit au bureau ou à la maison, nous passons de plus en plus de temps sur notre ordinateur, notre smartphone ou devant notre télévision. Par ailleurs, les progrès technologiques et l'automatisation font que les activités et tâches de nombreux métiers sont moins physiques dans notre société actuelle.

De plus en plus d'études s'intéressent aux causes et conséquences de la sédentarité. Il est reconnu qu'il existe une corrélation avec le surpoids, l'obésité, le diabète de type II ou l'hypertension. De plus, un manque d'activité physique doublerait les risques cardiovasculaires ainsi que de cancer, d'ostéoporose, de dépression et d'anxiété (Wilmot et al 2012). Pour l'observatoire national de l'activité physique et de la sédentarité (Onaps), un individu est sédentaire lorsqu'il passe 7 h et plus assis ou allongée dans la journée, ce qui concernerait 70 % des français. L'Onaps insiste sur le fait qu'être assis plus de 3 h par jour est responsable de 3,8 % des décès en France et que la sédentarité est reconnue par l'OMS comme l'un des dix facteurs de risque de mortalité globale.

Devant ces chiffres alarmants, de nombreux organismes et slogans ont été créés et diffusés au plus grand nombre, comme le programme national nutrition santé « Manger Bouger » initié par le Ministère Chargé de la Santé, afin d'alerter, informer et tenter d'inciter la population à être plus active. Cependant, l'activité physique à elle seule ne peut totalement compenser les effets délétères de la sédentarité. En effet, il faudrait faire au moins 1 h 30 à 2 h d'activité physique par jour pour observer des effets bénéfiques. Par ailleurs, peut venir s'ajouter à cette sédentarité le problème de **l'inactivité physique**. Selon l'OMS, en dessous de 2 h 30 d'activité physique hebdomadaire modérée (30 min/jour, 5 jours/semaine) ou de 1 h 15 d'activité physique intense (25 min 3 jours/semaine), on est considéré comme inactif. On peut donc être sédentaire et inactif, ce qui constitue un profil à haut risque pour la santé, ou bien sédentaire et actif, un profil intermédiaire en termes de risques.

2. L'alitement prolongé et le plâtrage

Un alitement prolongé, par exemple dans le cas d'une hospitalisation, est un exemple d'inactivité physique forcée. Il est reconnu qu'à la suite d'une opération ou de manière générale pour une maladie, les périodes de repos sont importantes et nécessaires. Par exemple, elles permettent une récupération musculaire, ou bien une réparation naturelle de tissus endommagés. Les phases de sommeil sont également critiques pour le bon fonctionnement des fonctions neurologiques ou immunitaires. Augmenter les temps de repos par un alitement semble donc être une stratégie thérapeutique attractive pour soigner des patients blessés ou malades. En effet, on peut considérer que (1) en évitant de faire des efforts physiques inutiles, les ressources métaboliques du corps peuvent être utilisées dans les processus de guérison et de rétablissement, (2) en réduisant la consommation d'oxygène par les muscles, l'oxygène peut être délivré préférentiellement aux organes endommagés, (3) chez les patients en hypotension, la position en décubitus peut améliorer le flux sanguin au niveau du système nerveux central, (4) en diminuant la pression sanguine et les exigences en consommation d'oxygène, l'alitement prolongé peut réduire les demandes métaboliques du cœur et prévenir des problèmes d'ischémie et d'arythmie, et enfin (5) un alitement prolongé diminue le risque de chutes graves chez des patients faibles et aide le corps à guérir d'une blessure ou d'une inflammation (Brower 2009).

Tous ces éléments laissent à penser que l'alitement prolongé est une solution idéale lors d'une hospitalisation. Cependant, le bon fonctionnement du corps humain nécessite une activité physique régulière, puisqu'elle a de nombreux effets bénéfiques sur l'ensemble des organes et systèmes physiologiques (Chieffi et al 2017, Hespanhol Junior et al 2015, Mitchell & Barlow 2011). Ainsi, si un alitement prolongé peut dans une certaine mesure favoriser la récupération, il est aussi

fréquemment associé à un manque d'effets bénéfiques de l'activité physique. Une longue période d'alitement peut de ce fait engendrer de sérieuses complications au niveau des systèmes cardiovasculaire, métabolique, articulaire, et musculaire... (Brower 2009).

Un certain nombre des effets bénéfiques comme délétères de l'alitement prolongé sont également rencontrés dans le cas d'une immobilisation d'un membre inférieur ou supérieur par **plâtrage**. En effet, un plâtrage permet au membre cassé de se régénérer et de guérir en le maintenant au repos. Cependant, le manque d'activité physique du membre immobilisé sur une période de quelques jours à quelques mois peut provoquer une atrophie musculaire, une perte de force, des problèmes articulaires, ou encore la compression de nerfs ou vaisseaux sanguins...

3. Le cas particulier des vols spatiaux

Un vol spatial est également une situation particulière de perturbation de l'activité sensorimotrice. En effet, sur Terre, l'organisme est constamment soumis à une force gravitationnelle et notre organisme a développé certains systèmes nous permettant de lutter contre l'attraction terrestre. Par exemple, certains de nos muscles sont dits « antigravitaires » (ou posturaux) et nous permettent de maintenir notre posture et notre équilibre en permanence. Par contre, lors de vols spatiaux, la force gravitationnelle est fortement diminuée et le corps du spationaute se retrouve en état d'apesanteur, ce qui le place en situation d'hypodynamie-hypokinésie.

Ces vols vont perturber les repères de notre organisme établis sur Terre. En effet, en l'absence de force gravitationnelle, les cellules de l'organisme sont moins soumises à des contraintes, ce qui perturbe leur organisation et leur stabilité qui se sont développées en fonction de la pesanteur terrestre. En conséquence, notre organisme va être amené à s'adapter à ce nouveau contexte de microgravité (Council 2006, Williams et al 2009). Par exemple, les phénomènes les plus marquants d'une longue période en microgravité sur le système cardiovasculaire, sont l'arrondissement du cœur de 10 % (Zhu et al 2015a), et au niveau musculaire, l'atrophie drastique des muscles antigravitaires (Narici & de Boer 2011).

B. Les effets néfastes d'une période de perturbation sensorimotrice sur le corps

Comportement sédentaire, période d'inactivité et alitement prolongé, ou encore séjour en microgravité, sont des situations de PSM qui entraînent de nombreux effets délétères plus ou moins graves sur l'ensemble de notre corps. Ces complications peuvent toucher le système cardiovasculaire, le métabolisme, le système nerveux ainsi que le système musculo-articulaire. Les risques liés à une période d'inactivité sont résumés dans la **Figure 1**.



Figure 1 : Illustration des principaux risques liés à une période d'inactivité physique. Une période de PSM peut avoir des répercussions sur le cœur et la vascularisation, le métabolisme glucidique, le cerveau (troubles mentaux), le système osseux et, les muscles et articulations.

1. Atteintes cardiovasculaires

Plusieurs études mettent en évidence qu'un comportement sédentaire est associé à une insuffisance cardiaque sur le long terme. De plus, le temps passé à être sédentaire devant la télévision (Dunstan et al 2009) ou assis en voiture (Warren et al 2010) par exemple est associé à une augmentation du risque de développement de maladies cardiovasculaires. En effet, dans une étude de Warren et ses collègues, les sujets qui ont déclaré avoir été plus de 10 h par semaine dans une voiture ou avoir eu un comportement sédentaire pendant une durée supérieure à 23 h par semaine combinés présentaient 82 % et 64 % de risques supplémentaires de mourir de maladies cardiovasculaires (Warren et al 2010).

Une période de sédentarité ou d'inactivité prolongée a également tendance à favoriser un ralentissement considérable de la circulation sanguine, ce qui se définit par une stase veineuse. Lors d'un alitement prolongé par exemple, une compression soutenue des veines, qui résulte d'un contact prolongé des membres avec le lit, peut contribuer à la stase et endommager l'endothélium vasculaire. Par conséquent, l'alitement prolongé est un facteur de risque important de maladie thromboembolique (Geerts et al 2004).

De plus, les modes de vie sédentaires sont associés à un dysfonctionnement de l'endothélium vasculaire systémique, qui peut contribuer à l'athérogenèse (formation d'athéromes – lésions de la surface interne des artères) (DeSouza et al 2000, Widlansky et al 2003). Après 5 jours d'alitement, les réponses hyperémiques (accroissement du flux sanguin) chez les sujets normaux sont également émoussées. Ceci suggère qu'il y a un dysfonctionnement endothélial, car les réponses hyperémiques vives, normales à l'occlusion vasculaire, dépendent en partie de la fonction endothéliale. De plus, le diamètre de l'artère pulmonaire diminue suite à un alitement prolongé, et ceci est associé à une diminution du débit artériel pulmonaire et à une augmentation de la pression artérielle systolique. Ainsi, la résistance vasculaire systémique augmente avec un alitement prolongé (Brower 2009, Hamburg et al 2007).

2. Atteintes métaboliques

Une étude a mis en évidence que le temps passé devant la télévision est corrélé avec l'adiposité abdominale (augmentation du tour de taille) et les taux de triglycérides à jeun et des marqueurs d'insulinorésistance (insulinémie à jeun, mesure du glucose 2 h post-prandial) (Dunstan et al 2007, Ford et al 2010, Healy et al 2007). Hamburg et ses collègues se sont notamment intéressés à l'effet d'un alitement de 5 jours sur différentes composantes métaboliques : taux d'insuline, de glucose, de triglycérides sanguins et le poids corporel (Hamburg et al 2007). Bien que le poids ne semble pas changer après ces 5 jours, la glycémie et l'insulinémie dans le sang après un repas ou à jeun sont plus élevées qu'avant les 5 jours d'alitement. Ces résultats suggèrent qu'une insulinorésistance survient quelques jours après le début de l'alitement. L'alitement a également été associé à une augmentation significative des concentrations sanguines de cholestérol et de triglycérides. Des résultats similaires sont observés après 6 à 7 jours d'alitement (Stuart et al 1988).

3. Atteintes neurologiques

Un alitement prolongé de 7 à 70 jours ne semble pas avoir d'effet sur les résultats de différents tests cognitifs évaluant le temps de réaction simple, l'arithmétique mentale, la mémoire à court terme et les fonctions exécutives (Lipnicki & Gunga 2009).

Par contre, une période d'inactivité est fortement associée à la dépression et l'anxiété (Bonnet et al 2005). Une étude a mesuré la relation entre le temps passé assis ou allongé et le risque de dépression. L'étude a révélé que ceux qui ont déclaré une plus grande quantité de temps sédentaire avaient des risques plus élevés de développer des symptômes dépressifs (Sanchez et al 2008). De plus, une autre étude a mis en évidence que des participants ayant les plus hauts niveaux de sédentarité (plus de 42 h de temps passé par semaine devant la télévision ou un ordinateur) ont 31 % de risque d'avoir un trouble mental (dépression, bipolarité, anxiété ou stress) par rapport aux participants qui ont signalé de faibles niveaux de comportement sédentaire (moins de 10 h par semaine) (Sanchez-Villegas et al 2008).

4. Atteintes musculo-articulaires et osseuses

Beaucoup de survivants de maladies graves (nécessitant une hospitalisation ou un alitement de longue durée) se plaignent de faiblesse pendant des mois ou des années après leur sortie de l'hôpital. Des mesures objectives de la force musculaire montrent que les muscles des membres sont très faibles (De Jonghe et al 2002). Des tests musculaires fonctionnels, tels que faire une marche de 6 minutes par exemple, démontrent également des déficits significatifs (Herridge et al 2003). Plusieurs facteurs comme les dérèglements vasculaires et métaboliques ou encore une inactivité prolongée contribuent à l'affaiblissement des muscles squelettiques au cours de maladies graves (Lee Hough 2006, Stevens et al 2007). Cette perte de force musculaire serait due principalement à un catabolisme protéique et donc à une perte de masse musculaire (Brower 2009).

Un mode de vie de plus en plus sédentaire a été suggéré comme étant un facteur important contribuant à la prévalence accrue de l'ostéoporose (McGraw & Riggs 1994). La sédentarité est associée à une diminution de la densité minérale osseuse (Chastin et al 2014) ainsi qu'à une augmentation du risque de fracture de la hanche chez les personnes qui ont travaillé plus de 20 ans dans un métier à composante sédentaire (Jaglal et al 1995). Lors d'un alitement prolongé, on peut également observer une perte de l'amplitude des mouvements articulaires du squelette. En effet, dans une analyse rétrospective de dossiers cliniques entre 2003 et 2005, des douleurs articulaires ont été identifiées chez 61 des 155 patients ayant survécu à une maladie grave nécessitant des soins intensifs dans un hôpital pendant au moins 14 jours (Clavet et al 2008). Pour finir, ces troubles

musculo-articulaires peuvent participer à l'augmentation du risque de chutes observé chez les personnes sédentaires et âgées (Skelton 2001).

C. Les différents modèles expérimentaux

Du fait des contraintes expérimentales, du coût et du nombre limité de vols spatiaux, de nombreux modèles humains et animaux ont été développés pour mieux comprendre les effets de la microgravité sur la santé des spationautes. Ces différents modèles sont maintenant également utilisés afin de mieux comprendre les changements physiologiques d'une PSM dans la vie quotidienne (sédentarité et inactivité physique) et essayer de développer des contremesures visant à limiter ses effets délétères.

1. Les modèles chez l'Homme

L'alitement prolongé ou « bed rest »

L'alitement prolongé est l'une des premières méthodes utilisées permettant d'étudier concrètement les changements physiologiques associés au vol spatial. Cette situation reproduit notamment le manque d'activité physique des spationautes (Hargens & Vico 2016). Cette méthode consiste à placer un sujet en position horizontale avec une inclinaison de -6° (tête légèrement plus basse que les pieds) (Figure 2A). L'expérience peut durer de quelques jours à plusieurs mois. Ainsi, cette position du corps induit la mise en place de mécanismes similaires à ceux observés lors de l'adaptation à la microgravité. On peut ainsi citer la perte de poids corporel, la redistribution des fluides tissulaires vers la partie thoracocéphalique, la perte de pression hydrostatique et la diminution des apports sensoriels (Council 2006).

L'immersion sèche ou « dry immersion »

L'immersion sèche est un deuxième procédé très utilisé afin de mimer les effets d'une PSM. Cette méthode est simple, facile à reproduire et permet des études de longue durée. Une étude en immersion sèche peut durer de quelques jours à plusieurs mois consécutifs. L'expérience est réalisée dans une enceinte spéciale remplie d'eau (dimensions : 2,2 m de long x 1,1 m de large x 0,85 m de profondeur). La température du bain est généralement maintenue entre 32 et 34,5 °C. Un tissu mince, imperméable et hautement élastique, est attaché autour des bords externes de l'enceinte. Ce tissu permet au sujet d'être isolé de l'eau et de paraître « en apesanteur » dans la masse d'eau dans des conditions similaires à une absence totale de force gravitationnelle **(Figure 2B)** (Navasiolava et al 2011).

La suspension ou l'immobilisation unilatérale d'un membre inférieur

La suspension unilatérale d'un membre inférieur permet d'étudier plus spécifiquement les effets d'un déconditionnement sur les muscles posturaux des membres inférieurs (quadriceps femoris, triceps sural). Le premier modèle proposé par Berg (Berg et al 1991) consistait à équiper les sujets d'une chaussure à semelle surélevée (50 mm) et de béquilles de petite longueur [Figure 2C (1)]. En utilisant un harnais porté sur l'épaule et attaché à la chaussure, le membre est suspendu avec une légère flexion de l'articulation du genou, empêchant le contact avec le sol lors de mouvements. Aujourd'hui, le harnais n'est plus utilisé et la semelle a une épaisseur de 100 mm [Figure 2C (2)]. De cette façon, le membre suspendu adopte une position droite et il est libre de se déplacer passivement autour de la hanche (Tesch et al 2016).

Il existe également des modèles d'immobilisation unilatérale d'un membre inférieur ou supérieur. Dans ce cas, un membre et son articulation (cheville, genou, coude...) sont totalement plâtrés afin de bloquer les mouvements pendant quelques jours (Glover et al 2008, Magnus et al 2010). Dans cette situation, l'inactivité du membre immobilisé est plus drastique que dans le cas de la suspension unilatérale d'un membre ou un alitement prolongé.



Figure 2 : Les différents modèles de PSM chez l'Homme. (A) Modèle d'alitement prolongé, avec une position horizontale et une inclinaison du corps de -6°. (B) Modèle d'immersion sèche. (C) Modèle de suspension unilatérale d'un membre inférieur, (1) ancienne version avec une semelle de 50 mm et (2) nouvelle version avec une semelle de 100 mm. Adapté de Hargens & Vico 2016, Navasiolava et al 2011, Tesch et al 2016.

4. Les modèles animaux

Elévation du train postérieur ou « hindlimb unloading »

Ce modèle de PSM consiste à surélever le train postérieur d'un rat ou d'une souris par la queue (Morey et al 1979) ou par un système de harnais (Chowdhury et al 2013), empêchant tout contact des pattes postérieures avec le sol. Par conséquent, cette situation modifie la nature des informations proprioceptives et cutanées transmises au système nerveux (Figure 3A). Il a été accepté par la communauté scientifique comme le modèle animal de référence pour simuler les effets d'un vol spatial et donc la microgravité, et il présente plusieurs avantages. En effet, il permet de mimer les réponses physiologiques telles que (1) l'atrophie musculaire et (2) le déplacement des liquides corporels vers la partie thoracocéphalique. En outre, (3) ce modèle laisse à l'animal une liberté de mouvements pour manger et se toiletter avec les pattes antérieures, et (4) permet de prévenir l'utilisation des pattes postérieures sans paralysie. (5) Il offre la possibilité d'une phase de récupération par le retour en situation normogravitaire. Enfin (6) un gain de poids normal est observé chez les rats en croissance, et une perte de poids minime est rapportée chez les rats adultes tout au long de la période expérimentale (Morey-Holton & Globus 2002).

Immobilisation des membres postérieurs

Différents modèles d'immobilisation des pattes postérieures ont également vu le jour chez le rat ou la souris afin d'étudier les adaptations de l'organisme à des maladies chroniques et d'évaluer également les effets de la position du muscle (raccourcie ou étirée) durant une période d'inactivité prolongée (Figure 3B). Une des méthodes les plus utilisée pour l'immobilisation de l'animal est le plâtrage d'une ou des deux pattes postérieures (Booth & Kelso 1973, Williams 1988). Afin de limiter les effets délétères du plâtrage (ulcération ou gonflement de la peau, perte de poids importante...), d'autres matériaux peuvent être utilisés telles qu'un dispositif en maille d'acier et de coton (Coutinho et al 2002) ou une immobilisation en utilisant une fermeture auto-agrippante disponible dans le commerce (bande Velcro[®]) (Aihara et al 2017).

Contention

La contention chez l'animal est également une méthode non invasive permettant de mimer une période d'inactivité et les effets d'un aliment prolongé chez l'Homme. Cette méthode d'immobilisation, limitant la locomotion, n'est pas une nouvelle approche et a souvent été utilisée pour étudier les réponses aux stress (Carlson et al 1991, Catalani et al 2000, Jean Kant et al 1985). Elle consiste à utiliser une cage avec un volume très réduit (12 cm de long × 8 cm de large x 12 cm de hauteur) (Figure 3C), soit environ 80 % de réduction du volume total par rapport à une cage standard de rat adulte (Marmonti et al 2017).



Figure 3: Les différents modèles de PSM chez l'animal. (A) Modèle d'élévation du train postérieur (1) par la queue ou (2) par un harnais. (B) Modèle d'immobilisation (1) par plâtrage ou (2) par un dispositif en maille d'acier et de coton. (C) Boîte de contention ajustable. Adapté de Aihara et al 2017, Barbosa et al 2011, Chowdhury et al 2013, Coutinho et al 2002, Marmonti et al 2017.

II. <u>Plasticité du système somesthésique après une période de perturbation</u> sensorimotrice

Suite à une période de PSM, les informations tactiles et proprioceptives sont significativement modifiées. Cette perturbation des informations afférentes peut être à l'origine d'adaptations structurales et fonctionnelles à différents niveaux du système somesthésique : des nerfs périphériques jusqu'aux structures supraspinales telles que le cortex somesthésique primaire, en passant par les ganglions spinaux.

Dans cette partie seront décrites l'organisation anatomofonctionnelle du système somesthésique, ainsi que l'adaptation des différentes composantes de ce système en condition de PSM.

A. Organisation anatomofonctionnelle du système somesthésique

Les sensations somesthésiques sont provoquées par la stimulation de récepteurs sensoriels situés dans la peau au niveau de l'épiderme et du derme, mais aussi dans les muscles, les tendons et les articulations. Les sensations somesthésiques se répartissent en quatre modalités : tactiles, thermiques, nociceptives et proprioceptives. Dans le cadre de cette thèse, nous nous intéresserons plus particulièrement aux sensations suscitées par la stimulation de la surface de la peau, appelées **sensations cutanées**, et à la **proprioception**. L'ensemble de l'organisation du système somesthésique (ou moteur dans une prochaine partie) sera uniquement documenté à partir de travaux réalisés chez le rat.

Le système somesthésique est constitué par différentes structures nerveuses qui fournissent des informations provenant des récepteurs sensoriels au cortex cérébral. Celles-ci incluent (1) les récepteurs sensoriels et les neurones afférents primaires, (2) les voies spinales ascendantes, (3) les noyaux somesthésiques dans le tronc cérébral et le thalamus, et (4) les régions somesthésiques du cortex.

1. Notion de champ récepteur

La peau a une innervation afférente très riche grâce à la présence de nombreux récepteurs sensoriels. Ces récepteurs sensoriels ne sont pas uniformément répartis : ils sont nombreux dans certaines zones de la surface du corps, clairsemés dans d'autres. Par exemple, ils sont très riches au niveau de la face et des doigts et faiblement présents dans le dos. Ainsi, leur distribution est en relation avec l'importance fonctionnelle de chaque surface corporelle. Pour la sensibilité tactile, il est important de prendre en compte la présence **des champs récepteurs cutanés.** En effet, un champ récepteur correspond à la région cutanée dans laquelle un stimulus tactile évoque une réponse neuronale (Chapin 1986). Trois modalités permettent de les caractériser :

- (1) L'intensité : le plus petit stimulus capable d'évoquer une sensation tactile correspond à l'intensité seuil de la stimulation. Plus l'intensité de la stimulation est importante, plus l'intensité de la sensation tactile le sera également. De plus, il existe la notion de seuil différentiel : il s'agit de la plus petite variation d'intensité du stimulus tactile qui peut être perçue par le sujet.
- (2) La localisation : le seuil de discrimination spatial représente la distance minimale entre deux stimuli ponctuels pour qu'ils soient perçus comme séparés. Le pouvoir de discrimination est inversement proportionnel à la taille des champs récepteurs. Par exemple, le seuil de discrimination est maximal au bout des doigts, puisque la densité de mécanorécepteurs cutanés est importante au niveau de petits champs récepteurs.
- (3) La durée : un intervalle de temps minimum est nécessaire pour pouvoir discerner deux stimulations comme séparées.

2. Les mécanorécepteurs cutanés

Les sensations tactiles sont le toucher, la pression et la vibration. Ces sensations sont détectées par les terminaisons périphériques de neurones afférents primaires appelées **mécanorécepteurs cutanés**, dont le corps cellulaire se situe dans les ganglions spinaux de la racine dorsale de la moelle épinière.

Les mécanorécepteurs peuvent être classés selon leur vitesse d'adaptation aux stimuli mécaniques et la taille de leurs champs récepteurs (Figure 4) :

Les mécanorécepteurs à adaptation lente (« Slow Adapting ») s'adaptent lentement à un stimulus mécanique. On distingue deux catégories :

Les mécanorécepteurs à adaptation lente de type I (« Slow Adapting I » ou SAI) ont de petits champs récepteurs avec des limites bien définies. Au niveau de la patte postérieure, ils sont très denses au niveau des extrémités des orteils et des coussinets. Les mécanorécepteurs de type SAI seraient impliqués dans la discrimination tactile fine (spatiale). Les disques de Merkel font parti de cette catégorie. Ils sont localisés dans l'épiderme de la peau glabre et pileuse (Leem et al 1993).

Les mécanorécepteurs à adaptation lente de type II (« Slow Adapting II » ou SAII) ont de larges champs récepteurs avec des limites diffuses. Ils sont situés dans la peau glabre et pileuse, au niveau des articulations. Ils sont sensibles aux étirements (mouvements) cutanés et des articulations, et joueraient donc un rôle dans la proprioception. Les corpuscules de Ruffini sont des récepteurs encapsulés allongés, de type SAII, situés profondément dans le derme ainsi que dans les ligaments et les tendons. Ils ont de grands champs récepteurs localisés au niveau des articulations des orteils et de la cheville (Leem et al 1993).

Les mécanorécepteurs à adaptation rapide (« Rapidly Adapting ») s'adaptent rapidement aux stimuli mécaniques. On distingue :

- Les corpuscules de Meissner qui ont de petits champs récepteurs et sont logés dans les papilles du derme de la peau glabre au niveau des bouts des doigts et de la plante des pieds.
 Ce sont des récepteurs du toucher fin et de vibrations de faible fréquence. Leurs terminaisons nerveuses sont enfermées dans une capsule de tissu conjonctif (Leem et al 1993).
- Les corpuscules de Pacini qui ont de grands champs récepteurs. Ils sont retrouvés dans les couches profondes de la peau et sont associés aux membranes interosseuses. Ce sont des récepteurs encapsulés en lamelles d'oignon. Leurs champs récepteurs détectent des vibrations de haute fréquence (Leem et al 1993).
- Les follicules pileux qui sont aussi des récepteurs tactiles à adaptation rapide, mais pour le toucher grossier. On peut distinguer trois unités : *G-hair* (G pour guard, ou poil long), *D-hair* (D pour Down, ou poil court) et *field* (unité de champs) (Hamann 1995). Ils sont situés dans la peau pileuse et sont formés de terminaisons nerveuses libres enroulées autour de follicules pileux. Les plexus de la racine des poils détectent leurs mouvements à la surface de la peau.
- Les mécanorécepteurs de type C, ou fibres nerveuses libres, qui sont présents uniquement à la surface pileuse de la patte. Ce sont des récepteurs très sensibles au toucher et innervés par des fibres amyéliniques de type C (Hamann 1995, Leem et al 1993).

А

В



Figure 4: Représentation schématique (A) des différents mécanorécepteurs cutanés, variant selon leur structure, innervation et adaptation lente ou rapide. (B) Distribution spatiale des champs récepteurs provenant d'unité afférente A β de la patte postérieure innervée par le nerf sural. (C) Distribution spatiale des champs récepteurs provenant d'unité afférente A β de la patte postérieure innervée par le nerf sural. (C) Distribution spatiale des champs récepteurs provenant d'unité afférente A β de la patte postérieure innervée par le nerf plantaire. SA : *Slow Adapting* ; RA : *Rapidly Adapting* ; fibres A β : fibres myélinisées de gros diamètre de type A β ; Hair et Field : follicules pileux. Adapté de https://www.canstockphoto.fr/sensoriel-anatomie-r%C3%A9cepteurs-peau-25695008.html et Leem et al 1993.

3. Les récepteurs proprioceptifs

La **proprioception** désigne la perception de la position des différentes parties de notre corps et de leurs mouvements. Les sensations proprioceptives ont leur origine dans les propriocepteurs qui se trouvent dans les muscles (en particulier, les muscles posturaux), les tendons et les articulations. Ils réagissent au degré de contraction des muscles et de tension des tendons, à la position de nos articulations et permettent également d'estimer le poids des objets et de déterminer l'effort musculaire nécessaire à l'accomplissement d'une tâche. Puisque que les propriocepteurs s'adaptent lentement et faiblement, le cortex reçoit constamment des influx nerveux relatifs à la position des différentes parties du corps et accomplit en permanence les ajustements nécessaires à la coordination des mouvements.

Il existe trois types de récepteurs proprioceptifs :

- Le fuseau neuromusculaire (Figure 5A) correspond à la région centrale et encapsulée d'un groupe de fibres musculaires modifiées, appellées fibres intrafusales. L'innervation sensitive est constituée de fibres afférentes de type la et II. La principale fonction des fuseaux neuromusculaires consiste à être sensible à la variation de longueur des muscles, c'est-à-dire leur degré d'étirement. Les terminaisons du groupe II signalent une variation de longueur de la fibre musculaire (elles s'adaptent lentement), alors que les terminaisons du groupe I sont sensibles à la fois à la longueur et à la vitesse d'étirement du muscle (Hunt 1990).
- Les organes tendineux de Golgi (Figure 5B) sont des propriocepteurs situés à la jonction entre le tendon et les fibres musculaires. Ils sont formés d'une mince capsule de tissu conjonctif enveloppant quelques faisceaux de fibres de collagène. Une ou plusieurs terminaisons nerveuses de fibres afférentes de type Ib pénètrent dans la capsule et s'enroulent parmi les fibres de collagènes du tendon et autour d'elles. Les organes tendineux de Golgi sont sensibles aux variations de la tension neuromusculaire et donnent donc des informations sur la force musculaire (Jami 1992).
- Les récepteurs articulaires (Figure 5C) sont présents à l'intérieur et autour des capsules articulaires. Ils jouent un rôle important dans le contrôle de la position et du mouvement des articulations (Strasmann et al 1990).


A Fuseau neuromusculaire

Figure 5 : Représentation schématique (A) d'un fuseau neuromusculaire et (B) d'un organe tendineux de Golgi et de leurs innervations sensorimotrices associées. Adapté de Ober et al 2012 et Canu et al 2018.

4. Innervation sensorielle de la patte postérieure du rat

Les récepteurs sensoriels sont associés à différents nerfs sensitifs. Les pattes postérieures du rat sont notamment innervées par **les nerfs sciatique** et **saphène**. La distribution cutanée de l'innervation sensorielle de ces deux nerfs est constante et spécifique chez le rat. Le nerf sciatique innerve une grande partie de la surface cutanée de la patte postérieure comprenant : la surface plantaire entière, le tiers dorsolatéral de la surface pileuse, la partie latérale et la partie postéromédiane de la cheville. Le nerf saphène innerve la surface pileuse qui s'étend de la partie dorsale des orteils 1 à 3 jusqu'à la partie dorsomédiane du pied et de la cheville (Wall & Cusick 1984) **(Figure 6)**.



Figure 6 : Innervation sensorielle de la patte postérieure de rat par les nerfs sciatique et saphène, du pied à la cheville. Adapté de Wall & Cusick 1984.

5. La moelle épinière

Les corps cellulaires des neurones sensoriels des membres sont localisés dans **les ganglions de la racine dorsale**. Les projections du nerf sciatique se situent dans les segments L4 à L6 (L pour Lombaire), tandis que celles du nerf saphène se situent dans les segments L2 à L4 (Wall & Cusick 1984). Deux groupes de corps cellulaires peuvent être distingués selon leur taille et le diamètre de leur axone (Lawson et al 1984) : des grands neurones sont associés aux mécanorécepteurs de bas seuil, tandis que des petits neurones sont liés aux axones finement myélinisés ou amyélinisés des nocicepteurs et thermorécepteurs (Harper & Lawson 1985).



Figure 7 : Organisation anatomofonctionnelle de la moelle épinière. La moelle épinière est subdivisée en trois régions fonctionnellement différentes : la corne dorsale, la zone intermédiaire et la corne ventrale. L'ensemble de ces trois régions a été subdivisé en groupes nucléaires (sensitif ou moteur associé à somatique ou viscérale) et en 10 lames numérotées de I à X (couches de Rexed). La corne dorsale est associée au traitement de l'information sensorielle. Les groupes nucléaires correspondant au toucher fin et la proprioception se situent dans les lames I à III et VI. La corne ventrale contient des interneurones et des motoneurones innervant les muscles. Elle comprend les lames VIII et IX, correspondant au groupe nucléaire moteur somatique. La substance grise de la corne dorsale contient des interneurones et des neurones de projection relayant les afférences sensorielles vers les centres supérieurs. Adapté de Felten & Shetty 2011.

Au niveau de la racine dorsale, les fibres se séparent de sorte que les fibres amyélinisées se trouvent dans la partie latérale de la racine dorsale et se terminent dans les couches superficielles I à II de la corne dorsale, alors que les axones plus épais et myélinisés provenant des mécanorécepteurs cutanés sont situés dans la partie médiane de la racine et se terminent dans des lames plus profondes de la corne dorsale (Light & Perl 1979, Sugiura et al 1993, Woolf 1987) (Figure 7).

Plus précisément, les terminaisons des follicules pileux de la patte postérieure de rat se projettent jusqu'aux lames II à IV, celles des mécanorécepteurs à adaptation rapide se situent principalement dans la lame IV avec des ramifications dans les lames III et V, et les terminaisons des mécanorécepteurs à adaptation lente sont localisées dans la lame V avec des ramifications dans la lame IV (Woolf 1987).

6. Les voies somesthésiques

La voie des colonnes dorsales et la voie spinothalamique sont les deux principales voies ascendantes qui propagent les informations sensorielles provenant des récepteurs périphériques jusqu'au tronc cérébral, au thalamus somesthésique et au cortex somesthésique primaire.

La voie des colonnes dorsales

Les fibres afférentes conduisent les informations sensorielles provenant des mécanorécepteurs cutanés et des propriocepteurs via la voie des colonnes dorsales. Il existe une **voie directe** et une voie indirecte, appelée **voie postsynaptique**, où les afférences effectuent un relais avec des neurones spinaux situés dans la corne dorsale de la moelle épinière (lame IV). Cette 2^{ème} voie représente 30 à 40 % des neurones se projetant vers les noyaux des colonnes dorsales (Giesler et al 1984).

Les axones provenant des mécanorécepteurs cutanés des membres supérieurs, du tronc et du cou forment **le faisceau cunéiforme** dans la partie latérale des colonnes dorsales. Les afférences cutanés et musculaires provenant des membres inférieurs forment le **faisceau gracile** dans la partie médiane des colonnes dorsales (Bolton & Tracey 1992, Low et al 1986, Scheurer et al 1983, Ygge 1989). Ces afférences vont ensuite se projeter jusqu'à un 1^{er} relais, les noyaux des colonnes dorsales situés dans le tronc cérébral, puis à un 2^{ème} relais correspondant au thalamus somesthésique et enfin, jusqu'au cortex somesthésique primaire.

La voie spinothalamique

La voie spinothalamique est la 2^{ème} voie ascendante. Les fibres de cette voie propagent des informations essentiellement thermiques et nociceptives, et du toucher non discriminatif (Pubols & Haring 1995). Par cette voie, les projections provenant des mécanorécepteurs font synapse avec un autre neurone directement dans la moelle épinière. Ce neurone se connecte ensuite directement au thalamus somesthésique sans passer par les noyaux des colonnes dorsales du tronc cérébral.

7. Les noyaux des colonnes dorsales

Organisation anatomique et afférences

Les afférences sensorielles provenant de la voie des colonnes dorsales se projettent ensuite, via la moelle épinière, au niveau d'un 1^{er} relais, les **noyaux des colonnes dorsales** présents dans le tronc cérébral. Ce relais comprend le noyau gracile, le noyau cunéiforme, le noyau cunéiforme externe et le noyau Z (Figure 8A). Les afférences cutanées de la patte postérieure se terminent au niveau du noyau gracile (Ueyama et al 1994), tandis que les afférences musculaires se projettent sur le noyau Z (Low et al 1986). La voie postsynaptique des colonnes dorsales se superpose à celles de la voie directe au niveau des noyaux cunéiforme et gracile (Cliffer & Giesler 1989).



Figure 8: Localisation des zones de projection des afférences cutanées et proprioceptives au niveau (A) des noyaux des colonnes dorsales, (B) du thalamus somesthésique et (C) du cortex somesthésique primaire. Les zones en blanc représentent les afférences provenant de la peau, alors que les zones en bleu représentent les afférences provenant des muscles et articulations. ECu : noyau cunéiforme externe ; Cu : noyau cunéiforme ; Z : noyau Z ; Gr : noyau gracile ; Po : noyau postérieur ; VPM : noyau ventropostéromédian ; VPL : noyau ventropostérolatéral. Adapté de Tracey 2004.

Organisation somatotopique

Les fibres afférentes provenant des mécanorécepteurs cutanés se projettent de manière somatotopique dans les noyaux des colonnes dorsales (Figure 9A). La somatotopie correspond à une représentation topographique du corps, où les différentes zones de représentation ne sont pas proportionnelles à la taille réelle des parties du corps, mais plutôt à leur importance fonctionnelle. Au niveau des noyaux des colonnes dorsales, la queue est représentée dans la partie médiane du noyau gracile, tandis que l'épaule, le cou et les oreilles sont représentés dans la partie latérale du noyau cunéiforme. La représentation des pattes antérieures est considérablement plus large que le reste du corps en raison de leur densité d'innervation (Maslany et al 1991).



Figure 9: Organisation somatotopique (A) des noyaux des colonnes dorsales, (B) du thalamus somesthésique et (C) du cortex somesthésique primaire. Au niveau du thalamus, VPL : noyau ventropostérolatéral ; VPM : noyau ventropostéromédian ; Po : noyau thalamique postérieur ; GLd : noyau géniculé dorsolatéral ; Rt : noyau réticulaire thalamique ; CL : noyau centrolatéral. Au niveau du cortex somesthésique primaire, SI : cortex somesthésique secondaire ; DZ : zone dysgranulaire centrale ; PP : patte postérieur ; PA : patte antérieure ; FL : Flanc ; Q : queue. Adapté de Bolton & Tracey 1992, Fabri & Burton 1991, Maslany et al 1991.

Les efférences

La plupart des neurones des noyaux des colonnes dorsales se groupent pour former le lemnisque médian. Ils se projettent ensuite au niveau d'un 2^{ème} relais, le thalamus somesthésique.

8. Le thalamus somesthésique

Organisation anatomique et afférences

Les afférences provenant des noyaux des colonnes dorsales se projettent sur le complexe ventrobasal (VB) du thalamus somesthésique. Celui-ci est composé de deux parties : le noyau ventropostérolatéral (VPL) et le noyau ventropostéromédian (VPM) (Figure 8B).

Le VPL reçoit des afférences tactiles provenant du tronc et des membres et le VPM reçoit des afférences tactiles provenant de la tête via le noyau trigéminal **(Figure 8B)**. D'autres parties du thalamus reçoivent des informations sensorielles (nociceptives) provenant des noyaux des colonnes dorsales et de la moelle épinière telles que le thalamus postérieur (Po) (Lund & Webster 1967a, Lund & Webster 1967b).

Organisation somatotopique

Il existe une organisation somatotopique du corps au niveau du complexe VB. Les pattes antérieures et postérieures sont représentées dans le VPL tandis que la face est représentée dans le VPM. On peut également constater que la représentation des pattes antérieures est plus large que celle des pattes postérieures (Figure 9B) (Angel & Clarke 1975).

Les efférences

Chez le rat, tous les neurones du complexe VB du thalamus se projettent vers les zones granulaires du cortex somesthésique primaire situé au niveau du cortex pariétal (Saporta & Kruger 1977).

9. Le cortex somesthésique primaire

Organisation anatomique et afférences

Au niveau du cortex somesthésique primaire, la couche IV se distingue par une présence importante d'agrégats de neurones granulaires, notamment au niveau des régions des vibrisses et des pattes antérieures et postérieures (Figure 10) (Dawson & Killackey 1987). La couche V contient un nombre important de cellules pyramidales. Des régions moins granulaires du cortex, appelées zones périgranulaires, entourent les zones granulaires. Enfin, deux "zones dysgranulaires" sont situées entre la représentation de la face et celles des membres antérieurs et postérieurs (Figure 9C) (Chapin & Lin 1984).





Les informations sensorielles sont transmises au cortex à partir du thalamus via les axones des neurones thalamocorticaux. Le flux d'information suit un trajet vertical dans les couches corticales selon ce modèle : couche IV \rightarrow couches II/III/V \rightarrow couche VI (Armstrong-James et al 1992). Il existe également des interconnexions horizontales : les cellules pyramidales des couches II/III et V se projettent préférentiellement vers les couches supra et infragranulaires (Tanifuji et al 1994).

Par ailleurs, les projections du VPM du thalamus somesthésique vont vers les zones granulaires des représentations de la face et des vibrisses, tandis que les projections du VPL vont vers les aires de représentation des pattes antérieures et postérieures. Les afférences provenant du thalamus Po se projettent quant à elles vers les zones dysgranulaires et périgranulaires du cortex somesthésique primaire (Lu & Lin 1993). Enfin, les zones dysgranulaires reçoivent également des informations provenant des récepteurs profonds des articulations et des muscles (Figure 8C).

Organisation somatotopique

Il existe également dans le cortex somesthésique primaire une représentation topographique de la surface du corps (Figure 9C). Chez le rat, cette somatotopie est dominée par la représentation des vibrisses et de la face. La représentation corticale des pattes a une position médiane, les vibrisses une position caudolatérale, et les mâchoires une position rostrolatérale. Chaque vibrisse est représentée par sa propre colonne corticale (ou tonneau). Les doigts des pattes antérieures sont aussi représentés dans un ordre séquentiel au niveau de la représentation corticale de la patte antérieure, et la même organisation est observée pour les doigts de la patte postérieure. La représentation des pattes postérieures est organisée à partir des afférences cutanées provenant à 85 % du nerf sciatique et à 15 % du nerf saphène (Wall & Cusick 1984).

- B. Plasticité du système somesthésique après une période de perturbation sensorimotrice
- 1. PSM et nerfs périphériques

Une période d'hypodynamie-hypokinésie (HH ou *Hindlimb Unloading*, HU) induit une dégénérescence de la gaine de myéline au niveau de la racine dorsale L5 (Ren et al 2012). Une analyse par microscopie électronique du nerf soléaire a également mis en évidence une réduction de l'épaisseur de la gaine de myéline entourant les fibres (Canu et al 2009). Ces observations pourraient expliquer les diminutions de conduction nerveuse des nerfs sciatique et soléaire (Canu et al 2009) ou de la racine dorsale L5 induites par une période d'HH (Ren et al 2012).

2. PSM et ganglions spinaux

L'étude de Ren et collègues (Ren et al 2012) a mis en évidence que les neurones des ganglions de la racine dorsale L5 ont des potentiels d'action plus longs, une repolarisation plus lente et des seuils d'activation et de rhéobase plus bas, rendant les cellules plus excitables chez les rats HH. Après 14 jours d'HH ou un séjour en microgravité, les résultats mettent en évidence une diminution du volume du nucléole, du noyau des neurones de gros diamètre, ainsi qu'une diminution du nombre de cellules gliales au niveau des ganglions spinaux (Krasnov 1994, Polyakov et al 1991).

3. Plasticité du cortex somesthésique primaire

Chez l'Homme, une réorganisation des **représentations corticales du cortex somesthésique** (cartes corticales sensorielles) est observée après une période de PSM. Suite à l'immobilisation d'un doigt pendant deux semaines, on peut observer une diminution de la représentation corticale correspondant à ce doigt. Cette réorganisation est accompagnée d'une diminution de l'activation corticale (observable par IRMf), d'un élargissement des champs récepteurs cutanés au niveau de l'index et une diminution de la discrimination tactile (Lissek et al 2009). Des résultats similaires sont observés suite à une immobilisation de la main et du poignet/bras pendant une courte période de 72 h (Weibull et al 2011). L'étude de Langer et de ses collègues a également mis en évidence qu'une longue période de 16 jours d'immobilisation du bras droit entraîne une diminution de l'épaisseur corticale au niveau du cortex sensorimoteur de l'hémisphère gauche (Langer et al 2012).

Une désorganisation des cartes corticales sensorielles induite par une PSM est également observée chez l'animal (Coq & Xerri 1999, Dupont et al 2011b, Langlet et al 1999, Mysoet et al 2015). Suite à la restriction de mouvements d'un membre antérieur par plâtrage durant 7 à 14 jours chez le rat adulte, l'aire de représentation corticale sensorielle de la patte antérieure est fortement diminuée, alors que son organisation topographique est maintenue. La taille et la distribution des champs récepteurs ne varient pas chez ces rats. On peut toutefois constater que le nombre de zones corticales dédiées aux afférences proprioceptives augmente, pouvant suggérer une perte de sélectivité des afférences cutanées (Coq & Xerri 1999). Plusieurs études réalisées chez le rat adulte en condition d'HH ont également décrit une réorganisation du cortex somesthésique (Dupont et al 2001, Dupont et al 2011b, Langlet et al 1999, Mysoet et al 2015). Une situation d'HH de 14 jours entraîne une réduction de la surface de représentation corticale de la patte postérieure, ainsi qu'un élargissement des champs récepteurs et une augmentation des sites répondant aux afférences proprioceptives (Figure 11) (Langlet et al 1999).



Figure 11: Illustration de la diminution de la représentation corticale sensorielle de la patte postérieure et de l'élargissement des champs récepteurs cutanés chez les rats HH. (A) Cartes typiques présentant les aires corticales des pattes postérieures entre les groupes C et HH. O et ● indiquent des sites d'enregistrement où les neurones sont respectivement activés ou ne répondent pas à la stimulation cutanée de la patte postérieure. L'aire de la carte, exprimée en mm², est indiquée au-dessous. (B) Illustration de 4 champs récepteurs cutanés typiques pour les groupes C et HH. Seule la surface ventrale (peau glabre) de la patte postérieure est présentée. La valeur est la taille moyenne (en pourcentage de la taille totale de la patte postérieure) pour les groupes C et HH. Adapté de Mysoet et al 2015.

Ces changements sont transitoires et réversibles : ils semblent survenir principalement à 14 jours d'HH tandis que 6 heures suffisent à rétablir une surface de la représentation corticale et une taille des champs récepteurs comparables à celles des rats contrôles (Dupont et al 2002, Dupont et al 2001, Langlet et al 1999). Toutefois, il est à noter que dans l'étude de Coq et Xerri (1999), les

Revue bibliographique – II. Le système somesthésique

modifications étaient encore observables après 7 jours de plâtrage, indiquant que les mécanismes de récupération étaient beaucoup moins rapides qu'en condition d'HH (Coq & Xerri 1999). Chez les rats soumis à 14 jours d'HH, la plasticité de la représentation corticale de la patte postérieure au niveau du cortex somesthésique est accompagnée d'une augmentation de l'activité neuronale dans la couche IV du cortex sensorimoteur. En effet, une élévation de l'activation de la protéine c-Fos est mise en évidence au niveau de la zone de représentation de la patte postérieure (Langlet et al 2001), ainsi qu'une diminution du seuil d'activation neuronale (Dupont et al 2003).

En conclusion, des périodes de PSM, et notamment d'HH, induisent une diminution de la représentation corticale du membre concerné, ainsi qu'un élargissement des champs récepteurs cutanés et des changements d'excitabilité corticale. Ces phénomènes sont transitoires et réversibles : un rétablissement peut être observé au bout de quelques heures seulement. L'ensemble de ces données confirment combien le cortex somesthésique est doué de plasticité.

4. Mécanismes impliqués dans la plasticité du cortex somesthésique primaire

Comme nous avons pu le voir dans le paragraphe précédent, plusieurs études mettent en évidence des réorganisations des représentations corticales sensorielles induites par une modification de l'expérience sensorielle (par exemple, une PSM) (Dupont et al 2002, Dupont et al 2001, Dupont et al 2011b, Langlet et al 1999, Mysoet et al 2015). Cette réorganisation des représentations corticales sensorielles repose sur des mécanismes mettant en jeu une plasticité des projections divergentes entre le thalamus et le cortex somesthésique primaire. Ces groupes d'afférences thalamocorticales forment des réseaux neuronaux qui se projettent sur un large ensemble de neurones de la couche IV du cortex somesthésique **(Figure 12A)**.

La synapse est l'élément clé pour l'échange d'informations dans le système nerveux central. Dans le cerveau des mammifères, la grande majorité des synapses glutamatergiques excitatrices se forment entre les boutons axonaux présynaptiques et les épines dendritiques postsynaptiques. Au niveau de ce réseau thalamocortical, la plasticité du cortex somesthésique dépendrait **de processus de masquage/démasquage synaptique (Figure 12)** (Coq & Xerri 1998). Une période de PSM provoquerait ainsi une réduction du flux d'informations sensorielles, pouvant entraîner le masquage de synapses dans l'aire corticale associée au membre concerné par la PSM, et en conséquence, induire une réduction de cette surface corticale de représentation. A l'inverse, l'augmentation du flux d'informations sensorielles pourrait induire un démasquage de synapses latentes (Figure 12B) (Feldman et al 1999, Pearson et al 1987, Xerri 2008).



Figure 12: Illustrations schématiques des mécanismes de la plasticité dépendant de l'expérience dans le cortex somesthésique. (A) Etat d'équilibre dynamique induit par des activations périphériques comparables de deux champs récepteurs cutanés. Les projections thalamocorticales principales en bleu propagent les influx excitateurs jusqu'à la zone de la carte corticale dédiée aux champs récepteurs en bleu, tandis que les projections latérales de la zone de la carte corticale adjacente (vert) ont été désactivées par l'inhibition synaptique latérale. (B) Une stimulation réduite du champ récepteur vert, comme dans une situation de PSM, réduit l'influx excitateur jusqu'à la zone corticale correspondante, ce qui contribue à démasquer les synapses latentes dans la zone corticale adjacente bleue (précédemment en vert) et induit une expansion de la région corticale correspondante. Adapté de Xerri 1998.

Mécanismes glutamatergiques

Le renforcement et le maintien de la transmission synaptique sont définis par la **potentialisation** à long terme (LTP) (Bliss & Lømo 1973), tandis que l'affaiblissement de la force synaptique est défini par la dépression à long terme (LTD) (Dudek & Bear 1992). Ces processus permettent de transmettre les informations de manière plus ou moins « efficace » ou « forte » selon l'expérience passée. Cette propriété, connue sous le nom d'efficacité synaptique, est à la base du stockage de l'information dans le cerveau. Ils ont été proposés comme des mécanismes impliqués dans le masquage/démasquage synaptique et la plasticité induite par l'expérience dans le cortex somesthésique primaire (Buonomano & Merzenich 1998, Wallace & Fox 1999).

De nombreuses études se sont notamment intéressées aux processus de LTP et LTD dans la réorganisation des cartes corticales des vibrisses. Après une vibrissectomie sélective chez le rat, on peut notamment observer l'induction de LTD dans les aires corticales privées d'afférences et une LTP dans les aires dont les afférences n'ont pas été touchées (Bender et al 2006, Celikel et al 2004, Fox 2002).

Revue bibliographique – II. Le système somesthésique

Les processus de LTP et LTD sont dépendants de récepteurs au glutamate, les récepteurs NMDA (acide N-méthyl-D-aspartique) et AMPA (acide α-amino-3-hydroxy-5-méthyl-4isoxazolepropionique). Aucune étude ne s'est intéressée à l'implication de ces récepteurs glutamatergiques dans le remaniement des cartes corticales sensorielles suite à des périodes de PSM. Cependant, des recherches sur les effets d'une déafférentation ou d'un apprentissage peuvent apporter des éléments sur leur rôle. Ainsi, d'un point de vue moléculaire, l'administration continue d'APV (acide 2-amino-5-phosphonovalérique), un antagoniste des récepteurs NMDA, suite à une désafférentation des pattes postérieures chez le chat, empêche la réorganisation des cartes corticales adjacentes à celle de la patte postérieure (Kano et al 1991). A l'inverse, une augmentation de l'expression des sous-unités NR2A des récepteurs NMDA est observée chez la rate allaitante lors de l'expansion et du maintien des représentations corticales du ventre et des tétines (Rosselet et al 2006). Une augmentation de 50 % de l'expression de PSD-95 (postsynaptic density protein-95), une protéine impliquée dans la liaison des récepteurs NMDA à la membrane de la densité postsynaptique, est également observée au niveau de la représentation corticale sensorielle des vibrisses après un entrainement (Skibinska et al 2001).

Les récepteurs AMPA pourraient également être impliqués dans la plasticité des cartes corticales sensorielles. En effet, après la stimulation *in vitro* du cortex en tonneaux, on peut observer une augmentation de l'expression des récepteurs AMPA dans les synapses entre les couches corticales II/III et IV (Takahashi et al 2003).

Mécanismes GABAergiques

L'inhibition corticale par le système GABAergique peut également jouer un rôle clé dans la plasticité des cartes corticales en réponse à une modification de l'expérience sensorielle (Akhtar & Land 1991, Welker et al 1989, Xerri 2008).

Canu et ses collègues rapportent qu'une période d'HH de 14 jours entraîne une diminution des taux de GABA (acide γ-aminobutyrique) dans la zone du cortex somesthésique correspondant à la représentation corticale de la patte postérieure (Canu et al 2006). On peut supposer que la diminution des seuils d'activation observés après une période d'HH chez le rat (Dupont et al 2003) résulte d'une diminution de libération de GABA (Canu et al 2006, D'Amelio et al 1996). Par ailleurs, la suppression de vibrisses chez le rat provoque rapidement une diminution des taux de l'enzyme de synthèse du GABA (acide glutamique décarboxylase ou GAD) au niveau des représentations corticales des vibrisses enlevées (Akhtar & Land 1991, Welker et al 1989). A l'inverse, des études ont montré que la stimulation de vibrisses de manière passive pendant 24 h (Knott et al 2002) ou de

manière intense (Welker et al 1989) chez la souris, entraîne respectivement une augmentation des taux de GABA et de GAD au niveau de la représentation corticale correspondant aux vibrisses stimulées.

Le rôle du système GABAergique dans la plasticité des cartes corticales est encore mal connu. Une étude a montré qu'un traitement au muscimol (agoniste GABAergique) potentialise la réponse neuronale des vibrisses adjacentes à celles sectionnées au sein de la zone corticale désafférentée (Wallace et al 2001). Dans le cas d'une désafférentation ciblée comme dans cette étude, on peut supposer qu'une diminution de l'inhibition corticale au niveau des zones corticales désafférentées favorise l'augmentation de l'excitabilité au niveau des afférences adjacentes, le démasquage de synapses et l'agrandissement des représentations corticales adjacentes, envahissant les représentations corticales désafférentées (Dykes 1997).

Mécanismes cholinergiques

La réorganisation du cortex somesthésique primaire implique également la modulation d'autres neurotransmetteurs que le glutamate ou le GABA, comme par exemple l'acétylcholine (ACh) (Dupont et al 2002, Xerri 2008). Par exemple, chez les rats soumis à 14 jours d'HH, la perfusion chronique d'atropine, un antagoniste cholinergique, à la surface du cortex cérébral prévient la réduction de la surface de l'aire corticale de la patte postérieure ainsi que l'élargissement des champs récepteurs cutanés (Dupont et al 2002). Ceci pourrait s'expliquer par les rôles de l'ACh dans les processus synaptiques (Rasmusson 2000) et dans la modulation de l'excitabilité corticale (Verdier & Dykes 2001).

De plus, une étude a montré que l'induction de la LTD par suppression de vibrisses chez la souris est accompagnée d'une augmentation du nombre de récepteurs cholinergiques nicotiniques au niveau de la couche IV du cortex somesthésique et plus précisément au niveau des neurones GABAergiques. Fait intéressant, cette LTD peut être induite ou annulée par des injections d'agoniste ou d'antagoniste des récepteurs cholinergiques nicotiniques, respectivement, dans le cortex somesthésique de souris contrôles (Brown et al 2012).

Mécanismes liés aux neurotrophines et voies de signalisation

Il est également bien établi que les facteurs neurotrophiques [NGF (*Nerve Growth Factor*), BDNF (*Brain-Derived Neurotrophic Factor*), IGF-1 (*Insulin-Like Growth Factor-1*)] jouent un rôle central dans la plasticité du système nerveux central chez l'adulte (Lo 1995, Thoenen 1995). Les neurotrophines et leurs récepteurs sont exprimés dans les régions très plastiques du cerveau, en particulier l'hippocampe et le cortex cérébral (Fernandez & Torres-Alemán 2012, Lee et al 1998, Yan et al 1997). De plus, les neurotrophines sont connues pour réguler la transmission synaptique : elles peuvent

potentialiser les fonctions synaptiques et conduire à une augmentation de la transmission excitatrice (Carmignoto et al 1997) et/ou à la suppression de la transmission inhibitrice (McAllister et al 1999). Par ailleurs, l'expression des neurotrophines varie en fonction de différentes expériences sensorielles, comme par exemple *in vivo* lors de la stimulation des vibrisses chez la souris (Rocamora et al 1996) ou le rat (Mack & Mack 1992, Nanda & Mack 2000). Après une période de 14 jours d'HH, on peut observer une augmentation des taux d'ARNm du NGF et du BDNF. Cet effet est associé à une augmentation du taux de NGF dans le cortex sensorimoteur (Dupont et al 2005). On peut également observer une diminution de l'expression de l'IGF-1 au niveau du cortex sensorimoteur après une période d'HH (Mysoet et al 2014). Enfin, il a été montré qu'une perfusion chronique d'IGF-1 au niveau du cortex sensorimoteur, prévient partiellement la réorganisation corticale et l'altération de la sensibilité tactile induites par une période d'HH (Mysoet et al 2015).

Ces facteurs neurotrophiques peuvent donc avoir un rôle essentiel dans les mécanismes de réorganisation du cortex somesthésique, notamment après une période de PSM. Le mode d'action de ces facteurs passe par l'activation de différentes voies de signalisation intracellulaires, telles que les voies [MAPK/ERK1/2 (*Mitogen-Activated Protein Kinases/Extracellular signal-Regulated Kinases 1/2*) et la voie PI3K (*Phospholnositide 3-Kinase*)/AKT] (Numakawa et al 2010). Après une période de 14 jours d'HH chez le rat, une augmentation de l'activation de la voie de signalisation des MAPK est observée. L'activation de cette voie semble nécessaire à la réorganisation corticale induite par une période d'HH. En effet, l'inhibition de la protéine ERK1/2 prévient la réduction de l'aire de représentation corticale de la patte postérieure et entraine même une augmentation de cette zone, mais n'affecte pas la taille des champs récepteurs (Dupont et al 2011b). Par ailleurs, l'IGF-1 est connu pour activer préférentiellement la voie de synthèse protéique PI3K/AKT. En corrélation avec la diminution de l'expression de l'IGF-1 chez les rats HH, on peut constater une diminution de l'activation de la voie PI3K/AKT, pouvant participer à la réduction de la surface de la représentation corticale de la patte postérieure à la réduction de la surface de la représentation de l'activation de la voie PI3K/AKT, pouvant participer à la réduction de la surface de la représentation corticale de la patte postérieure à la réduction de la surface de la représentation de l'activation de la voie PI3K/AKT, pouvant participer à la réduction de la surface de la représentation corticale de la patte postérieure (Mysoet et al 2014).

En conclusion, la plasticité du cortex somesthésique primaire suite à une période de PSM serait dépendante de mécanismes impliquant les systèmes glutamatergique (LTP/LTD), GABAergique (inhibition corticale) ou encore cholinergique (excitabilité corticale). Ces mécanismes joueraient un rôle fondamental dans les processus d'inhibition/excitation et la plasticité des cartes corticales sensorielles. De plus, il a été montré que différents facteurs neurotrophiques (NGF, BDNF, IGF-1) sont également impliqués dans la réorganisation des cartes corticales sensorielles, en modulant par exemple des voies de signalisation telles que la voie PI3K/AKT ou la voie MAPK/ERK.

III. <u>Plasticité du système moteur après une période de perturbation sensorimotrice</u>

Une des premières perturbations fonctionnelles visibles après une période de PSM est l'apparition de troubles moteurs. En effet, après un alitement prolongé, on peut observer une perte de force, ainsi qu'une altération des performances motrices, notamment de la locomotion et de la posture. Ces altérations ne sont pas uniquement dues à une atteinte du système musculaire. En effet, elles sont aussi associées à des changements à différents niveaux du système moteur impliquant tous les éléments de la voie motrice, depuis le cortex cérébral jusqu'au muscle. Par conséquent, cette troisième partie abordera l'organisation anatomique et fonctionnelle du système moteur, ainsi que les effets d'une période de PSM sur les différentes composantes de ce système.

A. Organisation anatomofonctionnelle du système moteur

1. Le cortex moteur primaire

Organisation anatomique

Le cortex moteur possède une organisation en 6 couches corticales, semblable à celle décrite pour le cortex somesthésique¹. Le **cortex moteur primaire** correspond à une zone agranulaire latérale (AgL) **(Figure 13A)**. Il possède des couches superficielles homogènes et une large couche corticale V contenant de grandes cellules (Donoghue & Wise 1982).

Le cortex moteur primaire reçoit des afférences de différentes régions cérébrales impliquées dans la planification et le contrôle des mouvements, telles que le cortex préfrontal et une partie du thalamus recevant des informations du cervelet et des noyaux gris centraux (Weiler et al 2008). Le cortex moteur primaire a également la particularité d'intégrer des informations sensorielles provenant par exemple du cortex somesthésique primaire (Mao et al 2011). Ces différentes afférences (corticocorticales ou thalamocorticales) se projettent horizontalement sur les couches corticales II/III. Les informations se propagent ensuite dans les couches corticales plus profondes, jusqu'à la couche V notamment impliquée dans l'initiation du mouvement volontaire (Weiler et al 2008). Il est à noter qu'il existe également des projections horizontales au niveau de la couche V des différentes représentations corticales des membres, permettant de réguler l'activité des neurones pyramidaux lors de la genèse d'un mouvement (Weiss & Keller 1994). Ainsi, cette combinaison d'afférences provenant des aires corticales sensorielles, motrices et frontales, des centres moteurs thalamiques et de plusieurs autres zones sous-corticales implique que le cortex moteur primaire joue un rôle important dans les mouvements volontaires, ainsi que dans les mouvements guidés par le retour sensoriel (Donoghue & Parham 1983).

¹ Voir paragraphe II.A.9. Le cortex somesthésique primaire, p44



Figure 13: Organisation anatomofonctionnelle du cortex moteur primaire du rat. Localisation du cortex moteur primaire (M1), correspondant à la zone agranulaire latéral (AgL), à côté du cortex somesthésique primaire (S1). Les régions motrices sont en vert tandis que les régions somesthésiques sont en rouge. Adapté de Chakrabarti & Schwarz 2014.

Organisation fonctionnelle

On peut définir fonctionnellement le cortex moteur primaire comme un ensemble de territoires corticaux où l'application d'une microstimulation permet de générer un mouvement. Ainsi, les différentes microstimulations ont permis de mettre en évidence **une représentation somatotopique du corps** au niveau du cortex moteur primaire, où la surface corticale d'un membre est proportionnelle à sa précision dans l'exécution de mouvements (Neafsey et al 1986). Chez le rat, les représentations corticales des pattes antérieures et des vibrisses sont les plus représentées.

Il est à noter que les représentations corticales des cortex moteur et somesthésique primaires des pattes postérieures se superposent (Figure 13). Globalement, la représentation somatotopique corticale du corps du rat se fait progressivement de manière médiolatérale, avec en position médiane la patte postérieure, ensuite le tronc, la patte antérieure et la face avec les vibrisses en position latérale. La représentation de la patte postérieure est située en position médiane et s'étend latéralement aux coordonnées stéréotaxiques 2 à 4 mm et antérieurement de 0 à 2 mm en arrière du bregma. Elle est entourée antérieurement et latéralement par la représentation de la patte antérieure, médialement par la représentation de la queue, et postérieurement par la jambe et par la cuisse. Au niveau de la représentation corticale motrice d'un membre du corps, les représentations musculaires détaillées ne présentent pas d'organisation topographique mais une distribution multiple avec des chevauchements. Par exemple, au niveau de la représentation corticale de la patte postérieure du rat, on peut observer une distribution multiple et dispersée des représentations des mouvements de la hanche, du genou, de la cheville et des doigts (Figure 14) (Langlet et al 2012, Mysoet et al 2017, Strata et al 2004).



Figure 14: Représentation corticale de la patte postérieure et de ses différentes articulations (hanche, genou, cheville et doigts). La représentation de la patte postérieure est située en position médiane et s'étend latéralement aux coordonnées stéréotaxiques 2 à 4 mm et antérieurement de 0 à 2 mm en arrière du bregma. La taille d'une carte corticale motrice de la patte postérieure est en moyenne de 2,8 mm². La taille des autres articulations forme un gradient proximodistal où la représentation de la hanche est plus importante que celle des doigts. Adapté de Mysoet et al 2017.

Comme nous le verrons dans le paragraphe « plasticité du cortex moteur primaire »², ces représentations corticales motrices sont très plastiques et peuvent se réorganiser en fonction de l'expérience de chaque individu.

2. Les différentes voies motrices

La commande motrice est régie par différentes structures cérébrales et par des voies motrices dites directe ou indirecte (Figure 15). La voie corticospinale est la voie la plus importante pour la production d'un mouvement volontaire.

La voie motrice directe

Chez le rat, la **voie corticospinale, ou pyramidale,** a essentiellement pour origine les neurones pyramidaux de la couche corticale V du cortex moteur primaire **(Figure 15)**, mais aussi d'autres neurones du cortex frontal et préfrontal (Li et al 1990, Miller 1987). La voie corticospinale se projette dans la substance grise de la moelle épinière et forme deux, voire trois, divisions. Environ 95 % des fibres se croisent au niveau médullaire inférieur (bulbe) et descendent à travers la moelle

² Voir le paragraphe III.B.4. Plasticité du cortex moteur primaire, p67

épinière dans la partie ventrale (93 %) ou dorsolatérale (2 %) du cordon dorsal. Les 5 % restants de fibres ne croisent pas et descendent dans la moelle épinière cervicale dans la partie dorsomédiale de la corne ventrale (Brosamle & Schwab 1997, Vahlsing & Feringa 1980, Whishaw & Metz 2002). Les axones des neurones provenant de la représentation corticale de la patte postérieure du cortex moteur primaire se projettent via le faisceau pyramidal jusqu'aux segments lombaires L4 à L6 (Li et al 1990). Ils établissent alors des connexions avec les motoneurones commandant les muscles extenseurs ou fléchisseurs des pattes postérieures. Ainsi, la voie corticospinale est impliquée dans la réalisation des mouvements volontaires distaux fins (Metz et al 1998, Whishaw et al 1998).



Figure 15 : Représentation schématique simplifiée des différentes voies motrices directe et indirectes chez le rat. La voie directe corticospinale (en bleu) se projette du cortex moteur primaire jusqu'à la moelle épinière. Une majeure partie des fibres de cette voie se croisent au niveau bulbaire. Les voies indirectes se projettent du tronc cérébral jusqu'à la moelle épinière : la voie rubrospinale (en rouge) ; la voie réticulospinale (en vert) ; la voie vestibulospinale (en jaune).

Les voies motrices indirectes

La voie rubrospinale a pour origine les neurones du noyau rouge (Figure 15). Le noyau rouge reçoit des afférences du cortex cérébral et du cervelet (Giuffrida et al 1988). Ensuite, les neurones rubrospinaux de la partie dorsale et dorsolatérale du noyau rouge se projettent au niveau cervical de la moelle épinière, tandis que ceux situés dans la partie ventrale et ventrolatérale se projettent au niveau lombaire (Murray & Gurule 1979). Ces projections de la voie rubrospinale établissent des connexions avec les motoneurones des muscles distaux et intermédiaires, mais pas des muscles proximaux des pattes (Küchler et al 2002). Chez le rat, la voie rubrospinale a un rôle important dans l'initiation et l'exécution des mouvements volontaires, notamment des membres antérieurs (Küchler et al 2002). Elle est aussi impliquée dans la coordination entre les membres antérieurs et postérieurs lors de la locomotion. En effet, la lésion unilatérale du noyau rouge ou du tractus rubrospinal conduit à une asymétrie des forces produites par les pattes et à des anomalies de la coordination des pattes lors de la locomotion sur terrain plat ou compromet la traversée d'une échelle horizontale (Muir & Whishaw 2000, Webb & Muir 2003).

La voie réticulaire a son origine au niveau des noyaux réticulaires (ou formation réticulée) (Figure 15) (Satoh 1979). Cette voie se divise en deux composantes : une partie médiane issue du pont se projetant au niveau ventromédian de la moelle épinière, et une partie latérale issue du bulbe se projetant au niveau ventrolatéral de la moelle épinière (Newman & Liu 1987). Les projections de la voie réticulospinale établissent des connexions avec les motoneurones des muscles axiaux, fléchisseurs et extenseurs des membres (Peterson et al 1975). Cette voie a un rôle particulièrement important pour le maintien de la posture en agissant sur les muscles posturaux (Peterson et al 1975, Robbins et al 1992) et pour l'initiation de la locomotion et la coordination des membres (Ballermann & Fouad 2006).

La voie vestibulospinale a pour origine les noyaux vestibulaires bulbaires (Figure 15) qui relaient l'information sensorielle issue des récepteurs vestibulaires du labyrinthe de l'oreille interne. Les noyaux vestibulaires se composent des noyaux supérieur et latéral, situés dans la partie caudale du pont, et des noyaux médian et inférieur, situés dans la partie rostrale. Les projections des neurones de ces noyaux sont à l'origine du tractus vestibulospinal médian et latéral. Chez le rat, le faisceau vestibulospinal médian se projette au niveau du funiculus ventrolatéral tandis que le faisceau vestibulospinal latéral se projette au niveau du funiculus ventromédian de la moelle épinière. Les axones de cette voie innervent les motoneurones de muscles antigravitaires des membres et du cou (Brodal 1974, Wilson & Yoshida 1969). Ainsi, la voie vestibulospinale a pour rôle de régir le tonus des muscles ipsilatéraux et de contribuer à maintenir la posture et l'équilibre en réponse aux mouvements de la tête (Hamann & Lannou 1988, Webb & Muir 2004).

57

3. Moelle épinière et nerfs

Comme cela a été décrit dans les paragraphes précédents, les voies motrices se projettent vers différents segments de la moelle épinière pour établir des connexions avec les motoneurones. Au niveau de la partie cervicale de la moelle épinière s'établiront les connexions pour les membres supérieurs, tandis qu'au niveau lombaire et thoracique s'établiront les connexions pour les membres inférieurs.

Organisation anatomique de la racine ventrale de la moelle épinière

L'anatomie de la moelle épinière a été décrite en détail dans la partie consacrée au système somesthésique **(pour rappel, voir Figure 7³)**. La **corne ventrale** contient des interneurones et des motoneurones innervant les muscles. Elle comprend les lames VIII et IX (couches de Rexed). La lame IX est subdivisée en plusieurs régions, appelées **colonnes motrices (**Rivero-Melian 1996).

Organisation fonctionnelle de la moelle épinière

A l'intérieur de chaque segment spinal, les corps cellulaires des motoneurones innervant les muscles distaux sont situés dorsalement et ceux innervant les muscles proximaux sont situés ventralement (**pour rappel, voir Figure 7**³). De plus, les motoneurones des muscles extenseurs sont situés plus latéralement que ceux des muscles fléchisseurs (**Figure 16**).



Figure 16 : Schéma récapitulatif des projections des motoneurones des muscles de la patte postérieure du rat dans les différentes colonnes motrices. Les colonnes motrices sont représentées en pointillé et numérotées de 1 à 5 (en bleu) dans la corne ventrale de la moelle épinière. Chaque barre horizontale permet d'identifier les segments lombaires (L1 à L6) impliqués spécifiquement dans l'innervation motrice des différents muscles. Adapté de Nicolopoulos-Stournaras & lles 1983.

³ Voir le paragraphe II.A.5. La moelle épinière, Figure 7, p39

Dans le cadre de cette thèse, nous nous intéresserons plus particulièrement au muscle soléaire et à l'extenseur long des doigts (EDL). Les motoneurones innervant le muscle soléaire proviennent de la lame IX distale et plus particulièrement de la colonne motrice 5 des segments lombaires L3 et L4, tandis que ceux innervant l'EDL proviennent de la colonne 4 des mêmes segments lombaires (Figure 16) (Nicolopoulos-Stournaras & Iles 1983)

Les motoneurones quittent ensuite la moelle épinière en formant **des nerfs moteurs** qui vont innerver les différents groupes musculaires. Les nerfs innervant les membres postérieurs quittent la moelle épinière entre les segments lombaires L1 à L5 (Nicolopoulos-Stournaras & Iles 1983). La plupart des muscles squelettiques de la patte postérieure sont innervés par le nerf sciatique. Au total, environ 2000 motoneurones le composent et se répartissent en différentes branches individuelles comprenant les nerfs péronier (31%), tibial (49%), sural (3%), et les nerfs gastrocnémiens médial et latéral (16%) (Swett et al 1986).

4. Les muscles squelettiques

En sortant de la moelle épinière, les axones des motoneurones se ramifient et établissent des connexions avec plusieurs **fibres musculaires** d'un muscle squelettique. Ces nombreuses unités motrices transmettent les informations nerveuses provenant du système nerveux central permettant les mouvements volontaires, les mouvements réflexes, ainsi que le maintien de la posture.

Les fibres musculaires peuvent être classées selon différents critères (Schiaffino et al 1970, Schiaffino & Reggiani 2011) telles que la coloration des fibres (rouge vs blanche), en corrélation avec le contenu en myoglobine ; la vitesse de raccourcissement lors d'une secousse simple (lente vs rapide) ; le degré de fatigabilité lors d'une activation soutenue (fatigable vs résistante à la fatigue) ; la prédominance de voies enzymatiques ou métaboliques (métabolisme oxydatif vs glycolytique), en lien avec le nombre de mitochondries que contient la fibre ; l'expression des isoformes de protéines contractiles et régulatrices... Ainsi, la classification la plus couramment utilisée définit trois types de fibres : le **type l** (fibre lente, oxydative, résistante à la fatigue), le **type IIA** (fibre rapide, aux propriétés métaboliques intermédiaires), et le **type IIX/IIB** (fibre rapide, glycolytique, fatigable) (Figure 17). Les muscles squelettiques sont constitués de ces différents types de fibres musculaires en proportion variable, ce qui leur confère une spécificité physiologique de contraction et de résistance à la fatigue. Au niveau de la patte postérieure d'un rat, un muscle postural, tel que le muscle soléaire, est constitué essentiellement de fibres lentes de type I. Les muscles impliqués dans des activités phasiques, tels que l'EDL, sont constitués d'une grande proportion de fibres rapides de type II (Soukup et al 2002).

	Fibres musculaires		
		IIA	IIX/IIB
Caractéristiques structurel	les		
Diamètre	Petit	Intermédiaire	Grand
Myoglobine et mitochondries	Quantité importante	Quantité importante	Petite quantité
Couleur	Rouge	Rouge-violet	Blanc
Caractéristiques métabolic	ques		
Voie synthèse ATP	Oxydatif	Intermédiaire	Glycolytique
Vitesse ATPase	Lente	Rapide	Rapide
Stockage du glycogène	Faible	Intermédiaire	Elevé
Caractéristiques fonctionn	elles		R
Vitesse de contraction	Lente	Rapide	Rapide
Résistance à la fatigue	Elevée	Modérée	Faible



Figure 17: Propriétés des différents types de fibres musculaires. A gauche, tableau récapitulatif des propriétés des fibres musculaires I, IIA et IIX/IIB. A droite, (A) marquage immunofluorescent des différentes fibres musculaires : les fibres de type I (bleu), de type IIA (vert), de type IIB (rouge), de type IIX (non coloré) et hybrides de type IIAX (noir) sont représentées. (B) Coloration de l'activité succinate déshydrogénase (enzyme à activité ATPasique) mettant en évidence les différents types de fibres musculaires. Adapté de Bloemberg & Quadrilatero 2012.

B. Plasticité du système moteur après une période de perturbation sensorimotrice

Une période de PSM induit une multitude de changements au niveau des différentes composantes du système moteur. Dans cette partie seront décrites les conséquences d'une inactivité (1) sur les muscles squelettiques des membres inférieurs, (2) au niveau spinal et (3) au niveau supraspinal plus particulièrement sur le cortex moteur primaire et les représentations corticales motrices.

1. PSM et conséquences musculosquelettiques

Atrophie musculaire

La première conséquence observée suite à des situations de PSM est **une atrophie musculaire** et **une réduction de la surface transversale des fibres musculaires** (changement du nombre et/ou du diamètre des fibres) (Roy et al 1987, Templeton et al 1984).

Chez l'Homme, les vols spatiaux ont des effets très hétérogènes sur le muscle squelettique avec une diminution du diamètre de la section transversale des muscles de la jambe de 6 à 24 % après une durée de vol de 8 à 197 jours (Narici & de Boer 2011). Suite à un alitement prolongé, la perte de masse musculaire du quadriceps et des muscles du mollet est très rapide avec une perte de 3 % après seulement 7 jours (Ferrando et al 1995) et 30 % après 90 à 120 jours (Alkner & Tesch 2004, Shackelford et al 2004). Après 17 semaines d'alitement prolongé, les muscles squelettiques fléchisseurs plantaires, le soléaire et le gastrocnémien présentent la plus forte atrophie musculaire avec une diminution de 30 % de leur masse. Les autres muscles de la jambe (fléchisseurs dorsaux, ischio-jambiers, quadriceps) ne présentent qu'une diminution de 16 à 21 %. Par ailleurs, les muscles intrinsèques des lombaires (multifide, longissimus, ilio-costal, spinaux et semispinaux, rotateurs) sont atrophiés de 9 %, mais le psoas n'est pas affecté. Ces résultats indiquent que chez l'Homme, ce sont les muscles posturaux les plus vulnérables à l'atrophie musculaire (LeBlanc et al 1995). Des résultats similaires sont observés pour les autres modèles de PSM. En effet, une période de suspension unilatérale d'un membre inférieur provoque également une diminution de la surface de la section transversale du quadriceps de 5,2 % après 14 jours et de 10 % après 23 jours (De Boer et al 2007). Enfin, une immobilisation par plâtrage d'un membre inférieur pendant 15 semaines entraîne une diminution de 12 % du volume de la jambe et de 46 et 37 % des diamètres des fibres de type I et type II du muscle vaste latéral (Sargeant et al 1977).

Chez le rat, une perte rapide de la masse musculaire apparait durant la 1^{ère} et la 2^{ème} semaine d'inactivité. Chez des rats immobilisés ou placés en HH, la perte de masse est généralement plus importante dans les muscles extenseurs de la cheville (soléaire et gastrocnémien) que pour les muscles fléchisseurs (tibial antérieur et EDL) (Adams et al 2003, Ohira et al 2002, Roy et al 1991, Zhong et al 2005). En effet, après 5 semaines d'HH chez le rat, une atrophie du soléaire de 63 % est observée précocement par rapport à une atrophie de 22 % pour l'EDL. Par ailleurs, le degré maximal d'atrophie est atteint après 2 semaines d'HH. Le diamètre de chaque fibre musculaire est également réduit de 30 % après une semaine d'HH (Desplanches et al 1987).

Le degré d'atrophie musculaire dépend donc (1) du type de muscle et (2) du degré d'inactivité. Les muscles posturaux, constitués principalement de fibres lentes, sont les plus touchés par l'atrophie musculaire (Ohira et al 2002, Roy et al 1991). Pour certains muscles (gastrocnémien médian et tibial antérieur), la perte de masse musculaire est souvent plus importante à la suite d'une immobilisation qu'à la suite d'une situation d'HH chez le rat ou d'un alitement prolongé chez l'Homme (Bodine et al 2001, Clark 2009). De plus, l'atrophie musculaire induite par une immobilisation varie significativement selon deux facteurs : (1) si le membre est totalement restreint de mouvement (plâtrage *vs* atèle) et (2) l'angle auquel le membre est fixé. Ainsi, l'atrophie musculaire est plus prononcée lorsque le muscle est immobilisé dans une position raccourcie que dans une position neutre ou étirée (Goldspink 1977, Spector et al 1982).

Fibres musculaires

Chez l'Homme, l'atrophie musculaire touche de manière comparable les fibres de type I, lentes et antigravitaires, ainsi que les fibres de type II, rapides et associées au mouvement (Fitts et al 2000, Fitts et al 2001). Suite à un vol spatial prolongé (environ 180 jours), on observe une diminution du diamètre des fibres musculaires et de la force dans le soléaire et le gastrocnémien dans l'ordre suivant : soléaire type I > soléaire type II > gastrocnémien type I > gastrocnémien type II (Fitts et al 2010). Le même processus est observé après 21 jours d'immobilisation ou 35 jours d'alitement prolongé sur le vaste latéral, avec une diminution plus importante pour la surface transversale des fibres de type I (13 % et 31 % respectivement) que de type II (environ 10 % et 21 % respectivement) (Brocca et al 2012, Hortobágyi et al 2000).

Chez le rat, l'atrophie concerne préférentiellement les fibres antigravitaires de type I, par rapport aux fibres de type II (Fitts et al 2001). Après 2 semaines d'HH, une diminution plus importante de la surface des fibres de type I (63 %) est constatée par rapport à la surface des fibres intermédiaires et de type IIA (33 %) dans le muscle soléaire (Desplanches et al 1987). Templeton et ses collègues montrent également une réduction des fibres de type I du muscle soléaire mais pas des fibres de type II, après 2 à 4 semaines d'HH (Templeton et al 1984) (Figure 18). Une immobilisation des pattes postérieures de 4 semaines entraîne aussi la diminution de la surface des fibres musculaires du soléaire ; les fibres de type I sont les premières touchées, et sont suivies des fibres rapides de type IIA puis de type IIX et IIB (Booth & Kelso 1973).



Figure 18 : Coupes transversales de muscles soléaires avec une coloration de l'ATPase de myosine (A) d'un rat contrôle avec une prédominance normale de fibres musculaires de type I, et de rats HH après (B) 2 semaines et (C) 3 semaines, montrant une prédominance anormale de fibres musculaires de type II. Adapté de Templeton et al 1984.

Perturbation de l'homéostasie protéique

Le maintien de la masse musculaire dépend de l'équilibre entre deux processus : la **synthèse** et la **dégradation protéiques**. En situation d'atrophie, un déséquilibre de cette balance peut entraîner une perte nette de protéines musculaires. Des études chez l'Homme ou sur des modèles animaux ont mis en évidence que le taux de synthèse des protéines diminuait immédiatement pendant une période de PSM. Au niveau du muscle soléaire de rats HH, on peut observer une inactivation progressive des voies anaboliques PI3K-AKT et de MAPK/ERK (Dupont et al 2011a), alors que la voie catabolique (FOXO1, RING1) est plus activée (Dupont et al 2011a, Nagatomo et al 2011). En effet, ce dernier résultat indique que la dégradation de protéines aurait également un rôle majeur dans l'atrophie musculaire induite par une PSM (Bodine 2013). Après 4 semaines d'HH chez le rat, une perte de 50 % des protéines des fibres musculaires dans le soléaire est constatée, tandis qu'aucun changement n'apparait dans le taux protéique des fibres du muscle plantaire (Tsika et al 1987). L'ensemble de ces évènements peut entraîner une altération des propriétés contractiles (couplage excitation-contraction ou encore une diminution du nombre de ponts actine-myosine), avec une transition phénotypique des isoformes de myosine (chaînes lourdes), d'actine et des protéines régulatrices (Fitts et al 2000, Stevens et al 2002).

En ce qui concerne l'activité métabolique, plusieurs études ont montré sur des rats HH des changements au niveau des enzymes glycolytiques et oxydatives. L'activité de la lactate déshydrogénase diminue de 50 à 70 % dans une fibre isolée (Fitts et al 1989, Hauschka et al 1987), tandis que les activités de la succinate déshydrogénase et de la phosphofructokinase augmentent de 113 % et de 71 % respectivement (Hauschka et al 1987). Dupont et ses collègues observent également une augmentation progressive des taux de différentes enzymes du métabolisme glucidique telles que la phosphoglucomutase 1, la pyruvate kinase, la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase, la lactate déshydrogénase ou encore l'adénylate kinase 1, après 7, 14 et 28 d'HH chez le rat (Dupont et al 2011a).

Fonctions contractiles

Suite à des situations de PSM, une **perte de force maximale volontaire** est observée. Chez l'Homme, la force développée par l'extension des jambes diminue respectivement de 11, 26 et 29 % après 31, 169 et 180 jours en microgravité (Antonutto et al 1999). Au niveau des modèles terrestres, cette perte de force est généralement plus importante suite à une immobilisation qu'après un alitement prolongé ou la suspension d'un membre. Par exemple, la valeur de contraction maximale des extenseurs du genou est réduite d'environ 15 % après 14 jours d'alitement prolongé (Bamman et

Revue bibliographique – III. Le système moteur

al 1998) ou encore de 22 % après 14 jours (Hespel et al 2001) et de 53 % après 28 jours d'immobilisation des membres (Veldhuizen et al 1993). Les effets d'une période d'inactivité sur la résistance à la fatigue musculaire donnent des résultats contradictoires. Certaines études rapportent en effet une résistance à la fatigue réduite (Berg et al 1993, Veldhuizen et al 1993), équivalente (Miles et al 1994), voire accrue (Clark et al 2008) après une période de PSM.

Après 14 jours d'HH chez le rat, la tension maximale diminue de manière drastique de 67 % au niveau des fibres de type I du muscle soléaire et de 60 % au niveau des fibres de type II (Leterme & Falempin 1996, Toursel et al 2002). Elle est associée à une diminution de la force musculaire, de la résistance à la fatigue et de sa consommation en oxygène (Desplanches et al 1987, McDonald et al 1994).

En conclusion, une période de PSM entraîne une atrophie musculaire substantielle caractérisée par une diminution du diamètre et/ou du nombre de fibres musculaires principalement de type I, majoritaires dans les muscles posturaux. D'un point de vue moléculaire, l'atrophie musculaire serait due à un déséquilibre de l'homéostasie protéique. En effet, une diminution de l'activation des voies de synthèse (PI3K/AKT) est constatée tandis que l'activation de la voie de dégradation (FOXO1) augmente. On peut aussi observer une transition des isoformes de myosine de type I lente vers un type II rapide, et une augmentation du métabolisme glucidique au détriment du métabolisme oxydatif. L'ensemble de ces paramètres conduit, en partie, à une perte de force maximale volontaire. D'autres études ont mis en évidence que des facteurs nerveux (spinaux et supra spinaux) participent également grandement à cette perte de force.

2. PSM et motoneurones

Une période de PSM entraîne **des changements de diamètre du corps cellulaire et de l'activité enzymatique oxydative des motoneurones** chez le rat. D'un point de vue structurel, après 14 jours de vol spatial ou d'HH, les données indiquent que la taille des corps cellulaires des motoneurones innervant le muscle soléaire ne change pas (Ishihara et al 2006), voire diminue de 19 % par rapport au groupe contrôle (De-Doncker et al 2006). En outre, il a été montré dans les motoneurones que l'activité de la succinate déshydrogénase, un marqueur des capacités oxydatives, est maintenue (Ishihara et al 2006) ou diminue après 2 semaines de vol spatial chez les rats (Ishihara et al 1997). A 35 jours d'HH, on observe une augmentation de 95 % des taux de Hsp25 (Heat shock protein 25), une protéine chaperonne anti-apoptotique (Islamov et al 2011), suggérant la mise en place de mécanismes de protection des motoneurones. Cormery et ses collaborateurs (Cormery et al 2005) ont mis en évidence des changements des **propriétés électrophysiologiques** des motoneurones innervant les pattes postérieures après une période d'HH. Les motoneurones du nerf tibial, innervant les muscles extenseurs de la cheville, sont moins excitables car la rhéobase est plus élevée. Toutefois, d'autres études mettent en évidence des effets inverses, où l'excitabilité des motoneurones innervant les muscles extenseurs de la cheville augmente (Anderson et al 1999, De-Doncker et al 2006).

3. PSM et moelle épinière

Différentes études ont mis en évidence qu'une période de PSM est à l'origine de répercussions **structurales** dans la moelle épinière. En effet, 30 à 35 jours d'HH chez la souris entraînent une diminution de la superficie totale de la substance grise (20 %) et de la substance blanche (12 %) (Chelyshev et al 2014), ainsi qu'une diminution de 21 % du contenu protéique au niveau des segments lombaires de la moelle épinière (Islamov et al 2011). Au niveau de la substance blanche, on peut notamment observer une dégradation de la myéline. En effet, une analyse transcriptomique réalisée au niveau de la région lombaire de la moelle épinière a permis de montrer que cette période d'HH entraîne une diminution de l'expression de différents gènes impliqués dans la synthèse de myéline [par exemple, pmp2 et pmp22 (*peripheral myelin protein*)], de la matrice extracellulaire [par exemple, le collagène de type IV, ou HSPG2 (*heparan sulfate proteoglycan 2*)], du cytosquelette ou encore des protéines d'adhésion. De plus, ces modifications génique et morphologique sont accompagnées de changements phénotypiques des cellules gliales, comme pour les astrocytes par exemple (Mukhamedshina et al 2014).

Une période de PSM influence également **la composition en neurotransmetteurs** et en **facteurs neurotrophiques** dans la moelle épinière. Ainsi, après 7 jours d'HH, les taux de neurotransmetteurs excitateurs (glutamate et aspartate) et inhibiteurs (glycine et GABA) augmentent au niveau de la corne ventrale de la moelle épinière contenant les motoneurones des muscles des pattes postérieures (Treffort et al 2006). Une période d'HH entraîne également une diminution des taux d'IGF-1 après une immobilisation unilatérale des membres postérieurs pendant 5 jours à 4 semaines chez des rats, alors que les taux des récepteurs à l'IGF-1 augmentent après une immobilisation prolongée (4 et 8 semaines) (Suliman et al 2001). En outre, on observe une augmentation des taux d'ARNm et protéiques de NT-3 (*Neurotrophin-3*), de BDNF et de leur récepteur TrkC (*Tropomyosin receptor kinase C*), au niveau des segments lombaires L4 à L6, et plus précisément au niveau de la colonne motrice correspondant au muscle soléaire, après 7 et 14 jours d'HH (Yang & Zhang 2016). Les variations d'expression de ces neurotrophines et de leurs récepteurs peuvent jouer un rôle important dans la plasticité neuromusculaire induite par une période d'HH.

En conclusion, une période de PSM induit des changements morphologiques et moléculaires au niveau des motoneurones et de la moelle épinière, plus particulièrement dans les segments lombaires correspondant à l'innervation des membres inférieurs. La taille des corps cellulaires des motoneurones et la surface totale (substances grise et blanche) de la moelle épinière lombaire ont tendance à diminuer. Au niveau des motoneurones, le taux de la succinate déshydrogénase semble réduit, tandis que celui de protéine anti-apoptotique (Hsp25) augmente après 14 jours de PSM. Les taux de neurotransmetteurs (GABA, glycine et glutamate) et de facteurs neurotrophiques (IGF-1, BDNF, NT-3), varient également, montrant une plasticité neuromusculaire active après cette période de PSM. Enfin, les motoneurones montrent des changements de leurs propriétés électrophysiologiques.

4. Plasticité du cortex moteur primaire

Les études sur la réorganisation du cortex moteur primaire suite à une période de PSM chez l'Homme sont rares et reposent sur l'utilisation de techniques de **stimulation magnétique transcrânienne** (TMS). Ces différentes études varient selon le type, la durée et le membre soumis à une PSM, c'est pourquoi les données obtenues sont souvent contradictoires. Par exemple, une courte immobilisation des doigts et du poignet de 5 jours n'induit pas de changement de **surface de la représentation corticale motrice** de la main (Ngomo et al 2012). Cependant, l'immobilisation de la cheville durant 4 semaines ou du bras pendant 3 à 6 semaines entraîne une diminution de la surface de représentation corticale du muscle tibial antérieur ou du membre supérieur, respectivement (Liepert et al 1995, Zanette et al 2004). Dans le cas de l'immobilisation de la cheville, cette diminution est proportionnelle à la durée de l'immobilisation du membre (6 à 60 semaines) (Liepert et al 1995).

La réorganisation des représentations corticales motrices est accompagnée de changements **morphologiques** et de changements **d'excitabilité corticale** du cortex moteur primaire. D'un point de vue morphologique, l'étude de Langer et ses collègues (Langer et al 2012) a mis en évidence une diminution de l'épaisseur du cortex sensorimoteur ainsi qu'une diminution de la fraction d'anisotropie (indication sur le degré de myélinisation) de la voie corticospinale après une période d'immobilisation de 2 semaines de l'avant-bras. En outre, l'excitabilité, au niveau de la zone corticale motrice du membre immobilisé, diminue très rapidement dès 3 h d'immobilisation de la main ou de l'avant-bras, 4 jours d'immobilisation de deux doigts (annulaire et petit doigt) ou 5 jours d'immobilisation de la main (Facchini et al 2002, Karita et al 2017, Ngomo et al 2012). Il en est de même suite à une immobilisation plus longue de la main pendant 4 semaines (Granert et al 2011), du bras dominant pendant 3 à 6 semaines (Kaneko et al 2003), de la cheville pendant 6 à 60 semaines (Liepert et al 1995), ou encore après une période d'alitement prolongé de 90 jours (Roberts et al

2012).

2010). A l'inverse, l'excitabilité corticale est accrue après 10 jours de plâtrage de la jambe (Roberts et al 2007) ou une immobilisation du bras pendant 3 à 6 semaines (Zanette et al 2004).

Une PSM chez l'animal induit une réorganisation des cartes corticales motrices relativement comparable à celle observée chez l'Homme. La détermination de l'organisation des représentations corticales motrices (cartes corticales motrices) chez l'animal est possible en effectuant des **microstimulations** au niveau de la couche corticale V, où se situent les neurones pyramidaux. Pour cela, une électrode de stimulation est déplacée à différentes coordonnées stéréotaxiques du cortex moteur et permet d'appliquer des courants électriques de faible intensité. Ces microstimulations génèrent ainsi des mouvements permettant de déterminer les représentations corticales correspondant à la motricité des différents membres du corps (Donoghue & Sanes 1988, Stoney et al 1968).

L'immobilisation unilatérale d'un membre antérieur chez le rat pendant 15 et 30 jours entraîne une réduction de sa représentation corticale motrice (Viaro et al 2014). Il en est de même après une période de 14 jours d'HH chez le rat, où la représentation corticale motrice de la patte postérieure diminue fortement (-60 %) (Langlet et al 2012). Cette diminution est liée principalement à une réduction de la représentation corticale motrice de la hanche (Figure 19). Dans ces deux études, les seuils de stimulation sont plus élevés au sein de l'aire de représentation corticale du membre immobilisé, qu'il s'agisse du membre antérieur (Viaro et al 2014) ou postérieur (Langlet et al



Figure 19 : Illustration des représentations corticales motrices de la patte postérieure d'un rat contrôle et d'un rat HH. Les zones bleues représentent la surface corticale de la hanche, en vert celle du genou, en jaune de la cheville, et en rouge des doigts. Les surfaces en violet représentent des zones dont la stimulation induit le mouvement de plusieurs articulations, tandis que les points noirs représentent les stimulations n'induisant pas de mouvement de la patte postérieure, mais par exemple, de la patte antérieure, des vibrisses ou de la queue. Adapté de Langlet et al 2012.

Ces situations de PSM induisent donc une réorganisation des représentations corticales des membres restreints et diminuent l'excitabilité corticale du cortex moteur primaire. Cette diminution de l'excitabilité corticale pourrait s'expliquer en partie par des changements des propriétés intrinsèques des neurones. En effet, l'étude de Canu et ses collègues, *in vitro*, a mis en évidence sur des coupes coronales de cerveau de rats HH que la résistance d'entrée et la constante de temps des cellules corticales étaient diminuées (-20 %), que la rhéobase augmentait (+ 34%), alors que le potentiel de repos était inchangé (Canu et al 2010).

En conclusion, une période de PSM induit de profonds remaniements au niveau des représentations corticales motrices et de l'excitabilité corticale, que ce soit chez l'Homme ou chez l'animal. Chez l'Homme, les résultats sont très variables selon le type d'inactivité physique étudié (immobilisation ou alitement prolongé), le membre impacté (membres supérieur ou inférieur) et surtout selon la durée de l'inactivité physique (heures, jours, semaines). Les résultats obtenus chez l'animal sont plus clairs mettant en évidence qu'une période de PSM induit une diminution drastique de la représentation corticale motrice du membre restreint, ainsi qu'une diminution de l'excitabilité corticale. Ce changement d'excitabilité pourrait être en partie dû à des changements des propriétés électrophysiologiques des cellules corticales, tandis que la plasticité des représentations corticales motrices résulterait de changements au niveau synaptique.

5. Mécanismes impliqués dans la plasticité du cortex moteur primaire

Les cartes corticales motrices sont douées d'une réorganisation rapide tout au long de la vie que ce soit chez l'animal ou l'Homme en fonction de nouvelles expériences ou interactions avec l'environnement. En effet, dans le cortex moteur, l'apprentissage d'une nouvelle tâche motrice s'accompagne d'une expansion de la représentation corticale des membres impliqués dans les mouvements liés aux tâches d'entrainement (Kleim et al 2002, Molina-Luna et al 2008, Nudo et al 1996), tandis qu'une période de PSM induit une réduction des représentations corticales motrices correspondant aux membres restreints (immobilisation ou HH) (Langlet et al 2012, Viaro et al 2014).

Il a été proposé que les **connexions horizontales du cortex moteur** servent de substrat structurel pour la plasticité des représentations corticales motrices. En effet, les neurones pyramidaux forment un réseau dynamique en créant une large connectivité horizontale, au niveau des **couches corticales II/III et V**, par d'importantes projections latérales qui forment des synapses excitatrices avec leurs partenaires postsynaptiques (Sanes & Donoghue 2000).

L'hypothèse proposée par de nombreux auteurs est que la plasticité des cartes corticales motrices, tout comme celle des cartes corticales sensorielles, repose sur **un processus de masquage/démasquage synaptique** (Sanes & Donoghue 2000). Par exemple, un apprentissage

Revue bibliographique – III. Le système moteur

moteur, tel qu'une tâche de préhension fine sollicitant les doigts, augmente l'activité au sein des aires corticales correspondantes, provoquant un démasquage de synapses excitatrices et latentes afin de contribuer à l'expansion de la représentation corticale des doigts (Nudo et al 1996). A l'inverse, une diminution de l'activité motrice d'un membre induit une réduction de l'activité synaptique au niveau de la zone correspondante et contribue à un masquage synaptique et une diminution de l'aire de représentation corticale (Langlet et al 2012, Martin et al 2005).

Ce processus de masquage/démasquage synaptique nécessite des **changements de l'efficacité synaptique (LTP/LTD)**, comme expliqué dans le paragraphe « mécanismes impliqués dans la plasticité du cortex somesthésique⁴ » (Sanes et al 1990, Teskey et al 2008, Ziemann et al 2006). En effet, dans un modèle animal d'épilepsie, des mécanismes de LTP sont observés conjointement à une augmentation de l'aire de représentation corticale motrice de la patte antérieure (Henderson et al 2011, Teskey et al 2002). Il a été montré également que l'apprentissage d'une tâche de préhension chez le rat renforce les connexions horizontales dans les couches corticales I, II/III et V du cortex moteur primaire, et provoque une augmentation de l'amplitude des potentiels évoqués (Harms et al 2008, Monfils & Teskey 2004, Rioult-Pedotti et al 1998). A l'inverse, il a été mis en évidence *in vivo* qu'une diminution de la fréquence d'activation corticale génère une LTD dans le cortex moteur en association avec une réduction de la représentation corticale motrice du membre antérieur (Teskey et al 2007).

Efficacité synaptique et système glutamatergique

Les mécanismes de LTP et LTD sont dépendants **des récepteurs glutamatergiques NMDA**. Chez l'Homme comme chez l'animal, l'administration de mémantine ou de MK-801 (deux antagonistes des récepteurs NMDA) prévient la réorganisation des cartes corticales motrices après un apprentissage moteur (Qiu 1990, Schwenkreis et al 2005).

Inhibition corticale et système GABAergique

La plasticité synaptique peut également être modulée par **l'inhibition corticale**. En effet, l'administration locale de bicuculline, un antagoniste GABAergique, au niveau de la représentation corticale motrice de la patte antérieure provoque une expansion importante de sa surface au niveau de la représentation corticale motrice des vibrisses (Jacobs & Donoghue 1991). Les auteurs supposent qu'une levée de l'inhibition corticale induit une réorganisation des cartes corticales

⁴ Voir le paragraphe – II.B.4. Mécanismes impliqués dans la plasticité du cortex somesthésique primaire, p48

Revue bibliographique – III. Le système moteur

motrices en favorisant les transmissions synaptiques excitatrices au niveau de la représentation corticale motrice de la patte antérieure (Jacobs & Donoghue 1991, Schneider et al 2002). Après l'application corticale de bicuculline au niveau du cortex moteur de rats immobilisés, on observe également une altération de la connectivité synaptique intracorticale dans la représentation corticale motrice des pattes antérieures et ce jusqu'à 15 jours après l'enlèvement du plâtre (Viaro et al 2014). A l'inverse, le diazepam (agoniste du GABA) produit les mêmes effets que la PSM : il entraine une diminution de la représentation corticale motrice de la patte antérieure et une augmentation du seuil de stimulation pour induire un mouvement de la patte (Young et al 2011), ce qui suggère un rôle de l'inhibition GABAergique dans les réorganisations corticales liées à la PSM.

Changements morphologiques des épines dendritiques

De nombreux éléments ont également montré que les **changements structurels synaptiques** sont associés aux changements fonctionnels des circuits neuronaux. Par exemple, dans le cortex moteur du rat, l'induction de la LTP dans l'aire corticale des membres antérieurs augmente la densité des épines dendritiques des neurones pyramidaux des couches corticales III et V, et entraîne l'élargissement de l'aire corticale des membres antérieurs (Monfils et al 2004). En revanche, l'induction de la LTD diminue la densité des épines dendritiques (Monfils & Teskey 2004), et réduit l'aire corticale des membres antérieurs (Teskey et al 2007). Une LTP associée à un apprentissage moteur est impliquée dans l'élargissement des têtes des épines dendritiques dans la couche I du cortex moteur (Harms et al 2008).

Ainsi, un changement de densité des épines dendritiques est important dans le processus d'adaptation qui contrôle les signaux qu'un neurone peut recevoir de ses afférences. De manière intéressante, l'étude de Trinel et ses collègues a mis en évidence, chez des rats soumis à 14 jours d'HH, une augmentation de 26 % de la densité des épines dendritiques dans le cortex sensorimoteur. Cette augmentation concerne principalement les filopodes (épines dendritiques immatures sans densité postsynaptique) (+82 %) et les épines dendritiques matures de type « champignon » (+33 %) (Figure 20B). La formation de filopodes est dépendante de l'activité corticale (Trachtenberg et al 2002). On peut supposer que la plupart de ces filopodes qui sont apparus les premiers jours d'HH vont devenir des épines dendritiques matures et stables (de type champignon) sur le long terme, tout comme après un apprentissage moteur (Figure 20A). La densité des épines dendritiques augmente également suite à un vol spatial de 14 jours (Belichenko & Krasnov 1991), tandis qu'elle diminue après 40 jours d'immobilisation (Sala-Catala et al 2005). Ces résultats contradictoires peuvent s'expliquer par la durée et le type de PSM.

Suite à l'apprentissage d'une tâche motrice, de nouvelles épines dendritiques se forment dans la couche corticale V du cortex moteur primaire quelques heures après le début de l'apprentissage moteur (Xu et al 2009, Yang et al 2009). Lors de cette phase d'acquisition, ces nouvelles épines pourraient fournir un moyen d'accroitre le nombre de connexions synaptiques, dont certaines vont se consolider. A cette formation rapide d'épines succède une période d'élimination d'un nombre significatif d'épines dendritiques quelques mois après le début de l'apprentissage, ce qui ramène le nombre total des épines dendritiques au niveau de base après une période d'entraînement prolongée. Cette élimination est sélective pour les épines existantes avant l'apprentissage de cette tâche motrice, tandis que les nouvelles épines induites pendant l'apprentissage sont préférentiellement stabilisées lors de l'entraînement suivant, et longtemps après l'arrêt de l'entraînement (Figure 20A) (Xu et al 2009).



Figure 20: Dynamique des épines dendritiques après (A) un apprentissage moteur ou (B) une période de 14 jours d'HH chez le rat. (A) Les nouvelles épines formées par l'apprentissage moteur sont préférentiellement stabilisées, tandis que les épines préexistantes sont éliminées de manière sélective, ce qui entraîne un remaniement des circuits neuronaux. L'apprentissage moteur augmente dans un premier temps la densité des épines dendritiques, qui revient progressivement au niveau contrôle. (B) Exemple représentatif de dendrites proximales superficielles dans les groupes C et HH. Les (*) représentent les épines trapues (*stubby spines*), les flèches (\bowtie) indiquent des épines fines (*thin spines*), des pointes de flèche pleines (\triangleright) des épines de type champignon (*mushrooms spines*) et vides (\triangleright) des filopodes (*filopodia*). Barre d'échelle = 5 µm. Adapté de Trinel et al 2013 et Yu & Zuo 2011.

Revue bibliographique – III. Le système moteur

Concernant la morphologie des épines dendritiques après une période d'HH, la longueur des épines dendritiques diminue et le diamètre de leur tête varie selon la couche corticale : il augmente dans les couches superficielles et diminue dans les couches plus profondes (Trinel et al 2013). Il est important de noter que la taille de la tête des épines est proportionnelle à l'amplitude du potentiel synaptique (Tan et al 2009). La diminution de la taille des têtes des épines dans les couches profondes peut être associée à la diminution de l'excitabilité corticale observée dans la couche corticale V du cortex moteur primaire des rats HH (Langlet et al 2012).

En conclusion, la plasticité des cartes corticales motrices résulterait d'une modification de l'équilibre excitation/inhibition corticale au niveau de la connectivité horizontale du cortex moteur primaire. Ceci permettrait le masquage/démasquage de synapses et la réorganisation des cartes somatotopiques. On peut ainsi supposer qu'une diminution de la représentation corticale d'un membre suite à une PSM résulterait d'un masquage de synapses au sein de cette représentation, lié à une réduction de l'excitabilité et à un mécanisme de LTD. De plus, une période de PSM entraîne également des changements morphologiques des épines dendritiques pouvant avoir des répercussions sur le maintien des réseaux neuronaux et l'excitabilité corticale.

C. Perturbation sensorimotrice et conséquences sur les performances motrices

Les différents changements induits par une période de PSM au niveau du système moteur ont des répercussions fonctionnelles importantes sur les performances motrices, telles que sur (1) le réflexe H, (2) la posture ou encore (3) la locomotion.

1. Le réflexe H

Définition

Le réflexe H (ou de Hoffman) est un réflexe monosynaptique habituellement utilisé pour évaluer l'excitabilité des motoneurones spinaux. La stimulation électrique des fibres afférentes la induit un analogue électromyographique du réflexe d'étirement, contournant les fuseaux musculaires, en raison de la connexion synaptique directe de ces afférences avec les motoneurones α (Figure 21A). Après stimulation, deux réponses sont observées (Figure 21B) (Pérot & Almeida-Silveira 1994) :

Une 1^{ère} réponse avec une courte latence (environ 1 ms chez le rat), appelée onde M (ou motrice). Elle correspond à une réponse directe, distale, des motoneurones.
Une 2^{ème} réponse avec une plus longue latence (environ 7 ms chez le rat), appelée réflexe H.
 Cette réponse réflexe correspond à la stimulation des fibres nerveuses afférentes la qui stimulent à leur tour les motoneurones α. Le temps de latence est plus élevé car l'information nerveuse se propage d'abord vers la moelle épinière pour revenir via le motoneurone α vers le muscle. Les seuils des ondes M et H étant égaux, l'onde du réflexe H apparaît ainsi en même temps ou après l'apparition de l'onde M.



Figure 21 : Schéma simplifié du traitement spinal de la composante monosynaptique du réflexe H. (A) Le stimulus électrique utilisé pour activer le nerf périphérique mixte est représenté par l'ellipse bleue. L'activation du nerf se propage orthodromiquement dans les axones moteurs pour évoquer l'onde M, et orthodromiquement dans les axones sensoriels (représentés ici comme des afférences du groupe la découlant des terminaisons annulospirales sur le fuseau neuromusculaire) pour évoquer le réflexe H via une connexion monosynaptique avec les motoneurones α . (B) Représentation des réponses d'onde M et du réflexe H chez l'Homme. Adapté de Zehr 2002.

Réflexe H et PSM

Lorsqu'on mesure les amplitudes de ces signaux, le rapport Hmax/Mmax (les amplitudes maximales des ondes) permet d'évaluer l'excitabilité du motoneurone α . Chez l'Homme, ce ratio Hmax/Mmax au niveau du muscle soléaire augmente après une période en microgravité (Nomura et al 2001, Ruegg et al 1997). Ce résultat est également observé après 5 semaines d'alitement prolongé sur les muscles soléaires et gastrocnémien (Duchateau 1995). Différentes périodes de suspension unilatérale d'un membre de 24 jours à 4 semaines induisent également une augmentation de l'amplitude du réflexe H (Clark et al 2006, Seynnes et al 2010). Cependant, d'autres études montrent une diminution du ratio Hmax/Mmax du muscle soléaire après 20 jours d'alitement prolongé (Yamanaka et al 1999), ou aucun changement de l'amplitude du réflexe H après une période de microgravité simulée lors de vols paraboliques (Kramer et al 2013).

Après deux et trois semaines d'HH chez le rat, le seuil d'activation pour obtenir le réflexe H diminuent (De-Doncker et al 2006) et le rapport Hmax/Mmax augmente au niveau du triceps sural (Anderson et al 1999) respectivement, ce qui suggère une augmentation de l'excitabilité des motoneurones.

2. La posture

Définition de la posture

L'activité motrice posturale a deux fonctions : lutter contre les effets de forces externes comme la gravité, les accélérations verticales ou la force centrifuge, et coordonner le maintien de l'équilibre du corps lors d'un mouvement ou d'un déplacement. L'activité musculaire qui permet le maintien de la posture est quasi-permanente, on parle de tonus musculaire. Cette activité est constamment soumise à des ajustements chargés de compenser les perturbations de la posture pouvant se traduire par une perte d'équilibre. Les centres nerveux contrôlant ces ajustements posturaux sont, pour l'essentiel, localisés dans le tronc cérébral.

Posture et PSM

Des situations de PSM provoquent une perturbation du contrôle postural. En effet, après un vol spatial de longue durée, des sujets ont été soumis à un test d'organisation sensorielle (ou SOT : *sensory organization test*), consistant à étudier la réponse posturale du sujet par un score en condition basale ou avec un mouvement de balancement, les yeux ouverts ou fermés. Ces sujets obtiennent un score faible représentant une instabilité posturale (Cohen et al 2012). Après un alitement prolongé de 70 jours, les sujets présentent également un faible score au SOT (Koppelmans et al 2017). De plus, il a été observé une diminution de la stabilité posturale et une augmentation de l'incidence des chutes immédiatement après 5 jours d'alitement prolongé (Reschke et al 2009).

Chez les rats HH, on constate une transition d'une position plantigrade (angle de la cheville entre 30 et 40°) à une position digitigrade (angle de la cheville de 90°) (Canu & Falempin 1996). Par ailleurs, une instabilité latérale est observée accompagnée d'une abduction des pattes postérieures (Canu & Falempin 1998). Lors de l'évaluation des comportements sensoriels, une étude a montré que les rats HH présentent de mauvais scores au test de l'adhésif (temps augmenté pour ressentir et enlever un adhésif placé sur la patte postérieure) et au test du filament de von Frey (temps de retrait de la patte postérieure beaucoup plus long suite à une stimulation tactile) (Mysoet et al 2015). Certes, ces tests évaluent d'abord la sensibilité tactile, mais ils révèlent également des altérations du contrôle moteur et de la posture, puisqu'un animal qui a des difficultés à maintenir son équilibre préfèrera conserver tous ses membres en contact avec le sol. L'ensemble de ces résultats semble indiquer de profonds changements posturaux chez le rat après une période d'HH.

3. La locomotion

Définition de la locomotion

La moelle épinière est capable d'engendrer à elle seule, c'est-à-dire sans l'intervention ni des structures suprabulbaires ni des afférences périphériques, des commandes motrices rythmiques organisées vers les muscles des membres et du tronc. La programmation du mouvement est dans ce cas assurée par un ou plusieurs réseaux spécialisés de neurones, localisés dans la moelle épinière, et communément désignés sous le terme de générateur central de patron locomoteur (ou CPG : central pattern generator). Ce CPG peut, de façon naturelle ou dans des conditions expérimentales particulières, fonctionner de manière autonome. Ainsi, pour la locomotion, le CPG est capable d'engendrer une activation rythmique organisée des muscles fléchisseurs et extenseurs dans les membres sollicités, respectivement pendant la phase d'oscillation et la phase d'appui. Cette activité rythmique et coordonnée génère ce que l'on appelle le patron locomoteur, défini comme étant un schéma moteur global qui se répète d'un cycle locomoteur à l'autre. Pour que le mouvement soit parfaitement adapté à l'environnement, il faut modifier constamment les informations contenues dans le message moteur. Ces informations se rapportent à l'amplitude, à la durée, à la force et aux coordinations des contractions musculaires. Ce contrôle en ligne du mouvement automatique a besoin des informations fournies par de nombreux récepteurs sensoriels et surtout proprioceptifs (Rossignol 2006, Grillner 1985), qui interagissent sur le message moteur par le biais de boucles de contrôle impliquant plusieurs centres nerveux spinaux ou supraspinaux, telles que les voies motrices descendantes (Armstrong 1988, Grillner 1985).

Locomotion et PSM

Après de longues périodes d'alitement prolongé de 70 à 90 jours, les sujets présentent une augmentation significative du temps pour faire un parcours de mobilité fonctionnelle (Koppelmans et al 2017, Reschke et al 2009). Il s'agit d'un parcours d'obstacles que les sujets doivent parcourir le plus rapidement et le plus sûrement possible sans toucher les obstacles (barres de mousse, pylônes de slalom...). La 1^{ère} partie du parcours est composée d'un sol en béton et la 2^e partie d'un sol en mousse afin de perturber les entrées proprioceptives. De plus, un jour après le retour d'un vol d'environ 185 jours, les spationautes ont également effectué ce test. Tous les spationautes présentent une augmentation de 48 % du temps nécessaire pour terminer le parcours (Mulavara et al 2010).

Plusieurs paramètres spécifiques du patron locomoteur seraient modifiés après un long vol spatial. La flexion du genou pendant la phase d'appui est significativement augmentée (Bloomberg & Mulavara 2003), l'amplitude de mouvement des membres inférieurs est légèrement modifiée, en particulier lors de l'appui du talon et des orteils (Layne et al 1997), en parallèle avec des changements d'espacement des orteils (Miller et al 2010).

La locomotion a été largement étudiée chez le rat évoluant sur tapis roulant (Canu et al 2005) ou sur piste (Canu & Garnier 2009, Mysoet et al 2017) après une période de 14 jours d'HH. Ces études ont mis en évidence de nombreuses altérations au niveau du patron locomoteur chez ces rats :

De manière générale, la locomotion des rats HH n'est pas fluide et se caractérise par des pas plus lents, plus longs et irréguliers (Figure 22A et B) (Canu & Falempin 1996, Canu & Falempin 1998, Canu & Garnier 2009, Canu et al 2005). Ces observations peuvent être la conséquence d'une coordination altérée des membres postérieurs. On observe chez les rats HH que la patte postérieure touche le sol après l'élévation de la patte antérieure (alors que ceci se fait en même temps chez les rats contrôles) (Figure 22A), ce qui serait la conséquence d'un retard de déclenchement de la phase de transfert (Canu et al 2005, Mysoet et al 2017).

Les déficits locomoteurs semblent également liés à des **changements angulaires**, traduisant une diminution de la mobilité des articulations de la patte postérieure. Les articulations proximales (hanche, genou) sont les plus affectées par une période d'HH par rapport aux articulations distales (cheville, doigts). En effet, l'angle de la hanche est profondément altéré chez les rats HH et l'extension du genou augmente de 20 %, excepté lors de la phase d'appui (Mysoet et al 2017). Lors de la marche, les rats HH soulèvent leurs membres plus haut que les contrôles, augmentant le degré d'oscillation du bassin (Mysoet et al 2017) (Figure 22C). En outre, à cause de l'extension des genoux, les rats HH semblent marcher en appui sur les orteils (Canu et al 2005). Une période d'HH entraine également une flexion importante de la cheville lors de la phase d'appui (Figure 22A) (Canu & Garnier 2009, Canu et al 2005).

Enfin, d'un point de vue **spatial**, la distance entre les pattes postérieures et antérieures homolatérales est augmentée de 84 % après la période d'HH (Figure 22B) (Mysoet et al 2017). La protraction, c'est-à-dire la projection en avant de la patte postérieure, est réduite de 40 % chez les rats HH, tandis que l'extension vers l'arrière est augmentée de 61 % en fin d'appui (Figure 22A) (Canu & Garnier 2009, Canu et al 2005, Mysoet et al 2017).



Figure 22 : Altération du patron locomoteur après une période de PSM. (A) Reconstruction du mouvement du membre postérieur droit (noir) et du membre antérieur (gris) dans le plan latéral pendant un cycle locomoteur sur une piste ou sur une échelle. (B) Patron des différentes articulations (orteils, cheville, genou, hanche, coude, poignet) mises en mouvement durant la locomotion, et numérotation des différents paramètres analysés (1 : levée maximale des orteils, 2 : longueur de la foulée, 3 : distance horizontale entre les membres homolatéraux, 4 : rétraction, 5 : protraction). (C) Oscillation du bassin durant la marche. Adapté de Canu & Garnier 2009, Mysoet et al 2017.

D. Le contrôle posturo-locomoteur après une période de perturbation sensorimotrice

Les altérations du patron locomoteur observées après une période d'HH sont en partie dues à des problèmes musculaires⁵. Ainsi, des études ont mis en évidence que l'activité électromyographique variait lors de la locomotion et pouvait participer au manque de coordination décrit ci-dessus chez les rats HH. En effet, l'analyse EMG de deux muscles impliqués dans la flexion et l'extension de la cheville, respectivement le tibial antérieur et le soléaire, montre qu'une période d'HH induit une augmentation de l'activité du soléaire tandis que l'activité du tibial antérieur diminue ; en outre, la coordination est perturbée car des coactivations de ces deux muscles antagonistes sont fréquemment observées (Canu & Falempin 1997). Les muscles soléaires des pattes postérieures droite et gauche seraient également coactivés lors de la marche sur tapis roulant (Canu & Falempin 1998).

⁵ Voir le paragraphe III.B.1. PSM et conséquences musculosquelettiques, p60

Revue bibliographique – III. Le système moteur

L'administration d'un agoniste β 2 adrénergique (clenbutérol) connu pour hypertrophier le muscle, préserve la masse et la force musculaires mais n'améliore pas les performances motrices chez les rats HH (Canu et al 2001a). Cela suggère que les altérations fonctionnelles ne sont pas dues, du moins pas exclusivement, à l'altération des propriétés musculaires. La locomotion des rats HH semble moins stéréotypée (Canu et al 2005) et l'étude de la locomotion sur une échelle horizontale montre des altérations exacerbées par rapport à celle sur tapis roulant (Canu & Garnier 2009). La locomotion sur échelle horizontale nécessite des mouvements précis et volontaires, impliquant les structures supraspinales (Beloozerova et al 2003). Ces deux observations suggèrent que les altérations de la locomotion chez les rats HH impliqueraient non seulement le système musculaire et le système nerveux périphérique, mais également des structures supraspinales, telles que le cortex moteur.

IV. La balance phosphorylation/O-GlcNAcylation dans la plasticité synaptique

La compréhension des mécanismes impliqués dans la réorganisation des représentations corticales sensorielles ou motrices reste encore parcellaire. Cette plasticité ferait principalement appel à des mécanismes de masquage/démasquage synaptiques⁶.

Dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes donc particulièrement intéressés (1) aux mécanismes moléculaires de la plasticité des synapses glutamatergiques, ainsi qu'à (2) deux modifications post-traductionnelles fondamentales impliquées dans l'activité synaptique : la phosphorylation et la O-GlcNAcylation.

A. Mécanismes moléculaires de la plasticité synaptique

La synapse est caractérisée par une organisation spécifique. Elle est classiquement divisée en trois régions, possédant chacune une spécialisation morphologique et fonctionnelle : le **compartiment présynaptique**, la **fente synaptique** et le **compartiment postsynaptique**.

Ces phases font intervenir différents mécanismes moléculaires pré- et postsynaptiques dont certains seront décrits dans les paragraphes ci-dessous.

1. Elément présynaptique

Le compartiment présynaptique issu des terminaisons axonales contient des vésicules synaptiques, remplies de molécules appelées neurotransmetteurs. Certaines de ces vésicules sont ancrées à la membrane plasmique, d'autres constituent un réservoir situé dans le bouton présynaptique. Au niveau de la membrane plasmique, on peut observer la présence d'une zone dense appelée zone active où les membranes des vésicules synaptiques fusionnent pour libérer les neurotransmetteurs dans la fente synaptique.

La libération de neurotransmetteurs par les vésicules synaptiques implique un cycle d'exoendocytose (Figure 23) qui comprend plusieurs étapes : (1) le stockage d'une partie des vésicules synaptiques dans un pool de réserve, (2) le transfert des vésicules synaptiques, du pool de réserve ou du pool prêt à être libéré, vers les sites de libération ; (3) l'amarrage et l'ancrage des vésicules synaptiques à la membrane plasmique dans la zone active, l'amorçage, puis la fusion et l'exocytose permettant la libération des neurotransmetteurs contenus dans les vésicules synaptiques, et (4)

⁶ Voir les paragraphes II.B.4. Mécanismes impliqués dans la plasticité du cortex somesthésique primaire, p48 et III.B.5 Mécanismes impliqués dans la plasticité du cortex moteur primaire, p68

enfin la récupération de la membrane des vésicules synaptiques par endocytose et (5) le recyclage des vésicules synaptiques.



Figure 23 : Représentation schématique du compartiment présynaptique et du cycle exo-endocytose des vésicules synaptiques. Les éléments en rouge représentent la synapsine1 ; les vésicules synaptiques sont représentées par des cercles et le cytosquelette par les bâtonnets rouges. Les différentes étapes du cycle sont numérotées de 1 à 5, voir détail dans le texte. Adapté de Cesca et al 2010.

Ce cycle en plusieurs étapes est rendu possible par l'interaction synchrone et/ou contiguë d'un certain nombre de protéines à la fois solubles et associées à la membrane, mettant en évidence une machinerie moléculaire complexe. En voici quelques exemples :

La synaptophysine

La **synaptophysine** est la première protéine de vésicule synaptique à avoir été clonée (Wiedenmann & Franke 1985). Elle est constituée de quatre domaines transmembranaires et forme un homo-oligomère (Thomas et al 1988) qui peut fonctionner comme un canal (Johnston & Sudhof 1990). La synaptophysine est l'une des protéines vésiculaires les plus abondantes, représentant environ 10 % du total des protéines vésiculaires (Takamori et al 2006). En effet, chaque vésicule synaptique comporte 32 copies de synaptophysine. La synaptophysine étant exclusivement localisée au niveau des vésicules synaptiques, elle est très souvent utilisée comme marqueur présynaptique.

Elle aurait des rôles dans l'exocytose et l'endocytose des vésicules synaptiques (Kwon & Chapman 2011, Shibaguchi et al 2000, Valtorta et al 2004), dans la formation des synapses (Tarsa & Goda 2002) et la biogenèse (Cameron et al 1991, Thiele et al 2000).

La synapsine 1

La **synapsine 1** est une phosphoprotéine neuronale dont le rôle est de moduler la libération de neurotransmetteurs par attachement réversible des vésicules synaptiques au cytosquelette d'actine **(Figure 23)**. Cette protéine est essentielle dans la plasticité neuronale, en régulant la transmission synaptique (trafic vésiculaire), la croissance des neurites et la synaptogenèse (Chi et al 2001, Greengard et al 1993, Hilfiker et al 1999, Pieribone et al 1995, Rosahl et al 1995).

La structure de la synapsine 1 est maintenant bien connue : elle est divisée en 5 domaines (A à E) sur lesquels sont disposés différents sites de phosphorylation (sites 1 à 9). L'activité de la synapsine 1 est régulée par de nombreuses protéines kinases qui modulent ses propriétés biochimiques et sa liaison aux vésicules synaptiques en jouant sur l'interaction avec les filaments d'actine et autres protéines synaptiques (**Figure 24**) :

- Site 1: Il a été montré que la phosphorylation du site 1 entraîne des changements conformationnels subtils dans la structure de la synapsine 1 (Benfenati et al 1990), conduisant à une diminution de son affinité pour l'actine (Bähler & Greengard 1987).
- Sites 2 et 3 : La phosphorylation de ces sites provoque des changements conformationnels majeurs dans la structure de la synapsine 1 (Benfenati et al 1990), conduisant à une réduction de sa liaison à l'actine (Bähler & Greengard 1987) et aux vésicules synaptiques (Stefani et al 1997).
- Sites 4, 5 et 6, 7: La phosphorylation de ces sites par la voie MAPK/ERK régulerait dynamiquement l'organisation des différents pools de vésicules synaptiques (Jovanovic et al 2000), ainsi que l'établissement de nouvelles connexions synaptiques par la phosphorylation de la synapsine 1 (Giachello et al 2010).
- Site 8 : La phosphorylation de la tyrosine a des effets opposés de celle des sérines, c'est-àdire qu'elle entraîne une augmentation de l'association de la synapsine à l'actine et aux vésicules synaptiques, ainsi que sa capacité à former des oligomères.

	S9 S62 S67 1 45		Y301 8	S549,551 S566 S603 67 2 3		S682*
	PKA / CaMKI/IV	МАРК	Src	MAPK / Cdk1/5	CaMKII	
Liaison à l'actine	Ъ	Ы	7	لا	لا	
Liaison aux vésicules synaptiques	Ъ	Ŕ	R	Ŕ	Ч	
Libération de neurotransmetteurs	7		И		٦	

Figure 24: Structure de la synapsine 1 et localisation de ses différents sites de phosphorylation. La synapsine 1, organisée en 5 domaines (A à E) est phosphorylée sur de nombreux sites (S pour sérine et Y pour tyrosine) par différentes kinases : PKA (*protein kinase A*), CaMKI/IV et CaMKII (*Ca*²⁺/*calmodulin-dependent protein kinase I/IV et II*), MAPK (*mitogen-activated protein kinase*), Src (*proto-oncogene tyrosine-protein kinase*), cdk1/5 (*cyclin-dependent kinase 1/5*). Ces différentes kinases modulent les interactions de la synapsine 1 avec l'actine et les vésicules synaptiques. Adapté de Cesca et al 2010.

La synaptotagmine 1

L'étape de la fusion des vésicules synaptiques avec la membrane plasmique est un phénomène finement contrôlé. Pour rappel, ce phénomène dépend des protéines SNARE (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor receptor*) trouvées à la fois sur les vésicules synaptiques (v-SNARE, synaptobrevine-2/VAMP-2) et la membrane plasmique cible (t-SNARE, *target*, Syntaxine 1 et SNAP-25). Ainsi, lors de l'exocytose conduisant à la libération de neurotransmetteurs, la fusion est déclenchée par une augmentation de la concentration intracellulaire de Ca²⁺. La **synaptotagmine 1**, protéine membranaire des vésicules synaptiques, semble être l'une des protéines sensibles au Ca²⁺ impliquées dans cette régulation (Chapman 2008, Südhof 2013). En effet, la synaptotagmine 1 possède deux domaines C2 homologues au domaine C2 de la PKC. Ces domaines C₂A et C₂B se lient respectivement à trois et à deux ions Ca²⁺, avec une faible affinité (**Figure 25A**) (Li et al 1995). L'augmentation de Ca²⁺ stimule l'interaction de la synaptotagmine 1 avec le complexe SNARE, les phospholipides et également avec les canaux Ca²⁺ dépendants du potentiel, et diminue son affinité pour SV2 (*synaptic vesicle 2*), une protéine des vésicules synaptiques (Charvin et al 1997, Davis et al 1999, Schivell et al 1996). La sensibilité de la libération de neurotransmetteurs au Ca²⁺ est directement liée à l'affinité de la synaptotagmine 1 pour cet ion (Bai & Chapman 2004, Fernández-

Revue bibliographique - IV. Plasticité synaptique & O-GlcNAcylation

Chacón et al 2001). En effet, il est possible que la synaptotagmine 1 participe à la genèse du pore de fusion (Wang et al 2001) : avant l'entrée du Ca²⁺, elle bloquerait la fusion, le complexe SNARE étant partiellement assemblé ; après l'entrée de Ca²⁺, elle se lierait au complexe SNARE et permettrait ainsi la fusion (**Figure 25B**). Tout comme la synapsine 1, la synaptotagmine peut être phosphorylée par différentes kinases (CaMKII, PKC, caséine kinase II) afin de réguler son activité (Sabine et al 1999).



Figure 25: Structure et fonction de la synaptotagmine 1. (A) Représentation schématique de la structure de la synaptotagmine 1, comprenant les deux domaines C_2A et C_2B , et les sites de liaison au Ca^{2+} . La partie rouge représente l'insertion transmembranaire de la synaptotagmine 1 dans la vésicule synaptique. (B) Mode d'action de la synaptotagmine 1 et de ces domaines C_2A et C_2B : (1) Avant l'arrivée du Ca^{2+} , la synaptotagmine 1 possède une faible affinité pour les protéines SNARE au niveau de la membrane plasmique. La synaptobrévine est dans une conformation inaccessible à ce stade. (2) La liaison au Ca^{2+} augmenterait considérablement la liaison de la synaptotagmine 1 avec la membrane plasmique et les protéines SNARE, en rapprochant la synaptobrévine de SNAP-25 et de la syntaxine. (3) Cela conduirait à la formation d'un faisceau à quatre hélices serrées, se fermant progressivement de l'extrémité distale vers l'extrémité proximale de la membrane. (4) Le complexe synaptotagmine-synaptobrévine-SNAP-25-syntaxine subirait une oligomérisation dépendante du Ca^{2+} , entraînant un flux lipidique au point de contact entre la vésicule synaptique et la membrane plasmique. Cela se traduirait par la formation du pore de fusion. L'oligomérisation de la synaptotagmine 1 stabiliserait alors le pore de fusion. Adapté de Koh & Bellen 2003, Nishiki et al 2015.

2. Elément postsynaptique

Suite à l'exocytose des vésicules au niveau présynaptique, les neurotransmetteurs libérés vont se fixer sur des récepteurs présents à la membrane plasmique de la **densité postsynaptique**.

Le **glutamate** est le principal neurotransmetteur excitateur du cerveau. La libération de ce neurotransmetteur au niveau des synapses entraine l'activation de deux types de récepteurs au glutamate, les **récepteurs AMPA (AMPAR)** et les **récepteurs NMDA (NMDAR)**. Ces deux récepteurs jouent un rôle différent dans la plasticité synaptique et dans les processus de LTP et LTD. Les récepteurs NMDA, du fait de leur forte perméabilité au Ca²⁺, sont essentiels à l'induction de la LTP, mais ne sont pas sujets à potentialisation. Les récepteurs AMPA sont quant à eux, les cibles principales de cette plasticité : leur nombre s'accroît dans la zone postsynaptique, favorisant un accroissement du signal postsynaptique. Les mécanismes mis en jeu sont complexes et font intervenir des processus de phosphorylation, d'exocytose et de stabilisation des récepteurs AMPA par des protéines d'ancrage au niveau postsynaptique (Hollmann & Heinemann 1994).

Les récepteurs AMPA

Structure et composition des AMPAR

Les AMPAR peuvent être composés de quatre sous-unités : GluA1, GluA2, GluA3 et GluA4. Toutes les sous-unités des AMPAR sont constituées de régions extracellulaires et transmembranaires hautement homologues, mais varient dans leurs domaines C-terminaux intracellulaires (Figure 26). Les extrémités C-terminales contiennent plusieurs éléments régulateurs qui sont sujets à diverses modifications post-traductionnelles, dont la phosphorylation, la palmitoylation et l'ubiquitination des protéines (Figure 26) (Anggono & Huganir 2012, Lu & Roche 2012). Ils interagissent également avec des protéines d'échafaudage qui lient les molécules de signalisation ainsi que les protéines du cytosquelette (Figure 26). Les domaines C-terminaux de ces sous-unités sont cruciaux pour la régulation de la fonction des AMPAR (synchronisation des canaux, trafic et stabilisation au niveau des synapses). L'expression de ces différentes sous-unités varie au cours du développement et en fonction des différentes régions cérébrales (Martin et al 1993) ; par exemple, les sous-unités prédominantes dans l'hippocampe adulte sont constituées d'hétéromères de GluA2/GluA1 avec une petite population de GluA2/GluA3 (Wenthold et al 1996).



Figure 26: Structure des sous-unités (A) GluA1 et (B) GluA2 des AMPAR et localisation des sites de différentes modifications post-traductionnelles. NTD : domaine N-terminal ; M1-4 : domaines transmembranaires ; M2 : formation du pore du canal ; S1 et S2 : domaines de liaison au glutamate. Au niveau intracellulaire, sont représentés en vert les sites de palmitoylation, en rouge les sites de phosphorylation, et en violet un site d'ubiquitination. Adapté de Lu & Roche 2012.

Régulation du trafic et de l'activité des AMPAR

Le trafic des AMPAR (endocytose/exocytose) est un processus fondamental et rapide dans la plasticité synaptique. La phosphorylation des sous-unités GluA1 et GluA2 s'est révélée être importante pour l'expression de la LTP et la LTD (Citri & Malenka 2007, Malenka & Bear 2004, Malinow & Malenka 2002).

Lors de la **phase d'induction de la LTP (Figure 27, droite)**, une augmentation rapide du Ca²⁺ intracellulaire sur une courte période de temps (Malenka et al 1992), suivie d'une activation de protéines kinases, conduit à l'insertion des AMPAR à la membrane postsynaptique et à une augmentation de la force synaptique (Song & Huganir 2002). En effet, l'activation de la CaMKII, la PKC (*Protein Kinase C*) et la PKA par l'entrée de Ca²⁺ conduit à la phosphorylation des sérines 816, 818, 831 et 845 de la sous-unité GluA1, permettant l'insertion de nombreux récepteurs à la densité postsynaptique (Boehm et al 2006, Oh & Derkach 2005, Oh et al 2006). La phosphorylation par la PKA de la sérine 845 peut également augmenter la conductance des AMPAR (Banke et al 2000).

Lors de la phase d'induction de la LTD (Figure 27, gauche), une augmentation de plus petite ampleur et de longue durée du Ca²⁺ intracellulaire (Mulkey et al 1993) stimule l'activation des phosphatases et l'internalisation des AMPAR de la densité postsynaptique (Anwyl 2006), entraînant une diminution de la force synaptique et finalement l'induction de la LTD. En effet, l'afflux prolongé de Ca²⁺ via les NMDAR stimule l'activation de la PKC et de la calcineurine, qui phosphoryle la sérine 880 (Seidenman et al 2003) sur la sous-unité GluA2 et déphosphoryle la sérine 845 sur la sous-unité GluA1 (Lee et al 2000). La partie C-terminale de la sous-unité GluA2 possède divers sites de liaison incluant la protéine interagissant avec le récepteur du glutamate (GRIP, Glutamate receptorinteracting protein), la protéine de liaison au récepteur AMPA (ABP, AMPA receptor-binding protein) et la protéine interagissant avec la C-kinase (PICK-1, Protein Interacting with C Kinase - 1) (Song & Huganir 2002). La phosphorylation de la sérine 880 augmente l'affinité de la sous-unité GluA2 pour PICK-1 et permet son détachement de GRIP/ABP, entraînant l'internalisation des AMPAR (Seidenman et al 2003). La déphosphorylation de la tyrosine 876 de la sous-unité GluA2 est également importante dans le processus d'endocytose des AMPAR (Scholz et al 2010). Il est important de noter que l'endocytose des AMPAR est le mécanisme d'expression de toutes les formes de LTD (Malinow & Malenka 2002).



Figure 27: Illustration des acteurs moléculaires et des mécanismes impliqués dans la LTD et la LTP. A gauche, la LTD se caractérise par une endocytose des AMPAR contenant des sous-unités GluA2. L'augmentation faible et prolongée de Ca²⁺ active la PKC, qui phosphoryle la ser880 de GluA2. Cette phosphorylation diminue l'affinité de GluA2 pour la protéine GRIP, et augmente l'affinité pour la protéine PICK-1. La liaison à PICK-1 entraîne l'internalisation des AMPAR. A droite, la LTP est caractérisée par une augmentation marquée des AMPAR à la surface de la membrane postsynaptique entraînant une augmentation importante de la force synaptique. La LTP est induite par des niveaux élevés de glutamate présynaptique qui activent les NMDAR, conduisant à un fort afflux de Ca²⁺ à l'origine de l'activation des kinases PKC, PKA et CaMKII impliquées dans la phosphorylation de GluA1. La phosphorylation de GluA1 entraîne l'exocytose des AMPAR. Enfin, les AMPAR diffusent latéralement jusqu'au niveau de la membrane postsynaptique et y sont ancrés par des protéines d'échafaudage. De Bassani et al 2013.

Les récepteurs NMDA

Structure et composition des NMDAR

Les NMDAR sont des récepteurs particuliers ; pour être activés, ils possèdent deux ligands potentiels, le glutamate ou la glycine (Johnson & Ascher 1987). Ces récepteurs sont un assemblage de différentes sous-unités : GluN1 (liant la glycine), GluN2 (liant le glutamate) et GluN3 (liant la glycine). Le plus souvent, les sous-unités des NMDAR sont associées en hétérotétramères de deux sous-unités GluN1 et de deux sous-unités GluN2 (Cull-Candy & Leszkiewicz 2004) pour former une unité fonctionnelle (Figure 28A) (Furukawa et al 2005).

Les sous-unités des NMDAR sont composées d'un domaine N-terminal extracellulaire long avec les sites de liaison du ligand, trois domaines transmembranaires, un pore, et un domaine C-terminal intracellulaire de longueur variable selon les sous-unités **(Figure 28B)** (Paoletti & Neyton 2007). Pour débloquer le pore du canal lors de la dépolarisation de la membrane, un ion Mg²⁺ doit être dissocié du NMDAR (Mayer et al 1984). Le domaine C-terminal régule les interactions du récepteur avec une variété de protéines cytosoliques et possède de nombreux sites de phosphorylation (Wenthold et al 2003). Les processus de phosphorylation/déphosphorylation régulent les interactions du récepteur avec d'autres protéines et plus globalement la localisation et la mobilité intracellulaire des NMDAR (Lee 2006).



Figure 28 : Arrangement et structure des sous-unités GluN1 et GluN2 des NMDAR. (A) La structure cristalline des sous-unités GluN1 et 2 montre que ces sous-unités s'assemblent en tant qu'hétérotétramères avec un motif alterné (c'est-à-dire, 1-2-1-2). Le récepteur NMDA est donc composé de deux sous-unités GluN1 liant à la glycine et de deux sous-unités GluN2 liant au glutamate formant un canal poreux central perméable aux cations. (B) Représentation schématique de la structure détaillée des sous-unités GluN1 et GluN2 des NMDAR. Adapté de Hansen et al 2018 et Paoletti & Neyton 2007.

La sous-unité GluN1 est codée par un seul gène et est ubiquitaire dans le cerveau. La sous-unité GluN2 (GluN2A-D) est codée par 4 gènes distincts et ses différentes isoformes sont exprimées différemment au cours du développement et en fonction des régions cérébrales. L'expression de la sous-unité GluN2B diminue au cours du développement pour laisser place à la sous-unité GluN2A très présente dans les neurones matures (Monyer et al 1994).

Régulation du trafic et de l'activité des NMDAR

L'ouverture des NMDAR conduit à un influx de Ca²⁺ dans l'élément postsynaptique (MacDermott et al 1986). Cette perméabilité au Ca²⁺ provoque l'activation de différentes voies de signalisation qui régulent la force synaptique. Les NMDAR sont des canaux ioniques se caractérisant par une activation/désactivation lente, modulant la durée du potentiel excitateur postsynaptique et donc la mesure de la force du signal synaptique (Cull-Candy et al 2001).

Plusieurs sites de phosphorylation de sérine et thréonine ont été identifiés sur les sous-unités des NMDAR. Ces sites sont le substrat de nombreuses protéines kinases telles que PKA, PKC ou CaMKII. Ces kinases régulent le trafic intracellulaire et les propriétés de canal des NMDAR, entraînant des changements d'efficacité synaptique (Lee 2006). Par exemple, la phosphorylation des sérines 890 et 896 de la sous-unité GluN1 par la PKC entraîne la dispersion des GluN1 à la surface membranaire (Tingley et al 1997). La phosphorylation conjointe et simultanée de la sérine 896 par la PKC et de la sérine 897 par la PKA sont nécessaires pour augmenter le nombre de NMDAR à la surface membranaire (Scott et al 2001). Au niveau de la sous-unité GluN2A, la phosphorylation de la tyrosine 1387 augmente la conductance des NMDAR (Zheng et al 1998) tandis que celle des sérines 1389 et 1416 par la PKC inhibe l'interaction des NMDAR avec CaMKIIα afin de lier la protéine d'échafaudage PSD-95 (Gardoni et al 2001).

PSD-95

Au début des années 1990, **PSD-95** (*postsynaptic density protein 95*), aussi appelé SAP90 (*synaptic associated protein 90*) fut la première protéine d'échafaudage identifiée au niveau des synapses glutamatergiques. PSD-95 appartient à la famille des MAGUK (*membrane-associated guanylate kinase*), et elle est la protéine d'échafaudage la plus abondante dans la densité postsynaptique (Cheng et al 2006). Une densité postsynaptique typique peut en effet contenir 200 à 300 molécules de PSD-95 (Chen et al 2005, Sugiyama et al 2005), ce nombre excédant le nombre de récepteurs au glutamate (Cheng et al 2006).

La structure de PSD-95 se compose de trois domaines PDZ, et d'un domaine SH3/GK (*Src homology 3 domain/guanylate kinase*) (Figure 29). Possédant de multiples domaines de liaison, PSD-95 interagit avec plusieurs constituants clés de la densité postsynaptique tels que les NMDAR (Kornau et al 1995), les AMPAR via le complexe Stargazine/TARP (*Transmembrane AMPA Receptor associated protein*) (Bats et al 2007, Nicoll et al 2006), des molécules d'adhésion (Neuroligine) (Futai et al 2007), d'autres protéines d'échafaudage telles que GKAP (Kim et al 1997) ou Shank (Sala et al 2001), des protéines de signalisation (CaMKII) (Fabrizio et al 2006) et des protéines du cytosquelette (Chen et al 2008).



Figure 29 : Structure de PSD-95 et sites de liaison à différentes protéines de la densité postsynaptique. PSD-95 est constitué de trois domaines PDZ en N-terminal associé à un domaine SH3/GK en C-terminal. De Vallejo et al 2017.

Etant donné la diversité des protéines se liant à PSD-95, cette protéine aurait trois grandes fonctions :

- PSD-95 est l'une des protéines les plus stables des synapses excitatrices (Blanpied et al 2008, Sturgill et al 2009) et aurait un rôle important dans l'organisation moléculaire de la densité postsynaptique (Chen et al 2011, Elias & Nicoll 2007).
- (2) PSD-95 serait également un régulateur clé de l'efficacité synaptique en contrôlant le nombre des AMPAR à la densité postsynaptique (Bats et al 2007). L'association Stargazine/PSD-95 est en effet responsable de l'adressage et la stabilisation des AMPAR au niveau des synapses (Opazo et al 2012).
- (3) PSD-95 attirerait des protéines de signalisation intracellulaires près des NMDAR et servirait ainsi de relais entre le flux de Ca²⁺ et l'activation de voies de signalisation spécifiques impliquées dans la plasticité synaptique (Xu 2011).

3. Voies de signalisation impliquées dans la plasticité synaptique

Une multitude de voies de signalisation sont impliquées dans la plasticité synaptique. Dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes intéressés plus particulièrement à deux d'entre elles : CaMKII et MAPK/ERK.

CaMKII

La CaMKII est une protéine synaptique majeure (Lisman et al 2002). Cette kinase est une grande holoenzyme comprenant 12 sous-unités. Au niveau cérébral, les sous-unités CaMKIIα et CaMKIIβ sont majoritaires. La CaMKII est activée par l'entrée de Ca²⁺ et par la calmoduline suite à l'ouverture des NMDAR. L'enzyme peut être autophosphorylée sur la thr286 (pour CaMKIIα), permettant à CaMKII de rester active même après la diminution de Ca²⁺ (état « autonome ») (Miller & Kennedy 1986). Plusieurs résultats mettent en évidence que l'activation de la CaMKII est nécessaire à l'induction de la LTP (Lucchesi et al 2011).

Lors de la LTP, une fois activée par l'entrée de Ca²⁺ (Figure 30), la CaMKII diffuse du cytoplasme vers la synapse, par un phénomène de translocation (Shen & Meyer 1999), puis se fixe aux protéines synaptiques, la plus importante étant les NMDAR (Leonard et al 1999). La formation de ce complexe CaMKII-NMDAR semble avoir un rôle essentiel dans l'induction de la LTP et serait d'une importance primordiale pour la liaison de CaMKII à la densité postsynaptique. Ainsi, une grande partie des CaMKII peuvent être maintenues dans la densité postsynaptique par d'autres partenaires de liaison, comme la protéine LRRC7 (*leucine-rich repeat-containing protein 7*), l'α-actinine (Walikonis et al 2001), SAP97 (*synapse-associated protein 97*) (Nikandrova et al 2010) et de multiples protéines possédant des domaines PDZ (Krapivinsky et al 2004). Par ailleurs, la CaMKII est connue pour s'associer à d'autres canaux et récepteurs tels que les canaux calciques voltage-dépendants (Hudmon et al 2005, Jiang et al 2008, Welsby et al 2003) et les récepteurs dopaminergiques (Liu et al 2009).

La CaMKII joue également un rôle important dans la conductance et le trafic des AMPAR. Lors de la phase précoce de la LTP, la CaMKII phosphoryle la sérine 831 de la sous-unité GluA1 des AMPAR afin d'augmenter sa conductance (Kristensen et al 2011). Ensuite, la phosphorylation de la Stargazine par la CaMKII permet aux complexes Stargazine/AMPAR de se lier à PSD-95, ancrant ainsi plus de AMPAR à la synapse (Opazo et al 2012). De plus, l'activité de la CaMKII, en association avec d'autres processus dépendant du Ca²⁺ telle que l'activation de la voie MAPK/ERK, stimule la fusion de vésicules contenant des AMPAR avec la membrane plasmique, augmentant leur concentration à la synapse (Zhu et al 2002).

Au niveau présynaptique, CaMKII possède également quelques substrats tels que la synapsine 1, et jouerait donc un rôle dans l'activité présynaptique en régulant l'attachement des vésicules synaptiques au cytosquelette, et en conséquence dans la libération des neurotransmetteurs (Stefani et al 1997).

MAPK/ERK

La famille des MAPK est un large groupe de sérine/thréonine kinases. Ces kinases sont activées via une cascade caractéristique à cinq niveaux (Figure 30). La voie la plus connue et étudiée est celle des MAPK/ERK1/2 (*extracellular signal-regulated kinases 1/2*). Les voies des MAPK sont principalement présentes dans le cytoplasme. Après activation, les MAPK sont transloquées dans le noyau où elles phosphorylent des facteurs de transcription, qui à leur tour régulent l'expression de gènes impliqués dans la croissance, la différenciation ou la survie cellulaires (Volmat & Pouysségur 2001). Dans les neurones, les MAPK sont notamment connues pour cibler des facteurs de transcription impliqués dans la transmission et la plasticité synaptique [ex : facteur de transcription CREB (*C-AMP Response Element-binding protein*)] (Sweatt 2004, Thomas & Huganir 2004).

Les protéines ERK1/2, et plus spécifiquement ERK2, sont particulièrement présentes au niveau des synapses et de la densité postsynaptique (Suzuki et al 1995). En effet, le rôle des MAPK ne se limite pas seulement à la régulation à long terme de l'expression de gènes dans le noyau. Elles agissent également localement pour réguler l'activité synaptique. Une concentration importante de protéines ERK1/2 phosphorylées est retrouvée au niveau de la densité postsynaptique, à proximité des protéines d'échafaudage (Edbauer et al 2009). En effet, PSD-95, Homer-1, PSD-93 sont différentes protéines d'échafaudage pouvant être des cibles potentielles de la voie MAPK/ERK. Des études ont notamment mis en évidence que ERK2 phosphoryle PSD-95 (Sabio et al 2004) et PSD-93 (Guo et al 2012), et pourrait ainsi jouer un rôle dans la transmission synaptique. ERK2 est connue également pour phosphoryler des protéines d'adhésion associées à la famille des cadhérines, telles que la caténine ou la plakophiline 4 (Edbauer et al 2009). Ces protéines sont cruciales pour la morphologie et la plasticité des synapses. La voie des MAPK/ERK, en phosphorylant et régulant ces protéines d'adhésion, participerait à la structuration et aux activités synaptiques. Ensuite, des études ont mis en évidence que la voie MAPK/ERK régule l'activité des canaux potassiques Kv4.2 (Schrader et al 2006, Yuan et al 2002) et des récepteurs métabotropiques au glutamate couplé aux protéines G (mGluR1/5) (Hu et al 2012, Orlando et al 2009). Durant la LTP, ERK1/2 améliore la phosphorylation de la sous-unité GluA2 des AMPAR conduisant à l'adressage des AMPAR à la membrane synaptique (Qin et al 2005).

Au niveau présynaptique, les substrats de la voie MAPK sont moins connus. Comme décrit dans le paragraphe sur la synapsine 1, cette phosphoprotéine est un des substrats de la voie MAPK (Jovanovic et al 1996). Ainsi, la voie MAPK, en régulant l'activité de la synapsine 1, module la machinerie de libération des vésicules synaptiques au niveau des boutons axonaux et contrôle la libération des neurotransmetteurs et la plasticité présynaptique.



Figure 30 : Activation des voies de signalisation CaMKII et MAPK/ERK1/2 et leurs différents rôles au niveau de la synapse.

B. La O-GlcNAcylation, une glycosylation atypique

La O-N-acétyl- β -D-glucosaminylation, plus communément appelée O-GlcNAcylation, est une glycosylation atypique découverte par Gerald W. Hart en 1984. Elle correspond au transfert d'un unique monosaccharide, la N-acétyl-D-glucosamine par l'intermédiaire d'une liaison β sur le groupement hydroxylé de résidus de sérine et de thréonine d'une protéine (Figure 31). Les glycosylations classiques correspondent à des protéines membranaires ou sécrétées et elles sont modifiées par des structures glycanniques complexes. La O-GlcNAcylation modifie uniquement les protéines cytosoliques, nucléaires et mitochondriales, sans ajout d'autres monosaccharides.



Figure 31 : Mécanisme de la O-GlcNAcylation d'une protéine. Le processus de O-GlcNAcylation est contrôlé par deux enzymes : à partir de l'UDP-GlcNAc synthétisée par la voie de biosynthèse des hexosamines, la O-GlcNAc transférase (OGT) transfère le N-acétyl-D-glucosamine (GlcNAc) sur des résidus protéines de sérine et de thréonine. A l'inverse, la O-GlcNAcase (OGA) libère le motif O-GlcNAc de ces protéines.

Tout comme la phosphorylation, la O-GlcNAcylation est une modification post-traductionnelle dynamique et réversible importante pour la physiologie cellulaire. L'état de phosphorylation d'une protéine est régulé par une multitude de kinases et phosphatases, tandis que la O-GlcNAcylation n'est dépendante que de deux enzymes : l'ajout d'un motif O-GlcNAc (N-acétyl-D-glucosamine) est effectué par la O-GlcNAc transférase (OGT) et son retrait par la O-GlcNAcase (OGA).

1. La voie de synthèse

Le substrat glucidique du donneur pour la O-GlcNAcylation est l'uridine diphosphate-Nacétylglucosamine (UDP-GlcNAc), qui est produite lorsqu'un faible pourcentage (environ 2 – 5 %) de glucose est métabolisé par la voie de biosynthèse des hexosamines **(Figure 32)**. Les deux premières étapes sont identiques à la glycolyse dans laquelle le glucose est converti en glucose-6-phosphate par l'hexokinase, puis en fructose-6-phosphate par la phosphoglucose isomérase. Le fructose-6phosphate est transformé en glucosamine-6-phosphate par l'enzyme glutamine-fructose-6phosphate amidotransférase (GFAT1), qui joue un rôle clé dans l'intégration du flux de glucose et du métabolisme des acides aminés. Les réactions d'acétylation et d'uridylation subséquentes incorporent le métabolisme des acides gras et des nucléotides dans la production de l'UDP-GlcNAc. Fait important, l'UDP-GlcNAc sert d'inhibiteur allostérique de la GFAT1, fournissant ainsi un mécanisme de rétrocontrôle négatif dans la voie de biosynthèse des hexosamines (Kornfeld 1967). En outre, une étude récente a rapporté qu'un stress nutritionnel tel qu'un manque de glucose ou d'acides aminés augmente la production de GFAT1, qui favorise le flux de glucose à travers la voie de biosynthèse des hexosamines et donc la O-GlcNAcylation des protéines (Chaveroux et al 2016).



Figure 32 : Voie de biosynthèse des hexosamines menant à la synthèse de l'UDP-GlcNAc, nécessaire à la O-GlcNAcylation des protéines. Les métabolismes glucidique, protéique, lipidique et nucléotidique sont à l'origine de la voie de biosynthèse des hexosamines et à la synthèse de l'UDP-GlcNAc.

2. Les enzymes régulant la O-GlcNAcylation

La O-GlcNAc transférase (OGT)

L'OGT catalyse le transfert d'un motif O-GlcNAc du substrat donneur UDP-GlcNAc aux résidus sérine et thréonine des substrats cibles. Le gène codant pour l'OGT a été cloné chez différents organismes et il est conservé au cours de l'évolution (Gao et al 2001, Hart et al 2011). En effet, le gène *ogt* présente 99 % d'homologie entre le rat et l'Homme et 61 % entre le rat et *Caenorhabditis elegans* (Kreppel et al 1997, Lubas et al 1997). Chez l'Homme, le gène codant l'OGT est situé sur le chromosome X, dans la région Xq13.1, une région associée au développement de désordres neurologiques (Shafi et al 2000). L'OGT a deux régions distinctes (Figure 33) : une région catalytique C-terminale, un domaine PPO (*phosphoinositide binding domain*) permettant à l'OGT de s'associer à la membrane (Yang et al 2008), et un domaine N-terminal comprenant des unités de répétition de 34 acides aminés (TPR : *tetratricopeptide repeat*). Le motif TPR correspond à un module d'interactions protéine-protéine et sert de médiateur pour la formation de complexes protéiques : il joue ainsi un rôle important dans la détermination de la sélectivité du substrat et permet la dimérisation de l'OGT pour qu'elle soit active (Clarke et al 2008, Jinek et al 2004, Lazarus et al 2011).



Figure 33: Structure des différentes isoformes de l'OGT. Ces différentes isoformes varient principalement selon leur nombre de répétitions TPR (unités de répétition de 34 acides aminés) en N-terminal. ncOGT : OGT nucléocytoplasmique ; mOGT : OGT mitochondriale ; sOGT : OGT courte ; NLS : *putative nuclear localization sequence* ; MTS: *mitochondrial targeting sequence*. Adapté de Ma et al 2017.

Le gène *ogt* code trois variants résultant d'un épissage alternatif. Ils se distinguent dans le nombre de motifs TRP ou dans la localisation cellulaire (Figure 33) (Bond & Hanover 2015, Hanover et al 2010, Hanover et al 2003) :

- L'OGT nucléocytoplasmique (ncOGT, 116 kDa) est la forme la plus longue de l'OGT avec 11 motifs TPR. Elle est localisée dans le noyau et le cytosol (Lubas et al 1997).
- L'OGT mitochondriale (mOGT, 103 kDa) possède 9 motifs TPR. Elle possède une séquence
 MTS (*mitochondrial targeting sequence*) localisée au niveau du domaine N-terminal.
- La forme la plus courte de l'OGT (sOGT, 70 kDa) possède 2,5 motifs TPR et se situe à la fois dans le noyau et le cytoplasme.

L'activité de l'OGT et le taux global de O-GlcNAcylation sont en conséquence directement influencés par le taux d'UDP-GlcNAc disponible dans la cellule (Kreppel & Hart 1999) ou dans un compartiment cellulaire (Bond & Hanover 2015). L'OGT peut transférer un motif O-GlcNAc sur près de 4000 cibles différentes (Ma & Hart 2014), c'est pourquoi son activité est régulée de plusieurs façons : épissage alternatif, expression spécifique dans un tissu ou un organite, interactions avec les substrats par les domaines TPR, interaction avec des protéines spécifiques comme MYPT1 (*Myosin phosphatase target subunit 1*), changement de localisation (domaine PPO), modifications post-traductionnelles (phosphorylation de résidus sérine/thréonine du domaine N-terminal (Dephoure et al 2008) et d'une tyrosine du domaine C-terminal (Kreppel et al 1997), S-nitrosylation (Ryu & Do 2011), O-GlcNAcylation de motifs TPR et du domaine catalytique (Tai et al 2004), modifications post-traductionnelles des substrats ou par l'apport en nutriments.

La O-GlcNAcase (OGA)

L'OGA est une enzyme unique qui intervient dans la déglycosylation des protéines O-GlcNAcylées par hydrolyse spécifique du résidu GlcNAc. L'OGA a été caractérisée chez l'Homme, le rat, la drosophile ou encore *Caenorhabditis elegans* (Comtesse et al 2001, Dong & Hart 1994, Forsythe et al 2006, Gao et al 2001, Kelly & Hart 1989), et comme pour l'OGT, son gène est conservé au cours de l'évolution. L'OGA a été initialement identifiée comme la MGEA5 (*meningioma-expressed antigen 5*) ; le gène *MGEA5*, localisé au niveau du chromosome 10 au locus 10q24.1, est identifié comme un locus de susceptibilité au diabète de type II (Lehman et al 2005).



Figure 34 : Structure des deux isoformes de l'OGA. Ces deux isoformes diffèrent par la présence ou non d'un domaine pseudo-HAT en C-terminal. OGA-L : isoforme longue de l'OGA ; OGA-S : isoforme courte de l'OGA ; HAT : histone acétyltransférase. Adapté de Ma et al 2017.

L'OGA possède trois domaines distincts (Figure 34) : un domaine catalytique (glycoside hydrolase NAGidase) N-terminal, un domaine intermédiaire pouvant être clivé par la caspase 3 lors de l'apoptose (Butkinaree et al 2008), et un domaine pseudo-histone acétyltransférase (HAT) à l'extrémité C-terminale (Dong & Hart 1994). Trois études indépendantes ont récemment étudié la structure de l'OGA humaine, et ont révélé que l'OGA forme un homodimère inhabituel dans lequel une fente putative de liaison au substrat était créée par le domaine catalytique d'un monomère et le domaine intermédiaire (Elsen et al 2017, Li et al 2017, Roth et al 2017). Les résidus près de la fente de liaison au substrat ont été suggérés pour contribuer à la spécificité du substrat de l'OGA, mais une séquence consensus pour la reconnaissance de la cible doit encore être identifiée. Il est également important de noter qu'il existe un domaine de liaison à l'OGT, mettant donc en évidence l'existence d'un complexe OGT-OGA, appelé O-GlcNAzyme (Whisenhunt et al 2006). L'activité de l'OGA peut aussi être régulée par des modifications post-traductionnelles telles que la phosphorylation de nombreux résidus de sérine et de thréonine (Khidekel et al 2007, Rexach et al 2011).

Un seul gène code pour deux variants de l'OGA résultant d'un épissage alternatif (Figure 34) (Macauley & Vocadlo 2009) :

- Une isoforme longue (OGA-L) située dans le compartiment cytosolique.
- Une isoforme courte (OGA-S) sans domaine HAT à l'extrémité C-terminale.

3. Les fonctions biologiques exercées par la O-GlcNAcylation

La O-GlcNAcylation peut influencer certaines fonctions des protéines telles que la structure peptidique, l'activité enzymatique, la conductance des canaux ioniques ou encore les interactions protéine-protéine... (Dias et al 2009, Hart et al 2011a, Myers et al 2016, Ruan et al 2014, Tarbet et al 2018, Tarrant et al 2012). Par conséquent, la O-GlcNAcylation intervient directement dans de nombreuses fonctions biologiques (**Figure 35**).

La O-GlcNAcylation est impliquée dans des processus cellulaires tels que la signalisation intracellulaire, la transcription et la traduction, la dégradation protéique, l'assemblage du cytosquelette, la réponse au stress, le trafic des protéines et des organites... (Gao et al 2001, Hanover et al 2010, Hardivillé & Hart 2014, Hart et al 2011). Ces mécanismes sont finement régulés par la O-GlcNAcylation puisqu'elle est considérée comme un senseur nutritionnel. En effet, la production d'UDP-GlcNAc dont dépend la O-GlcNAcylation est dépendante de la disponibilité en nutriments nécessaires pour la voie de synthèse des hexosamines. La concentration en UDP-GlcNAc varie en fonction des nutriments, du compartiment cellulaire et des différents stimuli. L'OGT ayant besoin de l'UDP-GlcNAc produite pour le processus de O-GlcNAcylation, la O-GlcNAcylation agit donc comme un « rhéostat » nutritionnel (Bond & Hanover 2015, Hanover et al 2010).



Figure 35 : Principales fonctions cellulaires régulées par la O-GlcNAcylation. Adapté de Hanover et al 2010.

4. Interaction entre la O-GlcNAcylation et la phosphorylation

Il a été mis en évidence qu'une modulation du taux de phosphorylation peut influer sur le taux de O-GlcNAcylation et réciproquement. Par exemple, l'augmentation du taux de O-GlcNAcylation au niveau de cellules de mammifère conduit à un changement de la stœchiométrie des groupements phosphate au niveau de 280 sites phosphorylés (Wang et al 2008). A l'inverse, une hyperphosphorylation induite par l'acide okadaïque, un inhibiteur de phosphatases, entraîne une diminution du taux global de O-GlcNAcylation (Lefebvre et al 1999). En effet, l'inhibition d'une kinase spécifique peut entraîner une augmentation de O-GlcNAcylation pour certaines protéines, ou une diminution pour d'autres (Griffith & Schmitz 1999, Wang et al 2007).

Le « dialogue » entre la phosphorylation et la O-GlcNAcylation au niveau d'un même site ou d'un site adjacent d'une protéine est maintenant bien connu **(Figure 36)** :

- La compétition sur un même site a été décrite, par exemple, sur le facteur transcriptionnel c-Myc (Chou et al 1995) ou encore le domaine C-terminal de l'ARN polymérase II (Comer & Hart 2001, Kelly et al 1993) (Figure 36A).
- La compétition impliquant des sites adjacents a été mise en évidence, par exemple, sur la CaMKII (Dias et al 2009) dont nous reparlerons plus tard (Figure 36B).

Par ailleurs, on peut également observer des phénomènes de « **coopération** », comme dans le cas de la protéine CREB, où sa phosphorylation peut augmenter sa O-GlcNAcylation (Hardivillé & Hart 2014). Ainsi, une protéine peut être soit phosphorylée, soit O-GlcNAcylée, soit les deux à la fois (Figure 36C).



Figure 36 : Différentes possibilités d'interaction entre la phosphorylation et la O-GlcNAcylation au sein d'une même protéine. (A) Compétition entre la O-GlcNAcylation et la phosphorylation sur un même site. (B) Compétition entra la O-GlcNAcylation et la phosphorylation sur un site adjacent. (C) Coopération entre la O-GlcNAcylation et la phosphorylation.

De plus, il est à noter que l'OGT et l'OGA peuvent également être phosphorylées. La phosphorylation de l'OGT par différentes kinases telles que la CaMKIV ou la GSK3 entraîne une augmentation de son activité ou module son interaction avec d'autres protéines ou substrats (Bullen et al 2014, Hart et al 2011, Kaasik et al 2013). Il a été mis en évidence également que le couple OGT/OGA peut interagir avec des kinases et phosphatases au sein de complexes multiprotéiques, entraînant une dynamique importante de la phosphorylation et/ou O-GlcNAcylation au niveau de diverses protéines (Slawson et al 2008, Wells et al 2004).

De tels phénomènes de coopération ou antagonisme entre la phosphorylation et la O-GlcNAcylation sont observés sur des protéines cérébrales en condition physiologique. Un défaut dans la régulation de la O-GlcNAcylation des protéines semblent également contribuer à la toxicité de certaines protéines observée dans les maladies neurodégénératives (Ma et al 2017, Wani et al 2017). Ainsi, dans la maladie d'Alzheimer, un défaut de O-GlcNAcylation de la protéine Tau, probablement dû à la diminution d'utilisation du glucose dans le cerveau des personnes âgées, semble contribuer à l'hyperphosphorylation de cette protéine, conduisant ainsi aux

dysfonctionnements qui aboutissent au développement de la maladie neurodégénérative (Gong et al 2016).

C. O-GlcNAcylation et système nerveux

1. Les protéines O-GlcNAcylées dans le système nerveux

Au niveau du système nerveux, la O-GlcNAcylation a tout d'abord été caractérisée au niveau du cervelet, de l'hippocampe (Figure 37B) et du cortex cérébral. Il s'avère en réalité que la O-GlcNAcylation est omniprésente dans plusieurs régions cérébrales et certains types cellulaires d'une zone cérébrale (Akimoto et al 2003, Lagerlöf et al 2017, Liu et al 2012, Taylor et al 2014). Par exemple, la O-GlcNAc est particulièrement présente dans les cellules de Purkinje du cervelet (Figure 37C) (Akimoto et al 2003), et dans les neurones pyramidaux de la région CA1 de l'hippocampe (Figure 37D) (Taylor et al 2014).



Figure 37: Localisation des protéines O-GlcNAcylées et de l'OGT au niveau de différentes régions cérébrales et types neuronaux. (A) L'OGT est marqué en rouge au niveau du cervelet et les noyaux en vert. (B) Les protéines O-GlcNAcylées sont marquées en vert dans l'hippocampe. (C) Les protéines O-GlcNAcylées (en vert) et l'OGT (en rouge) sont particulièrement présentes au niveau des cellules de Purkinje du cervelet ou (D) des cellules pyramidales de l'hippocampe. Mo : couche moléculaire ; Pu : couche des cellules de Purkinje ; Gr : couche granulaire ; Md : lamina médullaire. Adapté de Akimoto et al 2003 et Taylor et al 2014.

La O-GlcNAcylation globale, mesurée sur des homogénats de cerveau, est élevée lors des phases de développement pré- et périnatal et diminue progressivement lors de la phase de développement tardive. Ensuite, environ un mois après la naissance, le taux global de O-GlcNAcylation atteint un plateau à un niveau relativement bas et se stabilise jusqu'à l'âge adulte (Liu et al 2012). D'autres études ont mis en évidence que les taux de O-GlcNAcylation varient tout au long de la vie, même chez les sujets adultes (Fülöp et al 2008, Yang et al 2012). En effet, il est probable que l'abondance relative de la O-GlcNAcylation des protéines fluctue de façon constante.

L'émergence de différentes techniques protéomiques et d'analyse par spectrométrie de masse a permis d'identifier un certain nombre de protéines cérébrales O-GlcNAcylées, appartenant à un large spectre de catégories fonctionnelles (Khidekel et al 2004, Lagerlöf & Hart 2014, Trinidad et al 2012, Vosseller et al 2006, Wani et al 2017). Tout comme dans d'autres tissus, des sites de O-GlcNAcylation de protéines impliquées dans les voies de signalisation, la transcription, la traduction ou la régulation du cytosquelette ont été découverts (Alfaro et al 2012, Khidekel et al 2004). De manière plus spécifique, d'autres protéines O-GlcNAcylées telles que des récepteurs aux neurotransmetteurs et quelques protéines synaptiques ont été identifiées (Trinidad et al 2012, Vosseller et al 2006).

Par ailleurs, des études ont mis en évidence que la O-GlcNAcylation est fortement présente au niveau synaptique (Akimoto et al 2003, Cole & Hart 2001, Tallent et al 2009). En effet, l'analyse de Trinidad et ses collègues a mis en évidence qu'environ 20 % des protéines synaptiques sont O-GlcNAcylées (Trinidad et al 2012). Au niveau présynaptique, un marquage de la O-GlcNAcylation est observé près des vésicules synaptiques ; les protéines présynaptiques Piccolo et Bassoon sont parmi les protéines les plus fortement O-GlcNAcylées (Trinidad et al 2012). En plus des synapses, la O-GlcNAcylation est également très présente au niveau des noyaux des neurones (Akimoto et al 2003). Les principales protéines neuronales découvertes comme étant O-GlcNAcylées ainsi que leurs fonctions sont listées dans le **Tableau 1**. **Tableau 1:** Liste des principales protéines neuronales O-GlcNAcylées découvertes, de leurs fonctions et de leurs rôles. Adapté de Hwang & Rhim 2018.

Classification	Protéine	Fonction	Rôles de la O-GlcNAcylation	
Kinase	CaMKII	Kinase dépendante du Ca ²⁺ et de la calmoduline	Induit une activation autonome de la CaMKII (ser279) (Erickson et al 2013)	
	CaMKIV	Kinase dépendante du Ca ²⁺ et de la calmoduline	Diminue (ser137, ser189) ou augmente (ser344/S345) l'activité de la CaMKIV (Dias et al 2009)	
	AKT	Régulation de la survie neuronale	Diminue l'activité d'AKT (thr308, ser473) (Shi et al 2015)	
Facteur de transcription	CREB	Régulation du développement neuronal et de la mémoire à long terme	Réduit la transcription dépendante de CREB (ser40) (Rexach et al 2012)	
	SOX2	Maintenance des cellules souches neuronales	Altère les interactions protéine-protéine de SOX2 (S248) (Khidekel et al 2004)	
Régulation présynaptique	Synapsine 1	Modulation de la libération de neurotransmetteurs	Augmente la localisation de la synapsine 1 aux synapses et la taille de la réserve de vésicules synaptiques (thr87) (Skorobogatko et al 2014, Vosseller et al 2006)	
Protéines d'échafaudage	Bassoon	Modulation de la libération de neurotransmetteurs	Rôle précis à définir (Khidekel et al 2004, Vosseller et al 2006)	
	Piccolo	Organisation des zones actives	(Vosseller et al 2006)	
	Ankyrin-G	Liaison des canaux ioniques au cytosquelette	Concentre l'ankyrin-G au nœud de Ranvier (Zhang & Bennett 1996)	
Protéines de la densité postsynaptique	Skank 2	Echafaudage moléculaire de la densité postsynaptique	Rôle précis à définir (Vosseller et al 2006)	
	Synaptopodine	Formation des épines dendritiques	Rôle précis à définir (Khidekel et al 2004)	
Mitochondrie	Milton (TRAK1/2)	Transport mitochondrial	Diminue la motilité mitochondriale (sites putatifs : ser447, ser829, ser830, ser938) (Pekkurnaz et al 2014)	
Cytosquelette	NF-M	Composant structurel de l'axone	Aide à la régulation de l'assemblage des filaments (thr19, ser34, thr48, thr431) (Ludemann et al 2005)	
Canaux ioniques	GluA2	Transmission synaptique excitatrice	Diminue la taille de la transmission synaptique (Taylor et al 2014)	
	Kcnq3	Canal voltage dépendant au K ⁺	Augmente le courant sortant de K ⁺ (T655) (Ruan et al 2014)	
	InsP3R-I	Canal de libération intracellulaire de Ca ²⁺	Diminue la libération de Ca ²⁺ (Rengifo et al 2007)	
Sujet à l'agrégation	APP	Modulation de la formation de synapse	Augmente le processus non-amyloïdogénique de l'APP (Jacobsen & Iverfeldt 2011)	
	Tau	Stabilisation des microtubules axonaux	Inhibe l'oligomérisation de Tau (ser199, ser202, thr205, ser396, ser400, ser404) (Lim et al 2015, Yuzwa et al 2012)	
	α-synucléine	Régulation des vésicules synaptiques	Inhibe l'agrégation de l'α-synucléine (thr72, ser87) (Marotta et al 2015)	

Il est à noter qu'au niveau de synaptosomes (isolement de l'élément présynaptique et de la densité postsynaptique) murins, Trinidad et ses collègues ont découvert 1750 sites de O-GlcNAcylation et 16500 sites de phosphorylation. Au total, 7% de tous les sites O-GlcNAcylés identifiés se trouvent être également des sites de phosphorylation (Trinidad et al 2012). Alfaro et ses

collègues trouvent des résultats similaires : à partir de préparations de cellules de cortex, la plupart des sites de O-GlcNAcylation identifiés ou des sites de phosphorylation sont identiques ou proches (Alfaro et al 2012). De plus, les kinases dans le cerveau semblent être plus fréquemment modifiées par la O-GlcNAcylation que les autres protéines (Alfaro et al 2012, Trinidad et al 2012) et à l'inverse l'OGT et l'OGA sont également phosphorylées (Hart et al 2011). Ces résultats mettent en évidence la proximité entre la phosphorylation et la O-GlcNAcylation dans la régulation des processus synaptiques.

2. Expression de l'OGT dans le système nerveux

L'expression et l'activité de l'OGT sont particulièrement importantes dans le cerveau (Nolte & Muller 2002, Okuyama & Marshall 2003). L'expression des trois isoformes de l'OGT (ncOGT, mOGT et sOGT) est différemment régulée dans le cerveau au cours du développement. Chez le rat, les niveaux d'expression de la ncOGT sont relativement stables au cours de l'embryogenèse et au début du développement, et commencent à décliner jusqu'à 60 % à l'âge de 2 ans. En revanche, la sOGT est exprimée après la naissance et son expression commence à décliner vers l'âge de 2 ans (Liu et al 2012).

Comme cela a été décrit pour la O-GlcNAcylation, l'expression de l'OGT est particulièrement importante au niveau du cervelet **(Figure 37A et C)** et de l'hippocampe (Akimoto et al 2003, Liu et al 2012). Au niveau subcellulaire, l'OGT est enrichie dans les parties pré- et postsynaptique, où son activité est plus importante que dans un homogénat cérébral total (Akimoto et al 2003, Cole & Hart 2001, Lagerlöf et al 2017, Tallent et al 2009). Plus particulièrement, l'OGT est présente dans au moins 80 % des densités postsynaptiques des synapses excitatrices et régule dynamiquement la O-GlcNAcylation de nombreuses protéines de la densité postsynaptique (Lagerlöf et al 2017).

3. Expression de l'OGA dans le système nerveux

L'expression et l'activité de l'OGA sont, comme pour l'OGT, importantes dans le cerveau (Gao et al 2001). Dans le cerveau de rat, l'expression de l'OGA-L est faible au stade embryonnaire, mais commence à augmenter rapidement après la naissance. En revanche, l'isoforme OGA-S est détectée uniquement au stade embryonnaire.

La distribution de l'OGA est presque identique à celle de l'OGT dans le cerveau du rat adulte (Liu et al 2012). Au niveau subcellulaire, l'OGA est présente, phosphorylée, et très active au niveau des synaptosomes (Cole & Hart 2001, Trinidad et al 2012). Cependant, l'OGA est quasi absente dans la densité postsynaptique des synapses excitatrices par opposition à l'OGT (Lagerlöf et al 2017).

En conclusion, la O-GlcNAcylation est une modification post-traductionnelle omniprésente dans différentes régions cérébrales et types cellulaires. Ces enzymes associées, l'OGT et l'OGA, sont également abondantes dans le cerveau. Plus précisément, les protéines O-GlcNAcylées, l'OGT et l'OGA sont particulièrement enrichies au niveau des terminaisons pré- et postsynaptiques. Les taux globaux de O-GlcNAcylation et l'expression de l'OGT et de l'OGA varient au cours du développement et également au cours de la vie adulte. Le développement de différentes techniques a permis d'identifier un certain nombre de protéines O-GlcNAcylées aux niveaux cérébral et synaptique, mettant en évidence l'importance du processus de O-GlcNAcylation dans le fonctionnement synaptique.

D. L'implication de la O-GlcNAcylation dans le fonctionnement synaptique

1. Modulation des taux de O-GlcNAcylation

La modulation des taux de O-GlcNAcylation peut être abordée par différentes méthodes telles que des manipulations génétiques ou virales de l'expression de l'OGT ou de l'OGA, des traitements avec des petites molécules inhibitrices, ou des régimes alimentaires spécifiques. Une méthode simple pour examiner l'implication de la O-GlcNAcylation dans la régulation des fonctions cellulaires et des comportements animaux consiste à éliminer génétiquement le gène codant pour l'OGT ou l'OGA par KO (Knockout) et à comparer le phénotype des animaux KO avec des animaux contrôles. Cependant, la délétion des gènes codant pour l'OGT ou l'OGA peut être létale à cause du rôle important de ces enzymes et de la O-GlcNAcylation au cours du développement⁷. Cette limitation est résolue par des KO conditionnels qui permettent de déléter le gène dans une région cérébrale spécifique et/ou à un moment spécifique. De plus, il existe également un large choix d'agents pharmacologiques pour moduler l'activité de l'OGT ou de l'OGA de manière directe. Les inhibiteurs connus de l'OGT sont AC45SGlcNAc, le benzoxazolinone, Goblin 1, OSMI-1 (Borodkin et al 2014, Lim et al 2015, Ortiz-Meoz et al 2015, Zhu et al 2015b). L'alloxane est un autre inhibiteur de l'OGT qui était souvent utilisé auparavant. A ce jour, son utilisation est limitée car l'alloxane inhibe également l'activité de l'OGA et n'est efficace qu'à de fortes concentrations (Lee et al 2006). Les inhibiteurs utilisés pour inhiber l'OGA sont le Thiamet G, la PUGNAc, le NAG-thiazoline, et le GlcNAcstatine G (Dorfmueller et al 2006, Liu et al 2004, Macauley et al 2010, Macauley et al 2005, Yuzwa et al 2008), mais la PUGNAc est connue pour inhiber d'autres glycosides hydrolases. Il est également possible d'augmenter le taux global de O-GlcNAcylation par des traitements agissants sur la voie de biosynthèse des hexosamines, comme par exemple en utilisant la glucosamine.

⁷ Voir le paragraphe IV.C. O-GlcNAcylation et le système nerveux, p102

2. Implication de la O-GlcNAcylation au niveau présynaptique

Au niveau des terminaisons présynaptiques, la synapsine 1 lie les vésicules synaptiques et régule le nombre de synapses et leur fonction⁸ (Cesca et al 2010). Au moins 16 sites de O-GlcNAcylation ont été identifiés sur la synapsine 1 (Skorobogatko et al 2014, Trinidad et al 2012, Vosseller et al 2006). La mutation du site de O-GlcNAcylation, la thr87, par une alanine dans des neurones de culture primaire entraîne une augmentation de la localisation de la synapsine 1 au niveau des synapses, un élargissement de la taille du pool de réserve de vésicules synaptiques et une augmentation de la densité de synapses (Skorobogatko et al 2014). Les modulations des taux globaux de O-GlcNAcylation par inhibition ou délétion de l'OGA n'ont soit aucun effet, soit entrainent une diminution de la probabilité de libération présynaptique mesurée par électrophysiologie au niveau de l'hippocampe (Tallent et al 2009, Taylor et al 2014, Yang et al 2017).

3. Implication de la O-GlcNAcylation dans le trafic des AMPAR

La O-GlcNAcylation et ses enzymes associées sont abondantes au niveau de la densité postsynaptique, et plusieurs données laissent penser qu'elles seraient impliquées dans le trafic des AMPAR. Cependant, les mécanismes mis en jeu sont encore peu élucidés. Une délétion génétique partielle ou totale de l'OGT dans des neurones de culture primaire réduit l'expression des sous-unités GluA2 et GluA3 à la surface de la membrane synaptique et l'expression synaptique de GluA3, mais n'a pas d'effet sur l'expression de la sous-unité GluA1 (Lagerlöf et al 2017). De plus, l'OGT semble s'associer à la sous-unité GluA2, mais pas la GluA1, et modifierait directement GluA2 (Taylor et al 2014). Ces données suggèrent que l'expression synaptique des AMPAR GluA2/3 est régulée par la O-GlcNAc. Par ailleurs, chez ces souris $Oga^{+/-}$, l'induction de la LTP et de la LTD conduit à une phosphorylation aberrante de la sous-unité GluA1 des AMPAR aux sites ser831 et ser845, sites connus pour être impliqués dans le trafic des AMPAR GluA1/2 (Yang et al 2017).

Plusieurs protéines régulant le trafic des AMPAR et la dynamique des épines dendritiques sont connues pour être O-GlcNAcylées (Alfaro et al 2012, Trinidad et al 2012). Par exemple, CaMKII est O-GlcNAcylée sur sa thr306 (Trinidad et al 2012). Pour rappel, cette enzyme est activée en réponse à un afflux de Ca²⁺ et régule la phosphorylation de plusieurs protéines synaptiques impliquées dans les processus d'apprentissage et de mémoire⁹ (Herring & Nicoll 2016, Lisman et al 2012). Il a été montré que la phosphorylation de la thr305 et/ou 306 inhibe CaMKII et altère la LTP (Elgersma et al 2002). L'administration de Thiamet G entraîne également une augmentation de la phosphorylation de la 2002). La

⁸ Voir paragraphe IV.A.1 – Elément présynaptique, la synapsine 1, p81

⁹ Voir paragraphe IV.A.3. Voies de signalisation impliquées dans la plasticité synaptique, p91

phosphorylation de la ser831 de la sous-unité GluA1 des AMPAR, connue pour être un site phosphorylé par CaMKII, est bloquée lors de l'induction de la LTP chez les souris *Oga*^{+/-} (Yang et al 2017). Une autre kinase connue pour être O-GlcNAcylée et impliquée dans la régulation du trafic de la sous-unité GluA1 est la PKA (Xie et al 2016). Cependant, les résultats portant sur les effets d'une modulation pharmacologique de l'OGT et l'OGA sur les fonctions de la PKA sont contradictoires (Francisco et al 2009, Xie et al 2016). Ainsi, plusieurs données suggèrent que la O-GlcNAcylation affecte le trafic des AMPAR.

4. Implication de la O-GlcNAcylation dans la transmission synaptique

En modifiant des protéines pré- et postsynaptiques, la O-GlcNAcylation peut avoir un rôle fondamental dans les processus de LTP et LTD, et dans la régulation de la transmission synaptique.

Dans le cas de la LTP, une élévation du taux de O-GlcNAc par (1) l'inhibition de l'OGA par le Thiamet G, (2) la stimulation de la production d'UDP-GlcNAc par la glucosamine ou encore (3) par l'utilisation de souris KO OGA hétérozygotes *Oga*^{+/-}, diminue son induction (Taylor et al 2014, Yang et al 2017). Cependant, quelques heures après l'injection *in vivo* d'un autre inhibiteur de l'OGA, le 9d, la LTP dans l'hippocampe augmente (Tallent et al 2009). Les résultats obtenus cette fois-ci après inhibition de l'OGT au moyen de l'alloxane sont également contradictoires : soit la LTP est améliorée, soit elle diminue (Kanno et al 2010, Tallent et al 2009). Ces effets peuvent s'expliquer par le manque de spécificité de l'alloxane (Taylor et al 2014). Dans le cas de la LTD, une étude a montré que son induction est déstabilisée lors d'une élévation prolongée de la O-GlcNAcylation chez les souris *Oga*^{+/-} (Yang et al 2017). Les résultats contradictoires de ces trois études peuvent s'expliquer par des procédures expérimentales différentes telles que la manière d'appliquer les traitements (injection *in vivo* ou directement sur les tranches d'hippocampe) ainsi que par la spécificité de l'agent pharmacologique utilisé (en l'occurrence l'alloxane). Cependant, l'ensemble de ces études met en évidence que la O-GlcNAcylation affecte les propriétés synaptiques.

La façon dont la O-GlcNAc régulerait les propriétés synaptiques est encore obscure. La transmission synaptique basale dans l'hippocampe ne change pas 5 h après l'injection *in vivo* de 9d (Tallent et al 2009), ou chez les souris *Oga*^{+/-} (Yang et al 2017). Par contre, une autre étude montre que l'application de Thiamet G ou de glucosamine directement au niveau de tranches d'hippocampe conduit à une LTD. Ce phénomène est appelé « O-GlcNAc LTD » (LTD dépendante de la O-GlcNAc) (Taylor et al 2014). D'un point de vue moléculaire, la « O-GlcNAc LTD » est complètement abolie chez des animaux KO GluA2, ce qui suggère un mécanisme similaire entre l'induction de la « O-GlcNAc
LTD » et la LTD classique. Néanmoins, le blocage de certaines voies associées à l'induction de la LTD classique comme les NMDAR et PKC n'inhibe pas la « O-GlcNAc LTD » (Taylor et al 2014).

5. Autres fonctions neuronales associées à la O-GlcNAcylation

En plus des effets directs sur la transmission synaptique, la O-GlcNAc peut également influencer les fonctions synaptiques et la transmission neuronale en modulant l'activité transcriptionnelle des gènes. Par exemple, la protéine CREB est un facteur de transcription qui se lie à l'élément de réponse CRE (*C-AMP Response Element*) des séquences d'ADN, et qui est modifié à la fois par la O-GlcNAcylation et la phosphorylation (Lonze & Ginty 2002, Mayr & Montminy 2001). D'une part, la phosphorylation de la ser133 de CREB permet le recrutement de CBP (*CREB-binding protein*) et régule la transcription de gènes en aval tels que *BDNF* et *c-fos* (Chrivia et al 1993). D'autre part, l'activité neuronale déclenche la O-GlcNAcylation de la ser40 de CREB, qui supprime la transcription régulée par CREB en bloquant son interaction avec le coactivateur régulé par CREB (CRTC, *CREB-regulated transcription coactivator*) (Rexach et al 2012).

Enfin, la O-GlcNAcylation a également de nombreux rôles dans la régulation des activités mitochondriales. Par exemple, la O-GlcNAcylation de la protéine Milton est impliquée dans le transport mitochondrial. La O-GlcNAcylation peut ainsi être liée à la forte demande énergétique de la transmission neuronale en modulant le mouvement des mitochondries ainsi que la production d'ATP (Pekkurnaz et al 2014, Tan et al 2014).

En conclusion, la modulation des taux globaux de O-GlcNAcylation au niveau cérébral est permise par différentes méthodes telles que des manipulations génétiques (KO conditionnels *OGT* ou *OGA*), par l'utilisation d'inhibiteurs de l'OGT ou de l'OGA, ou encore par des régimes alimentaires. Ces différents outils ont permis de mettre en évidence l'implication de la O-GlcNAcylation et de ses enzymes associées dans diverses fonctions synaptiques résumées dans la **Figure 38.** En effet, la O-GlcNAcylation des protéines intervient dans la transmission synaptique et les processus de LTP/LTD en agissant, par exemple, sur la libération des vésicules synaptiques au niveau des terminaisons présynaptiques ou sur le trafic des récepteurs AMPA au niveau de la densité postsynaptique. De plus, la O-GlcNAcylation est également impliquée dans d'autres processus synaptiques importants, tels que la transcription génique (CREB), la régulation de canaux ioniques (Kcnq3) ou encore l'activité et le transport mitochondriale (Milton).



Figure 38 : Les différentes fonctions de la O-GlcNAcylation au niveau synaptique. Au niveau de la terminaison présynaptique, les protéines O-GlcNAcylées sont impliquées dans la machinerie de transport et d'exocytose des vésicules synaptiques. Au niveau pré- et postsynaptique, la O-GlcNAcylation des protéines a un rôle important dans la régulation des voies de signalisation et dans la plasticité synaptique. Adapté de Akimoto et al 2003.

<u>PARTIE 1 :</u> ANALYSE PROTEOMIQUE

<u>Etude 1</u>: Changements des protéines synaptiques après une période de PSM : implication de la phosphorylation et de la O-GlcNAcylation

I. Introduction

En résumé du chapitre précédent, nous avons vu que chez l'Homme, une PSM chronique telle qu'un alitement prolongé, une immobilisation ou la sédentarité, altère les performances motrices par une combinaison de facteurs périphériques et centraux. Les études effectuées sur un modèle de rat soumis à une période de PSM ont mis en évidence des changements moléculaires et une réorganisation du cortex sensorimoteur (plasticité des cartes corticales somatotopiques sensorielle et motrice), accompagnée de modifications morphologiques des épines dendritiques (nombre, longueur, fonctionnalité). Cependant, les mécanismes moléculaires à l'origine de ces remaniements restent encore obscurs.

Il est bien connu que la phosphorylation régule un grand nombre de processus impliqués dans l'activité synaptique conduisant à la neuroplasticité. Une autre modification post-traductionnelle importante, maintenant connue pour interagir avec la phosphorylation, est la O-GlcNAcylation. Cette glycosylation atypique, réversible et dynamique, est impliquée dans des processus cellulaires et physiologiques tels que l'activité synaptique, la morphologie neuronale, l'apprentissage et la mémoire.

Cette première étude a pour but d'apporter des éléments nouveaux concernant les mécanismes moléculaires associés à la plasticité synaptique après une période de PSM. Les objectifs étaient les suivants :

- (1) Déterminer si une période de PSM peut induire des variations d'activation et d'expression de marqueurs pré- (synaptophysine et synapsine 1) et postsynaptiques (PSD-95, AMPAR GluA2), ainsi que des marqueurs des voies de signalisation MAPK/ERK et CaMKII, dans les synaptosomes du cortex sensorimoteur et d'autres structures impliquées dans les fonctions motrices telles que le striatum et le cervelet.
- (2) Déterminer l'implication potentielle de la O-GlcNAcylation des protéines synaptosomales dans la régulation de la plasticité synaptique induite par une période de PSM. Pour cela, les variations d'expression des protéines O-GlcNAcylées et des enzymes associées OGT et OGA

ont été déterminées, et la localisation des protéines O-GlcNAcylées a été étudiée par immunohistochimie.

Un fractionnement synaptosomal a été utilisé sur l'ensemble des échantillons cérébraux afin d'étudier spécifiquement les changements au niveau synaptique.

II. <u>Matériels et Méthodes</u>

A. Animaux et modèle de PSM

Toutes les procédures décrites ci-dessous ont été réalisées conformément à la Directive du Conseil de la Communauté Européenne 2010/63/UE, et ont été approuvées par le Comité Régional d'Ethique de l'Expérimentation Animale de la région Nord-Pas-de-Calais (CEEA 75, Numéro de référence : APAFIS#4733-20 160329172661764).

Les expérimentations sont réalisées sur des rats mâles de souche Wistar, pesant de 280 à 320 g. Le rythme circadien (alternance de phases de luminosité de 12 h et d'obscurité de 12 h) et la température de la pièce (23 °C) sont maintenus constants. Les animaux ont accès à l'eau et à la nourriture *ad libitum*. Le poids des animaux est relevé au minimum 3 fois par semaine. Tous les efforts sont faits pour réduire au minimum le nombre d'animaux et leur souffrance.

Les conditions de PSM sont obtenues par élévation du train postérieur de l'animal pendant 14 jours selon le modèle de Morey-Holton et Globus (Morey-Holton & Globus 2002). Pour cela, le rat est placé dans une boîte de contention pour isoler la queue. Ensuite, la queue est lavée avec de l'eau savonneuse, puis nettoyée avec de l'alcool afin de l'assécher. Elle est alors enduite de Collodion 4 % (Merck) qui forme une fine pellicule protectrice. Enfin, on enroule une bande adhésive (Tensoplast Vet) uniquement sur le 1/3 proximal de la queue afin de ne pas limiter la thermorégulation naturelle de l'animal. Un crochet est fixé à la bande adhésive et il est raccordé à une potence munie d'un système de rotation sur 360°. La hauteur de la potence est réglée de manière à ce que l'inclinaison du corps du rat forme un angle de 30° avec l'horizontale. Les pattes postérieures ne sont plus en contact avec le sol. Le rat peut se déplacer à l'aide de ses pattes antérieures et peut avoir accès librement à l'eau et à la nourriture. Les rats Contrôles (C) (n=8-13) et PSM (n=8-11) sont hébergés dans la même pièce. Les rats PSM sont disposés les uns à côté des autres afin de garder une interaction sociale avec leurs voisins, et les rats C sont hébergés à 2 par cage.

B. Prélèvements des échantillons cérébraux

Les rats sont anesthésiés profondément au pentobarbital sodique (60 mg/kg) (Ceva santé animale). L'animal est placé en décubitus dorsal pour réaliser l'ouverture de la cage thoracique et permettre l'accès au cœur. Une perfusion intracardiaque d'une solution glacée de NaCl 0,9 % est ensuite réalisée jusqu'à exsanguination totale de l'animal. La tête de l'animal est alors fixée dans un cadre stéréotaxique, la peau du crâne incisée et la partie supérieure de la boite crânienne retirée. Une lame de scalpel est descendue verticalement afin de délimiter une tranche de 2 mm d'épaisseur aux coordonnées stéréotaxiques Antérieur 0 à -2 (limites antéro-postérieures du cortex sensorimoteur) par rapport au repère osseux Bregma (Figure 39B). Le cerveau est prélevé et placé dans une coupelle disposée sur un tapis de glace. Les tranches de 2 mm d'épaisseur sont isolées et des échantillons de cortex sont prélevés bilatéralement aux coordonnées Latéral 1 à 4, correspondant à la zone de représentation de la patte postérieure pour le cortex sensorimoteur (Figure 39A). Le striatum et le cervelet sont également prélevés. Les échantillons sont placés dans des microtubes immédiatement plongés dans de l'azote liquide et stockés à -80 °C. La durée totale du prélèvement n'excède pas 10 min.



Figure 39: Localisation des structures cérébrales étudiées. (A) Coupe transversale de cerveau de rat au niveau Bregma +0,20. En bleu, localisation du cortex sensorimoteur prélevé. (B) Coupe sagittale de cerveau de rat au niveau latéral 1,90. Localisation du cortex sensorimoteur, du cervelet, du striatum. Adapté de *Paxinos et Watson, 1986*.

C. Extraction protéique

1. Extraction protéique totale

Les échantillons de cortex sensorimoteur sont introduits dans un tampon d'extraction (10 μ L de tampon / mg de tissu) à 4 °C. Le tampon d'extraction est composé de NaCl (150 mM), Tris Base (20 mM), EDTA (1 mM), Triton X-100 1 %, anti-protéases (EDTA free protease inhibitor cocktail, cat# 11873580001, Roche), anti-phosphatases (PhosStop, cat# 04906837001, Roche) et 50 μ M PUGNAc (cat# A7229, Sigma). Les échantillons sont broyés à l'aide d'un potter à piston, homogénéisés 1 h à 4 °C sous agitation lente, centrifugés à 13 000 x g pendant 10 min à 4 °C, puis conservés à -20 °C.

2. Fractionnement synaptosomal : gradient de sucrose

Ce protocole est adapté de l'étude de Kamat et ses collègues (Kamat et al 2014). Les échantillons de cortex sont introduits dans un tampon HEPES avec 0,32 M de sucrose (10 μ L de tampon / mg de tissu). Le tampon HEPES est composé de NaCl (145 mM), KCl (5 mM), CaCl₂ (2 mM), MgCl₂ (1 mM), glucose (5 mM), HEPES (5 mM), anti-protéases, anti-phosphatases et 50 µM PUGNAc. Les échantillons sont broyés à l'aide d'un potter à piston. En résumé, les échantillons sont centrifugés à 600 x g pendant 10 min à 4 °C. Le culot (P1) obtenu, correspondant aux débris cellulaires et nucléaires, est enlevé. Le surnageant (S1) est récupéré, puis dilué dans du tampon HEPES avec 1,3 M de sucrose (volume 1/1) afin d'obtenir une concentration à 0,8 M de sucrose. Le surnageant (S1) est centrifugé à 20 000 x g pendant 30 min à 4 °C. Le surnageant (S2) obtenu, correspondant aux protéines solubles, est enlevé. Le culot (P2) correspond à la fraction synaptosomale brute (parties pré- et postsynaptiques). Ce culot (P2) est centrifugé 3 fois avec du tampon HEPES à 12 000 x g pendant 15 min à 4 °C pour éliminer l'excédent de sucrose. Le culot P2 est resuspendu dans du tampon RipA, qui est composé de Tris/HCl (10 mM), NaCl (150 mM), EDTA (1 mM), sodium deoxycholate 0,5 %, SDS 0,1 %. Les échantillons de synaptosomes sont conservés à -20 °C. La validité de ce fractionnement synaptosomal a été évaluée sur des marqueurs spécifiques et est présentée dans la Figure 41.



Figure 40 : Enrichissement de protéines synaptiques dans les synaptosomes du cortex sensorimoteur. La méthode présente étape par étape la préparation et l'isolement des protéines synaptiques du cortex sensorimoteur par centrifugation différentielle avec un gradient de sucrose dans un tampon HEPES.

D. Dosage protéique de Bradford

Une analyse des densités optiques obtenues par la réaction du bleu de Coomassie avec l'albumine sérique bovine est effectuée. Nous réalisons avec celle-ci une gamme étalon de quantités connues d'albumine sérique bovine (1 mg/mL) à laquelle nous comparons les densités optiques de nos échantillons. Le dosage de chaque échantillon est effectué en duplicat afin de limiter les erreurs de mesure. Après l'ajout du réactif (*Protein Assay Dye Reagant Concentrate*, cat#5000006, Biorad), les échantillons sont mis à incuber 10 min à température ambiante et à l'obscurité. Enfin, 200 µL de solution sont mis dans les puits d'une plaque à 96 puits et l'absorbance est mesurée à une longueur d'onde de 595 nm au moyen d'un spectrophotomètre (SpectraMax M2).

E. Immunoprécipitation

Les protéines de la fraction synaptosomale ou cytosolique (50 µg) sont suspendues dans 100 µl de tampon RipA. Des billes magnétiques couplées à la protéine G (5 µl) (cat#LSKMAGG10, Merck Millipore) sont incubées avec l'échantillon 1 h à 4 °C sous agitation lente. L'anticorps dirigé contre le groupement O-GlcNAc (RL2) (MA1-072, Thermo Scientific) (dilution de $1/250^{\circ}$) est incubé pendant une nuit à 4 °C avec le surnageant. Les billes magnétiques (10 µl) sont incubées avec l'échantillon 1 h à 4 °C. Le surnageant est éliminé, et les billes lavées successivement 4 fois avec différents tampons : (1) tampon RipA, (2) tampon RipA/0,5 M NaCl (3) tampon RipA/TNE (50 mM Tris/HCl, pH7.4), (4)

tampon TNE. Les billes sont resuspendues dans du tampon Laemmli (Tris Base 62,5 mM, glycérol 2 %, bleu de bromophénol 0,02 %, β -mercaptoéthanol 5 %, SDS 10 %, pH 6,8). Les échantillons sont ensuite analysés par western blot.

F. SDS-PAGE et western blot

1. SDS-PAGE

La migration des échantillons protéiques est réalisée sur des gels de polyacrylamide d'une réticulation de 7,5 % ou 10 % et d'une épaisseur de 1 mm (*TGX Stain-Free™ FastCast™ Acrylamide Kits*, cat#1610181 et 1610183 respectivement, Biorad). Les échantillons sont associés à du tampon Laemmli, mis à incuber durant 10 min à 95 °C afin de dénaturer les protéines, puis déposés dans chaque puits (10 µg de protéines provenant du fractionnement synaptosomal). On réalise ensuite la migration des protéines dans un tampon composé de Tris base 25 mM, glycine 190 mM et SDS 0,1 % en appliquant un voltage constant de 150 V. A la fin de la migration, le gel est disposé dans un imageur (BioRad ChemiDoc MP). Les gels TGX ont la particularité d'être constitués d'un composé se liant de manière covalente aux résidus tryptophane des protéines. En réalisant une activation aux UV pendant 2,5 min, les protéines présentes dans le gel émettent un signal fluorescent détectable immédiatement par l'imageur sans coloration (technologie *Stain-Free*). L'image obtenue est utilisée pour standardiser les résultats obtenus à la suite des western blots (Gurtler et al 2013).

3. Western blot

Le transfert des protéines est effectué sur une membrane de nitrocellulose 0,2 µm (*Trans-Blot*[®] *Turbo*[™] *RTA Midi Nitrocellulose Transfer Kit*, cat#1704271, Biorad). Le transfert sur membrane est effectué avec un voltage constant de 13 V pendant 12 min dans un *Transblot Turbo Transfer System* (cat# 1704150, Biorad). L'efficacité du transfert est alors évaluée par l'acquisition de l'image des protéines (dont les résidus tryptophanes sont « activés ») à l'imageur (BioRad ChemiDocTM MP).

La membrane est lavée dans du TBS-Tween (15 mM Tris/HCl, pH 7,6 ; 140 mM NaCl ; Tween-20 0,05 %) puis mise à incuber durant 1 h dans une solution de saturation composée de lait écrémé à 5 % ou de BSA à 5 % dans le TBS-Tween 0,05 %. La membrane saturée est mise à incuber à 4 °C pendant la nuit avec l'anticorps primaire. Les conditions de saturation et d'incubation (dilution des anticorps primaires et secondaires, durée et température d'incubation) ont été optimisées pour chaque anticorps **(Tableau 2)**. Le lendemain, la membrane est lavée 3 fois pendant 10 min au TBS-Tween 0,05 % sous agitation rapide puis incubée avec l'anticorps secondaire pendant 2 h (rabbit-HRP ou mouse-HRP), puis rincée 5 fois pendant 10 min au TBS-Tween 0,05 % sous agitation rapide.

Anticorps primaires	Hôte	Références	Compagnies	Concentrations
AMPA Receptor (GluR2) (E1L8U)	Rabbit	13607	Cell Signaling Technology	1:2000
CaMKII α	Rabbit	3357	Cell Signaling Technology	1:10000
MGEA5/OGA [EPR7154(B)]	Mouse	Ab124807	Abcam	1:1000
O-GICNAc RL2	Mouse	MA1-072	ThermoFisher Scientific	1:5000
OGT	Rabbit	Ab50273	Abcam	1:2000
р44/42 МАРК (ERK42/44)	Rabbit	9102	Cell Signaling Technology	1:2000
Phospho-AMPA Receptor (GluR2) (ser880)	Mouse	MABN103	Merck Millipore	1:5000
Phospho-CaMKII (thr286) D21E7	Rabbit	12716	Cell Signaling Technology	1:5000
Phospho-p44/42 MAPK (ERK42/44) (thr202/tyr204)	Rabbit	9101	Cell Signaling Technology	1:1000
Phospho-synapsine 1 (ser603)	Rabbit	Ab5883	Merck Millipore	1:5000
Phospho-synapsine 1 (ser62/67)	Rabbit	Ab9848	Merck Millipore	1:1000
PSD-95	Rabbit	2507	Cell Signaling Technology	1:2500
Synapsine 1	Rabbit	Ab1543	Merck Millipore	1:20000
Synaptophysine	Rabbit	4329	Cell Signaling Technology	1:2000

Tableau 2 : Liste des anticorps primaires utilisés pour l'étude en western blot.

4. Révélation par chemiluminescence

La membrane est mise sous agitation lente dans le réactif ECL (*Clarity*[™] Western ECL Substrate, cat#1705061, BioRad). L'acquisition du signal chemiluminescent se fait avec l'imageur Chemidoc MP.

Après les révélations du premier anticorps (notamment les formes phosphorylées), il est nécessaire de décaper la membrane afin de décrocher les anticorps fixés précédemment, et de pouvoir appliquer un nouvel anticorps. Ceci se fait à l'aide d'une solution de *Western Reprobe* (cat#786-305, G-Biosciences). La membrane est lavée (3 x 10 min au TBS-Tween 0,05 %). Elle est ensuite incubée pendant 30 min dans la solution de *Western Reprobe* puis de nouveau lavée. Après une nouvelle phase de saturation, la membrane est incubée en présence du second anticorps primaire.

Les signaux obtenus sont analysés et quantifiés à l'aide du logiciel Image Lab 4.1 (Biorad). Pour chaque échantillon, les valeurs de densité des signaux (formes phosphorylées et totales des protéines) sont normalisées à la densité globale du profil protéique obtenue sur l'image du *Stain-Free*. Pour les protéines dont les formes phosphorylées et totales ont été analysées, on effectue également le rapport entre leurs densités respectives.

G. Immunohistochimie

1. Prélèvement des cerveaux

Les rats sont anesthésiés profondément au pentobarbital sodique (60 mg/kg) (Ceva santé animale). L'animal est placé en décubitus dorsal pour réaliser l'ouverture de la cage thoracique et permettre l'accès au cœur. Ensuite, une perfusion intracardiaque de solution de NaCl à 0,9 % est réalisée, suivi d'une solution de paraformaldéhyde (PFA) à 4 % dans 0,1 % de tampon phosphate. Le cerveau est prélevé, puis il subit une post-fixation de 4 h dans du PFA suivie d'une cryoprotection dans du sucrose à 20 % pendant 12 h.

2. Coupes

Des coupes sagittales de 30 µm sont effectuées à l'aide d'un microtome à congélation (CM3050S, Leica). Les coupes sont ensuite montées sur des lames superfrost+ (ThermoFisher scientific), permettant une meilleure adhésion de la coupe à la lame.

3. Immunofluorescence

Les coupes sont incubées pendant 90 min avec une solution de blocage BSA 0,5 % et du Triton X-100 0,03 % afin de les perméabiliser. Ensuite, l'anticorps primaire dilué dans la solution de blocage est appliqué sur la nuit à 4 °C. Les conditions d'incubation et de dilution des anticorps primaires ont été optimisées pour chaque anticorps **(Tableau 3)**. Le lendemain, les coupes sont lavées au PBS 3 x 10 min. Après les lavages, l'anticorps secondaire, couplé à un Alexa Fluor et dilué au 1/500^e dans la solution de blocage, est appliqué 2 h dans l'obscurité à température ambiante (mouse IgG Alexa Fluor 555, ThermoFisher Scientific, A21422 et rabbit IgG Alexa Fluor 488, ThermoFisher Scientific, A11034). Toutes ces dilutions ont été optimisées pour chaque anticorps. Un contrôle négatif sans anticorps primaire est effectué afin de confirmer l'absence de marquage non-spécifique des anticorps secondaires.

Anticorps primaires	Hôte	Références	Compagnies	Concentrations
O-GlcNAc RL2	Mouse	MA1-072	ThermoFisher Scientific	1:500
Glial fibrillary acidic protein (GFAP)	Rabbit	ab10062	abcam	1:1000
NeuN	Rabbit	12943	Cell Signaling Technology	1:500
PSD-95	Rabbit	3450S	Cell Signaling Technology	1:500

Tableau 3 : Liste des anticorps primaires utilisés pour l'étude immunohistochimique.

Les coupes sont ensuite lavées 5 x 10 min au PBS. Puis des étapes de marquage au DAPI 1 μ g/ μ L (5 min) (Sigma) et de coloration au Noir Soudan 0,1 % (20 min) (Sigma) pour limiter l'autofluorescence du tissu sont effectuées et sont suivies de lavages au PBS. Un milieu de montage Prolong Gold (Molecular Probes) est déposé sur toutes les coupes.

Les lames sont conservées à 4 °C et à l'obscurité. Les analyses sont effectuées à la plateforme BiCEL sur le microscope Axio Imager Z1 APOTOME (Zeiss MicroImaging GmbH) (Institut Pasteur, Lille) muni d'une plateforme motorisée permettant de faire des mosaïques. Les localisations des protéines O-GlcNAcylées (RL2), des astrocytes (GFAP), des neurones (NeuN) et des densités postsynaptiques (PSD-95) sont visualisées par microscopie confocale (LSM 780, Zeiss MicroImaging GmbH). Les excitations des fluorophores correspondent à la diode 405 nm pour imager le DAPI, par un laser de longueur d'onde 514 nm pour l'Alexa Fluor 555 et 488 nm pour l'Alexa Fluor 488. Les images ont été acquises avec un objectif Apochromat 40X / 1,3 immergé sous huile, avec le logiciel Zen (Zeiss MicroImaging GmBH).

H. Analyse statistique

Les tailles d'échantillonnage ont été déterminées sur la base d'une analyse de puissance (puissance = 0,8, α = 0,05) en utilisant les tailles d'effet observées dans l'étude précédente (Mysoet et al 2014) ainsi que notre étude pilote (Master 2 Recherche). Les résultats sont présentés sous forme de moyennes affectées de l'écart standard à la moyenne (SEM). Tous les résultats quantitatifs ont été présentés sous forme de boîte à moustaches (encadré : premier et troisième quartiles et médiane, moustaches : minimum et maximum). La normalité de chaque groupe est évaluée par le test *d'Agostino & Pearson*. Les groupes *contrôle* et *PSM* sont comparés par un test *t de Student* lorsque les groupes répondent aux lois de normalité, ou un test *t de Mann-Whitney* dans le cas contraire (GraphPad Prism 6). Pour l'analyse immunohistochimique, une analyse de variance *two-way ANOVA* a été utilisée. Les variables indépendantes étaient "Groupe" (C vs. PSM) et "Couche corticale". Le seuil de significativité est placé à p < 0,05.

III. <u>Résultats</u>

A. Validation du fractionnement synaptosomal

La technique de fractionnement synaptosomal a été utilisée pour étudier spécifiquement les changements moléculaires au niveau des synapses (Figure 40). Le protocole de ce fractionnement synaptosomal est détaillé dans la partie « Matériels et Méthodes » de cette étude. En résumé, chaque fraction enrichie a été analysée par SDS-PAGE avec la technologie *Stain-Free*. On peut tout d'abord observer un profil protéique différent pour chaque fraction (Figure 41, en haut). L'efficacité du fractionnement synaptosomal a ensuite été confirmée par western blot avec une quantité égale des différentes fractions isolées : l'homogénat initial de cortex sensorimoteur (extrait total), la fraction cytosolique (S2) et le culot de synaptosomes brutes (P2) (Figure 41, en bas). Un enrichissement de différents marqueurs synaptiques (PSD-95, CaMKII, et dans une moindre mesure la synaptophysine) a été observé dans la fraction synaptosomale (P2) comparé à la fraction cytosolique (S2) ou l'extrait total, indiquant un fractionnement efficace. Par ailleurs, une diminution de l'expression de l' α -tubuline, un marqueur du cytosquelette, a été observée dans les synaptosomes par rapport à la fraction cytosolique ou à l'extrait total (Figure 41).



Figure 41: Validation de l'enrichissement de protéines synaptiques dans les synaptosomes du cortex sensorimoteur. Une quantité égale de protéines (10 μ g) des différentes fractions, incluant l'homogénat initial (extrait total), la fraction cytosolique (S2) et la fraction synaptosomale (P2) provenant du fractionnement synaptosomal du cortex sensorimoteur de rat, a été analysée par western blot pour la CaMKII, PSD-95, la synaptophysine et l' α -tubuline. La technologie *Stain-Free* révèle le profil protéique total de chaque fraction.

B. Une période de PSM induit des variations d'activation et d'expression de marqueurs pré- et postsynaptiques

Toutes les analyses ont été effectuées sur le cortex sensorimoteur, le striatum et le cervelet ; le cortex visuel a été utilisé comme contrôle interne. Dans le cortex visuel des rats PSM, aucune variation significative n'a été observée que ce soit pour la phosphorylation ou pour l'expression totale des différentes protéines synaptiques. Par conséquent, toutes les variations décrites cidessous sont spécifiques des structures sensorielles et motrices, et ne correspondent pas à un effet généralisé à l'ensemble du cortex.

1. Plasticité présynaptique

Afin d'évaluer si une période de PSM induit une plasticité dans l'élément présynaptique, et en particulier sur la mobilisation des vésicules synaptiques, la phosphorylation et l'expression de la synapsine 1 et de la synaptophysine ont été déterminées par western blot **(Figure 42)**.

La synapsine 1 est un marqueur présynaptique, qui régule la libération de neurotransmetteurs. Nos résultats montrent que la phosphorylation de la ser62/67 est significativement diminuée dans le cortex sensorimoteur (- 35 %, p < 0,05) (Figure 42B), suggérant une réduction du transfert des vésicules synaptiques d'un pool de « réserve » à un pool « prêt à être libéré ». La phosphorylation de la ser603, qui régule la disponibilité des vésicules synaptiques pour l'exocytose, reste constante (Figure 42D). Aucun changement des taux de phosphorylation de ces deux sites n'est constaté dans le striatum et le cervelet (Figure 42B et D). L'expression totale de la synapsine 1 est diminuée dans le cervelet (- 49 %, p < 0,05) (Figure 42F) et ne change pas dans le cortex sensorimoteur et le striatum.

La synaptophysine est utilisée comme marqueur de l'activité présynaptique. L'expression totale de la synaptophysine est significativement diminuée dans le cortex sensorimoteur (- 17 %, p < 0,05) (Figure 42H), tandis qu'elle augmente dans le cervelet (+ 12 %, p < 0,05) après une période de PSM, impliquant une modulation de la disponibilité des vésicules synaptiques et ensuite de l'activité présynaptique dans chaque structure. Aucun changement n'est rapporté dans le striatum.



Figure 42: Phosphorylation et expression totale des protéines présynaptiques après une période de PSM. (A, C et E) Western blot représentatifs des formes phosphorylées de la synapsine 1 aux sites ser62/67 et ser603 et de l'expression totale pour les groupes C et PSM. (B et D) Taux de phosphorylation (rapport entre P-synapsine 1 (ser62/67) ou (Ser603) sur l'expression totale de la synapsine 1) pour les groupes C (n=8-13) et PSM (n=8-10) et (F) expression totale (synapsine 1 normalisée sur le *Stain-Free*). (G) Western blot représentatifs de l'expression totale de la synaptophysine pour les groupes C et PSM. (H) Expression totale (synaptophysine normalisée sur le *Stain-Free*) pour les groupes C (n=8-12) et PSM (n=8-10). * p < 0,05. a.u. : unité arbitraire.

2. Plasticité postsynaptique

Pour déterminer si une période de PSM induit une plasticité postsynaptique en modulant le trafic des AMPAR, les taux de phosphorylation et d'expression de PSD-95 et des AMPAR GluA2 ont été déterminés par western blot (Figure 43).

PSD-95 est une protéine postsynaptique d'échafaudage qui lie les récepteurs au glutamate, tels que les AMPAR. PSD-95 est connue pour déterminer la taille et la force des synapses. Dans cette étude, l'expression de PSD-95 est significativement diminuée (- 26 %, p < 0,05) dans le cortex sensorimoteur des rats PSM (Figure 43B). Ce résultat renforce l'hypothèse d'une augmentation de l'internalisation des AMPAR GluA2 et suggère une diminution de la taille du compartiment postsynaptique. Aucun changement n'est observé pour le striatum ou le cervelet.

Les AMPAR sont généralement connus pour être les médiateurs de la transmission synaptique excitatrice rapide dans le système nerveux central. Plus spécifiquement, la sous-unité GluA2 joue un rôle crucial dans le trafic des AMPAR et dans leur assemblage. Dans le cortex sensorimoteur, la phosphorylation de la ser880 est significativement augmentée (+ 28 %, p < 0,05) (Figure 43D), suggérant que l'internalisation du récepteur est augmentée après une période de PSM. En effet, des études ont mis en évidence qu'une diminution de la localisation membranaire des AMPAR GluA2 est associée à la phosphorylation de la ser880, qui est impliquée dans l'internalisation du récepteur durant la LTD (Chung et al 2000). De manière intéressante, l'expression totale des AMPAR GluA2 est diminuée (- 21 %, p < 0,05) (Figure 43F) dans le groupe PSM. Enfin, la phosphorylation et l'expression totale des AMPAR GluA2 sont inchangées dans les synaptosomes de striatum et de cervelet.



Partie 1 – Etude 1 : Plasticité synaptique & PSM

Figure 43 (page précédente): Phosphorylation et expression totale des protéines postsynaptiques après une période de PSM. (A) Western blot représentatifs de l'expression totale de PSD-95 pour les groupes C et PSM. (B et D) Expression totale (PSD-95 normalisée sur le *Stain-Free*) pour les groupes C (n=8-13) et PSM (n=8-11). (C et E) Western blot représentatifs des formes phosphorylée sur le site ser880 et totale de AMPAR GluA2 pour les groupes C et PSM. (F) Taux de phosphorylation (rapport entre P-AMPAR GluA2 (ser880) sur l'expression totale de AMPAR GluA2) et (G) expression totale (AMPAR GluA2 normalisée sur le *Stain-Free*) pour les groupes C (n=8-13). * p < 0,05. a.u. : unité arbitraire.

C. Effet d'une période de PSM sur les voies de signalisation phosphorylation / O-GlcNAcylation

1. Les voies de signalisation – phosphorylation (MAPK/ERK et CaMKII)

Les voies de signalisation MAPK/ERK et CaMKII sont impliquées dans le trafic des AMPAR durant l'activité synaptique. De plus, ERK42/44 et CaMKII sont impliquées respectivement dans la phosphorylation des ser62/67 et ser603 de la synapsine 1. Les taux de phosphorylation et d'expression de ces deux voies de signalisation clés ont été étudiés par western blot **(Figure 44)**.

La phosphorylation de ERK42 est diminuée dans les synaptosomes du cortex sensorimoteur (- 53 %, p < 0,05), striatum (- 11 %, p < 0,05) et du cervelet (- 450 %, p < 0,01) après une période de PSM (Figure 44B). Dans le cortex sensorimoteur, cette diminution pourrait être mise en corrélation avec la diminution de la phosphorylation de la ser62/67 de la synapsine 1 et de la localisation membranaire des AMPAR GluA2. L'expression totale de ERK42 est inchangée dans toutes les structures (Figure 44D). Concernant ERK44, aucun changement des taux de phosphorylation et d'expression totale n'est observé (Figure 44E et F). Les taux de phosphorylation et d'expression totale de CaMKII ne varient pas dans le groupe PSM pour toutes les structures (Figure 44H et J), et ces résultats peuvent être corrélés à l'absence de variation de la phosphorylation au site ser603 de la synapsine 1.

Figure 44 (page suivante) : Phosphorylation et expression des voies de signalisation après une période de PSM. (A et C) Western blot représentatifs pour les formes phosphorylées et totales de ERK42/44 pour les groupes C ou PSM. (B) Taux de phosphorylation (rapport de P-ERK42 sur l'expression totale de ERK42) et (D) l'expression totale (ERK42 normalisé sur le *Stain-Free*) chez les rats C (n = 8-13) et PSM (n = 8-10). (E) Taux de phosphorylation (rapport de P-ERK44 sur l'expression totale de ERK44) et (F) expression totale (ERK44 normalisé sur le *Stain-Free*) chez les rats C (n = 8-13) et PSM (n = 8-10). (E) Taux de phosphorylation (rapport de P-ERK44 sur l'expression totale de ERK44) et (F) expression totale (ERK44 normalisé sur le *Stain-Free*) chez les rats C (n = 8-13) et PSM (n = 8-11). (G et I) Western blot représentatifs pour les formes phosphorylée et totale de CaMKII pour les groupes C et PSM. (H) Taux de phosphorylation (rapport de P-CaMKII (Thr286) sur l'expression totale de CaMKII) et (J) expression totale (CaMKII normalisé sur le *Stain-Free*) chez les rats C (n = 8-10). * p < 0,05. a.u. : unités arbitraires.

A P-ERK42/44 C PSM C PSM Cortex sensorimoteur Cortex visuel Striatum Cervelet

C ERK42/44 (42/44kDa)

	С	PSM	С	PSM		
Cortex sensorimoteur		=	-			
Cortex visuel	-	=	-	=		
Striatum		-	=	-		
Cervelet		=		=		



G P-CaMKII (thr286)



I CaMKII (50kDa)



H P-CaMKII (thr286) / CaMKII

С

PSM



C PSM

PSM

С

PSM

С

2. O-GlcNAcylation globale

La O-GlcNAcylation pourrait être une modification post-traductionnelle aussi importante que la phosphorylation dans la modulation des fonctions synaptiques après une période de PSM. En réalisant une étude immunohistologique, nous avons trouvé que les protéines O-GlcNAcylées étaient exprimées de manière ubiquitaire. En particulier, une forte immunofluorescence est détectée dans le cortex sensorimoteur des rats C et PSM **(Figure 45A)**.



Figure 45 : Expression et localisation de protéines O-GlcNAcylées dans le cerveau de rat. (A) Marquage de la O-GlcNAcylation (rouge) dans les coupes sagittales du cerveau (30 μm d'épaisseur, latéral 3 mm avec le bregma comme référence stéréotaxique) de rats C et PSM (grossissement 20X), * Localisation du cortex sensorimoteur. (B) Protéines O-GlcNAcylées dans différentes couches corticales du cortex sensorimoteur (couches I, II / III, IV, V et VI) chez des rats C et PSM (grossissement 20X). (C) Quantification de l'intensité moyenne de fluorescence des protéines O-GlcNAcylées dans différentes couches de cortex sensorimoteur C et PSM. (D) Les protéines O-GlcNAcylées (en rouge) sont localisées dans les astrocytes, (E) les neurones et (F) à proximité des épines dendritiques (grossissement 40X). Les flèches montrent des protéines O-GlcNAcylées proches des épines dendritiques.

Une analyse statistique par *two-way ANOVA*, avec « *l'intensité moyenne de la fluorescence de la O-GlcNAcylation* » comme 1^{er} effet « *groupe* » et/ou « *couches corticales* » comme 2^e effet, a mis en évidence un effet « *couches corticales* » (F=36,63, p < 0,0001) sans effet significatif « *groupe* » (C vs PSM) (F=2,02, p = 0,16), et une absence d'interaction « *groupe x couches corticales* » (F=0,81, p = 0,52) (Figure 45B et C). L'intensité moyenne de la fluorescence est faible dans les couches corticales granulaires et infragranulaires (couches corticales IV, V et VI) comparée aux couches corticales supragranulaires (I et II/III) entre les groupes C et PSM. Un double marquage par immunofluorescence montre que les protéines O-GlcNAcylées sont présentes dans les neurones (anti-NeuN), dans les astrocytes (anti-GFAP) et à proximité des épines dendritiques (anti-PSD-95) (Figure 45D-F).

L'expression totale des protéines O-GlcNAcylées, de l'OGT et de l'OGA dans les synaptosomes du cortex sensorimoteur a été déterminée par western blot (Figure 46). Le profil des protéines O-GlcNAcylées a été analysé en 3 zones distinctes (RL2, zone 1 : 250-100 kDa, zone 2 : 100-37 kDa et zone 3 : 37-15 kDa). L'expression des protéines O-GlcNAcylées est diminuée dans la zone 2 (- 25 %, p < 0,05) dans le cortex sensorimoteur du groupe PSM, alors que de manière surprenante elle augmente dans le cortex visuel (+ 49 %, p < 0,05) (Figure 46C). L'expression des protéines O-GlcNAcylées ne change pas dans les zones 1 et 3 après une période de PSM (Figure 46B et D). Bien qu'il n'y ait aucun changement dans le taux global de O-GlcNAcylation dans ces zones 1 et 3, nous ne pouvons pas exclure que certaines variations existent pour des protéines spécifiques. Enfin, le niveau d'expression de l'OGT et l'OGA est également constant dans le groupe PSM (Figure 46D-E).



Figure 46 : Taux d'expression des protéines O-GlcNAcylées et des enzymes OGT/OGA après une période de PSM. (A) Western blot représentatifs du profil des protéines O-GlcNAcylées (RL2, zones 1, 2 et 3) dans des synaptosomes du cortex sensorimoteur des groupes C et PSM. (B-D) Taux d'expression (zones 1, 2 et 3 de la révélation RL2 normalisées sur le Stain-Free) chez les rats C (n = 8) et PSM (n = 8). (E) Western blot représentatifs de la forme totale de l'OGT dans les groupes C et PSM. (F) Taux d'expression (OGT normalisé sur le Stain-Free) chez les rats C (n = 8) et PSM (n = 8). (G) Western blot représentatifs de la forme totale de l'OGA dans les groupes C et PSM. (H) Taux d'expression (OGA normalisé sur le Stain-Free) chez les rats C (n = 8) et PSM (n = 8). *p < 0,05. a.u. : unités arbitraires.

3. O-GlcNAcylation spécifique de protéines synaptiques

Nous avons ensuite déterminé le niveau de O-GlcNAcylation de la synapsine 1 par immunoprécipitation. Il est à noter que cette protéine (78 kDa) est incluse dans la zone 2 (Figure 47A). Cette analyse a été effectuée sur les fractions synaptosomale et cytosolique du cortex sensorimoteur pour déterminer si la O-GlcNAcylation était modulée en fonction de la localisation de la protéine. La O-GlcNAcylation de la synapsine 1 est diminuée (- 59 %, p < 0,05) dans les synaptosomes et augmentée (+ 182 %, p < 0,05) dans la fraction cytosolique dans le groupe PSM (Figure 47B).



Figure 47 : Taux de O-GlcNAcylation de la synapsine 1 et de CaMKII dans différentes fractions du cortex sensorimoteur après une période de PSM. (A) Western blot représentatifs des formes O-GlcNAcylées de la synapsine 1 des synaptosomes et de la fraction cytosolique du cortex sensorimoteur des groupes C et PSM, après immunoprécipitation avec l'anticorps RL2 (O-GlcNAc). (B) O-GlcNAcylation de la synapsine 1 dans les synaptosomes et dans la fraction cytosolique pour les rats C (n = 8) et PSM (n = 8). (C) Western blot représentatifs des formes O-GlcNAcylées de CaMKII des synaptosomes et de la fraction cytosolique du cortex sensorimoteur des groupes C et PSM, après immunoprécipitation avec l'anticorps RL2 (O-GlcNAc). (D) O-GlcNAcylation de CaMKII dans les synaptosomes et dans la fraction cytosolique pour les rats C (n = 8) et PSM (n = 8). * p <0,05. a.u. : unités arbitraires.

L'activité de la CaMKII est aussi connue pour être régulée par la O-GlcNAcylation (Trinidad et al 2012). Ensuite, la CaMKII est activée de manière autonome par sa modification O-GlcNAc, créant une mémoire moléculaire même après une diminution de la concentration en Ca²⁺ (Erickson et al 2013). Pour cette raison, la O-GlcNAcylation de la CaMKII a été déterminée par immunoprécipitation (**Figure**

47C). Dans le groupe PSM, la O-GlcNAcylation de la CaMKII est inchangée dans les synaptosomes et la fraction cytosolique du cortex sensorimoteur (Figure 47D).

L'analyse par immunoprécipitation de la O-GlcNAcylation de AMPAR GluA2 a également été effectuée. Cependant, nous n'avons pas été capables de détecter la O-GlcNAcylation de AMPAR GluA2 malgré différents tests. Par ailleurs, l'analyse n'a pas été conduite sur PSD-95 et la synaptophysine puisque ces protéines ne sont pas connues pour être O-GlcNAcylées (Trinidad et al 2012, Vosseller et al 2006).

IV. <u>Conclusions</u>

Le but de cette étude était de déterminer (1) si une période de PSM pouvait induire des variations dans l'activation et l'expression des protéines pré- (synaptophysine et synapsine 1) et postsynaptiques (PSD-95, AMPAR GluA2), ainsi que des marqueurs clés des voies de signalisation MAPK/ERK et CaMKII dans les synaptosomes du cortex sensorimoteur, du striatum et du cervelet, et (2) l'implication potentielle de la O-GlcNAcylation des protéines synaptosomales dans la régulation de la plasticité synaptique induite par la PSM. Nos résultats indiquent qu'une période de PSM induit des changements significatifs en particulier dans le cortex sensorimoteur, les autres structures cérébrales motrices étant moins affectées. Ainsi, nous avons montré dans les synaptosomes du cortex sensorimoteur :

- <u>Au niveau présynaptique</u> : une diminution de la phosphorylation de la synapsine 1 au site ser62/67 et une diminution de l'expression de la synaptophysine.
- <u>Au niveau postsynaptique</u> : une augmentation de la phosphorylation de AMPAR GluA2 au site ser880 et une diminution de l'expression de AMPAR GluA2 et de PSD-95.
- En ce qui concerne les voies de signalisation, l'activation de ERK42 a également été régulée par la PSM.
- Au niveau de la <u>O-GlcNAcylation spécifique des protéines</u>, la O-GlcNAcylation de la synapsine 1 était significativement réduite dans la fraction synaptosomale et augmentait dans la fraction cytosolique après une période de PSM.

Tous ces résultats sont synthétisés dans un schéma représentant les changements synaptiques après une période PSM (Figure 48) et seront plus amplement discutés dans la discussion générale de cette thèse.



Figure 48 : Schéma hypothétique des changements induits par une période de PSM de 14 jours. Au niveau présynaptique, une période de PSM induit des changements d'activation et d'expression de la synaptophysine et de la synapsine 1 (O-GlcNAcylation et phosphorylation aux sites ser62/67), indiquant des changements de disponibilité et de libération des vésicules synaptiques. Au niveau postsynaptique, les récepteurs AMPA GluA2 seraient moins présents à la densité postsynaptique après une période de PSM, de par une augmentation de la phosphorylation de la ser880 par PICK1 provoquant une internalisation du récepteur. L'expression de PSD-95 est également diminuée à la densité postsynaptique après la PSM, indiquant une diminution de la densité postsynaptique. La voie de signalisation ERK1/2 semble également moins activée après une période de PSM, ce qui est corrélé à la diminution de l'activation de la synapsine 1 (ser62/67) au niveau présynaptique et à une moindre activité au niveau postsynaptique pour la diffusion des récepteurs. Aucun changement n'est constaté pour l'activation de la voie de signalisation CaMKII.

V. <u>Article</u>



Original Article | 🔂 Full Access

Synaptic protein changes after a chronic period of sensorimotor perturbation in adult rats: a potential role of phosphorylation/O-GlcNAcylation interplay

Julie Fourneau 🗙, Marie-Hélène Canu, Caroline Cieniewski-Bernard, Bruno Bastide, Erwan Dupont

First published: 28 May 2018 | https://doi.org/10.1111/jnc.14474

<u>Etude 2</u>: Identification de protéines synaptosomales présentant une variation de O-GlcNAcylation, de phosphorylation ou d'expression après une période de PSM

I. Introduction

Les résultats de la première étude ont permis de mettre en évidence des changements pré- et postsynaptiques à l'origine d'une altération de l'efficacité synaptique dans le cortex sensorimoteur de rat suite à une période de PSM. Ces changements sont associés notamment à une régulation synergique de la phosphorylation et de la O-GlcNAcylation de la synapsine 1, qui pourrait affecter la libération de neurotransmetteurs présynaptiques. En conséquence, l'interaction phosphorylation/ O-GlcNAcylation de protéines synaptiques semble avoir un rôle essentiel dans la plasticité synaptique en régulant finement l'activité neuronale.

Ainsi, cette deuxième étude a pour but d'identifier l'ensemble des protéines synaptosomales (éléments pré- et postsynaptiques) du cortex sensorimoteur dont les taux de phosphorylation et/ou O-GlcNAcylation sont modifiés suite à des changements de l'expérience sensorimotrice. Une stratégie d'analyse protéomique différentielle innovante, récemment développée au sein du laboratoire sur un échantillon issu de culture cellulaire de myotubes murins (Cieniewski-Bernard et al 2014), permet de caractériser simultanément les protéines présentant une modulation de leur taux de O-GlcNAcylation et/ou de phosphorylation, en déterminant en même temps leur taux d'expression global. Cette analyse protéomique différentielle est basée sur une approche par électrophorèse bidimensionnelle. Cependant, ce type de technique expérimentale nécessite l'obtention de gels présentant une sensibilité élevée de détection ainsi qu'une résolution importante des spots afin de permettre une analyse aisée des spots différentiels.

L'objectif de cette seconde étude était donc d'effectuer une analyse protéomique différentielle des protéines synaptosomales du cortex sensorimoteur de rats C et PSM. Le but de cette étape était d'identifier par spectrométrie de masse des protéines clés présentant une modulation de leur taux de phosphorylation et/ou O-GlcNAcylation et/ou d'expression totale, et pouvant être impliquées dans la plasticité du cortex cérébral suite à un changement de l'expérience sensorimotrice. Pour mener à bien cette analyse, une optimisation des différentes étapes de l'électrophorèse bidimensionnelle était nécessaire afin de tenir compte des spécificités du tissu nerveux. Pour cela, différentes conditions de solubilisation et de séparation (en première et en seconde dimensions) des protéines synaptosomales ont été testées afin d'améliorer la qualité de la séparation de ces protéines. De plus, les différents marquages et colorations permettant de mettre simultanément en évidence le O-GlcNAcome, le phosphoprotéome et le protéome total ont également été optimisés pour les échantillons de synaptosomes.

II. Matériels et Méthodes

A. Animaux et prélèvements

L'ensemble des optimisations du protocole de l'électrophorèse bidimensionnelle (2-DE) et des différents marquages et colorations ont été effectuées sur des échantillons de synaptosomes de cortex sensorimoteur de rats contrôles. Ensuite, l'analyse protéomique différentielle a été effectuée sur des échantillons de synaptosomes de cortex sensorimoteur de rats C et PSM. Le modèle animal de PSM et les étapes de prélèvement du cortex sensorimoteur sont décrits dans le « Matériels et Méthodes » de l'étude 1¹⁰.

B. Fractionnement synaptosomal

Un second protocole de fractionnement synaptosomal a été testé et comparé au protocole par gradient de sucrose de l'étude 1, pour obtenir un meilleur enrichissement de la fraction synaptosomale. Ce protocole a été adapté de l'étude de Dunkley et ses collègues (Dunkley et al 2008).

Les échantillons de cortex sensorimoteur sont homogénéisés (10 µL de tampon/mg de tissu) dans un tampon composé de sucrose (0,32 M), EDTA (1 mM), Tris-base (5 mM), DTT (Dithiothréitol) (50 mM), anti-protéases et anti-phosphatases, pH 7,4. Les échantillons sont broyés à l'aide d'un potter à piston, puis sont centrifugés à 1000 x g pendant 5 min à 4 °C. Le culot (P1) obtenu, correspondant aux débris cellulaires et nucléaires, est enlevé. Le surnageant (S1) est récupéré, puis déposé sur un gradient discontinu de Percoll (3%, 10%, 15% et 23% v/v dans tampon Tris-sucrose) et différents temps et vitesses de centrifugation ont été testés selon le rotor utilisé (swing ou fixe (70.1Ti, Beckman)). Les interfaces entre 10/15 % et 15/23 %, correspondant aux fractions synaptosomales, sont récupérées puis diluées dans un tampon d'homogénéisation, afin d'éliminer l'excès de Percoll. Le culot est remis en suspension dans un tampon d'homogénéisation et la concentration en protéine du surnageant est déterminée par un dosage de Bradford.

¹⁰ Pour plus de détails, voir l'étude 1, II. Matériels et Méthodes, p113

- C. Électrophorèse bidimensionnelle (IEF SDS PAGE)
- 1. Généralités

L'électrophorèse bidimensionnelle est une technique qui permet de séparer des protéines contenues dans un échantillon. Ce principe repose sur une séparation en deux temps : l'isoélectrofocalisation permet de séparer les protéines selon leur point isoélectrique, puis une migration en conditions dénaturantes en gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) permet une séparation selon le poids moléculaire.

2. Précipitation Chloroforme/Méthanol

La précipitation Chloroforme/Méthanol permet d'éliminer de grosses molécules pouvant empêcher une bonne solubilisation d'un échantillon (délipidation et dessalage). Cette méthode est donc appliquée dans notre étude pour favoriser l'analyse protéomique. En résumé, le volume de l'échantillon est ajusté à 200 µl. Du méthanol (600 µl) est ajouté et l'échantillon est vortexé. Après l'addition de chloroforme (150 µl), de l'eau pure (400 µl) est ensuite ajoutée puis vortexée. Après centrifugation à 13 000 rpm pendant 5 min, la phase supérieure est enlevée tout en laissant l'interface protéique intacte. Un volume de 450 µl de méthanol est ajouté, l'échantillon est vortexé puis centrifugé à 13 000 rpm pendant 5 min. Le surnageant est éliminé et le culot séché pour la suite des marquages.

3. IsoElectroFocalisation (IEF)

Après la précipitation au chloroforme/méthanol, l'échantillon de synaptosomes (50 à 200 μg) (Tableau 4 – protocole 1) est dilué dans un tampon de solubilisation composé d'urée (7 M), de thiourée (2 M), d'ampholytes (IPG Buffer pH 3-11 NL 1 %, GE Healthcare) et de bleu de bromophénol. Des concentrations variables de détergents (0 – 4 %) : CHAPS (Sigma-Aldrich) et/ou ASB-14 (aminosulfobetaine-14, Sigma-Aldrich), ou d'agents réducteurs (5 – 60 mM) : DTT (Biorad) et/ou TBP (tributylphosphine, Biorad) ont aussi été testées (Tableau 4 – protocole 4). Le tampon de solubilisation est mis sous agitation à température ambiante durant une heure afin d'homogénéiser l'échantillon et de rompre les complexes protéiques. Puis il est déposé dans un sarcophage où l'on placera par la suite une bandelette d'acrylamide (*Immobiline® DryStrip*, 11cm, pH 3-11, non-linéaire, GE Healthcare) de façon à ce que l'acrylamide soit en contact avec le tampon de solubilisation. Le tout est ensuite recouvert d'huile minérale afin que l'urée ne cristallise pas. Cette réhydratation passive se fait durant la nuit (12 h). Le lendemain, la bandelette est déposée sur le plateau de focalisation (i12 11 cm *Focusing Tray*, BioRad). Les électrodes délivrant le courant sont positionnées aux extrémités de la bandelette. La bandelette est de nouveau recouverte d'huile minérale et l'IEF est lancée à température ambiante (20 °C). L'IEF est réalisée en plusieurs étapes avec le système Protean i12 IEF cell (BioRad) : on applique à la bandelette une réhydratation active ou passive **(Tableau 4 – protocole 2)** de 2 h à 50 V, puis 250 V durant 20 min, une augmentation graduelle jusqu'à 8 000 V pendant une heure, et 8 000 V maximum afin d'atteindre au final 26 000 V/h. La limite du courant est fixée à 50 µA et la durée de l'électrofocalisation est d'environ 7 h. A l'issue de cette première dimension, les protéines migrent jusqu'à ce que le pH soit égal à leur point isoelectrique (pI). Les ampholytes permettent une meilleure focalisation des protéines.

4. Équilibrations

Pour que la migration en seconde dimension se fasse uniquement selon la masse moléculaire de chaque protéine, la bandelette est baignée pendant 10 min dans un tampon d'équilibration (urée 6 M, SDS à 2 %, Tris-HCl à 0,375 M, glycérol à 30 %) contenant également 2 % de DTT afin de rompre les ponts disulfures, puis 10 min dans un tampon d'équilibration contenant 2,5% d'iodoacétamide afin d'empêcher la reformation de ces ponts.

5. SDS – PAGE

Cette seconde dimension se fait par l'intermédiaire d'une migration des protéines sur un gel de polyacrylamide (Biorad). Pour optimiser la séparation en fonction de la masse moléculaire des protéines, des gels de différentes réticulations (4 – 20 % ou 8 – 16 %) et compositions (TGX ou TGX *Stain-Free* ™ ou Tris-HCl) ont été testés **(Tableau 4 – protocole 3)**.

Protocole		Quantité solubilisation		Réhydratation	Composition gel acrylamide	Tampon migration	
1	A	50 μg	2 % CHAPS + 60 mM	Passive 12 h 4 - 20 % Criterion™		Glycine	
2	A	200 με	2 % CHAPS + 60 mM DTT	Passive 12 h		Glycine	
	В	100 µg		Passive 12h + active 2 h 50 V	12,5 % Criterion™ Tris-HCl™ Gel		
3	А		5 mM TBP + 2 % CHAPS	Passive 12 h	4 – 20 % Criterion™ TGX Stain-Free™ Gel		
	В	100 µg			8 – 16 % Criterion™ TGX Stain-Free™ Gel	Glycine	
	С				8 – 16 % Criterion™ Tris-HCl Gel		
4	А		60 mM DTT + 2 % CHAPS				
	В	100 µg	60 mM DTT + 2 % ASB-14	Passive 12 h	8 – 16 % Criterion™ Tris-HCl Gel	Glycine	
	С		5 mM TBP + 2 % CHAPS				
5	А	100 μα	5 mM TBP + 2 %	Dessive 12 h	8 – 16 % Criterion™ Tris-HCl Gel	Glycine	
5	В	100 µg	CHAPS	rassive 12 II		Taurine	

Tableau 4: Protocoles testés pour l'optimisation des étapes d'IEF et de SDS-PAGE sur des échantillons protéiques de synaptosomes.

La bandelette est ensuite déposée à la surface du gel de migration lorsque l'équilibration est terminée. La séparation électrophorétique est réalisée dans différents tampons de migration (0,2 M d'« ion de traîne », pH 8,3 ou pH 8,8, 0,02 M Tris-base, 0,2 % SDS) **(Tableau 4 – protocole 5 et Tableau 5)**. La migration s'effectue à ampérage constant (25 mA par cuve) pendant environ 6-7 h. Une fois la séparation électrophorétique terminée, les gels reposent au minimum 30 min dans une solution de fixation (acide trichloroacétique 10 % ; méthanol 50 %) puis, afin d'éliminer l'excès de solution, les gels sont lavés par agitation à l'eau ultra-pure 3 fois pendant 10 min.

Tableau 5 : Protocoles testés en SDS-PAGE – optimisation du tampon de migration pour des échantillons de protéines synaptosomales.

Prote	ocole	Quantité	Tampon de solubilisation	рН	Composition gel acrylamide	Tampon de migration
1	А	20 µg	RipA	8.3	10 % Tris-HCl mini-gel	Glycine
	В					Taurine
	С					Tricine
	D					Glycine
	E			8.8		Taurine
	F					Tricine

D. Colorations et marquages

1. Marquage des résidus O-GlcNAc par l'Alexa Fluor 488

Les résidus des O-GlcNAc des protéines synaptosomales sont marqués par fluorescence grâce à la *Click Chemistry* par l'intermédiaire d'un kit commercial (*Click-iT O-GlcNAc Enzymatic Labeling System*, Molecular Probes). L'Alexa Fluor 488 est excité à 490 nm et émet à 520 nm. Le protocole suivi est celui recommandé par le fournisseur.

Marquage: 100 μg de protéines sont dessalés et délipidés par une précipitation chloroforme/méthanol/eau. Le culot protéique est resuspendu dans 1 % de SDS, 20 mM HEPES, pH 7,9 puis chauffé 10 min à 90 °C. Une fois l'échantillon refroidi, le tampon de marquage, le MnCl2 (7,3 mM), l'UDP-GaINAz (33 μM) et la Gal-T1 (Y289L) sont ajoutés à l'échantillon pendant 24 h à 4 °C.

Couplage : une fois le marquage enzymatique terminé, l'échantillon marqué d'un groupement azide est dessalé par précipitation chloroforme/méthanol/eau puis le culot est resolubilisé dans 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1 % SDS et chauffé quelques minutes. Le tampon réactionnel, le sulfate de cuivre (2 μM), et deux additifs dont la composition n'est pas connue (l'un des deux renfermant l'Alexa Fluor 488 alkyne, Molecular Probe) sont ajoutés et incubés sous mélange rotatif 20 min, à température ambiante et à l'obscurité. L'échantillon est précipité (précipitation chloroforme/méthanol/eau) puis resuspendu dans le tampon de solubilisation afin de réaliser une électrophorèse bidimensionnelle.



Protéine O-GlcNAcylée

Figure 49 : Principe du marquage enzymatique des résidus O-GlcNAc puis le couplage chimique à un Alexa Fluor 488.

2. Détection du phosphoprotéome

Le Pro-Q Diamond (Invitrogen) ou le Phospho-Tag (Applied Bio-Probes) étant des colorants fluorescents (longueur d'onde d'excitation de 555 nm et d'émission 580 nm), les différentes étapes sont réalisées à l'obscurité. Après l'étape de fixation, les gels sont lavés à l'eau ultra pure (6 lavages de 20 min). Les gels sont incubés sous agitation lente dans la solution de Pro-Q Diamond pure ou de Phospho-Tag pendant 90 min. Postérieurement à cette étape de coloration, les gels sont décolorés à l'aide de rinçages par une solution de décoloration (50 mM acétate de sodium pH 4,0, 20 % 1,2-42 propane-diol ou solution de décoloration Phospho-Tag (Applied Bio-Probes)) durant 3 x 1 h, sous agitation. Puis les gels sont lavés 2 x 10 min avant d'être scannés par l'imageur ChemiDoc MP. Si le bruit de fond est important, des étapes de lavage à l'eau ultra pure sont ajoutées.

3. Détection du protéome total

Différents protocoles de coloration ou de marquage fluorescent ont été testés pour détecter le protéome total avec une résolution plus élevée et une meilleure sensibilité. De plus, ces protocoles ne devraient pas interférer avec d'autres colorations et marquages.

Marquage au T-Red 310: les protéines synaptosomales sont marquées par fluorescence par l'intermédiaire d'un kit commercial (*T-Dye Series, T-Red 310 Protein Labeling Kit*, NH DyeAGNOSTICS). Le T-Red 310 est excité à 650 nm et émet à 665 nm. Le protocole suivi est celui recommandé par le fournisseur. Le T-Red 310 est dilué dans 4 µl de solvant T-Dye. Cent µg d'échantillon de protéines synaptosomales sont ensuite ajoutés au mélange. La solution est vortexée puis incubée 30 min dans la glace.

Technologie *Stain-Free* : après une activation aux UV, les protéines contenues dans le gel émettent un signal fluorescent immédiatement détectable par le *Stain-Free* (technologie *Stain-Free*), ce qui permet de révéler le profil protéique complet de chaque échantillon.

Coloration au SYPRO® Ruby: le SYPRO® Ruby étant un colorant fluorescent (longueur d'onde d'excitation de 280 nm et d'émission 610 nm), l'ensemble des étapes se fait à l'obscurité. Les gels sont incubés dans la solution de SYPRO® Ruby sur la nuit. Les gels sont lavés 10 min à l'eau ultra pure, puis décolorés 2 x 10 min avec une solution de décoloration (10 % méthanol, 7 % acide acétique), puis 2 x 10 min à l'eau ultra pure. Les gels sont scannés par l'imageur ChemiDoc MP.

Coloration au nitrate d'argent : après la fixation, le gel est sensibilisé 1 min dans une solution de thiosulfate de sodium 0,02 %. Le gel est ensuite placé dans une solution de coloration (nitrate d'argent à 0,2 %, formaldéhyde à 37 %) durant 30 - 45 min. Le gel est alors placé dans une solution

de révélation (carbonate de sodium 2,5 %, thiosulfate de sodium 10 %, formaldéhyde 37 %) afin que les protéines apparaissent. Pour arrêter cette révélation, on met le gel dans la solution « stop » composée de tris base 4 % et d'acide acétique 2 %.

E. Visualisation des protéines

Une fois l'électrophorèse achevée, les gels 2-DE sont rincés dans de l'eau pure pour éliminer l'excès de SDS. La séquence de visualisation des protéines dépend des différentes colorations et marquages des trois protéomes. Dans tous les cas, les gels sont immédiatement analysés en utilisant l'imageur Chemidoc MP et le logiciel Image Lab[™] (Biorad) pour détecter le O-GlcNAcome (via le marquage à l'Alexa Fluor[®] 488). Les gels sont également scannés directement si le marquage T-Red 310 ou la coloration *Stain-Free* ont été utilisés pour le protéome total. Le jour suivant, les gels sont scannés après coloration au phosphoprotéome, et sont finalement visualisés le troisième jour après la coloration du protéome total (pour la coloration au SYPRO[®] Ruby ou au nitrate d'argent). La détection des fluorophores est réalisée avec une épi-illumination bleue, verte ou rouge. Les temps d'exposition sont choisis pour obtenir le rapport signal / bruit de fond le plus élevé sans saturation du signal.

F. Analyse différentielle avec le logiciel SameSpots

L'analyse des images des gels 2-DE et des 3 marquages (O-GlcNAcome, phosphoprotéome et protéome total) est effectuée sur **le logiciel SameSpots** (TotalLab). Cette analyse se fait en plusieurs étapes :

- Images: les images des 3 protéomes pour chaque gel 2-DE sont chargées sur le logiciel SameSpots. La qualité de chaque image est vérifiée (signal, bruit de fond, saturation), permettant de signaler tout problème avant le début de l'analyse. Les images de gels sont ensuite classées selon le marquage correspondant (O-GlcNAcome, phosphoprotéome, protéome total).
- 2) Choix de l'image de référence : sur l'ensemble des images de gels, l'image ayant la meilleure qualité et représentant tous les spots (protéome total) est choisie comme image de référence pour l'alignement des spots.
- Détermination de la zone d'analyse : sur cette image de référence, la zone de détection des spots est sélectionnée.

- 4) Alignement : cette étape minutieuse consiste à aligner les spots de chaque image aux spots de l'image de référence, permettant de superposer toutes les images et de détecter un seul motif de spots.
- 5) Détection des zones d'intérêt : suite à l'alignement, l'ensemble des zones, ou spots, sont détectés et localisés et sont représentés sur l'image de référence.
- 6) **Choix du modèle statistique :** le test choisi consiste à comparer les spots du O-GlcNAcome, du phosphoprotéome ou du protéome total séparément entre les groupes C et PSM.
- 7) Analyse automatique : un spot ponctuel unique est co-détecté sur toutes les images de l'analyse (O-GlcNAcome/phosphoprotéome/protéome total de chaque gel 2-DE). Les *p-values* et les valeurs de champs sont calculées automatiquement en fonction de la configuration des conditions expérimentales (ici, variation de la O-GlcNAcylation ou phosphorylation ou expression totale entre les gels des groupes C et PSM).
- 8) Statistiques : les tests statistiques (ANOVA), l'analyse de puissance, l'analyse des composantes principales et les dendrogrammes des relations entre les spots sont tous calculés automatiquement sur SameSpots. Cette étape permet de mettre en évidence les spots différentiels significatifs pour chaque protéome entre les groupes C et PSM. Les différentes représentations graphiques et dendrogrammes permettent de visualiser rapidement une augmentation ou une diminution de la O-GlcNAcylation et/ou phosphorylation et/ou expression totale entre les groupes C et PSM.
- 9) Rapport : les rapports peuvent être créés automatiquement à la fin de l'analyse. Toutes les images, les graphiques et les tableaux peuvent être exportés sous forme d'une galerie de plans. Une image du gel de référence avec les spots d'intérêt à piquer est également exportée.

G. Coloration au bleu colloïdal

Afin de visualiser les spots d'intérêt et les piquer, le gel est coloré au bleu colloïdal. Pour ce faire, le gel est incubé 2 x 1 h dans une solution de fixation (50 % éthanol, 2 % acide orthophosphorique) puis rincé 1 h dans une solution de 2 % d'acide orthophosphorique et incubé 20 min dans une solution de prétrempage (15 % sulfate d'ammonium, 2 % acide orthophosphorique, 17 % éthanol). Le gel est ensuite incubé 3 à 4 jours dans la solution de coloration (0,1 % bleu de Coomassie G250 et solution de prétrempage), puis rincé 2 x 10 min à l'eau ultra pure.

H. Digestion trypsique « in gel »

Les spots différentiels précédemment visualisés par la coloration au bleu colloïdal sont découpés du gel. Les spots sont alors décolorés par 0,1 M de bicarbonate d'ammonium (NH₄HCO₃) pendant 15 min, puis un volume égal d'acétonitrile (ACN) est ajouté pendant 20 min. Ces étapes sont répétées jusqu'à ce que les spots soient complétement décolorés ; ils sont ensuite déshydratés par l'ACN puis séchés dans un évaporateur rotatif (Speed-Vac, Thermo Scientific). Les protéines sont ensuite réduites par 10 mM de DTT dans 0,1 M de NH₄HCO₃ à 56 °C pendant 30 min, puis alkylées par 55 mM d'iodoacétamide dans 0,1 M de NH₄HCO₃ pendant 30 min à l'obscurité. Les spots sont ensuite lavés avec 0,1 M de NH₄HCO₃ pendant 15 min, puis déshydratés et séchés comme précédemment décrit. Les spots de gels sont réhydratés dans le tampon de digestion (0,1 M NH₄HCO₃, 5 mM CaCl2, et 12,5 ng/µl de trypsine (*Trypsin/Lys-C Mix, Mass Spec Grade,* Promega) pendant 15 min à 4 °C. L'excès de tampon est éliminé et les spots de gels sont recouverts par le tampon de digestion sans trypsine puis incubés sur la nuit à 37 °C.

I. Extraction des protéines d'intérêts

Après la digestion trypsique, les peptides sont extraits du gel par l'addition de 50 μ l de 25 mM de NH₄HCO₃ et sous agitation pendant 15 min ; le surnageant est alors récupéré. Deux extractions successives sont ensuite réalisées avec une solution de 45 % ACN/0,1 % acide trifluoroacétique (TFA) pendant 15 min, et les surnageants sont poolés avec la première fraction. La dernière extraction est réalisée avec une solution de 95 % ACN/0,1 % TFA pendant 15 min, qui sera aussi poolée avec les extractions précédentes. Les peptides sont séchés au Speed-Vac, et stockés à -20 °C.

J. Analyse par spectrométrie de masse de type nano-LC-MS (*nano liquid chromatography – mass spectrometry*)

Ce protocole d'analyse par spectrométrie de masse a été réalisé en collaboration avec le **Dr Sophie Duban-Deweer** (Plateforme d'Analyse Protéomique de l'Artois, Université Jean Perrin, Lens).

L'identification des protéines a été réalisée en utilisant un collecteur de fractions ProteineerTM (Brukers Daltonics). Les différents peptides extraits sont déposés sur une cible AnchorChipTM MALDI. La matrice CHCA (α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid) est ajoutée à chaque dépôt ; 2 µl de matrice, à une concentration de 0,3 mg/ml dans l'acétone : éthanol : 0,1 % TFA (3 : 6 : 1 v/v/v) sont ainsi déposés durant le processus de collecte des fractions.
Les mesures MS (mode réflectron) et MS/MS (mode lift) sont réalisées de manière automatique sur un spectromètre de masse Ultraflex[™] II TOF/TOF (Bruker Daltonics) avec le logiciel d'acquisition FlexControl[™] 3.3 (Bruker Daltonics). La calibration de masse d'un rang entre 1,000 et 3,500 Da a été effectuée par l'utilisation des ions mono-isotopiques [M+H]⁺ de la bradykinine 1-7, de l'angiotensine 1 et 2, de la substance P, de la bombésine, et de l'hormone adrénocorticotropique (clips 1-17 et clips 18-39) à partir d'un kit standard de calibration des peptides (Bruker Daltonics). Brièvement, chaque spectre MS est acquis par l'accumulation de données provenant de 500 tirs de laser avec un voltage d'accélération de 25 kV, un voltage de réflexion de 26,3 kV, à un rythme d'extraction de 160 ns. La fragmentation des peptides est réalisée en mode MS/MS avec le logiciel ProteinScape 2.1 (Bruker Daltonics), selon les paramètres suivants : rapport signal-bruit > 15, plus de 3 MS/MS par spot si le signal est disponible, une tolérance MS de 0,15 Da par pic et une élimination des pics qui apparaissent au-delà de 35 % des fractions. Les ions précurseurs sont accélérés à 8 kV et sélectionnés suivant leur temps de vol. Les ions métastables sont ensuite générés et leur masse est mesurée en mode réflectron. Pour les ions précurseurs et les ions fils, chaque spectre MS/MS est produit par l'accumulation de données provenant de 200 et 1000 tirs de laser respectivement. La liste de pics provenant des spectres MS et MS/MS est générée par le logiciel Flexanalysis[™] 3.3 (Bruker Daltonics).

Les protéines ont été identifiées sur la base de la fragmentation des empreintes peptidiques publiées. Le moteur de recherche utilisé est Mascot 2.3.02 (Matrix Science Ltd, London, UK) et la base de données est UnitProt via le logiciel ProteinScape 2.1 (Bruker Daltonics). La taxonomie a été restreinte au modèle rongeur (Rodentia), et les paramètres de sélection sont les suivants : une tolérance de masse 75 ppm, un site de clivage manquant pour PMF (*Peptide Mass Fingerprinting*), une tolérance MS/MS de 0,5 Da, un site de clivage manquant pour la MS/MS. La carbamidométhylation des cystéines et l'oxydation des résidus de méthionine sont considérées comme des modifications fixes et variables respectivement. La pertinence de l'identité des protéines a été jugée selon un score MOWSE calculé avec p < 0,05.

III. <u>Résultats</u>

A. Optimisation du fractionnement synaptosomal

Deux protocoles ont été testés et comparés pour l'enrichissement de la fraction synaptosomale du cortex sensorimoteur de rat. Le premier consistait en un gradient de sucrose, adapté de Kamat et ses collègues (Kamat et al 2014) (Etude 1)¹¹, et le second un gradient Percoll, selon Dunkley et ses collègues (Dunkley et al 2008) (Figure 49A). Nous avons travaillé sur le cortex sensorimoteur droit et gauche (masse totale ~ 20 mg). L'objectif était de maintenir l'hétérogénéité interindividuelle et d'éviter la mise en commun d'échantillons biologiques.



Figure 49 : Représentation schématique des principales étapes et validations du protocole en gradient de Percoll. (A) A partir d'homogénats de cortex sensorimoteur, des protocoles de centrifugation différentiels ont été effectués sur gradient discontinu de Percoll. Après un cycle de centrifugation, S1 et P1 correspondaient respectivement au surnageant et au culot ; la fraction enrichie en synaptosomes résultant d'un second cycle de centrifugation. (B) La fraction surnageante (S1), qui provient de l'homogénat de cortex sensorimoteur (60 mg), a été recueillie et directement appliquée à un gradient de Percoll discontinu. La photographie montre l'aspect typique d'un tube à la fin de l'étape de centrifugation, avec de très petites fractions F3 et F4 correspondant aux synaptosomes.

Après le protocole avec un gradient de Percoll, différentes fractions ont été obtenues, et seule la fraction 4 correspond à la fraction pure enrichie en synaptosomes (F4) **(Figure 49B)**. Cependant, cette fraction était insuffisante pour recueillir suffisamment de protéines, de sorte que les interfaces des fractions synaptosomales (F3 et F4) ont été recueillies. Malgré le regroupement des fractions F3

¹¹ Pour plus de détails, voir l'étude 1, II.C.2. Fractionnement synaptosomal : gradient de sucrose, p115

et F4, l'isolement des fractions synaptosomales par un gradient de Percoll était techniquement difficile et il était donc impossible d'obtenir suffisamment de protéines pour effectuer l'analyse protéomique en aval. Dans le protocole avec le gradient de sucrose, les différentes étapes de centrifugation conduisaient à la récupération des culots/surnageants, et ce protocole était plus efficace pour l'isolement des fractions enrichies en synaptosomes, même avec une petite quantité d'échantillon. Cette conclusion est conforme à l'étude de Tenreiro et ses collègues (Tenreiro et al 2016). Nous avons donc continué cette deuxième étude avec un fractionnement synaptosomal avec un gradient de sucrose.

B. Optimisation de la 2-DE sur les protéines synaptosomales

L'IEF a été effectuée sur des *strips* (bandelettes d'acrylamide) non linéaires (NL) de pH 3 – 11 afin de pouvoir étudier un large champ de protéines synaptosomales. De plus, les *strips* non linéaires ont une bonne résolution dans la région centrale des gels (Candiano et al 2002). Puisque la quantité de protéines contenues dans la fraction synaptosomale isolée du cortex sensorimoteur est très basse (environ 3 µg/µl), nous avons décidé d'utiliser des *strips* de 11 cm pour gagner en séparation de protéines sans nécessiter une quantité de protéines plus élevée (**Figure 50**).



Figure 50: Détermination de la quantité de protéines synaptosomales (Tableau 4 – protocole 1). La première dimension est réalisée sur des *strips* de 11 cm de pH 3 - 11 NL ; La deuxième dimension est un gel Criterion TGX *Stain-Free* [™] de 4 – 20 %. Les gels sont colorés au nitrate d'argent. Différentes quantités de protéines ont été utilisées : (A) 50 µg ; (B) 200 µg.

L'étape de réhydratation a également été optimisée pour améliorer la focalisation des protéines synaptosomales durant l'IEF (Figure 51). Habituellement, seule une réhydratation passive de 12 h était effectuée. Une étape de réhydratation active de 2 h à 50 V a été ajoutée avant l'IEF (Tableau 4 – protocole 2). Le nombre de spots était plus grand et les spots sont mieux focalisés sur la Figure 51A (~ 260 spots) par rapport à la Figure 51B (~ 220 spots) ; ainsi, cette étape de réhydratation active ne sera pas maintenue avant la mise au point de la première dimension.



Figure 51: Optimisation de l'étape de réhydratation (Tableau 4 - protocole 2). La première dimension est réalisée sur des *strips* de 11 cm, sur une gamme de pH de 3 à 11 NL ; la deuxième dimension est une SDS-PAGE à 12,5% d'acrylamide ; les gels sont colorés à l'argent. Différentes conditions de réhydratation ont été réalisées : (A) réhydratation passive pendant la nuit ; (B) réhydratation passive la nuit et réhydratation active de 2 h à 50 V.

Pour améliorer la qualité de la seconde séparation électrophorétique, différentes réticulations de gel (4 – 20 % ou 8 – 16 %) ont été comparées (Tableau 4 – Protocole 3). La majorité des spots correspondant aux protéines synaptosomales étaient concentrées entre 75 et 25 kDa, et quelques spots étaient présents à un poids moléculaire inférieur à 20 kDa (Figure 52). Ensuite, avec une réticulation de 4 – 20 %, la partie supérieure du gel n'apportait aucune information puisqu'aucun spot n'était détecté. Dans la partie basse du gel, tous les spots étaient distribués dans une région dense (Figure 52A). En comparaison, avec une réticulation de 8 – 16 %, tous les spots étaient distribués sur l'ensemble du gel avec une bonne détection des spots entre 20 et 100 kDa (Figure 52B et C). Deux compositions de gel ont également été comparées : des spots de protéines beaucoup plus diffus étaient observés sur le gel Tris-glycine (TGX) (Figure 52B) comparé au gel Tris-HCl (Figure 52C). Basé sur ces observations, les gels Tris-HCl avec une réticulation de 8 – 16 % semblent être les plus appropriés pour la séparation des protéines synaptosomales.





Afin de déterminer le tampon de solubilisation optimal pour les protéines synaptosomales, différents agents réducteurs et détergents ont été testés (**Tableau 4 - protocole 4**). Tous les échantillons de synaptosomes ont été solubilisés dans un tampon composé d'urée et de thiourée, auquel est ajouté un agent réducteur (DTT ou TBP) et un détergent zwitterionique (CHAPS ou ASB-14). En comparant avec le tampon DTT/CHAPS, la combinaison DTT/ASB-14 montrait une très mauvaise séparation et une faible résolution des spots (**Figure 52E**) ; on pouvait observer quelques trainées horizontales, suggérant que la résolution des spots était mauvaise par rapport à leur point isoélectrique. L'ASB-14 semblait être inefficace pour la solubilisation des protéines synaptosomales. Ce résultat est en accord avec l'étude de Carboni (Carboni et al 2002). Ensuite, le DTT a été remplacé par la TBP comme agent réducteur puisqu'il a été rapporté que la TBP améliore la solubilité des

protéines durant l'IEF, et augmente la résolution des spots (Herbert et al 1998). Une meilleure séparation a été observée sur le gel de la **Figure 52F** par rapport à celle de la **Figure 52D**. Nous avons conclu que l'association 5 mM TBP et 2 % CHAPS est le tampon le plus adéquat pour obtenir une solubilisation optimale des protéines synaptosomales.

Enfin, pour améliorer encore la qualité de la séparation électrophorétique, trois tampons de migration contenant différents ions de traîne (taurine, tricine et glycine) ont été testés en utilisant des gels 10 % d'acrylamide SDS-PAGE (Tableau 5). Un tampon à base de taurine ou de glycine à pH 8.3 (Figures 53A et B) est la plus appropriée pour une séparation électrophorétique optimale, en comparant avec un tampon à pH 8.8 (Figures 53D et E) ou un ion de traîne tricine (Figures 53C et D).



Figure 53 : Détermination du tampon de migration optimal. Électrophorèses monodimensionnelles colorées au nitrate d'argent. Des tampons de migration avec différents ions de traîne à 0,2 M ont été testés. (A) Glycine pH 8.3 ; (B) Taurine pH 8.3 ; (C) Tricine pH 8.3 ; (D) Glycine pH 8.8 ; (E) Taurine pH 8.8 ; (F) Tricine pH 8.8.

Les tampons de migration glycine et taurine à pH 8.3 ont été comparés en 2-DE **(Tableau 4 – protocole 5)**. Aucune différence significative n'a été observée entre les **Figures 52G et 6H**. Ainsi, pour la suite des expérimentations, le tampon glycine a été utilisé.

C. Optimisation de la détection du O-GlcNAcome, du phosphoprotéome et du protéome total des protéines synaptosomales

Récemment, une méthode innovante a été développée dans notre laboratoire pour obtenir trois informations (O-GlcNAcylation, phosphorylation et expression totale) à partir d'un seul gel sur des échantillons de cellules musculaires murines (Cieniewski-Bernard et al 2014). Ce protocole a été optimisé et amélioré pour les échantillons de synaptosomes du cortex cérébral de rat. Une étape préliminaire de déglycosylation des résidus O-GlcNAc a révélé que les protéines synaptosomales étaient principalement O-GlcNAcylées et non-N-GlcNAcylées, nous assurant d'avoir un marquage spécifique (données non présentées). Tout d'abord, l'efficacité du marquage des résidus O-GlcNAc par l'Alexa Fluor® 488 des protéines synaptosomales a été étudiée (Figure 54) ; une intensité de fluorescence significative du marquage à l'Alexa Fluor® 488 a été visualisée pour 40 ou 100 μg de protéines synaptosomales tandis qu'un signal très faible a été obtenu pour 20 μg de protéines synaptosomales (Figure 54A). De plus, ce marquage était spécifique car aucun signal n'a été observé pour les contrôles négatifs, alors qu'un signal au niveau du contrôle positif (αB-crystalline) a été remarqué. Le profil protéique de chaque échantillon a été visualisé par la technologie *Stain-Free* (Figure 54B). Le marquage Alexa Fluor® 488 des résidus O-GlcNAc de protéines synaptosomales par *Click chemistry* est donc efficace sur de petites quantités de protéines.



Figure 54 : Marquage des résidus O-GlcNAc par l'Alexa Fluor[®] 488 et coloration des protéines synaptosomales phosphorylées. (A) Marquage des résidus O-GlcNAc par l'Alexa Fluor[®] 488. (B) La technologie Stain-Free révèle le profil protéique de chaque échantillon. Une quantité de protéines de 20 à 100 µg a été déposée pour chaque échantillon. CN : contrôle négatif ; αBcrystalline : contrôle positif. Ensuite, deux colorations des protéines phosphorylées ont été testées : ProQ Diamond (C) et Phosphotag (D) ; (E) protéome total de chaque expérience colorée au SYPRO® Ruby. Une quantité de protéines de 40 à 12,5 µg a été déposée pour les deux conditions.

Le phosphoprotéome est couramment détecté par une coloration au ProQ Diamond. Cependant, le rapport signal/bruit était faible car le bruit de fond était élevé malgré une durée et un nombre de lavages importants. De plus, les bandes de protéines étaient mal résolues (Figure 54C). Par la suite, une nouvelle coloration des protéines phosphorylées par le Phospho-tag a été testée et a été plus efficace que la coloration ProQ Diamond (Figure 54D). En effet, la coloration était plus nette et intense. La spécificité de la coloration au Phospho-Tag a été testée et validée au cours d'une étape de déphosphorylation par la phosphatase alcaline (données non présentées). En outre, le bruit de fond était faible avec des temps de lavage plus courts. La coloration du protéome total au SYPRO[®] Ruby était identique, quelle que soit la coloration du phosphoprotéome utilisée (Figure 54E). Par la suite, la coloration au Phospho-tag a été utilisée pour la détection des phosphoprotéines.

Différents protocoles de marquage ou de coloration ont été réalisés pour détecter le protéome total **(Figure 55)**. La coloration au nitrate d'argent **(Figure 55A)** a révélé le protéome total mais avec un bruit de fond significatif comparé à d'autres protocoles de coloration **(Figures 55B et C)**. La détection du protéome total par la technologie *Stain-Free* **(Figure 55B)** ou par la coloration SYPRO[®] Ruby **(Figure 55C)** était très similaire en termes de sensibilité. Cependant, la technologie Stain-Free (qui nécessite une excitation UV des protéines) pouvait interférer avec d'autres marquages, en particulier avec la détection de l'Alexa Fluor[®] 488. En effet, nous avons observé une légère diminution de l'intensité des signaux de l'Alexa Fluor[®]488 lorsque la détection *Stain-Free* a été appliquée en premier **(données non présentées)**. Pour permettre la détection de l'O-GlcNAcome et du protéome total le même jour, le protéome total a également été marqué avec un fluorophore T-Red 310. Nous avons observé que certains spots n'étaient pas détectables au niveau du protéome total **(Figure 55D)**, ce qui indique que le marquage au T-Red 310 pourrait interférer avec d'autres marquages ou colorations, ou n'a pas été suffisamment efficace.



Figure 55: Optimisation de la détection du protéome total. Électrophorèse bidimensionnelle avec différents colorations ou marquages du protéome total. La première dimension est effectuée sur des *strips* de 11 cm, sur une gamme de pH de 3-11 NL ; la seconde dimension est réalisée sur un gel Criterion ™ TGX *Stain-Free* ™ ou Tris-HCl à 4-20 % ou 8-16 %. (A) coloration au nitrate d'argent ; (B) Technologie *Stain-Free* ; (C) coloration au SYPRO® Ruby ; (D) Marquage T-Red 310.

D. Conclusion de l'optimisation 2-DE et des différents marquages et colorations des protéines synaptosomales

Dans cette étude, nous avons déterminé le protocole optimal pour l'analyse des protéines synaptosomales sur une petite quantité de tissu cérébral en utilisant une analyse protéomique 2-DE (tampon de solubilisation, réticulation du gel et composition). Puis, le protocole de *Click-iT chemistry* a été appliqué pour la première fois sur un sous-protéome de synaptosomes du cortex cérébral de rat. Cette étape et d'autres optimisations de protocole de coloration ont permis une triple détection (O-GlcNAcome, phosphoprotéome et protéome total) de protéines synaptosomales sur un même gel **(Figure 56)**.



Figure 56 : Détection multiple du protéome total, de l'O-GlcNAcome et du phosphoprotéome de protéines synaptosomales. Droite : protocole final pour la détection multiple des protéines synaptosomales. À gauche : (A) O-GlcNAcome, marquage avec l'Alexa Fluor[®] 488 ; (B) Phosphoprotéome, coloration au Phospho-tag ; (C) protéome total, coloration au SYPRO[®] Ruby.

E. Analyse protéomique différentielle sur le logiciel SameSpots

L'ensemble de ces optimisations a permis d'effectuer une analyse différentielle du O-GlcNAcome, du phosphoprotéome et du protéome total des protéines synaptosomales du cortex sensorimoteur des groupes C et PSM. Pour cette partie, 3 échantillons de synaptosomes de cortex sensorimoteur de rat C ou PSM ont été rassemblés, afin d'avoir une quantité de protéines suffisante. Ensuite, 3 gels 2-DE ont été effectués pour chacun des groupes C et PSM afin de mettre en évidence les 3 protéomes.

Nous avons identifié 408 zones d'intérêt sur l'image de gel de référence avec le logiciel SameSpots. Parmi ces zones, la comparaison des images de gels des groupes C et PSM a mis en évidence :

- Dans le protéome total, 31 spots différentiels, dont :
 - Augmentation du profil d'expression de 18 spots
 - Diminution du profil d'expression de 13 spots
- Dans le phosphoprotéome, 14 spots différentiels, dont :
 - Augmentation du profil d'expression de 6 spots
 - Diminution du profil d'expression de 8 spots
- Dans l'O-GlcNAcome, 29 spots différentiels, dont :
 - Augmentation du profil d'expression de 16 spots
 - Diminution du profil d'expression de 13 spots

Les spots différentiels ont été vérifiés un à un (selon la *p-value*, la visualisation du spot sur l'image du gel et la localisation...), permettant de sélectionner 35 spots d'intérêt présentant une variation de O-GlcNAcylation et/ou de phosphorylation et/ou d'expression totale après une période de PSM (Figure 57A). Plus précisément, parmi ces 35 spots, 36 % présentent une variation de la O-GlcNAcylation, 24 % de la phosphorylation, 33 % de l'expression totale ou 7 % d'une combinaison (O-GlcNAcylation et/ou phosphorylation et/ou expression totale) dans le groupe PSM (Figure 57B). Comme illustré sur l'image du gel de référence, ces spots sont répartis sur l'ensemble du gel (Figure 57C), et quelques exemples de spots différentiels et de leurs graphiques statistiques correspondants sont illustrés sur la Figure 57D.



Figure 57: Résumé des résultats de l'analyse protéomique différentielle obtenus avec le logiciel SameSpots. (A) Tableau récapitulatif des 35 spots différentiels retenus, montrant une variation de O-GlcNAcylation et/ou phosphorylation et/ou expression totale. La *p-value* est indiquée entre parenthèses. (B) Diagramme résumant la répartition des spots différentiels selon une variation de O-GlcNAcylation, phosphorylation, expression totale ou une combinaison de ces facteurs dans le groupe PSM par rapport au groupe C. (C) Image de référence illustrant la répartition des spots différentiels sur le gel 2-DE. (D) Représentation des images et des graphiques de quelques spots différentiels en O-GlcNAcome, phosphoprotéome ou protéome total.

F. Identification par spectrométrie de masse

Les 35 spots différentiels décrits précédemment ont été découpés puis digérés par la trypsine. Les peptides résultants ont été analysés par nano-LC MS/MS. Le séquençage de ces peptides a été comparé à une banque de données (UniProt) via un moteur de recherche (Mascot) permettant l'identification des protéines. Les paramètres d'inclusion à l'identification d'une protéine ont été :

- Un nombre de peptides identifiés supérieur à 2
- Un score d'identification Mascot supérieur à 60 en MS et 57 (pour Rodentia) en MS/MS

L'ensemble des identifications est présenté dans le Tableau 6.

Partie 1 – Etude 2 : Analyse protéomique différentielle

N° Spot	N° accession (UniprotKB)	Nom protéine	Poids moléculaire prédit (kDa)	Séquence de recouvrement (%)	Nombre de peptides identifiés	Score Mascot
11	Q4QRB4	β3 tubuline	50,4	17.8	6	60
169	Q61120	SHC3 (SHC-transforming protein 3)	52,1			59
186	P60711	Actine cytoplasmique 1	41,7	12.5	3	183
187	P60711	Actine cytoplasmique 1	41,7	11.2	3	208
215	A2VCW9	AASS (alpha-aminoadipic semialdhehyde synthase) mitochondriale	102,8			54
224	P21707	Synaptotagmine 1	47,4	3.1	1	57
238	P15178	AspartatetRNA ligase, cytoplasmique	57,1			59
241	P19527	Neurofilament L	61,3	7.6	3	109
264	Q9Z2L0	VDAC 1 (voltage-dependent anion-selective channel protein 1)	30,7	25.4	4	260
285	P60711	Actine cytoplasmique 1	41,7	10.7	3	153
286	P60711	Actine cytoplasmique 1	41,7	31.2	9	72
292	P53702	Cytochrome c - type heme lyase	31	43.0	5	63
315	P20788	Cytochrome b-c1 complex subunit Rieske, mitochondriale	29,4	8.8	5	70
318	Q99LO4	DHRS1 (Dehydrogenase/reductase SDR family member 1)	34			62
321	Q8K3J1	NDUS8 (NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 8), mitochondriale	24	8.5	1	46
345	P31399	ATP synthase sous-unité d, mitochondriale	18,8	13.0	2	88
354	Q9DCJ5	NADUA8 (NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 8)	20	7.6	1	55
355	Q62718	Neurotrimine	38			52
356	Q8K3J1	NDUS8 (NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 8), mitochondriale	24	8.5	1	52
374	Q0VC21	Protéine ribosomale 39S, mitochondriale	33,7			65
376	D3ZVK1	DNA helicase MCM8	91,9	21.3	8	66
396	P48678	Prelamine-A/C	74,2			63
406	Q68FW6	PPR36 (Protein phosphatase 1 regulatory subunit 36)	47,7			61

Tableau 6 : Liste des protéines identifiées par spectrométrie de masse, au sein des synaptosomes du cortex sensorimoteur. L'identification des protéines est détaillée selon le nom de la protéine, son numéro d'accession (UniProtKB), sa masse moléculaire théorique (kDa), son recouvrement séquentiel (%), le nombre de peptides identifiés, le score Mascot, et les bandes dans lesquelles elles ont été identifiées suite à l'analyse différentielle sur le logiciel SameSpots. Le score Mascot a été obtenu à partir de la banque de données Mascot (www.matrixscience.com).

Une majorité des protéines identifiées sont des protéines mitochondriales (ATP synthase, cytochrome c...) ou du cytosquelette (β 3-tubuline, neurofilament-L, actine...). D'autres protéines identifiées sont impliquées dans les voies de signalisation (PPR36), des constituants de la matrice extracellulaire (prélamine A/C) ou des protéines d'adhésion (neurotrimine). Une protéine a particulièrement attiré notre attention : la synaptotagmine 1 est une protéine synaptique impliquée dans la libération des vésicules synaptiques. Les résultats sont résumés dans le diagramme ci-dessous **(Figure 58)**.



Figure 58 : Diagramme représentant la proportion des différents types de protéines identifiées par spectrométrie de masse, au sein des synaptosomes du cortex sensorimoteur.

IV. <u>Conclusions</u>

Les points forts :

L'ensemble de cette étude a permis de mettre au point un protocole complet pour analyser le protéome des synaptosomes provenant d'une petite quantité d'échantillon cérébral (cortex sensorimoteur) par 2-DE. En effet, dans la littérature, les analyses protéomiques sur les synaptosomes proviennent généralement de cerveau entier ou d'échantillons cumulés pour obtenir une quantité de protéines plus importante. Nous ne voulions pas rassembler nos échantillons de cortex sensorimoteur afin de garder les différences interindividuelles pouvant exister au sein d'un même groupe. C'est pourquoi, le fractionnement synaptosomal avec un gradient de sucrose était la méthode la plus simple permettant de garder une quantité satisfaisante de protéines pour effectuer les analyses protéomiques.

Différentes études se sont intéressées à l'analyse du protéome total et du phosphoprotéome des synaptosomes (voir par exemple, Filiou et al 2010, Witzmann et al 2005). Cependant, à ce jour, aucune n'a mis en évidence le O-GlcNAcome des synaptosomes par 2-DE. Ainsi, la deuxième étude de ma thèse a permis de mettre en évidence pour la première fois le O-GlcNAcome des synaptosomes de cortex cérébral et d'adapter une stratégie innovante permettant de marquer le O-GlcNAcome, le phosphoprotéome et le protéome total des synaptosomes du cortex sensorimoteur sur un même gel 2-DE. En effet, la stratégie développée dans notre laboratoire, permettant de détecter le O-GlcNAcome, le phosphoprotéome et le protéome total sur un même gel n'avait jusqu'à présent été appliquée que sur les cellules musculaires murines (Cieniewski-Bernard et al 2014).

A ce jour, des études ont permis d'identifier un ensemble de protéine synaptosomales O-GlcNAcylées ou phosphorylées (Filiou et al 2010, Trinidad et al 2012, Trinidad et al 2013, Vosseller et al 2006) par des techniques récentes (Rexach et al 2008). Cependant, ces études n'effectuent pas d'analyse différentielle de ces protéines ou ne font une analyse différentielle que sur un seul protéome (Mallei et al 2014, Tramutola et al 2018). L'intérêt de la stratégie protéomique optimisée dans cette thèse est qu'une fois le O-GlcNAcome, le phosphoprotéome et le protéome total des synaptosomes bien caractérisés à l'aide de logiciel d'analyse de gels 2-DE, il est possible de détecter des variations d'expression totale, de phosphorylation ou de O-GlcNAcylation des protéines synaptosomales entre différentes conditions expérimentales (par exemple suite à un changement de l'expérience sensorimotrice ou dans une situation pathologique).

Les points faibles :

Afin de mettre en évidence des spots différentiels entre les groupes C et PSM, nous avions au départ prévu de faire une analyse par électrophorèse bidimensionnelle à partir de protéines synaptosomales de cortex sensorimoteur de rats distincts. Cette stratégie avait pour but d'augmenter le nombre d'échantillons et de comparer un grand nombre de gels 2-DE entre les deux groupes (n = 10 / groupe). Lors de l'analyse sur le logiciel SameSpots, il s'est avéré très difficile de comparer autant de gels 2-DE différents et les résultats étaient très variables. Nous avons donc décidé de rassembler 3 échantillons de synaptosomes de cortex sensorimoteur de rats C et 3 échantillons de rats PSM. Avec ces deux pools, 3 gels 2-DE (réplicats) pour chaque groupe ont ensuite été effectués puis comparés.

Suite à l'analyse différentielle sur le logiciel SameSpots, nous avons été en mesure de détecter plusieurs spots différentiels dans les trois protéomes des synaptosomes entre les groupes C et PSM. Nous avons fait le choix de sélectionner une trentaine de spots pour réaliser leur identification par spectrométrie de masse. Cependant, nous avons rencontré un certain nombre de difficultés lors de ces identifications :

Lors d'un premier essai d'identification, un contaminant inconnu présent dans tous les échantillons n'a pas permis l'identification de la plupart des spots d'intérêt. Après plusieurs tests, nous avons découvert que le contaminant correspondait à de la trypsine, présente en trop grande quantité par rapport à la petite taille des spots du gel de piquage. En conséquence, nous avons effectué un deuxième essai d'identification en diluant la trypsine et en utilisant une plus grande quantité de protéines pour le gel de piquage (200 µg). Ce deuxième essai nous a permis d'identifier la plupart des protéines présentées dans le **Tableau 6**. Cependant, l'analyse par spectrométrie de masse a été une fois de plus difficile. Les critères d'inclusion de l'identification d'une protéine sont normalement un nombre de peptides identifiés supérieur à 2 et un score d'identification Mascot supérieur à 57 (dans la catégorie « *Rodentia* »). Un certain nombre de protéines présentées dans le **Tableau 6** ne respectent pas ces critères. Les protéines dont l'identification peut être incluse sont principalement des protéines majoritaires appartenant au cytosquelette (actine, neurofilament-L, β 3 tubuline) ou mitochondriales, et non comme nous l'aurions espéré une majorité de protéines synaptiques spécifiques telles que la synapsine 1.

Ces résultats peuvent être la conséquence d'un fractionnement synaptosomal relativement aspécifique. En effet, un fractionnement synaptosomal avec des gradients de sucrose ou de Percoll et des étapes d'ultracentrifugation auraient permis d'obtenir une fraction synaptosomale beaucoup plus pure, sans la présence de mitochondries, membranes, débris cellulaires et nucléaires... Ces

162

protéines majoritaires pouvant masquer des différences d'expression de protéines synaptiques minoritaires sur les images de gels 2-DE. De plus, la conformation des peptides d'intérêt de nos échantillons n'a peut-être pas permis une extraction correcte des peptides (par exemple, présence d'une majorité de protéines hydrophobiques) (Braun et al 2007). Enfin, il aurait été intéressant dans un premier temps d'identifier un maximum de spots ou du moins de sélectionner un plus grand nombre de spots différentiels. Nous nous sommes en effet limités à une trentaine de spots différentiels présentant les meilleures *p-value* et dont les différences d'expression étaient observables sur les images de gels. Cependant, des spots différentiels moins visibles, présentant des *p-values* moins importantes, étaient peut-être plus représentatifs de protéines spécifiques à la synapse.

<u>Etude 3 :</u> Analyse cinétique de la plasticité synaptique au cours d'une période de PSM et d'une phase de récupération « normogravitaire »

I. Introduction

La plasticité du cortex cérébral suite à une modification de l'expérience sensorielle se fait en plusieurs étapes pouvant durer de quelques heures à plusieurs mois. On peut notamment observer une phase d'acquisition (ou d'induction de la plasticité), une phase de maintien (ou de consolidation), et lorsque l'expérience sensorielle s'arrête, une phase de réversion (ou de récupération) s'opère¹². Au cours d'une période de PSM, même si les données restent parcellaires pour les premiers jours dans cette situation, la plasticité du cortex somesthésique primaire semble s'établir rapidement. Ainsi, dès 7 jours, une désorganisation de la représentation corticale de la patte postérieure commence à être observée, nous parlerons ici de **phase « d'induction »** de la plasticité, puis une diminution de cette représentation est nettement visible après 14 jours. Nous qualifierons cette dernière période de **phase « de maintien »** de la plasticité, où l'on peut observer des changements bien établis et reproductibles. Fait très remarquable, cette réorganisation corticale de la patte postérieure¹³.

Plusieurs mécanismes peuvent être impliqués dans la modulation dynamique des cartes du cortex somesthésique primaire chez l'adulte. Il est communément proposé que la plasticité à court terme reflète des changements au niveau des connexions synaptiques et des modifications morphologiques des épines dendritiques. Les deux premières études de cette thèse ont permis de mettre en évidence de nombreux changements synaptiques après une période de PSM de 14 jours. Nous avons pu observer des changements d'activation et d'expression de protéines présynaptiques impliquées dans le trafic et la libération des vésicules synaptiques (synapsine 1, synaptophysine, synaptotagmine 1) ; de protéines postsynaptiques (PSD-95 ou la sous-unité GluA2 des AMPAR) ; ou encore de protéines cytosquelettiques importantes pour la structuration et la stabilité des épines dendritiques (neurofilament-L, β3-tubuline). Cependant, aucune étude à ce jour ne s'est intéressée à l'évolution des protéines synaptiques et cytosquelettiques au cours des différentes phases de la plasticité corticale (induction, maintien et réversion) du cortex somesthésique.

¹² Voir Rappels bibliographiques – III.B.5 Mécanismes impliqués dans la plasticité du cortex moteur primaire, p68

¹³ Voir Rappels bibliographiques – II.B.3. Plasticité du cortex somesthésique primaire, p46

Ainsi, l'objectif principal de cette étude était d'observer l'évolution de l'activation et de l'expression d'un ensemble de protéines synaptiques au cours des phases d'induction, de maintien et de réversion de la plasticité corticale induite par une période de PSM. Les protéines sélectionnées et étudiées ont différentes fonctions afin d'avoir un aperçu global de la plasticité synaptique au cours du temps [protéines pré- (synapsine 1, synaptophysine, synaptotagmine 1) et postsynaptiques (les récepteurs AMPA et NMDA); protéines d'échafaudage de la densité postsynaptique (PSD-95 et Shank2); protéine d'adhésion (N-cadhérine); protéines cytosquelettiques (neurofilaments L et M, β3-tubuline)].

II. Matériels et Méthodes

A. Animaux et traitements

Afin d'évaluer la plasticité synaptique au cours des différentes phases de la plasticité corticale (induction et maintien) induite par une période de PSM (hypogravité) et lors d'une phase de réversion (normogravité), une cinétique a été réalisée sur 6 groupes de rats mâles Wistar adultes : les *groupes J0, J1, J7 et J14* ont été soumis à une période de PSM de respectivement 0, 1, 7 et 14 jours ; les *groupes R+6h et R+1J* ont eu une période de récupération normogravitaire de respectivement 6h et 1j après les 14 jours de PSM. Les différentes phases de cette cinétique sont représentées dans la **Figure 59**. Les cortex sensorimoteurs ont été prélevés et soumis à un fractionnement synaptosomal (le protocole est détaillé dans l'étude 1¹⁴).



Figure 59 : Analyse cinétique de la plasticité corticale au cours d'une période de PSM de 1, 7 et 14 jours, suivi d'une phase de récupération « normogravitaire » de 6 h (R+6 h) ou 1 jour (R+1J).

¹⁴ Pour plus de détails, voir l'étude 1, II.C.2. Fractionnement synaptosomal : gradient de sucrose, p115

Partie 1 – Etude 3 : Cinétique de la plasticité synaptique

B. SDS-PAGE et Western blot

Les protocoles de SDS-PAGE et de western blot sont décrits en détail dans la partie « Matériels et Méthodes » de l'étude 1¹⁵. Les anticorps utilisés sont présentés dans le **Tableau 7**.

Anticorps primaires	Hôte	Références	Compagnies	Concentrations						
Protéines présynaptiques										
Phospho-Synapsine 1 (ser62/67)		Ab9848	Merck Millipore	1:1000						
Synapsine 1	Rabbit	Ab1543	Merck Millipore	1:20000						
Synaptophysine	Rabbit	4329	Cell Signaling Technology	1:2000						
Synaptotagmine 1 (D33B7)	Rabbit	14558	Cell Signaling Technology	1:2000						
Protéines postsynaptiques										
Phospho-AMPA Receptor (GluA2) (ser880)	Mouse	MABN103	Merck Millipore	1:1000						
Phospho-AMPA Receptor (GluA2) (tyr869/tyr873/tyr876)	Rabbit	3921	Cell Signaling Technology	1:1000						
AMPA Receptor (GluA2) (D39F2)	Rabbit	5306	Cell Signaling Technology	1:2000						
Phospho-AMPA Receptor (GluA1) (ser845)	Rabbit	8084	Cell Signaling Technology	1:1000						
AMPA Receptor (GluA1) (D4N9V)	Rabbit	13185	Cell Signaling Technology	1:2000						
Phospho-NMDA Receptor 1 (GluN1) (ser897)	Rabbit	3385	Cell Signaling Technology	1:1000						
NMDA Receptor (GluN1) (D65B7)	Rabbit	5704	Cell Signaling Technology	1:2000						
Protéines d'échafaudage										
PSD-95	Rabbit	2507	Cell Signaling Technology	1:2500						
SHANK2	Rabbit	12218	Cell Signaling Technology	1:1000						
Protéine trans-synaptique										
N-cadhérine	Rabbit	13116	Cell Signaling Technology	1:2000						
Protéines du cytosquelette										
Neurofilament-L (C28E10)	Rabbit	2837	Cell Signaling Technology	1:2000						
Neurofilament-M (RMO 14.9)	Mouse	2838	Cell Signaling Technology	1:2000						
β3-Tubuline (D71G9)	Rabbit	5568	Cell Signaling Technology	1:2000						
Cycle O-GlcNAcylation										
O-GicNAc RL2	Mouse	MA1-072	ThermoFisher Scientific	1:5000						
OGT	Rabbit	Ab50273	Abcam	1:2500						

Tableau 7 : Liste des anticorps primaires utilisés dans cette étude 3.

¹⁵ Pour plus de détails, voir l'étude 1, II.F. SDS-PAGE et western blot, p117

C. Analyse statistique

Les statistiques ont été réalisées avec le logiciel Prism 6 (Graphpad). Les résultats graphiques sont présentés sous forme de moyennes affectées de l'écart standard à la moyenne (SEM). La normalité de chaque groupe est évaluée par le test de *Kolmogorov-Smirnov*. Les groupes sont comparés par une *ANOVA* suivi d'un test post-hoc de *Tukey* lorsque les groupes répondent aux lois de normalité, ou un test *de Kruskal-Wallis* dans le cas contraire, suivi d'un test post-hoc de *Dunn*. Dans un souci de clarté, les données des *ANOVA* ou *Kruskall-Wallis* seront présentées dans les graphiques et seuls les résultats significatifs des tests post-hoc par rapport à J0 et J14 seront présentés. Le niveau de significativité est fixé à p < 0,05.

III. <u>Résultats</u>

1. Plasticité présynaptique

Afin d'évaluer l'évolution de la plasticité présynaptique, et en particulier la mobilisation des vésicules synaptiques, au cours d'une période de PSM et d'une phase de récupération, la phosphorylation et l'expression de la synapsine 1, de la synaptophysine et de la synaptotagmine 1 ont été déterminées par western blot **(Figure 60)**.

Nos résultats montrent que la phosphorylation de la ser62/67 de la synapsine 1 est diminuée significativement dans le cortex sensorimoteur après 14 jours de PSM (- 41 % ; p < 0,05) (Figure 60A). Par ailleurs, nous pouvons observer une diminution progressive et particulièrement marquée à J14 de l'expression totale de la synapsine 1 (- 29 %, p < 0,05) (Figure 60B), de la synaptophysine (-60 %, p < 0,0001) (Figure 60C) et de la synaptotagmine 1 (- 36 % ; p < 0,001) (Figure 60D).

La diminution de l'expression totale des trois marqueurs présynaptiques se maintient jusqu'en phase de récupération R+1J [synapsine 1 (- 50 % ; p < 0,001), synaptophysine (- 90 % ; p < 0,0001) et synaptotagmine 1 (- 34 % ; p < 0,01)].

De manière générale, l'expression totale de la synapsine 1, la synaptophysine et la synaptotagmine 1 diminue graduellement durant la période de PSM, ce qui pourrait se traduire par une diminution de la disponibilité des vésicules synaptiques, et ce, même pendant les phases de récupération « normogravitaire » de 6 h et d'un jour **(Figure 60E)**.



Figure 60 : Phosphorylation et expression totale de protéines présynaptiques après 1, 7 et 14 jours de PSM et après 6 h et 1 jour de récupération « normogravitaire ». (A) Western blot représentatif et quantification de la phosphorylation de la ser62/67 de la synapsine 1 (rapport entre P-Synapsine 1 sur Synapsine 1). (B) à (D) Western blot représentatifs et quantification de l'expression de la synapsine 1 (B), de la synaptophysine (C) et de la synaptotagmine 1 (D) (normalisé par rapport au *Stain-Free*). (E) Evolution de l'expression de la synapsine 1, la synaptophysine et la synaptotagmine 1 (normalisée par rapport au Stain-Free). N = 5 à 10 par groupe. *, **, *** et **** correspondent respectivement à p < 0,05, p < 0,01, p < 0,001 et p < 0,0001 par rapport à J0 ; § correspond à p < 0,05 par rapport à J14. a.u. : unité arbitraire.

2. Plasticité postsynaptique

Pour déterminer l'évolution de la régulation du trafic des AMPAR et NMDAR au cours d'une période de PSM et d'une phase de récupération, les taux de phosphorylation et d'expression des sous-unités GluA1 et GluA2 des AMPAR et de la sous-unité GluN1 des NMDAR ont été déterminés par western blot (Figure 61).

Le taux de phosphorylation de la tyr876 de la sous-unité GluA2 ne varie pas significativement lors des différents temps d'une période de PSM ou en phase de récupération, par contre un effet *temps* est observé (Figure 61B). La phosphorylation de la ser880 est augmentée à partir de 14 jours de PSM, ainsi qu'à R+6h (respectivement, + 69 % et + 178 % ; p < 0,05 et p < 0,01) (Figure 61A). L'expression totale des AMPAR GluA2 est diminuée à partir de 14 jours de PSM (- 51 % ; p < 0,05) et reste stable en phase de récupération jusque R+1J (- 59 % ; p < 0,05) (Figure 61C).

Le taux de phosphorylation de la ser845 de AMPAR GluA1 ne varie pas significativement au cours d'une période de PSM ou en phase de récupération (Figure 61D). Par contre, l'expression totale de AMPAR GluA1 varie et diminue à R+1J (- 25 % ; p < 0,05) (Figure 61E).

Le taux de phosphorylation de la ser896 des NMDAR GluN1 augmente (+ 26 % ; p < 0,05) (Figure 61F), tandis que son expression totale diminue (- 34 % ; p < 0,01) (Figure 61G) après 14 jours de PSM.

Le trafic des AMPAR et NMDAR varie au cours d'une période de PSM et lors d'une récupération « normogravitaire ». En effet, les expressions totales des sous-unités GluA1 et GluA2 des AMPAR diminuent progressivement lors d'une période de PSM et des phases de récupération, tandis que l'expression totale de la sous-unité GluN1 des NMDAR diminue uniquement à partir de 14 jours de PSM (Figure 61H).



Figure 61: Phosphorylation et expression totale des protéines postsynaptiques après 1, 7 et 14 jours de PSM et après 6 h et 1 jour de récupération « normogravitaire ». (A) et (B) Western blot représentatifs et quantification de la phosphorylation de la tyr876 (A) et de la ser880 (B) de AMPAR GluA2 (rapport entre P-AMPAR GluA2 sur AMPAR GluA2). (C) Western blot représentatif et quantification de l'expression de AMPAR GluA2 (normalisée par rapport au *Stain-Free*). (D) Western blot représentatif et quantification de la phosphorylation de la ser845 de AMPAR GluA1 (rapport entre P-AMPAR GluA1 (ser845) sur AMPAR GluA1). (E) Western blot représentatif et quantification de l'expression de AMPAR GluA1 (ser845) sur AMPAR GluA1). (E) Western blot représentatif et quantification de l'expression de AMPAR GluA1 (ser845) sur AMPAR GluA1). (E) Western blot représentatif et quantification de l'expression de AMPAR GluA1 (normalisée par rapport au *Stain-Free*). (F) Western blot représentatif et quantification de l'expression de la phosphorylation de la ser897 de NMDAR1 (rapport entre P-NMDAR1 (ser897) sur NMDAR1). (G) Western blot représentatif et quantification de l'expression de NMDAR1 (normalisée par rapport au *Stain-Free*). (H) Evolution de l'expression des sous-unités GluA1 et GluA2 des AMPAR et de NMDAR1 (normalisée par rapport au *Stain-Free*). N = 5 à 10 par groupe. * et ** correspondent respectivement à p < 0,05 et p < 0,01 par rapport à J0. a.u. : unité arbitraire.

3. Les protéines d'échafaudage

Les protéines d'échafaudage, telles que PSD-95 ou Shank2, sont importantes pour la structuration de la densité postsynaptique ainsi que dans le trafic des AMPAR et NMDAR. Les expressions totales de PSD-95 et Shank2 ont ainsi été déterminées par western blot au cours d'une cinétique de PSM et d'une phase de récupération (Figure 62).

Dans cette étude, l'expression de PSD-95 est diminuée (- 33 % ; p < 0,01) après 14 jours de PSM (Figure 62A), tandis qu'une diminution de l'expression totale de Shank2 est observée lors de la phase de récupération R+6h (- 46 % ; p < 0,05) (Figure 62B).

Ainsi, les protéines d'échafaudage PSD-95 et Shank2 évoluent de la même manière que les AMPAR et NMDAR, notamment après 14 jours de PSM et lors de la phase de récupération « normogravitaire », mettant en évidence un remaniement dans la densité postsynaptique et des récepteurs lors de ces périodes (Figure 62C).



Figure 62: Expression totale des protéines d'échafaudage après 1, 7 et 14 jours de PSM et après 6 h et 1 jour de récupération « normogravitaire ». (A) et (B) Western blot représentatifs et quantification de l'expression de PSD-95 (A) et de Shank2 (B) (normalisées par rapport au *Stain-Free*). (C) Evolution de l'expression de PSD-95 et Shank2 (normalisées par rapport au *Stain-Free*). * et ** correspondent respectivement à p < 0,05 et p < 0,01 par rapport à J0. a.u. : unité arbitraire.

4. Adhésion pré- et postsynaptique

Les membranes pré- et postsynaptiques ne sont pas simplement apposées les unes aux autres au niveau de la jonction synaptique, mais elles sont étroitement liées par diverses molécules d'adhésion (Dalva et al 2007). Afin d'évaluer l'adhésion entre les éléments pré- et postsynaptiques au cours d'une période de PSM et d'une phase de récupération, le taux d'expression totale de la N-cadhérine a été déterminé par western blot (Figure 63).

Un effet *temps* est observé pour l'analyse de l'expression totale de la N-cadhérine, mais le test post-hoc *de Dunn* ne montre aucune différence significative au cours d'une période de PSM ou de récupération.



Figure 63 : Expression totale d'une protéine d'adhésion trans-synaptique après 1, 7 et 14 jours de PSM et après 6 h et 1 jour de récupération « normogravitaire ». Western blot représentatif et quantification de l'expression de la N-cadhérine (normalisée par rapport au *Stain-Free*). a.u. : unité arbitraire.

5. Dynamique du cytosquelette

Les protéines du cytosquelette telles que l'actine, la tubuline, ou les neurofilaments sont les constituants majeurs de la densité postsynaptique permettant de faire le lien entre de nombreuses protéines ; elles régulent en outre le trafic des vésicules synaptiques au niveau présynaptique. Afin d'étudier la dynamique du cytosquelette synaptique au cours d'une période de PSM et d'une phase de récupération, les taux d'expression totale des neurofilaments-L et M et de la β 3-tubuline ont été déterminés par western blot (Figure 64).

On peut observer une diminution importante de l'expression totale du neurofilament-L (- 44 % ; p < 0,01) (Figure 64A) et du neurofilament-M (- 51 % ; p < 0,05) (Figure 64B) après 14 jours de PSM. Il est à noter que l'expression du neurofilament-L redevient plus élevée qu'après 14 jours de PSM à R+1J (+ 63 % ; p < 0,05) (Figure 64A). L'expression de la β 3-tubuline diminue progressivement jusqu'à R+1J (- 74 % ; p < 0,01) (Figure 64C).

Les taux d'expression des neurofilaments et de la β 3-tubuline se caractérisent par une diminution après 14 jours de PSM. On peut tout de même constater une augmentation du taux d'expression ou une stabilisation des neurofilaments-L et M en phase de récupération « normogravitaire », tandis que l'expression de la β 3-tubuline continue à diminuer **(Figure 64D)**. Ainsi, les protéines du cytosquelette semblent être régulées différemment au cours d'une période de PSM et d'une phase de récupération.



Figure 64 : Taux d'expression totale des protéines du cytosquelette après 1, 7 et 14 jours de PSM et après 6 h et 1 jour de récupération « normogravitaire ». (A) à (C) Western blot représentatifs et quantification de l'expression du neurofilament-L (A) du neurofilament-M (B) et de la β 3-tubuline (C) (normalisées par rapport au *Stain-Free*). * et ** correspondent respectivement à p < 0,05 et p < 0,01 par rapport à J0 ; § correspond à p < 0,05 par rapport à J14. a.u. : unité arbitraire.

IV. <u>Conclusions</u>

Cette étude a permis de mettre en évidence qu'au cours d'une période de PSM, l'activation et l'expression de différentes catégories de protéines synaptiques varient différemment selon la phase d'induction (J1 à J7) et de maintien (J14) de la plasticité corticale. Il est à noter que les protéines étudiées ont des fonctions très diverses (modulation de la libération des vésicules synaptiques, régulation de l'efficacité synaptique par les récepteurs AMPA et NMDA, protéines d'échafaudage, cytosquelette...) et toutes présentent une modulation de leur activation ou expression. Cette régulation dynamique est le témoin d'une plasticité synaptique induite par la PSM. L'ensemble de ces résultats est résumé dans la **Figure 65**. <u>Au niveau présynaptique</u>, nous avons pu constater une diminution de la phosphorylation de la ser62/67 de la synapsine 1, ainsi qu'une diminution de l'expression de la synapsine 1, de la synaptophysine et de la synaptotagmine 1. Ces trois protéines sont localisées sur les vésicules synaptiques et interviennent activement à différentes étapes de leur mobilisation à la zone active pour la libération des neurotransmetteurs. Ces résultats montrent que la disponibilité et/ou la mobilisation des vésicules sont réduites au cours d'une période de PSM et ne reviennent pas à la normale après 1 jour de récupération.

<u>Au niveau postsynaptique</u>, les AMPAR sont généralement connus pour être les médiateurs de la transmission synaptique excitatrice rapide dans le système nerveux central. La déphosphorylation de la tyr876 et la phosphorylation de la ser880 de la sous-unité GluA2 sont importantes dans le processus d'endocytose des AMPAR durant la LTD (Scholz et al 2010). Une variation de la phosphorylation de ces deux sites a été observée au cours d'une période de PSM, suggérant que l'internalisation du récepteur est accrue au cours d'une période de PSM et de récupération « normogravitaire ». De manière intéressante, l'expression totale et donc la localisation membranaire des AMPAR GluA2 diminuaient durant ces périodes. La phosphorylation de la ser845 de la sous-unité se retrouve déphosphorylée au cours de la LTD (Lee et al 2000). Au cours d'une période de PSM et de récupération. Cette sous-unité se retrouve déphosphorylée au cours de la LTD (Lee et al 2000). Au cours d'une période de PSM et de récupération, la phosphorylation de la ser845 ne variait pas, cependant l'expression totale des AMPAR GluA1 diminuait notamment lors de la phase de récupération. Cette faible internalisation des AMPAR GluA1 peut être due à la phosphorylation d'un autre site que la ser845, ou éventuellement à l'internalisation des AMPAR composés des sous-unités GluA1 et GluA2.

En outre, l'ouverture des NMDAR conduit à un influx de Ca²⁺ dans l'élément postsynaptique (MacDermott et al 1986), provoquant l'activation de différentes voies de signalisation qui régulent la force synaptique. La phosphorylation conjointe et simultanée de la ser896 et de la ser897 est nécessaire pour augmenter le nombre de NMDAR à la surface membranaire (Scott et al 2001). Une augmentation de la phosphorylation de la ser896 était observée, tandis que l'expression de la sousunité GluN1 des NMDAR diminuait à J14 de PSM. Afin d'expliquer ces résultats contradictoires, il aurait été intéressant d'étudier la phosphorylation de la ser897.

Les protéines d'échafaudage PSD-95 et Shank2 régulent le trafic et la stabilisation des récepteurs AMPA et NMDA à la densité postsynaptique en interagissant ou non avec plusieurs protéines (GRIP, Homer, GKAP) (Sheng & Kim 2000). Une diminution de l'expression de ces deux protéines était observée à J14 et R+6h respectivement. Ces résultats renforcent l'hypothèse d'une augmentation de

174

l'internalisation des AMPAR GluA2 et GluA1 et la diminution d'expression totale des NMDAR GluN1, et suggèrent une diminution de la taille du compartiment postsynaptique.

<u>Au niveau trans-synaptique</u>, l'expression totale de protéine d'adhésion N-cadhérine variait au cours d'une période de PSM ou de récupération. Cette protéine d'adhésion est indispensable à l'établissement de connexions synaptiques et la formation de synapse (Aiga et al 2011).

<u>Au niveau du cytosquelette</u>, les neurofilaments et les microtubules sont importants pour la structuration et la stabilité des épines dendritiques, que ce soit au niveau pré- (liaison des vésicules synaptiques) que postsynaptique (organisation de la densité postsynaptique). Les changements d'expression des neurofilaments-L et M étaient marqués après 14 jours de PSM. Une récupération de l'expression des neurofilaments-L était observée après seulement 1 jour, tandis que l'expression de la β3-tubuline diminuait à cette période. Ces différences peuvent s'expliquer par les différentes propriétés des protéines du cytosquelette (Gordon-Weeks & Fournier 2014, Yuan et al 2015). Ces données mettent en évidence que l'organisation des éléments pré- et postsynaptiques est impactée au cours d'une période de PSM.



Figure 65 : Résumé des changements pré- et postsynaptiques, ainsi que du cytosquelette et de la protéine trans-synaptique (N-cadhérine) au cours d'une phase « d'induction » de J1 à J7 et d'une phase de « maintien » représentée à J14 d'une période de PSM, et au cours d'une période de récupération « normogravitaire » de 6 h et 1 jour.

<u>Résultats complémentaires de l'étude 3</u> : évolution du profil de O-GlcNAcylation de protéines synaptiques au cours d'une période de PSM et d'une phase de récupération « normogravitaire »

I. Introduction

Cette étude avait également pour but **de déterminer l'évolution de la O-GlcNAcylation de différentes protéines de la cinétique et confirmer les résultats de l'analyse protéomique différentielle de l'étude 2**. En effet, nous voulions confirmer les identifications et les variations de O-GlcNAcylation et/ou phosphorylation et/ou expression totale de certaines protéines d'intérêt identifiées dans l'étude 2. Pour cela, nous avons commencé à optimiser des techniques récentes sur nos échantillons de synaptosomes (gels Phos-Tag et WGA), permettant d'étudier finement les profils de phosphorylation et de O-GlcNAcylation d'une protéine. Pour des raisons de temps, cette partie de l'étude n'a pas encore pu être finalisée.

II. <u>Matériels et Méthodes</u>

A. Electrophorèse SDS-PAGE en présence de WGA : séparation des différentes formes
 O-GlcNAcylées

L'extrait protéique de synaptosomes (20 µg) préalablement dénaturé dans un tampon Laemmli est séparé sur un gel SDS-PAGE **(Figure 66)**. Le gel consiste en un gel de concentration (7,5 % acrylamide/bisacrylamide [37,5 : 1] ; 0,125 M Tris/HCl pH 6,8 ; 0,034 % APS ; 0,06 % TEMED), un gel intermédiaire WGA (*Tritium Vulgaris (Wheat) lectin*) (WGA 10 mg/ml ; 7,5 % acrylamide/bisacrylamide [37,5 : 1] ; 0,375 M Tris/HCl pH 8,8 ; 0,034 % APS ; 0,06 % TEMED) et en un gel de séparation (7,5 % acrylamide/bisacrylamide [37,5 : 1] ; 0,375 M Tris/HCl pH 8,8 ; 0,034 % APS ; 0,06 % TEMED). La séparation électrophorétique est réalisée à un ampérage constant de 20 mA pour le gel de concentration et de 25 mA pour le gel de séparation. Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane de nitrocellulose 0,2 µm en utilisant le système de transfert Turbo Blot (Biorad)¹⁶.

¹⁶ Pour plus de détails, voir l'étude 1, II.F. SDS-PAGE et western blot, p117





Figure 66: Schéma du principe d'une électrophorèse SDS-PAGE en présence de WGA. Un extrait protéique contient des protéines ayant différents états de O-GlcNAcylation : en (A), une protéine d'intérêt non O-GlcNAcylée migre profondément dans le gel de séparation ; en (B), des protéines non-O-GlcNAcylée, partiellement ou totalement O-GlcNAcylée sont séparées dans le gel selon le nombre de sites O-GlcNAcylés ; en (C), la protéine est totalement O-GlcNAcylée, et sa migration est retardée. En résumé, dans la phase du gel d'acrylamide copolymérisée avec la WGA, la migration des protéines O-GlcNAcylées est retardée, produisant ainsi des bandes migrant plus lentement dans le gel de séparation. Adapté de Kubota et al 2017.

B. Electrophorèse SDS-PAGE en présence de Phos-Tag[™] : séparation des différentes formes phosphorylées

L'extrait protéique de synaptosomes (20 µg) préalablement dénaturé dans un tampon Laemmli est séparé sur un gel SDS-PAGE (Figure 67). Le gel consiste en un gel de concentration (4 % acrylamide/bisacrylamide [29 : 1] ; 0,125 M Tris/HCl pH 6,8 ; 10 % SDS ; 0,034 % APS ; 0,06 % TEMED) et en un gel de séparation (7,5 % acrylamide/bisacrylamide [29 : 1] ; 0,375 M Tris/HCl pH 8,8 ; 10 % SDS ; 10 mM MnCl² ; 20 µM Phos-TagTM acrylamide [AAL-107, NARD Institute] ; 0,034 % APS ; 0,06 % TEMED). La séparation électrophorétique est réalisée à un ampérage constant de 20 mA pour le gel de concentration et de 25 mA pour le gel de séparation. Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane PVDF en utilisant le système de transfert Turbo Blot (Biorad) suivant les mêmes conditions de transfert que pour les membranes de nitrocellulose¹⁷.

¹⁷ Pour plus de détails, voir l'étude 1, II.F. SDS-PAGE et western blot, p117



Figure 67 : Représentation schématique de l'électrophorèse SDS-PAGE en présence de Phos-tag[™]. La copolymérisation de Phos-tag[™] avec de l'acrylamide fournit un gel SDS-PAGE qui peut retarder spécifiquement des protéines migrant dans le gel en fonction de leur nombre de sites phosphorylés : les protéines les plus phosphorylées seront les plus retardées dans leur migration. Ceci permet la séparation de multiples formes phosphorylées d'une protéine, permettant une analyse quantitative de l'état de phosphorylation global et fournissant des informations sur les différences dans les fonctions des protéines provenant des différences de leurs états de phosphorylation. Adapté de Kinoshita et al 2015.

III. Résultats

1. O-GlcNAcylation globale et OGT

Les taux d'expression totale des protéines O-GlcNAcylées et de son enzyme associée l'OGT ont été déterminés par western blot afin d'évaluer leur évolution au cours d'une période de PSM et d'une phase de récupération (Figure 68).

Aucune variation significative de la O-GlcNAcylation globale (Figure 68A) ou de l'expression totale de l'OGT (Figure 68B) n'a été observée au cours d'une période de PSM ou de la phase de récupération (Figure 68C).

Nous confirmons avec ces résultats que la O-GlcNAcylation globale ou l'expression de l'OGT des synaptosomes ne varient pas, même au cours des différentes phases de la plasticité du cortex sensorimoteur. C'est pourquoi, il est important de trouver de nouvelles techniques afin d'étudier plus finement la O-GlcNAcylation de protéines synaptiques spécifiques.



Figure 68 : Taux d'expression des protéines O-GlcNAcylées et de l'enzyme OGT après 1, 7 et 14 jours de PSM et après 6 h et 1 jour de récupération « normogravitaire ». (A) et (B) Western blot représentatifs et quantification de l'expression des protéines O-GlcNAcylées (RL2) (A) et de l'OGT (B) (normalisée par rapport au *Stain-Free*). (C) Evolution de l'expression des protéines O-GlcNAcylées et de l'OGT (normalisée par rapport au *Stain-Free*). a.u. : unité arbitraire.

2. Optimisation des gels Phos-Tag et WGA

L'étude de cette cinétique de la plasticité synaptique au cours d'une période de PSM et d'une phase de récupération « normogravitaire » avait également pour but de consolider les résultats des identifications de l'analyse protéomique différentielle (étude 2) et d'étudier spécifiquement les profils de phosphorylation et de O-GlcNAcylation de protéines synaptiques. Des anticorps primaires spécifiques à certains sites de phosphorylation ne sont pas disponibles pour toutes les protéines et il n'existe pas encore d'anticorps primaires dirigés contre des sites spécifiques de O-GlcNAcylation. De ce fait, nous nous sommes intéressés à deux techniques permettant de distinguer les sites de phosphorylation et de O-GlcNAcylation d'une protéine : les gels Phos-Tag et WGA. Ces deux techniques décrites dans la partie « Matériels et Méthodes » ont exigé une période d'optimisation pour chaque protéine dont voici les exemples pour la synapsine 1 (Figure 69A) et de la synaptotagmine 1 (Figure 69B).


Figure 69 : Etude des profils de phosphorylation et de O-GlcNAcylation par l'utilisation de gels Phos-Tag et WGA. (A) Profil de phosphorylation à gauche et profil de O-GlcNAcylation à droite de la synapsine 1. La partie saturée (noire) de la membrane représente l'expression totale de la synapsine 1 et des bandes de WGA. (B) Absence de profil de phosphorylation et possibles sites de O-GlcNAcylation de la synaptotagmine 1.

La synapsine 1 est une protéine connue pour être très phosphorylée et O-GlcNAcylée, il n'est pas surprenant que les gels Phos-Tag et WGA montrent des profils de phosphorylation et O-GlcNAcylation marqués (Figure 69A). Malheureusement, nous n'avons pas été en mesure d'obtenir un profil de phosphorylation pour la synaptotagmine 1 par un gel Phos-Tag. Nous pouvons observer deux bandes sur la membrane correspondant au gel WGA de la synaptotagmine 1. Cependant, ces résultats restent à vérifier puisque la synaptotagmine 1 est connue pour être également N-glycosylée et il est donc possible que ces bandes ne correspondent pas à des sites de O-GlcNAcylation (les gels WGA séparent des protéines N-glycosylées) (Han et al 2004, Kubota et al 2017). Les optimisations des autres protéines de l'étude 2 doivent aussi être approfondies.

3. O-GlcNAcylation des protéines synaptiques : exemple de la synapsine 1

Suite aux optimisations décrites dans le paragraphe précédent, le profil de la O-GlcNAcylation de la synapsine 1 a été déterminé par un gel WGA au cours d'une cinétique de PSM et d'une phase de récupération (Figure 70).

Le taux global de O-GlcNAcylation de la synapsine 1 change significativement au cours d'une période de PSM et de récupération. Cependant, le test post-hoc de *Tukey* ne montre aucune différence significative entre les différents temps de l'induction et du maintien de la plasticité corticale, ainsi que pour la phase de récupération normogravitaire.



Figure 70 : Taux de O-GlcNAcylation de la synapsine 1 après 1, 7 et 14 jours de PSM et après 6 h et 1 jour de récupération « normogravitaire ». Western blot représentatif et quantification de la O-GlcNAcylation de la

synapsine 1 normalisé par rapport aux bandes de WGA. a.u. : unité arbitraire.

Remarque technique :

- ✓ L'expression totale de la synapsine 1 variait de manière importante ne rendant pas possible une normalisation correcte. Les gels WGA ne permettent pas d'utiliser la technologie Stain-Free, nous avons utilisé les bandes de WGA en bas de la membrane comme « standard » de normalisation.
- Il est à noter que le profil de O-GlcNAcylation utilisé pour la quantification est obtenu après un temps d'exposition plus long que pour la WGA ou pour l'expression totale de la synapsine 1. En effet, comme expliquer pour la Figure 69A, les signaux de l'expression totale et de la WGA saturent très vite en comparaison du profil de O-GlcNAcylation.

V. <u>Conclusions</u>

Les résultats de l'étude 3 sur l'évolution de la plasticité synaptique au cours d'une période de PSM et de récupération devaient être complétés par l'analyse des profils de phosphorylation et de O-GlcNAcylation de différentes protéines synaptiques de l'étude connues pour être O-GlcNAcylées (synapsine 1, AMPAR GluA2, Shank2, les neurofilaments-L et M) et permettre également la vérification des identifications obtenues dans l'étude 2 (par exemple pour la synaptotagmine 1 ou le neurofilament-L). Pour cela, les techniques d'électrophorèse SDS-PAGE en présence de WGA ou de Phos-Tag semblaient les plus appropriées pour étudier finement ces changements. Cependant, ces méthodes requièrent de nombreux tests pour obtenir un résultat optimal pour chaque protéine (quantité de protéines, réticulation du gel, quantité de WGA...). Par manque de temps, seules les conditions expérimentales pour quelques protéines ont pu être testées, et un premier essai d'analyse du profil de la O-GlcNAcylation de la synapsine 1 au cours de la cinétique a été effectuée. Comme dans l'étude 1, cette analyse montre que la O-GlcNAcylation ainsi que sa phosphorylation (voir les études 1 et 3) de la synapsine 1 varient au cours d'une période de PSM. Ainsi, même si la O-GlcNAcylation globale ne change pas au cours d'une période de PSM ou de récupération, la

<u>PARTIE 2 :</u> ANALYSE FONCTIONNELLE

<u>Etude 4</u>: Modulation des taux de O-GlcNAcylation dans le cortex sensorimoteur

I. Introduction

Avant de déterminer quelles seraient les conséquences fonctionnelles d'une modulation chronique des taux corticaux de O-GlcNAcylation pendant un épisode de PSM de 14 jours, il était nécessaire de choisir un agent pharmacologique et de définir sa concentration. Notre choix s'est porté sur le Thiamet G, un inhibiteur de l'OGA, avec le but de réaliser une perfusion chronique et d'avoir un effet « localisé » sur le cortex sensorimoteur.

Pour cela, une vérification de la variation d'expression des protéines O-GlcNAcylées et de son enzyme associé, l'OGT, a été effectuée par western blot avec cinq concentrations différentes de Thiamet G (0, 50, 100, 250 et 500 μ M). L'action de cet inhibiteur a également été analysée par immunohistochimie

II. <u>Matériels et Méthodes</u>

A. Animaux et traitements

Pour déterminer quelle concentration de Thiamet G devait être perfusée au niveau du cortex sensorimoteur pour avoir un effet physiologique localisé, deux séries de tests ont été réalisées sur des groupes de rats ayant reçu une perfusion chronique d'un inhibiteur de la O-GlcNAcase, le Thiamet G, avec différentes concentrations (0, 50, 100, 250 et 500 µM de Thiamet G).

B. Perfusion corticale chronique de Thiamet G

1. Implantation d'une pompe osmotique

L'intervention chirurgicale est réalisée en conditions aseptiques. Le rat est anesthésié profondément à l'isoflurane (induction à 4 % et maintien à 2 %) avec une injection d'analgésique (ketoprofen, sc, 2 mg/kg). Avant le début de l'expérimentation, un hydratant ophtalmique (Viskal) est déposé sur les yeux afin d'éviter leur dessèchement et un analgésique local (xylocaïne) est appliqué dans les oreilles.

Le rat est placé dans un appareil stéréotaxique, sa température corporelle est maintenue constante (37 °C) grâce à une couverture chauffante. La peau recouvrant le crâne est rasée, passée à la bétadine (Asta Médica), puis incisée longitudinalement sur 2 cm. La fine couche musculaire recouvrant le crâne est écartée avec une rugine. Au moyen d'un foret (Ø 0,8 mm), un orifice est percé sur la partie droite de la boîte crânienne aux coordonnées stéréotaxiques A -3,5 et L 3, par rapport au repère osseux Bregma. L'orifice se situe légèrement en arrière de l'aire corticale de représentation de la patte postérieure. La canule (Phymep) est positionnée dans cet orifice de manière à ce que son extrémité arrive à fleur de la surface interne du crâne. Ce positionnement est réalisé pour éviter tout contact de la canule avec la dure-mère. La canule est reliée par un cathéter à une pompe osmotique Alzet (modèle 2002, Charles River) pour délivrer la substance au niveau cortical. Cette pompe osmotique dispose d'un réservoir de 200 µl et permet une perfusion constante et continue de substance pendant 14 jours avec un débit de 0,5 µl/h. La substance est ainsi délivrée au niveau épidural sur une large surface, incluant la zone corticale de la patte postérieure. Deux vis d'ancrage situées de part et d'autre de la canule permettent de la maintenir au moyen de ciment dentaire (TAB 2000, Kerr). Le conjonctif entre la peau et les muscles du cou est dilacéré afin de placer la pompe osmotique sous la peau du dos de l'animal. La peau est recousue avec un fil de soie tressée noire (Mersilk, W328H, Ethicon). La plaie est à nouveau badigeonnée à la bétadine.

2. Solutions utilisées pour la perfusion corticale

Pour notre étude, les pompes osmotiques sont remplies soit avec du liquide cérébrospinal artificiel (LCS), soit avec du Thiamet G dissout dans du LCS artificiel. Le LCS artificiel est composé de 117 mM NaCl, 23 mM NaHCO₃, 4,7 mM KCl, 2,5 mM CaCl₂, 1,2 mM MgCl₂, 1,2 mM NaH₂PO₄ et 10 mM de glucose.

C. SDS-PAGE et Western blot et immunohistochimie

Les variations des taux de O-GlcNAcylation et de l'OGT des synaptosomes de ces échantillons ont été déterminées par western blot et confirmés par immunohistochimie. Les protocoles sont identiques à ceux décrits dans la partie « Matériels et Méthodes » de l'étude 1¹⁸.

¹⁸ Pour plus de détails, voir l'étude 1, II.F. SDS-PAGE et western blot, 117 et G. Immunohistochimie, p119

III. <u>Résultats</u>

1. Confirmation par analyse moléculaire

Les cortex sensorimoteurs droit et gauche des différents groupes de rats contrôle, PSM et ThG ont été prélevés. Les variations des taux de O-GlcNAcylation et de l'OGT des synaptosomes de ces échantillons ont été déterminées par western blot **(Figure 71).** Ce test a été réalisé sur 2 séries de rats.



Figure 71: Effet de différentes concentrations de Thiamet G (0, 50, 100, 250 et 500 μ M) sur les taux de O-GlcNAcylation et de l'OGT au niveau des protéines synaptosomales des cortex sensorimoteurs droit et gauche chez des rats contrôles (un échantillon de rat PSM a été testé dans le même temps). Il est à noter que la perfusion chronique de Thiamet G est réalisée sur le cortex droit des rats. (A) Histogrammes représentant les taux de O-GlcNAcylation (en haut) et de l'OGT (en bas) au niveau des cortex sensorimoteur gauche et droit. (B) Western blot représentatifs. a.u. : *arbitrary unit*.

On peut constater au niveau du cortex sensorimoteur droit où est perfusé le Thiamet G, une augmentation proportionnelle du taux de O-GlcNAcylation avec des doses de 50 et 100 μ M de Thiamet G par rapport aux groupes ne recevant pas de Thiamet G. De manière surprenante, la O-GlcNAcylation ne varie pas avec 250 μ M de Thiamet G et semble diminuer à une dose de 500 μ M de Thiamet G. Au niveau du cortex sensorimoteur gauche, les taux de O-GlcNAcylation ne changent pas avec des doses de 50, 100 et 250 μ M de Thiamet G et diminuent avec une dose de 500 μ M de Thiamet G. L'expression de l'OGT reste constante que ce soit au niveau des cortex sensorimoteurs gauche et droit ou en fonction des différentes concentrations de Thiamet G. D'après ces tests, la dose de Thiamet G permettant une augmentation localisée de la O-GlcNAcylation au niveau des synaptosomes du cortex sensorimoteur droit est de 100 μM.

2. Confirmation par analyse histologique

Pour vérifier les résultats observés par western blot, une analyse par immunohistochimie des variations du taux de la O-GlcNAcylation a été effectuée sur les groupes de rats Thiamet G aux doses 0, 50, 100, 250 et 500 µM. Grâce à la plateforme motorisée du microscope Axio Imager Z1 APOTOME (plateforme BiCEL, Pasteur), des mosaïques d'images d'une grande partie de la coupe ont été réalisées sur un rat de chaque groupe, donnant une vue d'ensemble des variations de fluorescence au niveau du cerveau (Figure 72).



Figure 72 : Localisation des mosaïques d'images réalisées sur les coupes longitudinales de l'hémisphère droit du cerveau de rat. Les marquages ont été observés sur une coupe longitudinale effectuée à une latéralité de 2,40 mm par rapport à la ligne médiane. L'encadré rouge correspond aux mosaïques effectuées sur les coupes (atlas de Paxinos et Watson 1986).

On peut observer sur les mosaïques de la **Figure 73** que la O-GlcNAcylation est omniprésente dans le cerveau. Une dose de 50 μ M de Thiamet G ne semble pas induire une augmentation significative du taux de la O-GlcNAcylation autour du cortex sensorimoteur droit par rapport au groupe ne recevant pas de Thiamet G. Après une perfusion de 100, 250 et 500 μ M de Thiamet G, on peut voir une augmentation croissante, dose dépendante de la O-GlcNAcylation au niveau du cortex sensorimoteur. Cette augmentation diffuse sur une grande partie du cerveau jusqu'au cortex gauche pour des doses de 250 et 500 μ M de Thiamet G **(résultats non présentés)**. Une dose de 50 μ M de Thiamet G semble insuffisante pour une induire une augmentation de la O-GlcNAcylation, tandis qu'une dose de 500 μ M de Thiamet G est trop importante et provoque une augmentation généralisée à l'ensemble du cerveau. Ce dernier résultat ne concorde pas avec les résultats obtenus en western blot, où l'on pouvait observer une diminution de la O-GlcNAcylation au niveau des synaptosomes. Cette différence pourrait s'expliquer par le fait que nous observons un effet global sur l'ensemble du tissu cérébral. Ainsi, la diminution de la O-GlcNAcylation au niveau synaptique peut être masquée par une forte augmentation dans d'autres zones cellulaires que les synapses (corps cellulaires, noyaux...). Par conséquent, les prochaines expérimentations seront réalisées avec une dose de 100 µM afin d'avoir un effet localisé sur le cortex sensorimoteur et au niveau synaptique.



Figure 73 : Mosaïques d'images du cortex droit des rats recevant du Thiamet G à des doses de 0 μ M, 50 μ M, 100 μ M, 250 μ M et 500 μ M (un rat PSM a été testé dans le même temps) après un marquage de la O-GlcNAcylation (RL2). Les coupes ont une épaisseur de 50 μ m. L'anticorps primaire RL2 est dilué au 1/500e et l'anticorps secondaire, l'Alexa Fluor 555 goat anti-mouse IgG, au 1/500e (Grossissement X20). La localisation des mosaïques correspond à l'encadré rouge de la figure 72.

<u>Etude 5</u>: Effets d'une modulation corticale des taux de O-GlcNAcylation sur la cartographie corticale sensorielle (analyse électrophysiologique *in vivo*)

I. Introduction

Une période de PSM induit des remaniements au niveau du cortex sensorimoteur, maintenant bien caractérisés¹⁹, comme par exemple, la diminution des cartes corticales sensorielle et motrice de la patte postérieure chez le rat. Pour rappel, les mécanismes de plasticité des cartes corticales feraient appel à des processus de masquage/démasquage synaptique, de LTP/LTD ou encore de modifications de morphologie des épines dendritiques.

Nos précédentes études protéomiques ont notamment permis de mettre en évidence qu'une période de PSM induit des changements aux niveaux pré- et postsynaptiques, caractérisés par une réduction de la phosphorylation (synapsine 1, AMPAR GluA2, NMDAR1) et de l'expression (synaptophysine, synaptotagmine, PSD-95, AMPAR GluA2, NMDAR1) des protéines synaptiques du cortex sensorimoteur. L'efficacité synaptique semble donc altérée et pourrait participer à la plasticité des représentations corticales de la patte postérieure après une période de PSM.

A ce jour, aucune étude ne s'est intéressée à une relation entre la O-GlcNAcylation et la plasticité synaptique du cortex sensorimoteur suite à une période de PSM. Pourtant, la O-GlcNAcylation intervient dans de nombreuses propriétés synaptiques telles que la transmission synaptique et les processus de LTP/LTD, ou de manière plus spécifique dans le trafic et la conductance des récepteurs AMPA et la libération des vésicules synaptiques... Nous avons notamment montré dans l'étude 1 qu'une période de PSM entraîne une diminution de la O-GlcNAcylation de la synapsine 1, protéine impliquée dans la libération des vésicules synaptiques. Par ailleurs, l'administration de Thiamet G, un inhibiteur de l'OGA pouvant diffuser à travers la barrière hémato-encéphalique et permettant de moduler le taux global de O-GlcNAcylation, s'est avéré bénéfique dans des pathologies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer ou la maladie de Parkinson. Ainsi, nous pouvons nous demander si la O-GlcNAcylation, globale ou de protéines spécifiques, intervient dans les remaniements du cortex sensorimoteur durant une période PSM.

¹⁹ Voir Rappels bibliographiques – II.B.3. Plasticité du cortex somesthésique primaire, p46

L'objectif de cette étude 5 est d'évaluer si une modulation des taux de O-GlcNAcylation, par une perfusion chronique de Thiamet G au niveau du cortex sensorimoteur pendant 14 jours, permet de prévenir les remaniements corticaux induits par une période de PSM.

II. Matériels et Méthodes

A. Les animaux

Cette étude électrophysiologique *in vivo* a été réalisée sur 4 groupes de rats mâles Wistar adultes : (1) groupe C (n = 10), (2) groupe PSM [rats soumis à 14 jours de PSM (n = 9)], (3) groupe C + ThG [rats munis d'une pompe osmotique perfusant du Thiamet G (ThG) (100 μ M) pendant 14 jours (n = 8)] et (4) groupe PSM + ThG [rats munis d'une pompe osmotique perfusant du ThG (100 μ M) et soumis à 14 jours de PSM (n = 10)].

B. Procédure chirurgicale

L'intervention chirurgicale est réalisée en conditions aseptiques sous anesthésie générale après une injection d'un mélange de Kétamine (50 mg/kg) et de Dexmédétomidine (Domitor) (0,25 mg/kg). La profondeur de l'anesthésie (stade III-4) est contrôlée pendant l'expérience selon les critères suivants : perte de réflexe oculopalpébral, absence de mouvements spontanés des vibrisses, suppression des réflexes moteurs en réponse à une stimulation nociceptive. Des doses supplémentaires (mélange dilué au demi) sont injectées si nécessaire selon la durée de l'expérience.

L'animal est ensuite placé dans un appareil stéréotaxique. Sa température corporelle est maintenue constante à 37 °C pendant l'expérience grâce à une couverture chauffante. La peau du crâne est incisée longitudinalement. Une craniotomie est effectuée sur le côté droit sur une surface d'environ 9 mm², entre les repères osseux Bregma et Lambda aux coordonnées A 0,5 à -3, L 1,5 à 4,5. La dure-mère est enlevée à l'aide de pinces fines. La surface corticale mise à nu est protégée grâce à du sérum physiologique maintenu à 37 °C dans un bain-marie.

C. Enregistrements électrophysiologiques de l'activité cellulaire corticale

Les enregistrements de l'activité de neurones individuels ou de petits groupes de neurones corticaux sont réalisés à l'aide de deux microélectrodes de Tungstène (8 - 10 M Ω , WPI) espacées de 1 mm. Une électrode de référence est positionnée sur la peau au-dessus du sinus frontal, et l'électrode de masse se situe au niveau de l'oreille. Les électrodes sont fixées sur un micromanipulateur. Elles sont descendues dans le cortex somesthésique primaire de l'hémisphère droit, aux coordonnées A 0 à -2,5 et L 2 à 4 par rapport au Bregma. Les pénétrations d'électrode sont réalisées à une profondeur comprise entre 600 µm et 900 µm au-dessous de la surface corticale (zone supposée de la couche IV selon l'atlas de Paxinos & Watson 1986). La position des électrodes est ajustée de 10 à 20 µm pour optimiser la discrimination de l'activité neuronale. Les électrodes d'enregistrement sont reliées à un amplificateur (gain x10 000, bande passante 300 Hz à 10 KHz) (A-M SYSTEMS, model 1800). L'activité cellulaire est visualisée sur un oscilloscope (Tektronix, model 5113) et entendue grâce à un haut-parleur.

D. Représentation de l'aire corticale de la patte postérieure

La carte corticale de la patte postérieure (ou plus précisément, du pied) est délimitée par une centaine de pénétrations d'électrodes. On réalise des déplacements longitudinaux et latéraux des électrodes espacés de 100 µm. Les électrodes sont descendues dans la couche IV du cortex somesthésique. Pour chaque pénétration, on détermine si la stimulation tactile légère (70 mg) de la patte postérieure gauche entraîne une bouffée d'activité au niveau du cortex somesthésique primaire de l'hémisphère droit. Si c'est le cas, on reporte une croix sur un repère quadrillé aux coordonnées d'enregistrement. Si pour une autre pénétration, aucune bouffée de potentiels d'action n'est enregistrée à la suite de la stimulation, le point est considéré comme ne faisant pas partie de l'aire corticale de la patte postérieure. Il est défini comme « non-répondant », et est représenté par un rond sur le repère quadrillé. Les points répondant à la fois à la patte postérieure et à une autre zone du corps sont considérés comme des points limites et sont représentés par des triangles (Figure 74A).

Les déplacements de l'électrode permettent de représenter une limite entre les points « répondants » et « non-répondants ». Le tracé de la carte corticale est donc réalisé en délimitant la zone qui ne contient que des pénétrations où l'on a enregistré une activité corticale en réponse à la stimulation tactile légère de la patte postérieure.

192

E. Taille des champs récepteurs cutanés

La taille des champs récepteurs cutanés est déterminée en utilisant une intensité de stimulation de 70 mg au moyen d'un filament de von Frey calibré (Stoelting Co). On délimite le champ récepteur cutané qui correspond à la zone du pied dont la stimulation tactile légère entraîne systématiquement une bouffée de potentiels d'action au niveau des cellules corticales. La zone cutanée produisant la meilleure réponse est définie comme le centre fonctionnel du champ récepteur. Les champs récepteurs sont reproduits sur un schéma des surfaces dorsale et plantaire du pied. La taille des champs récepteurs est alors déterminée avec le logiciel Photoshop (Adobe). Elle s'étend entre 0 et 800 mm². On détermine trois classes de champs récepteurs :

- (1) Les petits champs récepteurs (0 à 300 mm²) : ils correspondent à un ou plusieurs doigts ;
- (2) Les champs récepteurs intermédiaires (300 à 500 mm²) ;
- (3) Les grands champs récepteurs (500 à 800 mm²) : ils s'étendent sur la majeure partie du pied.

F. Le seuil d'excitation neuronale

Pour déterminer le seuil mécanique, c'est-à-dire la sensibilité naturelle, les stimuli tactiles sont délivrés sur la patte avec des filaments de von Frey calibrés en force (Stoelting Co). Le seuil cutané, déterminé pour des forces comprises entre 8 et 70 mg correspond à la force requise pour obtenir une réponse distincte (bouffée d'activité) au niveau du haut-parleur. Chaque filament est identifié par une valeur correspondant à la valeur logarithmique de la force appliquée (valeur du filament = log₁₀ [force en mg]). Ainsi, la valeur logarithmique du filament peut être directement utilisée pour une analyse statistique.

G. Analyse statistique

Les statistiques ont été réalisées avec le logiciel Prism 6 (Graphpad). Les résultats sont présentés sous forme de moyennes affectées de l'écart standard à la moyenne (SEM). La normalité de chaque groupe est évaluée par le test de *Kolmogorov-Smirnov*. Pour l'évaluation de l'aire corticale de la patte postérieure et de la taille des champs récepteurs cutanés, une *two-way ANOVA* est utilisée. Les variables indépendantes sont « *Groupe* » (C vs PSM) et « *Traitement* » (C vs ThG). Un test de Sidak est utilisé pour une comparaison post-hoc. Pour l'analyse des seuils d'excitation neuronale, les quatre groupes sont tout d'abord comparés avec un test χ^2 . Le niveau de significativité est fixé à p < 0,05.

III. <u>Résultats</u>



1. Surface des cartes corticales sensorielles de la patte postérieure

Figure 74 : Effets d'une période de PSM et/ou d'une perfusion chronique de ThG sur la plasticité des cartes corticales sensorielles. (A) Cartes typiques présentant les aires corticales des pattes postérieures. x et • indiquent des sites d'enregistrement où les neurones sont respectivement activés ou ne répondent pas à la stimulation cutanée de la patte postérieure. La zone de la carte, exprimée en mm², est indiquée au-dessous. (B) Boîtes à moustache montrant la médiane (barre horizontale), les quartiles (boîte), et les valeurs extrêmes (moustaches) des aires corticales de la patte postérieure des groupes C, C + ThG et PSM et PSM + ThG. * indique une différence significative par rapport au groupe C (p < 0,05), ### et #### par rapport au groupe PSM (p < 0,001 et p < 0,0001, respectivement).

La **Figure 74** représente des exemples typiques de cartes corticales sensorielles de la patte postérieure des rats C, PSM, C + ThG et PSM + ThG (**Figure 74A**), et la taille moyenne de cette surface pour les différents groupes (**Figure 74B**). La moyenne de la surface corticale de la patte postérieure est de 2,65 \pm 0,07 mm² dans le groupe C. Une *ANOVA* à deux facteurs montre un effet « *Traitement* » (F = 25,94, *p* < 0,0001) et une interaction *Groupe* x *Traitement* (F = 6,91, *p* < 0,05). Une diminution significative est observée dans le groupe PSM par rapport aux groupes C (- 17 %, *p* < 0,05) et C + ThG (- 34 %, *p* < 0,001). L'administration de ThG à des rats C n'a pas d'effet sur la représentation corticale de la patte postérieure (+ 10 %, *ns*). Cependant, quand le ThG est perfusé chez des rats PSM, le ThG prévient la diminution de la carte corticale sensorielle (+ 41 %, *p* < 0,0001).

2. Taille des champs récepteurs cutanés de la patte postérieure

La Figure 75 représente les champs récepteurs cutanés et leurs tailles moyennes (en pourcentage par rapport à la taille totale de la patte postérieure) pour les différents groupes. Pour tous les groupes, les champs récepteurs s'étendent d'un seul doigt ou coussinet, à la patte entière (Figure 75A). Cependant, la distribution varie entre les groupes. Dans le groupe C, les champs récepteurs s'étendent principalement sur quelques doigts ou une petite partie de la surface plantaire. La taille moyenne est de 48 % par rapport à la surface totale de la patte postérieure. Un élargissement des champs récepteurs cutanés est observé après une période de PSM par rapport au groupe C (+33 %, p < 0,0001) et C + ThG (+ 36 %, p < 0,0001) (Figure 75B). Dans ce groupe, les champs récepteurs cutanés s'étendent généralement sur l'entièreté de la surface de la patte postérieure (entre 600 et 800 mm²) (Figure 75C). L'administration de ThG à des rats C n'a pas d'effet sur la taille des champs récepteurs cutanés (+ 1 %, *ns*) par rapport au groupe C. Cependant, quand le ThG est perfusé chez des rats PSM, le ThG prévient partiellement l'élargissement des champs récepteurs cutanés (+ 20 %, p < 0,0001) par rapport au groupe PSM. La distribution des tailles de champs récepteurs cutanés est très semblable entre les groupes C, C + ThG et PSM + ThG (Figure 75C).



Figure 75 : Effets d'une période de PSM et/ou d'une perfusion chronique de ThG sur la taille des champs récepteurs cutanés de la patte postérieure. (A) Illustrations de 4 champs récepteurs cutanés typiques pour chaque groupe. Seule la surface ventrale (peau glabre) de la patte postérieure est présentée. La valeur est la taille moyenne (en pourcentage de la taille totale de la patte postérieure). (B) Boîtes à moustache montrant la médiane (barre horizontale), les quartiles (boîte), et les valeurs extrêmes (moustaches) de la taille des champs récepteurs cutanés de la patte postérieure des groupes C, C + ThG, PSM et PSM + ThG. (C) Distribution en pourcentage de la taille des champs récepteurs cutanés de la patte postérieure par pas de 200 mm² des différents groupes. **** indique une différence significative par rapport au groupe C (p < 0,0001), #### par rapport au groupe PSM (p < 0,0001).

3. Seuil de sensibilité cutané de la patte postérieure

Le seuil cutané pour évoquer une réponse neuronale a été déterminé par l'utilisation de filaments de von Frey calibrés de 8 à 70 mg. Le test χ^2 effectué sur les quatre groupes montre des changements importants après une période de PSM et/ou une perfusion chronique de ThG ($\chi^2 = 160,4, p < 0,0001$). Chez les rats C, 39 % des réponses neuronales sont observées avec une stimulation tactile de 8 mg appliquée sur la plante du pied, contre 27 % avec une stimulation de 20 mg, 14 % avec 40 mg et 20 % avec 70 mg (Figure 76). Une période de PSM diminue fortement le seuil de sensibilité : 76 % des réponses neuronales sont observées avec une stimulation tactile de 8 mg. De plus, aucune réponse n'est obervée avec une stimulation de 70 mg. Le ThG prévient partiellement cette augmentation de la sensibilité. En effet, 53 % des réponses neuronales sont observées avec une stimulation tactile de 8 mg, et pour les autres stimulations, on obtient 25 % de réponses à 20 mg, 16 % à 40 mg et 6 % à 70 mg. Ce profil des seuils d'activation est très proche de celui des rats C + ThG.



Figure 76 : Effet d'une période de PSM et ou d'une perfusion chronique de ThG sur le seuil d'excitabilité. Les seuils cutanés sont déterminés à l'aide de filament de von Frey (8-70 mg) sur différents sites des cartes corticales. Le graphique représente la distribution des seuils de sensibilité pour les groupes C, C + ThG, PSM et PSM + ThG.

IV. <u>Conclusions</u>

Nos résultats confirment les études antérieures²⁰, à savoir qu'une période de PSM de 14 jours entraîne un rétrécissement de la surface de représentation corticale sensorielle de la patte postérieure. Une perfusion chronique de ThG chez le groupe C n'affecte pas la taille de la carte. De manière intéressante, le ThG prévient la diminution de la carte en condition de PSM.

Une période de PSM induit également un élargissement des champs récepteurs cutanés et une diminution du seuil d'excitabilité puisque la plupart des neurones répondent à de faibles stimulations tactiles (8 mg). Le ThG prévient ces deux effets chez le groupe PSM sans avoir d'effet chez le groupe C.

Cette étude a permis de mettre en évidence **qu'une perfusion chronique de ThG au niveau du cortex sensorimoteur pendant toute la durée de PSM prévient la réorganisation corticale du cortex somesthésique**. Ces résultats indiquent que la modulation du taux de O-GlcNAcylation par le ThG pourrait jouer un rôle important dans les mécanismes de la plasticité corticale induite par une période de PSM.

²⁰ Voir Rappels bibliographiques – II.B.3. Plasticité du cortex somesthésique primaire, p46

<u>Etude 6</u>: Effets d'une modulation corticale des taux de O-GlcNAcylation sur les performances motrices (analyse comportementale)

I. Introduction

Chez l'Homme comme chez l'animal, une période de PSM entraîne une altération des performances motrices, notamment de la posture et de la locomotion²¹. On peut observer, par exemple, que les rats HH ont tendance à marcher en appui sur les orteils, et ont une instabilité latérale accompagnée d'une abduction des pattes postérieures. De plus, la locomotion des rats HH n'est pas fluide et se caractérise par des pas plus lents, plus longs et irréguliers, en raison d'une mauvaise coordination des membres postérieurs.

Ces troubles moteurs induits par une période de PSM sont en partie dus à des problèmes musculaires (atrophie, perte de force, changements des activités électromyographiques...). Cependant, le cortex sensorimoteur est également directement impliqué dans les performances motrices. Or, après 14 jours d'HH, l'organisation du cortex somesthésique et du cortex moteur est altérée (réduction de la surface des représentations corticales sensorielle et motrice des pattes postérieures, changement des seuils d'excitabilité, modifications synaptiques...).

Nous avons vu dans l'étude précédente, qu'une modulation chronique des taux de O-GlcNAcylation au niveau du cortex sensorimoteur pouvait prévenir les altérations corticales du cortex somesthésique. Cette prévention pourrait en partie limiter la dégradation des performances motrices. Ainsi, le but de cette étude 6 est d'évaluer les effets d'une augmentation des taux corticaux de O-GlcNAcylation sur l'altération des performances motrices induites par une période de PSM.

Nous avons pour cela utilisé différents tests comportementaux : l'activité spontanée du rat en réponse à la nouveauté et pendant sa phase active a été évaluée par actimétrie, le réflexe de retrait au moyen d'un filament de von Frey électronique, la coordination motrice par le Rotarod et la locomotion par le Catwalk XT.

²¹ Voir Rappels bibliographiques III.C. Perturbation sensorimotrice et conséquences sur les performances motrices, p72

II. Matériels et Méthodes

A. Les animaux

Afin d'évaluer les performances motrices au cours d'une période de PSM et lors d'une phase de récupération « normogravitaire », une cinétique a été réalisée sur 4 groupes de rats mâles Wistar adultes précédemment décrits dans l'étude 5 : (1) groupe C (n = 6), (2) groupe PSM (n = 6), (3) groupe C + ThG (n = 5) et (4) groupe PSM + ThG (n = 5).

Les différents groupes de rats sont soumis à une série de tests moteurs dans un ordre défini à 0, 3, 7 et 14 jours de PSM puis après une phase de récupération « normogravitaire » de 3 et 7 jours. Ils ont été habitués aux différents tests (filament de von Frey électronique, Rotarod et Catwalk) 4 fois sur une période d'une semaine précédant le début de l'étude. La cinétique et les différents tests moteurs utilisés sont présentés dans la **Figure 77**. Toutes les manipulations se font à la même heure et les expériences ont toutes été faites par le même expérimentateur.



Figure 77 : Cinétique d'évaluation des performances motrices au cours d'une période de perturbation sensorimotrice de 3, 7 et 14 jours, suivie d'une phase de récupération « normogravitaire » de 3 (R+3J) ou 7 jours (R+7J). Les tests d'actimétrie sont effectués à JO, J14, R+3J et R+7J. Les rats sont habitués sur une période d'une semaine avant le début de l'étude aux différents tests dans un ordre défini : (1) filament de von Frey électronique (2) Rotarod et (3) Catwalk XT. Ces tests sont ensuite effectués sur les différents groupes à JO, J3, J7 et J14 puis à R+3J et R+7J.

B. Les tests moteurs

1. Mesure de l'activité globale : l'actimétrie

L'actimétrie est la quantification de l'activité motrice spontanée. La cage du rat est placée sur un dispositif (Activmeter, Bioseb) qui détecte les vibrations de la cage pour mesurer l'activité locomotrice. En plus de la plateforme, deux capteurs horizontaux infrarouges sont installés sur les côtés des cages et permettent de détecter tout redressement des rongeurs. Les animaux sont placés individuellement dans une cage transparente à 18 h, et pour une durée totale de 14 h. Les deux premières heures, l'environnement est éclairé puis les 12 h suivantes correspondent à la période d'obscurité. L'analyse a été faite sur les six premières heures d'obscurité. Le rat a librement accès à l'eau et à la nourriture pendant ce test. A l'issue de ce test, le rat est replacé en cage collective.

2. Test de retrait : test du filament de von Frey électronique

Le Von Frey électronique (Ugo Basile) permet une évaluation du seuil de retrait des pattes postérieures des rats. Il permet ainsi d'estimer l'acuité tactile des animaux. Pour ce test, les animaux sont placés individuellement dans une cage (17 x 11 x 13 cm) dont le sol est constitué d'une grille. Le dispositif est placé en hauteur pour permettre à l'expérimentateur d'appliquer des stimulations tactiles au niveau de la sole plantaire des rats. À l'issue d'une période d'habituation de 5 min, l'expérimentateur vient stimuler la sole plantaire au moyen d'un filament rigide relié à un transducteur. Un prisme est disposé autour du filament, pour aider l'expérimentateur à localiser la zone de stimulation. L'expérimentateur stimule la patte de l'animal, entre les phalanges et le talon, avec une force croissante et régulière (20 g/s) jusqu'au retrait de la patte. Chaque session de test contient 6 essais consécutifs. La durée d'un essai n'excède pas 5 s, et les essais sont séparés d'au moins 30 s.

3. Mesure de la coordination motrice : le Rotarod

Cette approche permet l'évaluation de la coordination motrice et de la fatigue musculaire. Le dispositif (Bioseb) est composé d'un cylindre tournant compartimenté par des disques de séparations. L'animal est préalablement familiarisé avec le test (1 min par jour pendant 1 semaine). Le temps pendant lequel chaque rat est capable de rester sur le cylindre rotatif avant de tomber est mesuré. La durée maximale est de 3 min avec une rampe d'accélération allant de 4 à 40 tours par minute. Pour cette étude nous avons fait le choix de ne pas laisser les rats aller au-delà des 3 min et 40 tours par minute.

4. Analyse de la locomotion : le Catwalk XT

Le système d'analyse de la marche CatWalk XT est un test locomoteur dans lequel les animaux traversent une plateforme de 7 cm de large sur 131 cm de long en verre, traversée d'un faisceau lumineux vert et plafonnée par un fond rouge. Le système permet de recueillir les empreintes de l'animal pendant sa locomotion spontanée. Le test est effectué dans une pièce sombre. La cage de l'animal protégée de la lumière est placée à l'autre extrémité de la plateforme, afin d'inciter le rat à traverser le dispositif. L'animal est préalablement familiarisé avec le Catwalk (3 min par jour pendant 1 semaine), puis 3 essais successifs sont effectués pour chaque animal, avec une période de repos de 2 min entre chaque essai. Le rat est ensuite replacé dans sa cage d'hébergement avec ses congénères, ou replacé en situation de PSM.

C. Analyse statistique

Les statistiques ont été réalisées avec le logiciel Prism 6 (Graphpad) ou Statistica (Statsoft). Les résultats sont présentés sous forme de pourcentage de changements par rapport au premier jour des expériences (J0), affecté de l'écart standard à la moyenne (SEM). La normalité de chaque groupe est évaluée par le test de *Kolmogorov-Smirnov*. Pour le test de von Frey, la médiane des 6 valeurs était calculée, et seules les trois valeurs les plus proches de la médiane étaient prises en compte (Martinov et al 2013). Une *analyse de variance à trois facteurs [groupe (PSM), traitement (ThG)* et *temps*] avec mesures répétées a été effectuée, suivie d'un test post-hoc de *Fisher* pour rechercher une éventuelle différence par rapport à J0, dans un même groupe. Pour faciliter la lecture, les résultats statistiques détaillés sont présentés sous forme de tableau à côté de chaque graphique. Le niveau de significativité est fixé à p < 0,05.

III. <u>Résultats</u>

Les résultats du groupe C ne sont pas présentés car aucun changement significatif pour tous les paramètres analysés n'a été observé au cours du temps.

1. Evaluation de l'activité spontanée par actimétrie

De manière générale, l'activité spontanée change au cours du *temps* (p < 0,0001). On observe également un effet *PSM* (p < 0,0001) et une interaction *PSM* × *temps* × *traitement* (ThG) (p < 0,05) (**Figure 78A**). Suite à une perfusion de ThG pendant 14 jours, l'activité spontanée des rats du groupe C + ThG est augmentée (+ 62 %, p < 0,0001) et ce même pendant les phases de récupération de 3 (+ 60 %, p < 0,0001) et 7 jours (+ 29 %, p < 0,01). Pour les groupes PSM et PSM + ThG, l'activité

spontanée ne varie pas suite aux 14 jours de PSM, mais augmente après 7 jours de récupération (respectivement, + 29 % et + 27 %, p < 0,001 et p < 0,01).

En ce qui concerne le nombre de redressements, un effet *PSM* (p < 0,01) et une interaction *PSM* × *temps* (p < 0,0001) sont constatés (Figure 78B). Les rats C + ThG se redressent plus souvent à 14 jours (+ 215 %, p < 0,01) et lors des phases de récupération de 3 (+ 180 %, p < 0,01) et 7 jours (+ 119 %, p < 0,05). Par contre, pour les groupes PSM et PSM + ThG, le nombre de redressement diminue significativement après 14 jours de PSM (respectivement, - 59 % et - 47 %, p < 0,01 et p < 0,05).

Ces résultats indiquent que le ThG augmente l'activité spontanée et les redressements des rats C, mais ne prévient pas les effets d'une PSM.



(A) Activité spontanée



		F	р
GROUPE		0,99	0,34
TRAITEMENT	F(1, 48)	0,00	0,95
GROUPE*TRAITEMENT		0,91	0,35
TEMPS	F(3, 48)	10,24	,000*
TEMPS*GROUPE		12,28	,000*
TEMPS*TRAITEMENT		1,87	0,15
TEMPS*GROUPE*TRAITEMENT		3,42	,024*

		F	p
GROUPE		13,33	,002*
TRAITEMENT	F(1, 48)	0,39	0,54
GROUPE*TRAITEMENT		0,03	0,88
TEMPS		1,79	0,16
TEMPS*GROUPE	F(3, 48)	11,04	,000*
TEMPS*TRAITEMENT	1 (3, 40)	0,37	0,78
TEMPS*GROUPE*TRAITEMENT		1,45	0,24

Figure 78: Effet d'une période de PSM et d'une perfusion chronique de ThG sur (A) l'activité spontanée et (B) le nombre de redressements chez le rat, et conséquences sur la phase de récupération fonctionnelle. Les graphiques représentent les pourcentages de changement par rapport au JO des groupes C + ThG, PSM et PSM + ThG à J14, et lors d'une récupération de 3 et 7 jours (R+3J et R+7J). Les tableaux représentent les résultats de l'analyse de variance à trois facteurs (groupe, traitement et temps) avec mesures répétées. *, **, *** et **** correspondent respectivement à p < 0,05, p < 0,01, p < 0,001 et p < 0,0001 par rapport à JO (test post-hoc de Fisher).

2. Evaluation du réflexe de retrait de la patte postérieure (Filament de von Frey électronique)

Le test du filament de von Frey électronique permet d'évaluer la force nécessaire à appliquer sur la sole plantaire pour entraîner un retrait de la patte chez le rat. Des effets *PSM* (p < 0,001) et *temps* (p < 0,0001) sont observés, ainsi que des interactions *PSM* × *traitement* (p < 0,05) et *temps* × *PSM* (p < 0,0001) (Figure 79). Suite à une perfusion de ThG pendant 14 jours, aucun changement n'est constaté chez les rats C. Par contre, l'application d'une force croissante de plus en plus importante à J3 (82 %, p < 0,01), J7 (+ 214 %, p < 0,0001) et J14 (+ 244 %, p < 0,0001) est nécessaire pour que les rats PSM retirent leur patte postérieure jusqu'à revenir à la normale lors des phases de récupération de 3 et 7 jours. Une augmentation de la force est également nécessaire dans une moindre mesure dans le groupe PSM + ThG à J3 et J14 (respectivement, + 49 % et + 76 %, p < 0,05 et p < 0,001). Cependant, de manière intéressante, les rats PSM recevant du ThG réagissent pour des stimulations plus légères lors des phases de récupération à 3 et 7 jours (respectivement, - 38 % et - 62 %, p < 0,05 et p < 0,001).



Figure 79 : Effet d'une période de PSM et d'une perfusion chronique de ThG sur le réflexe de retrait de la patte postérieure chez le rat testé avec un filament de von Frey électronique, et conséquences sur la phase de récupération fonctionnelle. Les graphiques représentent les pourcentages de changement par rapport au JO des groupes C + ThG, PSM et PSM + ThG à J3, J7 et J14 d'une période de PSM, et lors d'une récupération de 3 et 7 jours (R+3J et R+7J). Le tableau représente les résultats de l'analyse de variance à trois facteurs (groupe, traitement et temps) avec mesures répétées. *, **, *** et **** correspondent respectivement à p < 0,05, p < 0,001 et p < 0,0001 par rapport à J0 (test post-hoc de *Fisher*).

3. Evaluation de la coordination motrice et de la résistance à la fatigue (Rotarod)

Le test du Rotarod indique un effet *PSM* (p < 0,01), *temps* (p < 0,01), et une interaction *temps* × *PSM* (p < 0,0001) (Figure 80). La perfusion de ThG chez les rats C n'a pas d'effet sur leur coordination motrice ou la résistance à la fatigue. Par contre, les rats PSM tombent rapidement des cylindres à J3, J7 et J14 (respectivement, - 60 %, - 62 % et - 65 %, p < 0,0001 pour chaque groupe). Le groupe PSM n'a pas encore totalement récupéré sa coordination après 3 jours de récupération (- 27 %, p < 0,05). Les rats PSM recevant du ThG tombent également très rapidement des cylindres à J3, J7 et J14 (respectivement, - 58 %, - 49 % et - 44 %, p < 0,01 pour chaque groupe) mais récupèrent très vite une performance similaire à celle obtenue à J0.



Figure 80 : Effet d'une période de PSM et d'une perfusion chronique de ThG sur la coordination motrice et la fatigabilité chez le rat testées avec le Rotarod, et conséquences sur la phase de récupération fonctionnelle. Les graphiques représentent les pourcentages de changement par rapport au J0 des groupes C + ThG, PSM et PSM + ThG à J3, J7 et J14 d'une période de PSM, et lors d'une récupération de 3 et 7 jours (R+3J et R+7J). Le tableau représente les résultats de l'*analyse de variance à trois facteurs* (groupe, traitement et temps) avec mesures répétées. *, ** et **** correspondent respectivement à p < 0,05, p < 0,01 et p < 0,0001 par rapport à J0 (test post-hoc de *Fisher*).

4. Evaluation de la locomotion (Catwalk XT)

Chaque pas correspond à un cycle locomoteur. Il est composé d'une phase d'appui, pendant laquelle le pied est en contact avec le sol et supporte le poids du corps, et d'une phase de transfert (ou d'oscillation) pendant laquelle la patte n'est plus en contact avec le sol mais est projetée vers l'avant. La phase d'appui est constituée d'une période de flexion, au cours de laquelle toutes les articulations fléchissent, permettant de décoller le pied du sol puis d'une phase d'extension au cours de laquelle le pied va chercher le contact vers l'avant. La phase d'appui peut elle-même être divisée en deux parties : une première pendant laquelle le membre supporte le poids du corps et une phase de propulsion au cours de laquelle les articulations présentent une extension (Phillipson 1905).

Les paramètres suivants ont été analysés au cours des trois passages successifs de l'animal dans le couloir du Catwalk XT :

- Paramètres temporels (en s): durée de la phase d'appui, de la phase de transfert, et du cycle (Figure 81A); vitesse moyenne d'un passage (en cm/s).
- (2) Paramètres spatiaux (en cm) : longueur de l'enjambée de la patte postérieure (distance entre deux appuis successifs d'une même patte) et distance entre les pattes postérieures lors de la marche (écart entre les appuis des deux pattes postérieures dans le plan frontal).
- (3) Surface d'appui (en cm²) de chaque patte postérieure mesurée lors du contact maximal. Le contact maximal correspond au moment de la phase d'appui où une patte établit un contact maximal avec la plaque de verre.
- (4) **Intensité maximale au contact maximal** : L'intensité d'une empreinte dépend du degré de contact entre une patte et la plaque de verre et de la force exercée sur le sol.
- (5) Coordination entre les pattes : Elle est évaluée par le couplage temporel (Kappos et al 2017) des pattes homolatérales droites ou gauches, qui décrit la relation temporelle entre le placement de deux pattes dans un cycle. Il correspond au moment du contact initial d'une patte cible exprimé en pourcentage du temps de cycle d'une patte « d'ancrage » (score entre 50 et 75 %) (Figure 81B). L'index de régularité exprime la régularité de la séquence (alternée, croisée, rotatoire) du patron locomoteur (Kappos et al 2017). Chez les animaux sains présentant une marche parfaitement régulière, sa valeur est de 100 %.



Figure 81: Représentations (A) des phases d'appui et de transfert lors d'un cycle locomoteur et (B) diagramme représentant le couplage temporel entre la patte avant (RF) et la patte arrière (RH) droites. La phase d'appui pour chaque patte est représentée par une barre grise, la phase de transfert est représentée par une barre blanche. Le contact initial est indiqué par une ligne verticale en pointillés. Un cycle va du contact initial au contact initial suivant de cette patte, soit 0,44 s en (1) et 0,28 s en (2) pour la patte « d'ancrage ». Le couplage temporel est calculé en mesurant la synchronisation entre les contacts initiaux d'une paire de pattes (RF-RH) et en l'exprimant en pourcentage du temps de cycle de la patte « d'ancrage » (RF). (1) Le contact initial de RH, la patte « cible », se produit 0,22 s après celui de la patte « d'ancrage » (RF), entraînant une dispersion de phase de 50 % (0,22 / 0,44 × 100). Dans l'exemple (2), la valeur du couplage temporel dépasse 75 % avec la première ancre (0,22 / 0,28 × 100 = 78,6). Dans un tel cas, la cible est assignée à l'ancrage suivant, ce qui entraîne une valeur de – 25 % (-0,06 / 0,24 × 100). Une valeur du couplage temporel positive indique que le contact initial de la patte « cible » est survenu après celui de la patte « d'ancrage ». Une valeur de phase de couplage négative indique que la patte « cible » a précédé la patte « d'ancrage ».

Paramètres temporels de la locomotion

Pour la phase d'appui (Figure 82A), le cycle de marche (Figure 82C) et la vitesse moyenne du passage (Figure 82D), un effet *PSM* ou *temps* est observé, ainsi qu'une interaction entre ces deux effets. Il n'y a aucune variation significative pour la phase de transfert (Figure 82B).

Chez les rats C + ThG, les durées des phases d'appui et de transfert ainsi que du cycle de marche ne changent pas au cours du temps. Pour le groupe PSM, une augmentation des durées de la phase d'appui et de transfert est observée après 7 jours de PSM (respectivement, + 78 % et + 14 %, p < 0,0001 et p < 0,05) entraînant une augmentation de la durée du cycle à J7 (+ 46 %, p < 0,0001). Ces différentes phases ne varient pas significativement chez les rats PSM + ThG au cours de la période de PSM. Par contre une diminution de la durée de la phase d'appui est visible après 7 jours de récupération (- 31 %, p < 0,05), entraînant une diminution de la durée du cycle (- 22 %, p < 0,05).

La vitesse moyenne du passage du groupe C + ThG augmente significativement à partir de J14 (+ 36 %, p < 0,01) jusqu'en phase de récupération de 3 (+ 36%, p < 0,05) et 7 jours (+ 30 %, p < 0,05). A l'inverse, les rats PSM mettent plus de temps à traverser le couloir à J3 (- 25 %, p < 0,05), J7 (- 36 %, p < 0,01) et J14 (- 24 %, p < 0,05) puis, leur vitesse redevient normale à 3 jours de récupération et augmente même à 7 jours (+ 31 %, p < 0,05). La vitesse des rats PSM + ThG ne varie pas significativement durant la période de PSM, mais une augmentation est observée après 7 jours de récupération (+ 42 %, p < 0,01).

Figure 82 (page suivante) : Effet d'une période de PSM, d'une perfusion chronique de ThG et d'une période de récupération fonctionnelle sur les paramètres temporels de la marche, tels que (A) la phase d'appui, (B) la phase de transfert, (C) le cycle de marche et (D) la vitesse moyenne de passage. Les graphiques représentent les pourcentages de changements par rapport au J0 des groupes C + ThG, PSM et PSM + ThG à J3, J7 et J14 d'une période de PSM, et lors d'une récupération de 3 et 7 jours (R+3J et R+7J). Les tableaux présentent les résultats de l'analyse de variance à trois facteurs (groupe, traitement et temps) avec mesures répétées. *, ** et **** correspondent respectivement à p < 0,05, p < 0,01 et p < 0,0001 par rapport à J0 (test post-hoc de *Fisher*).







р *GROUPE* TRAITEMENT 16,06 ,001* F(1, 90) 2,18 0,16 GROUPE*TRAITEMENT 0,02 0,90 TEMPS 9,47 ,000* TEMPS*GROUPE 6,42 ,000* F(5, 90) TEMPS*TRAITEMENT TEMPS*GROUPE*TRAITEMENT 1,09 0,37 1,00 0,42

		-	р
GROUPE		3,32	0,09
TRAITEMENT	F(1, 90)	0,09	0,77
GROUPE*TRAITEMENT		2,13	0,16
TEMPS		1,25	0,29
TEMPS*GROUPE	F(5, 90)	1,87	0,11
TEMPS*TRAITEMENT		0,41	0,84
TEMPS*GROUPE*TRAITEMENT		0,19	0,97

		F	р
GROUPE		16,28	,001*
TRAITEMENT	F(1, 90)	1,06	0,32
GROUPE*TRAITEMENT		0,25	0,63
TEMPS		8,55	,000*
TEMPS*GROUPE	E(E 00)	5,67	,000*
TEMPS*TRAITEMENT	F(3, 90)	0,83	0,53
TEMPS*GROUPE*TRAITEMENT		1,02	0,41





(D) Vitesse moyenne du passage



		F	р
GROUPE		15,39	,001*
TRAITEMENT	F(1, 90)	1,11	0,31
GROUPE*TRAITEMENT		0,41	0,53
TEMPS		10,59	,000*
TEMPS*GROUPE	E(5 00)	6,28	,000*
TEMPS*TRAITEMENT	F(3, 90)	1,19	0,32
TEMPS*GROUPE*TRAITEMENT		0,97	0,44

Paramètres spatiaux

L'écart entre les pattes postérieures change au cours du *temps* (p < 0,001) et une interaction *temps* × *PSM* est observée (p < 0,01) (Figure 83A). Cette distance ne varie pas au cours du temps chez les rats C + ThG. Par contre, elle diminue après 3 jours dans le groupe PSM (- 10 %, p < 0,05) et elle augmente significativement à J14 et R+3J dans le groupe PSM + ThG (respectivement, + 14 % et + 12 %, p < 0,05).

Pour la longueur de l'enjambée, un effet groupe (p < 0,001) et temps (p < 0,0001) est observé, ainsi qu'une interaction groupe × temps (p < 0,01) (Figure 83B). La longueur de l'enjambée diminue après 7 et 14 jours pour le groupe PSM (respectivement, - 14 % et - 14 %, p < 0,05 oiur chaque groupe) et 3 et 7 jours pour le groupe PSM + ThG (respectivement, - 14 % et - 15 %, p < 0,05pour chaque groupe). Puis la longueur de l'enjambée augmente dans ces deux groupes après 7 jours de récupération (respectivement, + 15 % et + 15 %, p < 0,05 pour chaque groupe).



(B) Longueur	de l'er	njambée
----	------------	---------	---------



		•	P
GROUPE		0,03	0,87
TRAITEMENT	F(1, 90)	0,03	0,87
GROUPE*TRAITEMENT		1,27	0,28
TEMPS		4,40	,001*
TEMPS*GROUPE	E(E 00)	3,87	,003*
TEMPS*TRAITEMENT	F(5, 90)	0,49	0,78
TEMPS*GROUPE*TRAITEMENT		0,18	0,97

E n

		F	р
GROUPE		17,64	,001*
TRAITEMENT	F(1, 90)	0,53	0,48
GROUPE*TRAITEMENT		0,37	0,55
TEMPS		10,26	,000*
TEMPS*GROUPE	E(5 00)	4,28	,002*
TEMPS*TRAITEMENT	F(3, 90)	1,32	0,26
TEMPS*GROUPE*TRAITEMENT		0,43	0,83

Figure 83 : Effet d'une période de PSM, d'une perfusion chronique de ThG et d'une période de récupération fonctionnelle sur les paramètres spatiaux de la marche, tels que (A) la distance entre les pattes postérieures et (B) la longueur de l'enjambée. Les graphiques représentent les pourcentages de changement par rapport au J0 des groupes C + ThG, PSM et PSM + ThG à J3, J7 et J14 d'une période de PSM, et lors d'une récupération de 3 et 7 jours (R+3J et R+7J). Les tableaux présentent les résultats de l'*analyse de variance à trois facteurs* (groupe, traitement et temps) avec mesures répétées. * correspond à p < 0,05 par rapport à J0 (test post-hoc de *Fisher*).

Paramètres des empreintes des pattes postérieures

La surface des empreintes des pattes postérieures varie selon une période de *PSM* (p < 0,0001) et le *temps* (p < 0,05). Une interaction *PSM* × *temps* est observée (p < 0,01) (Figure 84A). La surface des empreintes ne change pas que ce soit pour le groupe C + ThG ou pour le groupe PSM. Par contre, une diminution de la surface des empreintes des pattes postérieures des rats PSM + ThG est observée à J7 (- 25 %, p < 0,05), J14 (- 39 %, p < 0,01) et R+3J (- 44 %, p < 0,001).



		F	р
GROUPE		24,40	,000*
TRAITEMENT	F(1, 90)	0,15	0,71
GROUPE*TRAITEMENT		1,38	0,26
TEMPS		2,34	,048*
TEMPS*GROUPE	E(E 00)	3,78	,004*
TEMPS*TRAITEMENT	F(3, 90)	1,59	0,17
TEMPS*GROUPE*TRAITEMENT		1,87	0,11

(B) Intensité maximale au contact maximal



		r i i i	p
GROUPE		19,17	,000*
TRAITEMENT	F(1, 90)	0,04	0,84
GROUPE*TRAITEMENT		0,06	0,80
TEMPS		5,54	,000*
TEMPS*GROUPE	F(F 00)	6,67	,000*
TEMPS*TRAITEMENT	r(5,90)	4,82	,001*
TEMPS*GROUPE*TRAITEMENT		3 20	011*

Figure 84 : Effet d'une période de PSM, d'une perfusion chronique de ThG et d'une période de récupération fonctionnelle sur les paramètres des empreintes des pattes postérieures, tels que (A) la surface des empreintes des pattes postérieures et (B) l'intensité maximale au contact maximal. Les graphiques représentent les pourcentages de changement par rapport au J0 des groupes C + ThG, PSM et PSM + ThG à J3, J7 et J14 d'une période de PSM, et lors d'une récupération de 3 et 7 jours (R+3J et R+7J). Les tableaux présentent les résultats de l'analyse de variance à trois facteurs (groupe, traitement et temps) avec mesures répétées. *, **, *** et **** correspondent respectivement à p < 0,05, p < 0,01, p < 0,001 et p < 0,0001 par rapport à J0 (test post-hoc de *Fisher*).

L'intensité maximale change en fonction d'une période de *PSM* (p < 0,0001), du *temps* (p < 0,0001), et des interactions *PSM* x *temps* (p < 0,0001), *temps* × *traitement* (p < 0,001) ou encore *PSM* × *temps* × *traitement* (p < 0,05) sont également observées (**Figure 84B**). L'intensité maximale ne varie pas dans le groupe C + ThG. Dans le groupe PSM, une augmentation de l'intensité est constatée à J3 (+ 11 %, p < 0,01), suivi d'une diminution à J14 (- 7 %, p < 0,05) et d'une forte réaugmentation après 3 et 7 jours de récupération (respectivement, +13 % et + 15 %, p < 0,001 et p < 0,0001). Dans le groupe PSM + ThG, l'intensité maximale diminue progressivement de J7 à R+3J (respectivement, - 11 %, - 11 %, et - 14 %, p < 0,01, p < 0,01 et p < 0,0001).

Coordination des pattes postérieures

En ce qui concerne l'analyse du couplage temporel des pattes droites (Figure 85A) ou gauches (Figure 85B), des effets *PSM* (p < 0,05) et *temps* (respectivement, p < 0,0001 et p < 0,01) sont observés ainsi qu'une interaction *temps* × *PSM* (respectivement, p < 0,0001 et p < 0,05).

Le couplage temporel des pattes droites varie de manière importante dans les groupes PSM recevant ou non du ThG de J3 à J14 (respectivement, + 19 % et + 16 % à J3 et + 22 % et + 17 % à J14, p < 0,0001). Il en est de même pour les pattes gauches, où le couplage temporel varie à J3 et J7 (respectivement, + 20 % et + 14 %, p < 0,01 et p < 0,05) pour le groupe PSM et J3 et J14 pour le groupe PSM + ThG (respectivement, + 17 % et + 15 %, p < 0,05).

L'index de régularité change chez les groupes soumis à une période de *PSM* (p < 0,05), ainsi qu'en fonction du *temps* (p < 0,01) (Figure 15C). Cet index ne varie significativement que dans le groupe PSM à J3 et J7 (respectivement, - 8 % et - 9 %, p < 0,01).

50

25

0



р GROUPE 8,30 ,010* TRAITEMENT F(1, 90) 0,44 0,51 GROUPE*TRAITEMENT 0.14 0.72 .000* TEMPS 14.38 ,000* TEMPS*GROUPE 14,91 F(5, 90) TEMPS*TRAITEMENT 0,65 0,66 TEMPS*GROUPE*TRAITEMENT 0,07 1,00

р

,041*

0,63

0,30

.003* ,014* 0,74

0,49

			F
	GROUPE		4,86
	TRAITEMENT	F(1, 90)	0,24
	GROUPE*TRAITEMENT		1,14
	TEMPS		3,83
	TEMPS*GROUPE	E(5 00)	3,06
* *	TEMPS*TRAITEMENT	F(3, 90)	0,55
т т	TEMPS*GROUPE*TRAITEMENT		0,89



₃β

51

PSM

51

sЭ

J14 R*3 R*73

C + ThG

314 R*32 R*13

ςβ 51

Т

	F		р
GROUPE		5,04	,038*
TRAITEMENT	F(1, 90)	1,50	0,24
GROUPE*TRAITEMENT		0,52	0,48
TEMPS	F(5, 90)	3,25	,010*
TEMPS*GROUPE		2,06	0,08
TEMPS*TRAITEMENT		0,42	0,84
TEMPS*GROUPE*TRAITEMENT		0.53	0.76

Figure 85 : Effet d'une période de PSM, d'une perfusion chronique de ThG et d'une période de récupération fonctionnellesur les paramètres permettant d'analyser la coordination lors de la marche, tels que le couplage temporel des pattes droites (A) ou gauches (B) et l'index de régularité (C). Les graphiques représentent les pourcentages de changement par rapport au J0 des groupes C + ThG, PSM et PSM + ThG à J3, J7 et J14 d'une période de PSM, et lors d'une récupération de 3 et 7 jours (R+3J et R+7J). Les tableaux présentent les résultats de l'analyse de variance à trois facteurs (groupe, traitement et temps) avec mesures répétées. *, ** et **** correspondent respectivement à p < 0.05, p < 0.01 et p < 0.001 par rapport à J0 (test post-hoc de Fisher).

314 a+35 a+75

PSM + ThG

IV. Conclusions

L'ensemble de ces données confirment les études antérieures²², à savoir qu'une période de PSM de 14 jours entraîne une dégradation progressive des performances motrices. En résumé, nous avons observé chez le groupe PSM :

- Une diminution du nombre de redressements en réponse à la nouveauté et pendant la phase active
- Une diminution du réflexe de retrait des pattes postérieures
- Une diminution de la coordination motrice et de la résistance à la fatigue
- Une multitude de troubles posturo-locomoteurs tels que (1) une augmentation de la durée du cycle de marche due à une augmentation des temps de phase d'appui et de transfert,
 (2) une diminution de la longueur de l'enjambée, (3) une variation de l'intensité maximale au contact maximal, (4) une forte altération de la coordination des membres postérieurs.

Il est à noter qu'une période de récupération « normogravitaire » de 3 à 7 jours suffisent à reverser la plupart de ces altérations.

Une perfusion chronique de ThG chez le groupe C n'a pas d'effet sur la coordination motrice, la fatigabilité, le réflexe de retrait des pattes postérieures ou encore la plupart des paramètres pris en compte pour analyser la locomotion. De manière intéressante, il est tout de même à noter que le groupe C + ThG présentait une hyperactivité : l'activité spontanée, le nombre de redressements et la vitesse moyenne du passage du Catwalk XT étaient toujours plus importants dans ce groupe.

Dans l'ensemble, le ThG ne prévient pas l'altération de la performance motrice induite par une période de PSM., mais a toutefois des effets sur le patron locomoteur. En effet, si les paramètres temporels sont préservés par le ThG, on peut aussi observer que ses effets peuvent être délétères, comme par exemple pour la surface des empreintes ou l'espacement entre les pattes postérieures.

Cette étude a donc permis de mettre en évidence qu'une perfusion chronique de ThG au niveau du cortex sensorimoteur pendant toute la durée de PSM ne prévient pas la dégradation de la performance motrice, mais prévient certains paramètres précis du patron locomoteur.

²² Voir Rappels bibliographiques III.C. Perturbation sensorimotrice et conséquences sur les performances motrices, p72

<u>Etude 7</u>: Effet d'une modulation corticale du taux de O-GlcNAcylation sur le phénotypage des muscles de la patte postérieure (résultats préliminaires)

I. Introduction

Aucune étude à ce jour n'a montré qu'une perfusion chronique d'un agent pharmacologique perfusé au niveau du cortex sensorimoteur pouvait avoir des répercussions directes sur des acteurs périphériques tels que le muscle et sur ses propriétés : fibres musculaires lentes vs rapides, surface des fibres, poids des muscles...

En complément des études 5 et 6, cette étude a pour but d'étudier les effets d'une modulation corticale des taux de O-GlcNAcylation, par une administration chronique de Thiamet G au niveau du cortex sensorimoteur, sur les différentes propriétés des muscles soléaires et de l'EDL. Cette étude a également l'objectif d'étudier la plasticité musculaire après quelques heures ou une journée de retour en situation « normogravitaire » après 14 jours de PSM.

Pour cela, nous avons prélevé l'ensemble des muscles soléaires et EDL des pattes postérieures des rats utilisés pour la cinétique de la plasticité synaptique (étude 3) et de l'étude électrophysiologique *in vivo* (étude 5). Pour rappel, le muscle soléaire, antigravitaire, est particulièrement impacté par une période de PSM tandis que l'EDL y est beaucoup moins sensible. Sur ces muscles, les analyses du taux d'expression des isoformes de chaînes lourdes de myosine (rapide vs lente vs hybride), de la surface des fibres musculaires ainsi que du poids des muscles entiers ont été effectuées. Il s'agit de résultats préliminaires puisque tous les muscles n'ont pas encore été examinés, ne permettant pas de faire une analyse statistique complète.

II. Matériels et Méthodes

A. Les animaux

Les groupes de rats utilisés pour cette étude 7 sont :

- Groupe C
- Groupe PSM : les rats de ce groupe ont été répartis en sous-groupes soumis à une période de PSM de respectivement 3, 7 et 14 jours et à une période de récupération « normogravitaire » de respectivement 6h et 1j après les 14 jours de PSM.
- *Groupe C + ThG :* les rats ont reçu une perfusion chronique de Thiamet G pendant 14 jours.
- Groupe PSM + ThG : les rats ont été soumis à une période de PSM de 14 jours et ont reçu une perfusion chronique de Thiamet G pendant cette période.

B. Prélèvement musculaire

Les rats sont anesthésiés profondément au pentobarbital sodique (60 mg/kg) (Ceva santé animale). Les muscles soléaires ainsi que l'EDL des pattes postérieures sont prélevés. Les échantillons sont placés dans des cryotubes immédiatement plongés dans de l'azote liquide et stockés à -80 °C. La durée totale du prélèvement n'excède pas 5 min.

C. Immunohistochimie

Des coupes sagittales de 10 µm sont effectuées à l'aide d'un microtome à congélation (CM3050S, Leica). Les coupes sont ensuite montées sur des lames superfrost+ (ThermoFisher scientific), permettant une meilleure adhésion de la coupe à la lame. Le taux d'expression des isoformes de chaînes lourdes de myosine a été établi sur des coupes de muscles entiers par utilisation d'anticorps primaires monoclonaux présentés dans le **Tableau 8**. Les coupes sont incubées pendant 3 h en chambre humide à température ambiante avec l'anticorps primaire. Les coupes sont lavées au PBS 3 x 10 min. Après les lavages, un anticorps secondaire biotinylé est appliqué 30 min dans l'obscurité à température ambiante (Vectastain Elite ABC Kit, Vector laboratories).

 Tableau 8 : Liste des anticorps primaires utilisés pour analyser l'expression des isoformes de chaînes lourdes de la myosine.

Anticorps primaires	Hôte	Références	Compagnies	Concentrations
Anti-slow muscle myosin	Mouse	MAB1628	EMD Millipore	1 :400
Anti-Myosin (Skeletal, Fast) (clone MY32)	Mouse	M1570	Sigma Aldrich	1 :2000
BF-F3 (Mysoin Heavy Chain Type IIB)	Mouse	-	DSHB	1 :10
SC-71 (Myosin Heavy Chain Type IIA)	Mouse	-	DSHB	1 :10
La réaction de fixation de cet anticorps est amplifiée à l'aide du complexe avidine-biotine couplé à une peroxydase. La révélation est visualisée par la diaminobenzidine (SIGMA). Après déshydratation aux alcools croissants et au toluène, les coupes sont montées dans une résine (Eukitt, Kindler). La réactivité à chaque anticorps est vérifiée sur un minimum de 200 fibres identifiées sur chaque coupe de muscle entier. Les analyses sont effectuées sur le microscope DMi8 (Leica) muni d'une plateforme motorisée permettant de faire des mosaïques avec le logiciel LAS X (Leica).

III. <u>Résultats</u>

L'évolution au cours d'une période de PSM (J1, J7 et J14) et les phases de récupération « normogravitaire » (R+6 h et R+1J) n'a été évaluée que sur le groupe PSM.

Poids des muscles

Le poids de tous les muscles prélevés (en mg) a été rapporté à celui du poids du corps du rat (en g) afin de déterminer la proportion relative de chaque muscle et son évolution en fonction des différentes conditions expérimentales.

Dans un premier temps, les rats soumis à 0, 1, 7 et 14 jours de PSM ou à 6h et 1j de récupération « normogravitaire » (R+6h et R+1J) sont comparés par un test de *Kruskal-Wallis* suivi d'un test post-hoc de *Dunn*, afin de déterminer l'évolution des paramètres en fonction du temps de PSM et/ou de récupération. Dans un second temps, les groupes J0 et J14 ont été comparés par une *ANOVA* à deux facteurs [*groupe* (PSM) et *traitement* (ThG)], suivie d'un test post-hoc de*Turkey*.

Le test de Kruskal-Wallis a permis de mettre en évidence une évolution du poids du muscle soléaire en fonction du temps (p < 0,0001). L'ANOVA a quant à elle démontré les effets de la PSM (F(1, 38) = 144,2, p < 0,0001) et du ThG (F(1, 38) = 6, p < 0,05). En effet, on peut observer une atrophie du muscle soléaire du groupe PSM à J14 par rapport au groupe C (- 36 %, p < 0,001). Cette atrophie est retrouvée au niveau des muscles soléaires (- 46 %, p < 0,001) du groupe PSM recevant du ThG par rapport au groupe C. Aucune différence n'est observée entre les groupes C recevant ou non du ThG (Figure 86A).

Le rapport de poids ne varie jamais pour l'EDL que ce soit entre les 4 groupes (C, PSM, C+ThG et PSM+ThG) ou au cours du temps pour le groupe PSM (Figure 86B).



(A) Poids du muscle soléaire par rapport au poids du corps

(B) Poids de l'EDL par rapport au poids du corps



Figure 86 : Evolution du poids des muscles soléaires (A) et EDL (B) par rapport au poids du corps, au cours d'une période de PSM ou de récupération de 6h et 1J et lors d'une perfusion chronique de ThG au niveau du cortex sensorimoteur. Le poids des muscles a été rapporté à celui de chaque rat.

Expression des différentes isoformes des chaînes lourdes de myosine (MHC)

Tous les muscles n'ont pas encore été examinés, ne permettant pas de faire une analyse statistique complète de l'expression des différentes isoformes des chaînes lourdes de myosine (MHC).

Le muscle soléaire contrôle se caractérise par une expression importante des fibres de type I (82 %) et une quasi absence des fibres de type II (7 %), ainsi que des fibres hybrides (9 %) (Figure 87A).

On peut observer un profil similaire dans les muscles soléaires du groupe C + ThG et une légère augmentation de l'expression des fibres de type I est également visible (+ 15 %).

Au cours d'une période de PSM, une diminution marquée de l'expression des fibres de type I à J14 est constatée (- 16 %) au profit d'une augmentation de l'expression de fibres de type IIA (+ 117 %) et IIX (+ 6 %). Après 6 h de récupération, la proportion des fibres de type IIB (+ 7 %) et hybrides (+ 129 %) est plus importante qu'après 14 jours de PSM. Après 1J de récupération, l'expression des fibres de type I réaugmente légèrement par rapport à J14 (+ 20 %), tandis que les fibres de type IIB et IIX disparaissent et l'expression des fibres hybrides diminue (- 70 %) par rapport à R+6 h.

Les profils d'expression des fibres du muscle soléaire du groupe PSM + ThG sont très similaires aux muscles soléaires du groupe PSM à J14 (66 % de fibres de type I, 8 % de fibres de type IIA et 29 % de fibres hybrides).

L'EDL se caractérise par une faible présence de fibres de type I (6 %), une forte proportion de fibres de type IIA (27 %), IIX (16 %) et IIB (50 %) et peu de fibres hybrides (2 %) **(Figure 87B)**. Les profils d'expression des différents types de fibres de l'EDL ne changent pas entre les différents groupes ou au cours du temps.



(B) Expression des différentes MHC de l'EDL



Figure 87 : Evolution de l'expression des différents isoformes de chaînes lourdes de myosine (MHC I, IIA, IIX et IIB) du muscle soléaire (A) et de l'EDL (B) au cours d'une période de PSM ou de récupération de 6h et 1J et lors d'une perfusion chronique de ThG au niveau du cortex sensorimoteur.

La caractérisation par immunohistochimie des différents isoformes des chaînes lourdes de myosine (MHC I, IIA et IIB) sur des coupes transversales du muscle soléaire des rats C et PSM et PSM + ThG est reprentée dans la **Figure 88**.



Figure 88 : Caractérisation des différents isoformes de chaînes lourdes de myosine (MHC I, IIA, IIB) sur des coupes transversales de muscle soléaire de rat par immunohistochimie. Les photographies représentent des images caractéristiques de chaque marquage (MHCI avec l'anticorps anti-slow, MHCIIA avec l'anticorps SC-71 et MHCIIB avec l'anticorps BF-F3) pour les groupes C, PSM et PSM + ThG à J14. Les flêches noires permettent d'identifier une même fibre pour chaque marquage. I, MHCI ; H, MHC Hybride, IIA, MHC IIA ; IIB, MHC IIB.

Surface des différents types de fibres musculaires

La surface de chaque type de fibres musculaires (I, IIA, IIX et IIB) pour chacun des muscles a été déterminée.

Au niveau du muscle soléaire dans le groupe C, en moyenne les surfaces des fibres de type I, IIA et IIX sont de 2587 μ m², 2406 μ m² et 2076 μ m² (Figure 89A). La surface des fibres de type I est plus grande dans les muscles soléaires du groupe C + ThG par rapport au groupe ne recevant pas de ThG (+ 49 %).

Au cours d'une période de PSM, la surface des fibres de type I, IIA et IIX diminue à J7 (respectivement, - 55 %, - 44 % et - 40 %) et J14 (respectivement, - 42 %, - 56 % et - 52 %). Des périodes de récupération de 6 h et 1J ne sont pas suffisantes pour récupérer une surface normale des fibres de type I, IIA et IIX, mais il est à noter que l'apparition des fibres de type IIB augmente après 6 h de récupération.

Enfin, dans les muscles soléaires du groupe PSM + ThG une diminution importante de la surface des fibres de type I (- 38 %) et IIA (- 38 %) est également observée par rapport au groupe C.

Au niveau de l'EDL dans le groupe C, en moyenne les surfaces des fibres de type I, IIA, IIX et IIB sont de 960 μ m², 956 μ m², 1443 μ m² et 2756 μ m² (**Figure 89B**). La surface des différentes fibres de l'EDL ne varie pas que ce soit entre les 4 groupes ou au cours du temps.



(A) Surface des fibres musculaires du muscle soléaire

(B) Surface des fibres musculaires de l'EDL



Figure 89: Evolution de la surface des différents types de fibres musculaires (I, IIA, IIX et IIB) du muscle soléaire (A) et de l'EDL (B) au cours d'une période de PSM ou de récupération de 6h et 1J et lors d'une perfusion chronique de ThG au niveau du cortex sensorimoteur.

IV. Conclusions

Une modulation corticale des taux de O-GlcNAcylation n'a pas d'effet sur l'atrophie du muscle soléaire, le profil d'expression des isoformes de MHC ou la surface des fibres musculaires après une période de PSM de 14 jours. Par ailleurs, les données obtenues sur l'EDL restant stables quelque soit le groupe étudié. La modulation du taux de O-GlcNAcylation ainsi que les conditions de PSM n'affectent pas ce muscle qui n'intervient pas dans le contrôle postural.

Ainsi, nous avons montré que l'administration corticale d'une substance jouant sur la plasticité du cortex sensorimoteur ne semble pas avoir un effet direct sur les propriétés des muscles des pattes postérieures. Ces résultats pour le muscle soleus restent cependant encore à confirmer en augmentant le nombre de muscles à analyser.

Enfin, nous avons également montré que la récupération musculaire pouvait être un processus rapide, puisque qu'au bout d'une journée de récupération « normogravitaire » des changements pouvaient déjà être observés.

DISCUSSION GENERALE

Ces travaux expérimentaux ont permis d'approfondir nos connaissances sur la réorganisation corticale induite par une période de PSM et ses répercussions fonctionnelles. Pour cela, je me suis plus particulièrement intéressée aux rôles potentiels de deux modifications post-traductionnelles au niveau des protéines synaptosomales : la phosphorylation et la O-GlcNAcylation.

Tout d'abord, mon intérêt s'est porté sur les mécanismes moléculaires et dynamiques de la plasticité synaptique du cortex sensorimoteur induite par une PSM. Les études de cette analyse protéomique m'ont permis de révéler qu'une période de PSM induit une variation d'activation et d'expression de diverses protéines impliquées dans les propriétés synaptiques. J'ai également mis en évidence que la phosphorylation et la O-GlcNAcylation interviennent dans cette plasticité synaptique en régulant finement l'activité de protéines synaptiques telles que la synapsine 1. Ensuite, j'ai voulu déterminer si une modulation des taux de O-GlcNAcylation dans le cortex sensorimoteur pendant toute la durée d'une PSM pouvait prévenir la réorganisation corticale du cortex somesthésique et la dégradation des performances motrices induites par une PSM. Mes résultats montrent que la perfusion de Thiamet G, un modulateur des taux de O-GlcNAcylation, au niveau cortical prévient totalement la réorganisation corticale du cortex somesthésique, mais ne permet de prévenir les altérations des performances motrices. Nous avons également mis en évidence que la modulation des taux de O-GlcNAcylation au niveau cortical ne permet pas de prévenir la transition phénotypique du muscle soléaire en réponse à la PSM. L'ensemble de ces résultats est résumé dans la **Figure 90**.



Figure 90 : Synthèse des effets d'une PSM sur la plasticité synaptique et de la modulation des taux de O-GlcNAcylation sur la réorganisation corticale du cortex somesthésique et la dégradation des performances motrices induites par une PSM. Une PSM induit de nombreux changements au niveau des synapses du cortex sensorimoteur, de la libération des vésicules synaptiques aux récepteurs du compartiment postsynaptique et au remodelage du cytosquelette synaptique. Ces processus sont dynamiques et font intervenir des modifications post-traductionnelles telles que la phosphorylation et la O-GlcNAcylation. La modulation pharmacologique des taux de O-GlcNAcylation au niveau du cortex sensorimoteur prévient la réorganisation du cortex somesthésique, mais ne prévient pas l'altération des performances motrices, ni les changements de phénotypage du muscle soléaire

Les acteurs de la plasticité synaptique induite par une PSM

Dans le cortex sensorimoteur, la neuroplasticité dépendante de l'expérience est régulée par différents mécanismes qui favorisent ou réduisent l'activité neuronale à court et à long terme en jouant sur l'efficacité synaptique, le démasquage de synapses silencieuses (Jacobs & Donoghue 1991) ou la morphologie des épines dendritiques (nombre, longueur, fonctionnalité) (Trinel et al 2013), suggérant la formation et la disparition de connexions synaptiques. Cette plasticité synaptique dépend de changements moléculaires impliquant des neurotransmetteurs (acétylcholine, glutamate, GABA) (Bandrowski et al 2003, Floyer-Lea et al 2006, Kilgard 2003), des facteurs neurotrophiques (NGF, BDNF, IGF-1) (Dupont et al 2005, Mysoet et al 2014), l'activation de récepteurs membranaires (NMDAR, AMPAR) (Froc & Racine 2004, Sherman 2014) et/ou de voies de signalisation intracellulaires (PI3K-AKT, MAPK/ERK) (Dupont et al 2011b, Mysoet et al 2014). En dépit de l'ensemble de ces données, les événements moléculaires et dynamiques associés à cette plasticité synaptique, en particulier au cours d'une période de PSM, restent à clarifier. Le but de la première partie des travaux expérimentaux de cette thèse était **d'apporter des éléments nouveaux sur les mécanismes moléculaires et dynamiques de la plasticité synaptique au cours d'une période de PSM.**

Nous avons mis en évidence une modulation de l'activation et de l'expression des protéines préet postsynaptiques au cours d'une période de PSM. Au niveau présynaptique, l'expression de la synapsine 1, de la synaptophysine et de la synaptotagmine 1 diminuaient dans les synaptosomes du cortex sensorimoteur. Ces trois protéines sont importantes pour chaque étape du cycle de libération des neurotransmetteurs. Les modifications de l'expression de la synapsine 1 et de la synaptophysine reflètent des modifications de la disponibilité et de la quantité des vésicules synaptiques (Bogen et al 2006, Nithianantharajah et al 2004), tandis qu'une diminution de la synaptotagmine 1 réduit les capacités de libération des vésicules synaptiques de la zone active (Bacaj et al 2015). Ainsi, on peut considérer qu'une PSM induit une réduction de disponibilité et de libération des vésicules synaptiques dans les terminaisons présynaptiques des neurones sensorimoteurs corticaux.

L'analyse protéomique différentielle et les identifications de marqueurs par spectrométrie de masse nous ont permis de mettre en évidence des changements importants du cytosquelette lors d'une période de PSM. Nous avons notamment montré une diminution d'expression de l'actine en 2-DE, et de la β 3-tubuline et des neurofilaments-L et M par western blot après 14 jours de PSM. Les filaments d'actine sont les principaux éléments du cytosquelette de la synapse, tandis que les microtubules, polymères assemblés d' α - et de β -tubuline, entrent transitoirement dans les synapses (Gordon-Weeks & Fournier 2014). En recrutant des protéines régulatrices (par exemple, les protéines

Discussion générale

ABP (*actin-binding protein*, spectrine, CaMKII) pour l'actine et MAP (*microtubule-assocatied proteins*, MAP2, Tau) pour les microtubules), l'activité synaptique peut remodeler le cytosquelette d'actine et de microtubules pré- et postsynaptique (Cingolani & Goda 2008, Conde & Cáceres 2009). Au niveau présynaptique, l'actine et les microtubules interviendraient tous deux dans le trafic des vésicules synaptiques. Si le rôle précis des microtubules reste encore à définir (Bodaleo & Gonzalez-Billault 2016), nous savons en revanche que l'actine participe au maintien et à la régulation des pools de vésicules synaptiques, probablement en servant de support pour limiter la mobilité des vésicules et en guidant le transfert des vésicules entre les pools (Greengard et al 1994). Au niveau de la zone active, l'actine peut réguler l'amarrage et l'amorçage des vésicules et elle facilite également la récupération endocytaire des vésicules synaptiques (Bloom et al 2003, Phillips et al 2001). Ainsi, une diminution de l'expression de l'actine et de la β3-tubuline induite par une PSM peut participer à l'altération du trafic des vésicules synaptiques décrite dans le paragraphe précédent, et en conséquence à une baisse de la transmission synaptique.

Au niveau postsynaptique, une PSM induit une diminution de l'expression de PSD-95 mais pas de Shank2. Ces deux protéines d'échafaudage sont des régulateurs importants de l'efficacité synaptique et de la plasticité. PSD-95 est fréquemment utilisé comme marqueur moléculaire pour déterminer la taille et la force des synapses (Holtmaat & Svoboda 2009). La surexpression de la PSD-95 est observée à la densité postsynaptique durant la LTP et est associée à une augmentation du volume de la tête, tandis que la délétion de PSD-95 est associée à une diminution du nombre d'épines dendritiques au niveau du striatum et de l'hippocampe (Vickers et al 2006). La diminution de l'expression de PSD-95 pourrait être liée à une réduction du nombre d'épines dendritiques et/ou à une réduction de la taille des synapses. Cependant, à la suite d'une période de PSM, le nombre d'épines matures sur les neurones pyramidaux serait légèrement augmenté (Trinel et al 2013), ce qui nous conduit à rejeter la première hypothèse. Quant à la taille de la tête des épines dendritiques, elle était diminuée pour les neurones pyramidaux des couches infragranulaires après une PSM (Trinel et al 2013). Ainsi, **la diminution de l'expression de la PSD-95 est corrélée à une réduction de la surface de la densité postsynaptique et du volume de la tête des épines.**

Les modifications morphologiques des épines dendritiques se font en partie en réorganisant le cytosquelette d'actine et de microtubules sous-jacent. Lors de la LTP, les épines deviennent plus grandes et augmentent leur teneur relative en actine ; lors de la LTD, les épines rétrécissent et dépolymérisent leur actine (Honkura et al 2008, Okamoto et al 2004). L'invasion des microtubules dans les épines est en corrélation avec l'augmentation de l'actine et l'élargissement de l'épine dendritique (Kapitein et al 2011). **Une diminution de l'actine et de la β3-tubuline pourrait donc être**

229

corrélée aux modifications de taille et de forme des épines dendritiques, comme cela a été observé après une période de PSM (Trinel et al 2013).

L'efficacité synaptique dépend du nombre de récepteurs incorporés dans la membrane postsynaptique. Fait intéressant, une PSM induit une diminution de l'expression des AMPAR GluA2 et NMDAR GluN1, suggérant une diminution de l'efficacité synaptique après une PSM. La diminution de l'expression de ces deux récepteurs au glutamate après une PSM peut être liée à une succession d'événements, et notamment à la baisse d'expression de PSD-95. En effet, **PSD-95** se lie, directement ou non, à ces deux récepteurs au glutamate (Cousins et al 2008, Schnell et al 2002), et le nombre des AMPAR est corrélé à l'expression de PSD-95 durant la LTP (Ehrlich & Malinow 2004). A l'inverse, une délétion de PSD-95 par un *Knock-Down* entraîne une diminution du nombre des AMPAR ainsi qu'une diminution des courants des AMPAR et NMDAR (Ehrlich et al 2007, Ehrlich & Malinow 2004, Futai et al 2007). Par ailleurs, nous avons mis en évidence une augmentation de la **phosphorylation de la ser880 des GluA2**. Celle-ci induit une endocytose des AMPAR GluA2 au cours de la LTD, entraînant une diminution des AMPAR à la surface postsynaptique (Seidenman et al 2003). L'activité de la voie **MAPK/ERK** est liée à la LTP en agissant sur l'insertion des AMPAR à la synapse (Zhu et al 2002). En situation de PSM, nous avons observé une diminution de l'activité de la voie MAPK/ERK, ce qui renforce l'idée d'une moindre insertion des AMPAR à la surface de la membrane postsynaptique.

Une dernière possibilité est le rôle du cytosquelette dans l'adressage et la stabilisation de protéines telles que PSD-95 ou les NMDAR GluN1 au niveau de la densité postsynaptique. Les neurofilaments (L, M et H) ou filaments intermédiaires des neurones matures font partie des protéines les plus abondantes dans le cerveau. Or, leur rôle au niveau synaptique reste encore un mystère puisque les synapses ont longtemps été considérées comme des sites de dégradation pour les neurofilaments atteignant les terminaisons. Une étude récente a mis en évidence que les neurofilaments, surtout le neurofilament-M, étaient très abondants dans les terminaisons postsynaptiques par rapport aux terminaisons présynaptiques. De plus, la délétion de tous les types de sous-unités des neurofilaments a des effets importants sur la plasticité synaptique (réduction de la LTP, mais pas de changement de morphologie des épines) (Yuan et al 2015). En outre, il semblerait que le neurofilament-L influe de manière sélective sur la localisation et la stabilisation des NMDAR GluN1 à la membrane de la densité postsynaptique (Ehlers et al 1998), tandis que la stabilisation de PSD-95 est dépendante des microtubules (Hu et al 2011). Ainsi, une baisse d'expression des neurofilaments-L et de la β 3-tubuline peut conduire à la diminution de la présence de PSD-95 et des NMDAR GluN1 observée après une période de PSM.

Discussion générale

Les changements d'expression de l'actine, des microtubules (β 3-tubuline) et des neurofilaments au cours d'une période de PSM mettent en évidence des changements structurels importants des synapses (modification de la forme et de la taille des épines dendritiques). Fonctionnellement, cela doit se traduire par un dysfonctionnement synaptique : au niveau présynaptique, les vésicules synaptiques sont moins liées au cytosquelette, entrainant une dérégulation de leur trafic ; au niveau postsynaptique, une diminution de la présence de cytosquelette déstabilise des protéines importantes telles que PSD-95 et les NMDAR GluN1 au niveau de la densité postsynaptique.

L'analyse protéomique a également montré des changements au niveau des protéines mitochondriales. Les neurones sont enrichis de mitochondries génératrices d'énergie (ATP, adénosine triphosphate), en particulier au niveau des synapses (Shepherd & Harris 1998). Les mitochondries sont des organelles mobiles dynamiques en cours de remodelage et de transport continus (Hollenbeck 1996). En réponse à une stimulation neuronale, les mitochondries synaptiques redistribuent et améliorent leur propre activité (Miller & Sheetz 2004), suggérant que la neurotransmission est un processus demandant beaucoup d'énergie. La glycolyse cytoplasmique produit environ 10 % de l'ATP cellulaire tandis que les mitochondries en produisent plus de 90 %. Cet ATP est réquisitionné pour plusieurs processus synaptiques : pour le potentiel de membrane synaptique, les différentes étapes de trafic des vésicules synaptiques (amorçage par les protéines SNARE, endocytose par les manteaux de clathrine, rechargement des vésicules en neurotransmetteurs, transport et mobilisation des vésicules synaptiques du pool de réserve) et pour les différentes voies de signalisation (phosphorylation) actives au niveau de la synapse (Ly & Verstreken 2006). De plus, l'augmentation du contenu mitochondrial dendritique ou de l'activité mitochondriale augmente le nombre et la plasticité des épines et des synapses. Réciproquement, l'activité synaptique module la distribution des mitochondries, ainsi que leur motilité et leur morphologie (Li et al 2004). En conséquence, les mitochondries ont un rôle central dans le fonctionnement synaptique. Lors d'une période de PSM, nous avons montré de nombreux changements au niveau du trafic des vésicules synaptiques et dans l'activation des voies de signalisation, ainsi que dans la morphologie des épines dendritiques. Il n'est donc pas étonnant que lors de l'identification de marqueurs par spectrométrie de masse nous obtenions un nombre important de protéines mitochondriales.

Il serait intéressant d'examiner les variations d'expression et d'activation de ces différentes protéines en fonction du temps et de leur localisation (analyse spatio-temporelle par des techniques

231

d'imagerie) afin d'approfondir nos connaissances sur l'enchaînement des différentes étapes de la plasticité synaptique induite par une PSM.

Dynamique moléculaire de la plasticité synaptique induite par une PSM

L'ensemble des changements décrits ci-dessus sont dynamiques. En effet, nous avons effectué une analyse cinétique de la plasticité synaptique induite par une PSM et avons montré pour la première fois que les protéines synaptiques ne sont pas modulées de la même manière au cours des différentes phases d'une période de PSM ou au cours d'une phase de récupération « normogravitaire ».

Les variations d'expression des protéines présynaptiques sont précoces (elles apparaissent après 1 à 7 jours de PSM) et se prolongent jusqu'en phase de récupération, sans amélioration. Il n'est pas à exclure que ces effets précoces peuvent être dus au stress des premiers jours de PSM : un dosage sanguin a été effectué sur notre modèle de PSM mettant en évidence une augmentation du taux de la corticostérone pendant les trois premiers jours de PSM, puis ce taux revient à un niveau normal après 7 jours de PSM (Mysoet et al 2014). Un stress aigu ou chronique a tendance à augmenter l'activité de libération des neurotransmetteurs *via* l'activation des récepteurs aux glucocorticoïdes (Popoli et al 2011). Or, l'expression des protéines présynaptiques va dans le sens d'une baisse de l'activité présynaptique au cours d'une PSM, et persiste jusqu'en période de récupération donc audelà des 3 jours de stress. Ces derniers points appuient l'hypothèse que le stress n'est pas à l'origine des variations observées au cours de cette cinétique.

Les changements au niveau postsynaptique n'apparaissent quant à eux que lors d'une phase plus avancée : l'expression des AMPAR GluA2 et NMDAR GluN1 diminue après 14 jours de PSM, et celle des AMPAR GluA1 diminue lors de la phase de récupération. L'expression des NMDAR GluN1 revient très vite à la normale au bout de quelques heures de récupération, tandis que l'expression des AMPAR GluA2 reste basse. Ces résultats peuvent s'expliquer d'une part par le fait que l'activité neuronale induit une mobilité importante des AMPAR (diffusion latérale, endo-exocytose) et dans une moindre mesure des NMDAR à la surface de la membrane synaptique (Groc et al 2004), et d'autre part que leurs stabilisation et localisation à la densité postsynaptique sont dépendantes d'autres protéines dont l'expression varie au cours d'une PSM (protéines d'échafaudage, cytosquelette).

L'expression des protéines d'échafaudage associées aux récepteurs glutamatergiques, à savoir PSD-95 et Shank2, est impactée selon le même décours que les AMPAR et NMDAR. En effet, PSD-95 diminue tardivement, après 14 jours de PSM, comme pour AMPAR et NMDAR. L'expression de Shank2 ne change pas au cours d'une période de PSM mais diminue après quelques heures de récupération « normogravitaire ». Contrairement à PSD-95, qui se trouve très près de la membrane, Shank2 joue un rôle organisateur au niveau intracellulaire de la densité postsynaptique, là où cette dernière est en interface avec le cytoplasme (Sheng & Kim 2000). Cette différence de localisation, qui suppose des rôles différents dans le fonctionnement de l'élément postsynaptique pourrait expliquer ce décalage temporel.

Enfin, au cours d'une période de PSM et d'une phase de récupération, les protéines du cytosquelette sont les plus dynamiques parmi toutes les protéines étudiées. L'expression du neurofilament-M augmente précocement au cours d'une période de PSM puis l'expression des neurofilaments-L et M diminue tardivement après 14 jours de PSM. Seule l'expression du neurofilament-L augmente après une journée de récupération. Les microtubules (β3 tubuline) varient seulement lors des phases de récupération. Les rôles précis de ces trois éléments du cytosquelette au niveau synaptique ne sont pas encore bien connus mais des changements dans leur expression ou activation peuvent contribuer à un dysfonctionnement synaptique important (Yuan & Nixon 2016). Ils seraient impliqués dans l'adressage des récepteurs au glutamate et de PSD-95 à la membrane postsynaptique (Ehlers et al 1998, Hu et al 2011, Yuan et al 2015), ainsi qu'éventuellement dans le trafic des vésicules synaptiques (Bodaleo & Gonzalez-Billault 2016). Une variation alternée de leur expression pourrait moduler ces différents éléments au cours du temps.

L'ensemble de ces résultats met en évidence que l'efficacité synaptique et la libération des neurotransmetteurs sont altérées progressivement au cours d'une période de PSM et une récupération de 6 à 24 h n'est pas suffisante pour contrebalancer ces effets.

Nous n'avons pas mis en évidence d'effets majeurs dans les phases précoces de la plasticité corticale induite par une période de PSM (de 1 à 7 jours) et lors de la première journée de récupération (6 h et 1 j). Pourtant, les têtes des épines dendritiques peuvent évoluer remarquablement vite (en quelques secondes à quelques minutes) (Holtmaat & Svoboda 2009). Toutefois, le temps de maturation des épines dendritiques et de synaptogénèse dans le cortex somesthésique adulte semble être plus lent. En effet, suite à une expérience de déafférentation de vibrisses chez la souris, des épines nouvellement formées (moins de 2 jours), les 70 % restants correspondant probablement à la population d'épines stationnaires sans synapses (Holtmaat & Svoboda 2009). Dans notre modèle, l'analyse de la morphologie des épines dendritiques n'a été effectuée qu'après 14 jours de PSM (Trinel et al 2013). *Il serait intéressant de*

chercher s'il existe une corrélation entre les modifications morphologiques des épines dendritiques et les changements des différentes protéines synaptiques et du cytosquelette au cours du temps.

Plasticité synaptique induite par une PSM, un rôle potentiel de la O-GlcNAcylation ?

Notre analyse protéomique a également été réalisée pour déterminer si une balance entre la phosphorylation et la O-GlcNAcylation des protéines synaptosomales était impliquée dans la plasticité cérébrale induite par une PSM. Ces travaux apportent la preuve que les protéines O-GlcNAcylées sont omniprésentes dans le cerveau des rats PSM ou témoins, en particulier dans les neurones (corps cellulaires, dendrites et à proximité des épines dendritiques) et les cellules gliales telles que les astrocytes. Nous avons également montré la présence de protéines O-GlcNAcylées et des enzymes OGT/OGA dans les synaptosomes du cortex sensorimoteur, en accord avec les observations faites sur d'autres structures telles que l'hippocampe ou le cervelet (Akimoto et al 2003, Cole & Hart 2001, Lagerlöf et al 2017, Tallent et al 2009). Ces résultats ne sont pas surprenants puisque la O-GlcNAcylation est connue pour être impliquée dans les différentes fonctions synaptiques, et en particulier dans la plasticité synaptique (Hwang & Rhim 2018). Le taux global des protéines O-GlcNAcylées était inchangé. Cependant, nous avons montré que les cellules non neuronales, en particulier les astrocytes, ainsi que les corps cellulaires des neurones présentent une forte immunofluorescence, caractérisant des taux élevés de protéines O-GlcNAcylées. Ainsi, il n'est pas exclu que l'observation du tissu entier masque une diminution subtile de la O-GlcNAcylation des protéines au niveau de la synapse.

La synapsine 1 est l'une des protéines O-GlcNAcylées les plus étudiées dans le cerveau. En effet, la cartographie de la synapsine 1 a révélé plusieurs sites O-GlcNAcylés dans des domaines régulateurs importants (Cole & Hart 1999, Kang et al 2013). Fait intéressant, nous avons démontré chez les rats PSM que la O-GlcNAcylation de la synapsine 1 était diminuée dans les synaptosomes du cortex sensorimoteur et inversement régulée dans la fraction cytosolique. La O-GlcNAcylation de la synapsine 1 (thr87) pourrait réguler son emplacement et sa fonction au niveau présynaptique par la variation de la densité des vésicules synaptiques regroupées le long des axones et la modulation de la taille et de la libération de vésicules synaptiques du pool de réserve (Skorobogatko et al 2014). Par conséquent, la O-GlcNAcylation de la synapsine 1 pourrait être un mécanisme clé pour moduler la plasticité présynaptique induite par une PSM.

La synapsine 1 peut également être phosphorylée à différents endroits. L'interaction entre la phosphorylation et la O-GlcNAcylation est complexe et spécifique. Selon Tallent et ses collaborateurs (Tallent et al 2009), ces deux modifications n'agissent pas de manière réciproque mais plutôt par une régulation synergique, puisque la phosphorylation de la synapsine 1 est augmentée en réponse à l'augmentation de la O-GlcNAcylation. Nous avons montré que les niveaux de phosphorylation de la synapsine 1 (ser62/67) et de la O-GlcNAcylation diminuaient significativement dans les synaptosomes. Nous pourrions émettre l'hypothèse que la diminution de la phosphorylation des ser62/67 pourrait être liée à la diminution de la O-GlcNAcylation de la synapsine 1, mais également, comme le montrent nos résultats, pourrait être due à la modulation de la voie ERK42/44. Les ser62/67 de la synapsine 1 sont des sites de substrat des kinases ERK42/44. Lorsqu'elle est phosphorylée, la synapsine 1 favorise le transfert des vésicules synaptiques du cytosquelette (où elles sont stockées) vers l'extrémité synaptique (où elles peuvent être libérées), entraînant une augmentation de la probabilité de libération des neurotransmetteurs (Cesca et al 2010, Tallent et al 2009). La phosphorylation de la synapsine 1 dépendante de ERK42/44 a un double rôle dans la régulation de la formation de synapses fonctionnelles et de la plasticité dépendante de l'activité, et régule ainsi la formation et la fonction synaptiques. Ainsi, chez les rats PSM, une diminution de la phosphorylation de la synapsine 1 ser62/67 et de sa O-GlcNAcylation suggère une diminution de la libération des neurotransmetteurs, contribuant éventuellement à une diminution de l'efficacité synaptique (Giachello et al 2010).

De plus, la disponibilité des vésicules synaptiques pour la libération dépend également de l'augmentation de la phosphorylation de la synapsine 1 au niveau du site de substrat de CaMKII, la ser603, en réponse à l'élévation de la O-GlcNAc (Tallent et al 2009). Cependant, dans notre étude, l'activation de CaMKII était inchangée, de même que la phosphorylation de la synapsine 1 sur la ser603. Il n'y avait pas non plus de changement dans la O-GlcNAcylation de la CaMKII, connue pour augmenter l'activité d'autophosphorylation et de kinase (Erickson et al 2013, Trinidad et al 2012). Selon Chi et al. (Chi et al 2003), l'absence de changement dans la phosphorylation et la O-GlcNAcylation de CaMKII suggère que la mobilisation du pool actif des vésicules synaptiques n'a pas changé.

Bien que, dans certains cas, la O-GlcNAcylation entre en compétition avec la phosphorylation sur les sites proximaux, la O-GlcNAcylation pourrait avoir des rôles de régulation directs indépendants des influences sur la phosphorylation de la synapsine 1, comme décrit par Skorobogatko et ses collègues (Skorobogatko et al 2014). Dans notre étude, la régulation différentielle des sites de la synapsine 1 par les voies ERK42/44, CaMKII et par la O-GlcNAcylation est en faveur d'une double régulation synergique et indique des niveaux de complexité supplémentaires dans la régulation de cette protéine synaptosomale chez les rats PSM.

pourrait induire des changements de la Une période de PSM balance phosphorylation/O-GlcNAcylation de protéines synaptiques autres que la synapsine 1. Nous nous sommes intéressés également aux AMPAR GluA2. Dans l'ensemble, nos données indiquent que la présence des AMPAR diminue à la surface postsynaptique après une période de PSM, suite à une augmentation de leur phosphorylation sur la ser880. Malheureusement, nous n'avons obtenu aucun résultat pour la O-GlcNAcylation des AMPAR GluA2 dans le cortex sensorimoteur contrairement à Taylor et ses collègues (Taylor et al 2014) dans l'hippocampe. Pour expliquer cette divergence, nous pouvons supposer que la O-GlcNAcylation des AMPAR GluA2 est plus élevée dans l'hippocampe que dans le cortex sensorimoteur. De plus, ces auteurs ont dû augmenter le niveau global de O-GlcNAcylation par exposition à la glucosamine de tranches d'hippocampe pour détecter la O-GlcNAcylation des AMPAR GluA2. Enfin, la O-GlcNAcylation des AMPAR GluA2 reste un sujet controversé puisque des résidus spécifiques modifiés par O-GlcNAc de GluA2 doivent encore être identifiés.

Ensuite, notre analyse protéomique différentielle nous a amené à nous intéresser à d'autres protéines potentiellement O-GlcNAcylées, telles que les neurofilaments ou la synaptotagmine 1. L'étude de Trinidad et ses collègues (Trinidad et al 2012) a montré que les neurofilaments-L et M peuvent être O-GlcNAcylés. De nombreuses études ont démontré que la phosphorylation du neurofilament-M joue un rôle critique dans la régulation de sa translocation, de la formation de son filament et de sa fonction (Elder et al 1998, Liu et al 2004). Il a été montré qu'une diminution du métabolisme du glucose dans le cerveau entraîne une diminution de la O-GlcNAcylation et une augmentation de la phosphorylation du neurofilament-M (Deng et al 2008). Nous avons montré que l'expression totale des neurofilaments-L et M varie au cours d'une période de PSM ; *il serait intéressant d'examiner également les taux de phosphorylation et de O-GlcNAcylation des neurofilaments au cours du temps*. Pour ce qui est de la synaptotagmine 1, aucune étude n'a encore montré que cette protéine est O-GlcNAcylée. Par contre, la synaptotagmine 1 possède un site de N-glycosylation intravésiculaire qui collabore avec ses domaines C2 cytoplasmiques en dirigeant la synaptotagmine 1 vers les vésicules synaptiques (Han et al 2004).

Enfin, l'analyse protéomique différentielle a également mis en évidence que la O-GlcNAcylation de protéines mitochondriales varie après 14 jours de PSM. Ces résultats restent encore à confirmer, cependant plusieurs études ont mis en évidence que la O-GlcNAcylation a un rôle important dans l'activité des protéines mitochondriales (Hu et al 2009, Pekkurnaz et al 2014).

Vers une régulation subtile de la O-GlcNAcylation au cours d'une PSM ?

De nombreuses études ont établi des corrélations entre le mode de vie sédentaire et le risque de développer un syndrome de « diabésité », c'est-à-dire une association entre le diabète de type II et l'obésité (Hu 2003, Rey-Lopez et al 2008). Le diabète de type II correspond à une élévation prolongée de la concentration de glucose dans le sang, favorisée par une insulino-résistance. L'insuline est un peptide neurorégulateur important dans le cerveau, où elle coordonne divers aspects de l'équilibre énergétique et de l'homéostasie du glucose périphérique (Dodd & Tiganis 2017). En condition physiologique, l'insuline est transportée vers le noyau arqué de l'hypothalamus et se fixe à son récepteur situé sur sur deux populations neuronales opposées : les neurones POMC (pro-opiomelanocortin) anorexigènes et les neurones AgRP/NPY (agouti-related peptide /neuropeptide Y) orexigènes. L'activation du récepteur active la voie de signalisation PI3K/AKT pour réguler la transcription des gènes des neuropeptides métaboliques et l'excitabilité neuronale. La signalisation de l'insuline dans ces neurones se propage au reste du cerveau et des tissus périphériques, comme le tissu adipeux et le foie, pour coordonner la prise alimentaire, la dépense énergétique et le métabolisme du glucose (Dodd & Tiganis 2017). Une altération de la signalisation de l'insuline, comme dans le cas d'une insulino-résistance cérébrale, se traduit par une dérégulation de la prise alimentaire entrainant une obésité (Blazquez et al 2014, Klockener et al 2011). Fait intéressant, les expressions de l'IGF-1 et de son récepteur diminuent après une période de PSM au niveau cérébral (Mysoet et al 2014). Il a été montré que l'IGF-1 pouvait se lier aux récepteurs à l'insuline et l'insuline aux récepteurs à l'IGF-1. En outre, les récepteurs à l'IGF-1, comme ceux à l'insuline, activent préférentiellement la voie de signalisation PI3K-AKT.

Aussi, l'étude de cette modification post-traductionnelle est particulièrement pertinente dans le cadre de notre modèle d'inactivité **puisqu'elle est connue pour être régulée par des facteurs nutritionnels et métaboliques au niveau cérébral**, dont l'insuline. La O-GlcNAcylation est nécessaire pour la transduction et l'amplification correctes des signaux initiés au niveau de la membrane plasmique par l'insuline (Zeidan & Hart 2010). L'activation de la PI3K, déclenchée par la fixation de l'insuline à son récepteur, entraîne la localisation de l'OGT du noyau vers la membrane plasmatique, où elle est recrutée par liaison au PIP3 (phosphatidylinositol (3, 4, 5) – trisphosphate). Lors de la translocation sur la membrane plasmique, l'OGT s'associe au récepteur de l'insuline et devient phosphorylée, ce qui augmente l'activité de l'OGT (Whelan et al 2008). Cette redistribution et activation de l'OGT permet la modification dynamique par la O-GlcNAcylation des cibles en aval dans la voie de l'insuline, telles que IRS-1 (substrat du récepteur de l'insuline 1) (Ball et al 2006, Klein et al

Discussion générale

2009), AKT et l'OGT lui-même (Vosseller et al 2002, Whelan et al 2008, Yang et al 2008). Une activité accrue de la voie de biosynthèse des hexosamines (voie permettant la production, à partir de glucose, d'UDP-GlcNAc, substrat de l'OGT pour O-GlcNAcyler une protéine) est associée au développement d'une insulino-résistance (McClain & Crook 1996). En outre, la suractivation de la voie des hexosamines enclenche un dérèglement de la balance phosphorylation/O-GlcNAcylation des protéines impliquées dans la voie de l'insuline, provoquant une mauvaise activation/inactivation de la voie qui sous-tend le phénomène de résistance à l'insuline.

L'obésité et la sédentarité sont les deux principaux facteurs responsables de l'augmentation des triglycérides (Hamburg et al 2007, Howard et al 2003). La leptine est une adipokine qui joue un rôle fondamental dans la régulation neuronale des tissus adipeux. Comme pour l'insuline, les récepteurs de la leptine sont exprimés sur les deux populations neuronales de l'hypothalamus : les neurones POMC et AgRP/NPY. La stimulation par la leptine des neurones NPY diminue leur activité et atténue la prise alimentaire, alors que ses actions sur les neurones POMC sont opposées (Pandit et al 2017). Il semblerait que la O-GlcNAcylation soit également régulée par la leptine au niveau cérébral. Une délétion du gène codant la leptine chez la souris diminue le taux de O-GlcNAcylation et sa distribution est altérée dans l'hippocampe, résultant peut-être d'une réduction de l'OGT. Une restriction calorique réverse ces effets sur la O-GlcNAc et l'OGT dans certaines parties de l'hippocampe (Jeon et al 2016). Les mécanismes sous-jacents de ces résultats sont, cependant, difficiles à interpréter car la leptine peut réguler directement la O-GlcNAcylation, indépendamment de l'état métabolique de l'animal (Harris & Apolzan 2015, Zimmerman & Harris 2015). Par ailleurs, une augmentation des triglycérides pendant une période d'inactivité devrait induire une augmentation des taux de leptine au niveau cérébral. Or, les résultats sont contradictoires : chez des patients alités, le taux de leptine augmente après 7 jours (Blanc et al 2000) ou ne change pas après 20 et 60 jours (Bergouignan et al 2010, Kanikowska et al 2010), tandis qu'il diminue après 28 jours d'HH chez l'animal (Baek et al 2008). De plus, les triglycérides induisent une résistance à la leptine au niveau de la barrière hématoencéphalique (Banks 2004). Ainsi, la régulation de la O-GlcNAcylation par la leptine au niveau cérébral après une période d'inactivité reste encore à élucider.

D'autres facteurs peuvent intervenir dans la régulation de la O-GlcNAcylation : il existe des preuves que l'activité neuronale régule la O-GlcNAcylation indépendamment des changements énergétiques du neurone. La modulation de l'activité neuronale par l'induction d'une LTP ou LTD sur des tranches d'hippocampe semble moduler le taux global de O-GlcNAcylation (Taylor et al 2014, Yang et al 2017). Par ailleurs, l'augmentation de la décharge neuronale par blocage de la neurotransmission inhibitrice de cellules corticales primaires est associée à une augmentation de la O-GlcNAcylation de la 2017). Une

période de PSM entraîne une diminution de l'activité des interneurones GABAergiques, et une réactivité accrue des neurones de l'aire corticale des membres postérieurs (Dupont et al 2003) pouvant potentiellement entraîner une variation du taux de O-GlcNAcylation dans ces interneurones. Par ailleurs, il n'est pas à exclure que l'activité d'autres neurones augmente après une PSM. *Aussi, il serait intéressant d'examiner indépendamment l'activité neuronale et les variations de O-GlcNAcylation des différentes catégories de neurones (interneurones GABAergiques, neurones excitateurs glutamatergiques...) en réponse à une période de PSM.*

L'ensemble de ces hypothèses sur l'implication des facteurs métaboliques et de l'activité neuronale dans la modulation de la régulation de la O-GlcNAcylation reste encore à vérifier. En effet, dans nos études nous n'avons pas montré de variation de la O-GlcNAcylation globale au niveau du cortex sensorimoteur, mais des changements subtils de la O-GlcNAcylation de quelques protéines synaptiques. L'activité neuronale peut aussi impliquer les voies de phosphorylation, pour affecter la O-GlcNAcylation de protéines spécifiques plutôt que la O-GlcNAcylation globale.

La O-GlcNAcylation peut-elle influencer la réorganisation corticale induite par une PSM ?

Le cortex somesthésique est particulièrement affecté par une période de PSM. En effet, que ce soit chez l'Homme ou l'animal, une PSM entraîne une réorganisation corticale importante. Celle-ci se caractérise par une diminution de la surface de la représentation corticale du membre restreint (immobilisation ou HH) (Coq & Xerri 1999, Langer et al 2012, Langlet et al 1999, Lissek et al 2009), d'un élargissement des champs récepteurs cutanés (Coq & Xerri 1999, Dupont et al 2011b), ainsi qu'une diminution de l'excitabilité corticale (Dupont et al 2003). Des études ont permis de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans ces remaniements corticaux : la dynamique de cette réorganisation corticale est possible à court et long termes grâce à des modifications d'efficacité synaptique, au masquage/démasquage de synapses, ou encore à des modifications morphologiques des épines dendritiques. Cette plasticité synaptique est en outre dépendante de mécanismes moléculaires impliquant l'action de neurotransmetteurs (acétylcholine, glutamate, GABA) (Canu et al 2006, D'Amelio et al 1996, Dupont et al 2002) ou de neurotrophines (NGF, BDNF) (Dupont et al 2005), l'activation (phosphorylation) de voies de signalisation intracellulaire (PI3K-AKT, MAPK...) (Dupont et al 2011b, Mysoet et al 2014) ou de récepteurs membranaires (NMDA, AMPA...) (Sherman 2014, Xerri 1998).

Discussion générale

Il est à noter que la réorganisation de la représentation corticale de la patte postérieure et l'évolution de la plasticité synaptique présentent des décours différents. En effet, si la diminution de la représentation corticale de la patte postérieure est nettement visible après 14 jours de PSM (Dupont et al 2001, Dupont et al 2011b, Langlet et al 1999), une désorganisation de cette représentation commence à apparaître dès 7 jours (Langlet et al 1999), alors que les changements synaptiques que nous avons décrits ne sont pas tous significatifs à J7. D'autres études sont nécessaires afin d'élucider les mécanismes à court terme, responsable de la phase d'induction de la plasticité. Il aurait également été intéressant de prolonger l'observation de la plasticité synaptique au cours d'une plus longue période de PSM (la diminution de surface de l'aire de représentation corticale après 14 jours est transitoire ; celle-ci revient à la normale après 28 jours de PSM (Dupont et al. 2011)) afin de déterminer si les taux d'expression et d'activation des différentes protéines synaptiques reviennent également à leur niveau de base ou si la taille des cartes corticales est indépendante des changements synaptiques. En effet, nous n'observons que peu d'effets sur les protéines synaptiques au cours d'une période de récupération de 6 à 24 h alors que la représentation corticale de la patte postérieure revient à une taille normale en 6 h (Dupont et al 2001).

La O-GlcNAcylation a de nombreux rôles au niveau cérébral, et pourrait être impliquée dans la réorganisation corticale induite par une PSM. En effet, plusieurs protéines synaptiques importantes dans les processus de LTP/LTD sont O-GlcNAcylées (AMPAR, CREB, synapsine 1...) (Kang et al 2013, Rexach et al 2012, Taylor et al 2014). Nos résultats de l'analyse protéomique ont montré que certaines de ces protéines pouvaient être modulées par une PSM. Nous avons notamment mis en évidence que le taux de glycosylation de la synapsine 1 était diminué dans les synaptosomes du cortex sensorimoteur de rat PSM. La O-GlcNAcylation pourrait également être impliquée dans les modifications morphologiques des épines dendritiques, puisque l'activité de protéines du cytosquelette (tubuline, neurofilaments) sont modifiées par la O-GlcNAc (Deng et al 2008, Ji et al 2011). De plus, la O-GlcNAcylation peut moduler la phosphorylation des voies de signalisation impliquées dans les processus synaptiques (par exemple, CaMKII, MAPK, AKT) (Dias et al 2012, Erickson et al 2013, Gandy et al 2006, Tallent et al 2009). Enfin, la O-GlcNAcylation en régulant des canaux ioniques, tels que le canal potassique Kcnq3 (Ruan et al 2014), peut moduler l'excitabilité neuronale. Ces données renforcent l'hypothèse selon laquelle la **O-GlcNAcylation pourrait être un acteur majeur dans la réorganisation du cortex somesthésique induite par une PSM.**

Nous avons perfusé chroniquement, pendant toute la durée d'une PSM, du Thiamet G sur le cortex des rats. Le Thiamet G est un inhibiteur spécifique de l'OGA permettant d'augmenter les taux de O-GlcNAcylation. Il s'agit d'un des inhibiteurs de l'OGA les plus efficaces disponibles commercialement, s'avérant être hautement stable, soluble et sélectif de l'OGA. Par ailleurs, les

240

études où le Thiamet G est utilisé démontrent que cet inhibiteur n'est pas toxique (Taylor et al 2014, Yu et al 2012, Yuzwa et al 2008, Yuzwa et al 2012). Notre hypothèse était qu'une modulation des taux de O-GlcNAcylation pourrait prévenir la réorganisation corticale induite par une PSM. Nos études ont montré que cette administration de Thiamet G prévient totalement la réduction de l'aire corticale de la patte postérieure, limite l'élargissement des champs récepteurs cutanés ainsi que l'augmentation du seuil d'activation des neurones du cortex somesthésique. Ces résultats mettent en évidence que **la O-GlcNAcylation joue un rôle important dans la plasticité corticale induite par une PSM**.

De précédentes études effectuées dans notre équipe ont montré qu'une perfusion chronique de différents agents au niveau cérébral avait différentes répercussions sur la réorganisation du cortex somesthésique. Une administration d'un antagoniste de la voie des MAPK ou d'un antagoniste muscarinique au cours d'une PSM prévient la réduction de la représentation corticale de la patte postérieure (Dupont et al 2002, Dupont et al 2011b), tandis que l'administration d'IGF-1 non seulement prévient la réduction, mais augmente même la surface de cette représentation corticale (Mysoet et al 2015). Pour ce qui est des champs récepteurs cutanés, seul l'antagoniste muscarinique prévenait leur élargissement (Dupont et al 2002). L'excitabilité corticale n'a été évaluée qu'après l'administration d'IGF-1 mais cette dernière n'a pas eu d'effet (Mysoet et al 2015). Il est intéressant de noter que la modulation de la O-GlcNAcylation prévient les trois facteurs (surface corticale, champs récepteurs et seuil d'activation) en comparaison des antagonistes des MAPK, muscarinique et de l'IGF-1. L'ACh, la voie MAPK/ERK et l'IGF-1 ont certes de nombreux rôles au niveau cérébral mais ne peuvent pas agir sur l'ensemble des paramètres neuronaux impactés par une PSM. A l'inverse, la O-GlcNAcylation est une modification post-traductionnelle pouvant toucher un grand nombre de protéines et de voies de signalisation impliquées dans la plupart des processus neuronaux : morphologie et excitabilité neuronale, plasticité synaptique... (Hwang & Rhim 2018).

Les études sur la O-GlcNAcylation au niveau du système nerveux central se sont principalement focalisées sur l'hippocampe et la transmission des synapses excitatrices glutamatergiques. Le système GABAergique joue un rôle fondamental dans la réorganisation du cortex somesthésique et des cartes corticales sensorielles induite par une PSM (Canu et al 2006, D'Amelio et al 1996). Il serait intéressant d'examiner l'implication de la O-GlcNAcylation au niveau des interneurones GABAergiques et de la libération de GABA au cours d'une PSM.

La prévention de la réorganisation corticale par la O-GlcNAcylation peut-elle prévenir la dégradation des performances motrices ?

Nous avons mis en évidence qu'une modulation des taux de O-GlcNAcylation au niveau du cortex sensorimoteur prévenait la réorganisation corticale du cortex somesthésique, et d'autres conséquences comme l'élargissement des champs récepteurs et l'augmentation du seuil d'activation induites par une période de PSM. Est-ce que **la prévention de la réorganisation du cortex somesthésique par l'augmentation de O-GlcNAcylation pourrait avoir un effet sur la dégradation des performances motrices** induite par une PSM ?

L'altération des performances sensorimotrices (activité spontanée, locomotion et posture, retrait de la patte...) induite par une période de PSM est due à des facteurs musculaires (atrophie, changement phénotypique, perte de force) mais également à des facteurs nerveux. En effet, l'étude de Canu et ses collègues (Canu et al 2001b) montre que l'administration de clenbuterol, molécule permettant d'induire une hypertrophie musculaire, chez des rats PSM permet de limiter les effets sur le muscle, mais n'a aucun effet sur la dégradation de la locomotion. Plusieurs arguments suggèrent que les variations de surface des cartes corticales seraient associées aux performances motrices. Chez l'Homme, l'augmentation de la surface corticale de l'index au niveau cortex somesthésique suite à une succession de stimulations tactiles est associée à une augmentation de la discrimination tactile (Hodzic et al 2004). A l'inverse, une immobilisation des doigts entraine une réduction de leur représentation corticale et une diminution de la discrimination tactile (Lissek et al 2009). Sur notre modèle animal de PSM, le lien entre les cartes somatotopiques et les performances motrices a été particulièrement étudié. Nous savons que la diminution de la représentation des pattes postérieures au niveau des cortex somesthésique (Langlet et al 1999) comme moteur (Langlet et al 2012) est associée à une profonde dégradation des performances sensorimotrices (Canu & Garnier 2009, Canu et al 2005, Mysoet et al 2017, Mysoet et al 2015), sans qu'il soit possible de dire clairement s'il existe une relation de cause à effet.

Une modulation des taux de O-GlcNAcylation au niveau du système nerveux peut avoir des conséquences sur divers comportements tels que la prise alimentaire (Lagerlof et al 2016), les processus d'apprentissage et mémoire et potentiellement sur les fonctions neuromusculaires (Su & Schwarz 2017, Taylor et al 2014, Yang et al 2017). Ainsi, notre hypothèse était que lors d'une PSM, l'action bénéfique d'une modulation des taux de O-GlcNAcylation sur la réorganisation corticale et ses effets sur le comportement pourrait prévenir la dégradation des performances motrices. En réalité, nos résultats montrent qu'une administration de Thiamet G au niveau cortical ne prévient pas la dégradation des performances motrices, que ce soit l'activité spontanée, la coordination motrice ou la résistance à la fatigue. Si la perfusion de Thiamet G au niveau du cortex sensorimoteur a des effets bénéfiques (paramètres temporels de la locomotion, index de régularité), elle a aussi des effets délétères : les rats PSM recevant du Thiamet G montraient un placement de la patte postérieure très altéré (surface des empreintes, intensité maximale au contact maximal). De plus, chez des rats témoins recevant du Thiamet G, nous avons observé une hyperactivité générale que ce soit lors de l'analyse de l'activité spontanée que lors des passages sur le Catwalk XT (vitesse de marche).

Plusieurs raisons peuvent expliquer ces résultats. D'une part, la modulation des taux de O-GlcNAcylation au niveau du cortex cérébral a peut-être peu de conséquences sur le pattern locomoteur car celui-ci est régulé de manière automatique au niveau du CPG situé dans la moelle épinière. D'autre part, nous avons fait en sorte de perfuser le Thiamet G localement au niveau du cortex sensorimoteur droit. Or, le cortex sensorimoteur gauche et d'autres structures sont impliqués dans le contrôle moteur et peuvent être également impactées par une période de PSM. L'étude protéomique de la plasticité synaptique après 14 jours de PSM a également mis en évidence que des changements synaptiques s'opéreraient dans le striatum et le cervelet. En résumé, les signaux sensoriels détectent et corrigent l'instabilité posturale en agissant sur le cortex cérébral, le cervelet et le tronc cérébral (Takakusaki 2017). Ainsi, le cervelet et les noyaux gris centraux (comprenant le striatum) peuvent également contribuer à divers aspects du contrôle locomoteur. *Au vu de ces informations, il serait intéressant de ne pas se concentrer uniquement sur le cortex sensorimoteur mais également sur les autres structures motrices impliquées dans le contrôle moteur en effectuant par exemple une injection intracérébrospinale de Thiamet G.*

Toutefois, nous avons, pour la première fois, mis en évidence des effets périphériques suite à l'administration d'un agent pharmacologique au niveau cortical. En effet, nous avons constaté que le Thiamet G prévient partiellement l'augmentation du temps de retrait de la patte chez les rats PSM. Cette constatation peut être expliquée par le fait que le cycle de O-GlcNAcylation est indispensable à la survie et au maintien des neurones sensoriels périphériques. Des souris avec une délétion de l'OGT

Discussion générale

spécifiquement dans les neurones sensoriels montraient une réduction de leur sensibilité thermique et tactile des pattes postérieures (Su & Schwarz 2017). Une augmentation du taux de O-GlcNAcylation pourrait avoir un effet inverse et augmenter ou maintenir une sensibilité tactile. Cependant, il est à prendre en compte que nous avons modulé les taux de O-GlcNAcylation au niveau cérébral et non en périphérie. Or, si le Thiamet G est connu pour pouvoir passer la barrière hémato-encéphalique (Yuzwa et al 2008), la dose que nous avons utilisée (100 µM) est trop faible pour que l'on puisse envisager un effet en périphérie après dilution dans le compartiment sanguin. De plus, le test de von Frey électronique est classiquement utilisé pour évaluer la douleur : un rat contrôle retire sa patte quand il sent le filament et/ou quand la sensation devient douloureuse. Ainsi, l'augmentation du seuil de retrait reflète donc une moindre sensibilité et/ou une instabilité posturale plutôt qu'un changement de sensibilité tactile.

Les résultats phénotypiques du muscle soléaire doivent être confirmés en augmentant le nombre de muscles à analyser. Ils auraient pu expliquer que les performances motrices des rats PSM recevant du Thiamet G sont plus altérées que chez les rats du groupe PSM. A notre connaissance, aucune étude n'a encore exploré si une application directe de Thiamet G sur le muscle soléaire affecte son phénotype. Cependant, il est connu qu'un traitement au Thiamet G augmente l'affinité calcique des fibres soléaires lentes ou augmente les taux de O-GlcNAcylation de plusieurs protéines contractiles régulatrices, principalement des isoformes rapides (Cieniewski-Bernard et al 2012). Cela étant, comme explicité plus haut, la dose de Thiamet G utilisée rend très improbable une action directe sur le muscle via le compartiment sanguin. *Il serait intéressant de réaliser en conditions chroniques des enregistrements électrophysiologiques du cortex sensorimoteur d'une part et de l'activité électromyographique d'autre part chez des rats munis d'une pompe délivrant du Thiamet G, afin de déterminer si cette substance modifie le message moteur.*

La O-GlcNAcylation, un espoir thérapeutique ?

L'objectif de ces travaux était d'améliorer nos connaissances sur les mécanismes impliqués dans la réorganisation corticale induite par une période de PSM. Une meilleure compréhension de cette plasticité corticale permettrait à terme de développer des stratégies de prévention ou l'amélioration des stratégies de récupération fonctionnelle chez des patients alités ou immobilisés. Est-ce que la O-GlcNAcylation peut-être une cible thérapeutique ? Une accumulation de preuves suggère que la régulation de la O-GlcNAcylation est étroitement liée aux maladies neurodégénératives et plusieurs auteurs s'accordent sur le fait que la O-GlcNAcylation pourrait être une aide au diagnostic ou avoir un potentiel thérapeutique **(Figure 91)** (Akan et al 2018).





Discussion générale

Actuellement, la communauté scientifique porte un grand intérêt à l'utilisation de techniques d'imagerie non invasives [IRMf (imagerie à résonnance magnétique fonctionnelle), PET (*positron emission tomograph*)] pour prédire quels patients développeront des maladies neurodégénératives (Shimizu et al 2018). Un hypométabolisme glucidique est observé dans les régions du cerveau sujettes à la neurodégénérescence. Ainsi, plusieurs radiotraceurs (par exemple, la fluorine 18, FDG) utilisés avec la technique de PET ont été développés pour surveiller la fonction cérébrale et le profilage de l'utilisation du glucose et des molécules associées. Cette technique permet d'évaluer l'état de la maladie et l'efficacité du traitement (Landau et al 2011). Que ce soit pour les maladies neurodégénératives ou dans d'autres situations, pouvant impacter le métabolisme glucidique et le cycle de O-GlcNAcylation, telles qu'un alitement prolongé, il serait intéressant de **développer des radiotraceurs pour suivre les variations des taux de O-GlcNAcylation au cours du temps**. Des inhibiteurs de l'OGA et des ligands complémentaires de PET ont d'ores et déjà été développés et utilisés dans des études précliniques (Smith et al 2016).

Étant donné que la O-GlcNAc et ses enzymes associées semblent critiques pour l'activité et la stabilité des protéines et le développement de pathologies, la modulation des taux globaux de O-GlcNAcylation au niveau cérébral est devenue une cible thérapeutique intéressante. Les inhibiteurs pharmaceutiques du cycle de la O-GlcNAcylation sont alors apparus comme une solution thérapeutique potentielle à la neurodégénérescence. Cette idée a été particulièrement étudiée dans le cas de la maladie d'Alzheimer et l'hyperphosphorylation de la protéine tau. En effet, plusieurs études ont mis en évidence que l'administration de Thiamet G au niveau cérébral permettait de diminuer la phosphorylation de Tau et son agrégation, en augmentant sa O-GlcNAcylation, sur différents modèles de souris (Graham et al 2014, Yu et al 2012, Yuzwa et al 2008, Yuzwa et al 2012). De plus, l'utilisation d'inhibiteur de l'OGA entraîne également la diminution de formation de plaques amyloïdes, un autre marqueur de la maladie d'Alzheimer, et améliore les capacités cognitives (Yuzwa et al 2014). Dans le cadre des travaux de cette thèse, nous avons montré qu'une modulation des taux de O-GlcNAcylation au niveau du cortex sensorimoteur avait également des effets bénéfiques en prévenant la réorganisation du cortex somesthésique, ainsi que l'élargissement des champs récepteurs et l'augmentation de l'excitabilité corticale. Ces résultats laissent penser que le Thiamet G pourrait également être une solution thérapeutique potentielle pour améliorer la condition des personnes alités ou immobilisés. Cependant, la modulation des taux de O-GlcNAcylation ne prévient pas la dégradation des performances motrices induite par une PSM. Il faut également envisager les effets secondaires possibles de l'utilisation systémique des inhibiteurs de l'OGA. Comme nous l'avons évoqué à plusieurs reprises, la O-GlcNAcylation est d'une importance cruciale dans les fonctions physiologiques des cellules et organes ; ainsi, l'augmentation de la O-

246

GlcNAcylation pourrait être à l'origine d'évolutions pathologiques dans d'autres tissus ou organes (Bond & Hanover 2015). En outre, il existe plusieurs mises en garde concernant la manipulation pharmacologique des taux de O-GlcNAcylation. Plus précisément, les modifications aiguës et chroniques de O-GlcNAcylation peuvent entraîner différents effets cellulaires. Ainsi, l'inhibition aiguë de l'OGA est en corrélation avec une diminution de la phosphorylation des protéines, mais l'inhibition à plus long terme n'affecte pas la phosphorylation de protéines telles que la protéine tau, suggérant que les cellules s'adaptent (Zhu et al 2014). De plus, il existe des milliers d'autres protéines dont la O-GlcNAcylation peut être modulée par un ciblage thérapeutique des enzymes OGT/OGA entraînant des conséquences inattendues.

Par conséquent, il est d'une importance cruciale d'élucider les mécanismes d'action de la O-GlcNAcylation et de ses enzymes – sites de O-GlcNAcylation, effet sur l'activité des protéines, dans quelles circonstances et dans quels buts, dans des conditions physiologiques et pathologiques... – au niveau cérébral afin de mieux cibler les stratégies de prévention et de récupération thérapeutique.

<u>REFERENCES</u> <u>BIBLIOGRAPHIQUES</u>

- Adams GR, Caiozzo VJ, Baldwin KM. 2003. Skeletal muscle unweighting: spaceflight and ground-based models. *J Appl Physiol (1985)* 95: 2185-201
- Aiga M, Levinson JN, Bamji SX. 2011. N-cadherin and Neuroligins Cooperate to Regulate Synapse Formation in Hippocampal Cultures. *The Journal of biological chemistry* 286: 851-58
- Aihara M, Hirose N, Katsuta W, Saito F, Maruyama H, Hagiwara H. 2017. A new model of skeletal muscle atrophy induced by immobilization using a hook-and-loop fastener in mice. *J Phys Ther Sci* 29: 1779-83
- Akan I, Olivier-Van Stichelen S, Bond MR, Hanover JA. 2018. Nutrient-driven O-GlcNAc in proteostasis and neurodegeneration. *Journal of Neurochemistry* 144: 7-34
- Akhtar ND, Land PW. 1991. Activity-dependent regulation of glutamic acid decarboxylase in the rat barrel cortex: Effects of neonatal versus adult sensory deprivation. *Journal of Comparative Neurology* 307: 200-13
- Akimoto Y, Comer FI, Cole RN, Kudo A, Kawakami H, et al. 2003. Localization of the O-GlcNAc transferase and O-GlcNAc-modified proteins in rat cerebellar cortex. *Brain Research* 966: 194-205
- Alfaro JF, Gong C-X, Monroe ME, Aldrich JT, Clauss TRW, et al. 2012a. Tandem mass spectrometry identifies many mouse brain O-GlcNAcylated proteins including EGF domain-specific O-GlcNAc transferase targets. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109: 7280-85
- Alkner BA, Tesch PA. 2004. Knee extensor and plantar flexor muscle size and function following 90 days of bed rest with or without resistance exercise. *European journal of applied physiology* 93: 294-305
- Anderson J, Almeida-Silveira MI, Perot C. 1999. Reflex and muscular adaptations in rat soleus muscle after hindlimb suspension. *J Exp Biol* 202: 2701-7
- Angel A, Clarke KA. 1975. An analysis of the representation of the forelimb in the ventrobasal thalamic complex of the albino rat. *The Journal of Physiology* 249: 399-423
- Anggono V, Huganir RL. 2012. Regulation of AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. *Current Opinion in Neurobiology* 22: 461-69
- Antonutto G, Capelli C, Girardis M, Zamparo P, di Prampero PE. 1999. Effects of microgravity on maximal power of lower limbs during very short efforts in humans. *J Appl Physiol (1985)* 86: 85-92
- Anwyl R. 2006. Induction and expression mechanisms of postsynaptic NMDA receptorindependent homosynaptic long-term depression. *Progress in Neurobiology* 78: 17-37
- Armstrong-James M, Fox K, Das-Gupta A. 1992. Flow of excitation within rat barrel cortex on striking a single vibrissa. *Journal of Neurophysiology* 68: 1345-58
- Armstrong DM. 1988. The supraspinal control of mammalian locomotion. *The Journal of Physiology* 405: 1-37

- Bacaj T, Wu D, Burré J, Malenka RC, Liu X, Südhof TC. 2015. Synaptotagmin-1 and -7 Are Redundantly Essential for Maintaining the Capacity of the Readily-Releasable Pool of Synaptic Vesicles. *PLOS Biology* 13: e1002267
- Baek K, Barlow AA, Allen MR, Bloomfield SA. 2008. Food restriction and simulated microgravity: effects on bone and serum leptin. *Journal of Applied Physiology* 104: 1086-93
- Bähler M, Greengard P. 1987. Synapsin I bundles F-actin in a phosphorylation-dependent manner. *Nature* 326: 704
- Bai J, Chapman ER. 2004. The C2 domains of synaptotagmin partners in exocytosis. *Trends in Biochemical Sciences* 29: 143-51
- Ball LE, Berkaw MN, Buse MG. 2006. Identification of the Major Site of O-Linked β-N-Acetylglucosamine Modification in the C Terminus of Insulin Receptor Substrate-1. *Molecular* & Cellular Proteomics 5: 313-23
- Ballermann M, Fouad K. 2006. Spontaneous locomotor recovery in spinal cord injured rats is accompanied by anatomical plasticity of reticulospinal fibers. *European Journal of Neuroscience* 23: 1988-96
- Bamman MM, Clarke MS, Feeback DL, Talmadge RJ, Stevens BR, et al. 1998. Impact of resistance exercise during bed rest on skeletal muscle sarcopenia and myosin isoform distribution. *J Appl Physiol (1985)* 84: 157-63
- Bandrowski AE, Huguenard JR, Prince DA. 2003. Baseline Glutamate Levels Affect Group I and II mGluRs in Layer V Pyramidal Neurons of Rat Sensorimotor Cortex. *Journal of Neurophysiology* 89: 1308-16
- Banke TG, Bowie D, Lee H, Huganir RL, Schousboe A, Traynelis SF. 2000. Control of GluR1 AMPA receptor function by cAMP-dependent protein kinase. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 20: 89-102
- Banks WA. 2004. The many lives of leptin. *Peptides* 25: 331-38
- Barbosa AA, Del Carlo RJ, Galvão SR, Vilela MJ, Louzada MJQ, et al. 2011. Bone mineral density of rat femurs after hindlimb unloading and different physical rehabilitation programs. *Revista Ceres* 58: 407-12
- Bassani S, Folci A, Zapata J, Passafaro M. 2013. AMPAR trafficking in synapse maturation and plasticity. *Cell Mol Life Sci* 70: 4411-30
- Bats C, Groc L, Choquet D. 2007. The Interaction between Stargazin and PSD-95 Regulates AMPA Receptor Surface Trafficking. *Neuron* 53: 719-34
- Belichenko PV, Krasnov IB. 1991. The dendritic spines of the pyramidal neurons in layer V of the rat sensorimotor cortex following a 14-day space flight. *Biull Eksp Biol Med* 112: 541-2
- Beloozerova IN, Sirota MG, Swadlow HA. 2003. Activity of Different Classes of Neurons of the Motor Cortex during Locomotion. *The Journal of Neuroscience* 23: 1087-97
- Bender KJ, Allen CB, Bender VA, Feldman DE. 2006. Synaptic Basis for Whisker Deprivation-Induced Synaptic Depression in Rat Somatosensory Cortex. *The Journal of Neuroscience* 26: 4155-65
- Benfenati F, Neyroz P, Bahler M, Masotti L, Greengard P. 1990. Time-resolved fluorescence study of the neuron-specific phosphoprotein synapsin I. Evidence for phosphorylation-dependent conformational changes. *The Journal of biological chemistry* 265: 12584-95
- Berg HE, Dudley GA, Haggmark T, Ohlsen H, Tesch PA. 1991. Effects of lower limb unloading on skeletal muscle mass and function in humans. *Journal of Applied Physiology* 70: 1882-85
- Berg HE, Dudley GA, Hather B, Tesch PA. 1993. Work capacity and metabolic and morphologic characteristics of the human quadriceps muscle in response to unloading. *Clinical physiology (Oxford, England)* 13: 337-47

- Bergouignan A, Momken I, Schoeller DA, Normand S, Zahariev A, et al. 2010. Regulation of Energy Balance during Long-Term Physical Inactivity Induced by Bed Rest with and without Exercise Training. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 95: 1045-53
- Blanc S, Normand S, Pachiaudi C, Duvareille M, Gharib C. 2000. Leptin responses to physical inactivity induced by simulated weightlessness. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 279: R891-R98
- Blanpied TA, Kerr JM, Ehlers MD. 2008. Structural plasticity with preserved topology in the postsynaptic protein network. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105: 12587-92
- Blazquez E, Velazquez E, Hurtado-Carneiro V, Ruiz-Albusac JM. 2014. Insulin in the brain: its pathophysiological implications for States related with central insulin resistance, type 2 diabetes and Alzheimer's disease. *Frontiers in endocrinology* 5: 161
- Bliss TVP, Lømo T. 1973. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *The Journal of Physiology* 232: 331-56
- Bloemberg D, Quadrilatero J. 2012. Rapid Determination of Myosin Heavy Chain Expression in Rat, Mouse, and Human Skeletal Muscle Using Multicolor Immunofluorescence Analysis. *PLOS ONE* 7: e35273
- Bloom O, Evergren E, Tomilin N, Kjaerulff O, Löw P, et al. 2003. Colocalization of synapsin and actin during synaptic vesicle recycling. *The Journal of Cell Biology* 161: 737-47
- Bloomberg JJ, Mulavara AP. 2003. Changes in walking strategies after spaceflight. *IEEE* engineering in medicine and biology magazine : the quarterly magazine of the Engineering in Medicine & Biology Society 22: 58-62
- Bodaleo FJ, Gonzalez-Billault C. 2016. The Presynaptic Microtubule Cytoskeleton in Physiological and Pathological Conditions: Lessons from Drosophila Fragile X Syndrome and Hereditary Spastic Paraplegias. *Frontiers in Molecular Neuroscience* 9
- Bodine SC. 2013. Disuse-induced muscle wasting. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 45: 2200-08
- Bodine SC, Latres E, Baumhueter S, Lai VK, Nunez L, et al. 2001. Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science* 294: 1704-08
- Boehm J, Kang MG, Johnson RC, Esteban J, Huganir RL, Malinow R. 2006. Synaptic Incorporation of AMPA Receptors during LTP Is Controlled by a PKC Phosphorylation Site on GluR1. *Neuron* 51: 213-25
- Bogen IL, Boulland JL, Mariussen E, Wright MS, Fonnum F, et al. 2006. Absence of synapsin I and II is accompanied by decreases in vesicular transport of specific neurotransmitters. *J Neurochem* 96: 1458-66
- Bolton PS, Tracey DJ. 1992. Neurons in the dorsal column nuclei of the rat respond to stimulation of neck mechanoreceptors and project to the thalamus. *Brain Res* 595: 175-9
- Bond MR, Hanover JA. 2015. A little sugar goes a long way: the cell biology of O-GlcNAc. *J Cell Biol* 208: 869-80
- Bonnet F, Irving K, Terra JL, Nony P, Berthezène F, Moulin P. 2005. Anxiety and depression are associated with unhealthy lifestyle in patients at risk of cardiovascular disease. *Atherosclerosis* 178: 339-44
- Booth FW, Kelso JR. 1973. Production of rat muscle atrophy by cast fixation. *Journal of Applied Physiology* 34: 404-06
- Booth SL, Sallis JF, Ritenbaugh C, Hill JO, Birch LL, et al. 2001. Environmental and Societal Factors Affect Food Choice and Physical Activity: Rationale, Influences, and Leverage Points. *Nutrition Reviews* 59: S21-S36
- Borodkin VS, Schimpl M, Gundogdu M, Rafie K, Dorfmueller HC, et al. 2014. Bisubstrate UDP– peptide conjugates as human O-GlcNAc transferase inhibitors. *Biochemical Journal* 457: 497-502

- Braun RJ, Kinkl N, Beer M, Ueffing M. 2007. Two-dimensional electrophoresis of membrane proteins. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 389: 1033-45
- Brocca L, Cannavino J, Coletto L, Biolo G, Sandri M, et al. 2012. The time course of the adaptations of human muscle proteome to bed rest and the underlying mechanisms. *J Physiol* 590: 5211-30
- Brodal A. 1974. Anatomy of the Vestibular Nuclei and their Connections In *Vestibular System Part 1: Basic Mechanisms*, ed. HH Kornhuber, pp. 239-352. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg
- Brosamle C, Schwab ME. 1997. Cells of origin, course, and termination patterns of the ventral, uncrossed component of the mature rat corticospinal tract. *J Comp Neurol* 386: 293-303
- Brower RG. 2009. Consequences of bed rest. *Critical Care Medicine* 37: S422-S28
- Brown CE, Sweetnam D, Beange M, Nahirney PC, Nashmi R. 2012. α4* Nicotinic Acetylcholine Receptors Modulate Experience-Based Cortical Depression in the Adult Mouse Somatosensory Cortex. *The Journal of Neuroscience* 32: 1207-19
- Bullen JW, Balsbaugh JL, Chanda D, Shabanowitz J, Hunt DF, et al. 2014. Crosstalk between two essential nutrient-sensitive enzymes: O-GlcNAc transferase (OGT) and AMP-activated protein kinase (AMPK). *Journal of Biological Chemistry*
- Buonomano DV, Merzenich MM. 1998. Cortical Plasticity : From Synapses to Maps. *Annual Review of Neuroscience* 21: 149-86
- Butkinaree C, Cheung WD, Park S, Park K, Barber M, Hart GW. 2008. Characterization of beta-N-acetylglucosaminidase cleavage by caspase-3 during apoptosis. *The Journal of biological chemistry* 283: 23557-66

С

- Cameron PL, Südhof TC, Jahn R, De Camilli P. 1991. Colocalization of synaptophysin with transferrin receptors: implications for synaptic vesicle biogenesis. *The Journal of Cell Biology* 115: 151-64
- Candiano G, Musante L, Bruschi M, Ghiggeri GM, Herbert B, et al. 2002. Two-dimensional maps in soft immobilized pH gradient gels: a new approach to the proteome of the Third Millennium. *Electrophoresis* 23: 292-7
- Canu M-H, Stevens L, Ricart-Firinga C, Picquet F, Falempin M. 2001a. Effect of the β2-agonist clenbuterol on the locomotor activity of rat submitted to a 14-day period of hypodynamia– hypokinesia. *Behavioural brain research* 122: 103-12
- Canu M, Falempin M, Orsal D. 2001b. Fictive motor activity in rat after 14 days of hindlimb unloading. *Experimental Brain Research* 139: 30-38
- Canu MH, Berezowski V, Duriez P, Langlet C, Mariot P, Petrault O. 2018. Mémo visuel de Physiologie humaine : tout le cours en fiches. . *Dunod*: pp.204
- Canu MH, Carnaud M, Picquet F, Goutebroze L. 2009. Activity-dependent regulation of myelin maintenance in the adult rat. *Brain Res* 1252: 45-51
- Canu MH, Falempin M. 1996. Effect of hindlimb unloading on locomotor strategy during treadmill locomotion in the rat. *European journal of applied physiology and occupational physiology* 74: 297-304
- Canu MH, Falempin M. 1997. Effect of hindlimb unloading on two hindlimb muscles during treadmill locomotion in rats. *European journal of applied physiology and occupational physiology* 75: 283-8

- Canu MH, Falempin M. 1998. Effect of hindlimb unloading on interlimb coordination during treadmill locomotion in the rat. *European journal of applied physiology and occupational physiology* 78: 509-15
- Canu MH, Garnier C. 2009. A 3D analysis of fore- and hindlimb motion during overground and ladder walking: Comparison of control and unloaded rats. *Experimental Neurology* 218: 98-108
- Canu MH, Garnier C, Lepoutre FX, Falempin M. 2005. A 3D analysis of hindlimb motion during treadmill locomotion in rats after a 14-day episode of simulated microgravity. *Behavioural brain research* 157: 309-21
- Canu MH, Picquet F, Bastide B, Falempin M. 2010. Activity-dependent changes in the electrophysiological properties of regular spiking neurons in the sensorimotor cortex of the rat in vitro. *Behavioural Brain Research* 209: 289-94
- Canu MH, Treffort N, Picquet F, Dubreucq G, Guerardel Y, Falempin M. 2006. Concentration of amino acid neurotransmitters in the somatosensory cortex of the rat after surgical or functional deafferentation. *Exp Brain Res* 173: 623-8
- Carboni L, Piubelli C, Righetti PG, Jansson B, Domenici E. 2002. Proteomic analysis of rat brain tissue: Comparison of protocols for two-dimensional gel electrophoresis analysis based on different solubilizing agents. *ELECTROPHORESIS* 23: 4132-41
- Carlson JN, Fitzgerald LW, Keller RW, Glick SD. 1991. Side and region dependent changes in dopamine activation with various durations of restraint stress. *Brain Research* 550: 313-18
- Carmignoto G, Pizzorusso T, Tia S, Vicini S. 1997. Brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor potentiate excitatory synaptic transmission in the rat visual cortex. *The Journal of Physiology* 498: 153-64
- Catalani A, Casolini P, Scaccianoce S, Patacchioli FR, Spinozzi P, Angelucci L. 2000. Maternal corticosterone during lactation permanently affects brain corticosteroid receptors, stress response and behaviour in rat progeny. *Neuroscience* 100: 319-25
- Celikel T, Szostak VA, Feldman DE. 2004. Modulation of spike timing by sensory deprivation during induction of cortical map plasticity. *Nature Neuroscience* 7: 534
- Cesca F, Baldelli P, Valtorta F, Benfenati F. 2010. The synapsins: key actors of synapse function and plasticity. *Prog Neurobiol* 91: 313-48
- Chakrabarti S, Schwarz C. 2014. Studying motor cortex function using the rodent vibrissal system. *e-Neuroforum* 5: 20-27
- Chapin JK. 1986. Laminar differences in sizes, shapes, and response profiles of cutaneous receptive fields in the rat SI cortex. *Exp Brain Res* 62: 549-59
- Chapin JK, Lin CH. 1984. Mapping the body representation in the SI cortex of anesthetized and awake rats. *The Journal of Comparative Neurology* 229: 199-213
- Chapman ER. 2008. How Does Synaptotagmin Trigger Neurotransmitter Release? *Annual Review of Biochemistry* 77: 615-41
- Charvin N, Lévêque C, Walker D, Berton F, Raymond C, et al. 1997. Direct interaction of the calcium sensor protein synaptotagmin I with a cytoplasmic domain of the α1A subunit of the P/Q-type calcium channel. *The EMBO Journal* 16: 4591-96
- Chastin SFM, Mandrichenko O, Helbostadt JL, Skelton DA. 2014. Associations between objectively-measured sedentary behaviour and physical activity with bone mineral density in adults and older adults, the NHANES study. *Bone* 64: 254-62
- Chaveroux C, Sarcinelli C, Barbet V, Belfeki S, Barthelaix A, et al. 2016. Nutrient shortage triggers the hexosamine biosynthetic pathway via the GCN2-ATF4 signalling pathway. *Sci Rep* 6: 27278
- Chelyshev YA, Muhamedshina YO, Povysheva TV, Shaymardanova GF, Rizvanov AA, et al. 2014. Characterization of spinal cord glial cells in a model of hindlimb unloading in mice. *Neuroscience* 280: 328-39
- Chen X, Nelson CD, Li X, Winters CA, Azzam R, et al. 2011. PSD-95 Is Required to Sustain the Molecular Organization of the Postsynaptic Density. *The Journal of Neuroscience* 31: 6329-38
- Chen X, Vinade L, Leapman RD, Petersen JD, Nakagawa T, et al. 2005. Mass of the postsynaptic density and enumeration of three key molecules. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102: 11551-56
- Chen X, Winters C, Azzam R, Li X, Galbraith JA, et al. 2008. Organization of the core structure of the postsynaptic density. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105: 4453-58
- Cheng D, Hoogenraad CC, Rush J, Ramm E, Schlager MA, et al. 2006. Relative and Absolute Quantification of Postsynaptic Density Proteome Isolated from Rat Forebrain and Cerebellum. *Molecular & Cellular Proteomics* 5: 1158-70
- Chi P, Greengard P, Ryan TA. 2001. Synapsin dispersion and reclustering during synaptic activity. *Nature Neuroscience* 4: 1187
- Chi P, Greengard P, Ryan TA. 2003. Synaptic Vesicle Mobilization Is Regulated by Distinct Synapsin I Phosphorylation Pathways at Different Frequencies. *Neuron* 38: 69-78
- Chieffi S, Messina G, Villano I, Messina A, Valenzano A, et al. 2017. Neuroprotective Effects of Physical Activity: Evidence from Human and Animal Studies. *Frontiers in neurology* 8: 188
- Chou TY, Hart GW, Dang CV. 1995. c-Myc Is Glycosylated at Threonine 58, a Known Phosphorylation Site and a Mutational Hot Spot in Lymphomas. *Journal of Biological Chemistry* 270: 18961-65
- Chowdhury P, Long A, Harris G, Soulsby ME, Dobretsov M. 2013. Animal model of simulated microgravity: a comparative study of hindlimb unloading via tail versus pelvic suspension. *Physiol Rep* 1: e00012
- Chrivia JC, Kwok RP, Lamb N, Hagiwara M, Montminy MR, Goodman RH. 1993. Phosphorylated CREB binds specifically to the nuclear protein CBP. *Nature* 365: 855-9
- Chung HJ, Xia J, Scannevin RH, Zhang X, Huganir RL. 2000. Phosphorylation of the AMPA Receptor Subunit GluR2 Differentially Regulates Its Interaction with PDZ Domain-Containing Proteins. *The Journal of Neuroscience* 20: 7258-67
- Cieniewski-Bernard C, Dupont E, Deracinois B, Lambert M, Bastide B. 2014. Multiplexed Detection of O-GlcNAcome, Phosphoproteome, and Whole Proteome within the Same Gel. *Frontiers in endocrinology* 5: 184
- Cieniewski-Bernard C, Montel V, Berthoin S, Bastide B. 2012. Increasing O-GlcNAcylation Level on Organ Culture of Soleus Modulates the Calcium Activation Parameters of Muscle Fibers. *PLOS ONE* 7: e48218
- Cingolani LA, Goda Y. 2008. Actin in action: the interplay between the actin cytoskeleton and synaptic efficacy. *Nature Reviews Neuroscience* 9: 344
- Citri A, Malenka RC. 2007. Synaptic Plasticity: Multiple Forms, Functions, and Mechanisms. *Neuropsychopharmacology* 33: 18
- Clark BC. 2009. In vivo alterations in skeletal muscle form and function after disuse atrophy. *Medicine and science in sports and exercise* 41: 1869-75
- Clark BC, Hoffman RL, Russ DW. 2008. Immobilization-induced increase in fatigue resistance is not explained by changes in the muscle metaboreflex. *Muscle & nerve* 38: 1466-73
- Clark BC, Manini TM, Bolanowski SJ, Ploutz-Snyder LL. 2006. Adaptations in human neuromuscular function following prolonged unweighting: II. Neurological properties and motor imagery efficacy. *J Appl Physiol (1985)* 101: 264-72
- Clarke AJ, Hurtado-Guerrero R, Pathak S, Schüttelkopf AW, Borodkin V, et al. 2008. Structural insights into mechanism and specificity of O-GlcNAc transferase. *The EMBO Journal* 27: 2780-88
- Clavet H, Hébert PC, Fergusson D, Doucette S, Trudel G. 2008. Joint contracture following prolonged stay in the intensive care unit. *Canadian Medical Association Journal* 178: 691-97
- Cliffer KD, Giesler GJ. 1989. Postsynaptic dorsal column pathway of the rat. III. Distribution of ascending afferent fibers. *The Journal of Neuroscience* 9: 3146-68
- Cohen HS, Kimball KT, Mulavara AP, Bloomberg JJ, Paloski WH. 2012. Posturography and locomotor tests of dynamic balance after long-duration spaceflight. *Journal of vestibular research : equilibrium & orientation* 22: 191-6

- Cole RN, Hart GW. 1999. Glycosylation sites flank phosphorylation sites on synapsin I: Olinked N-acetylglucosamine residues are localized within domains mediating synapsin I interactions. *Journal of Neurochemistry* 73: 418-28
- Cole RN, Hart GW. 2001. Cytosolic O-glycosylation is abundant in nerve terminals. *J Neurochem* 79: 1080-9
- Comer FI, Hart GW. 2001. Reciprocity between O-GlcNAc and O-Phosphate on the Carboxyl Terminal Domain of RNA Polymerase II. *Biochemistry* 40: 7845-52
- Comtesse N, Maldener E, Meese E. 2001. Identification of a Nuclear Variant of MGEA5, a Cytoplasmic Hyaluronidase and a β-N-Acetylglucosaminidase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 283: 634-40
- Conde C, Cáceres A. 2009. Microtubule assembly, organization and dynamics in axons and dendrites. *Nature Reviews Neuroscience* 10: 319
- Coq JO, Xerri C. 1998. Environmental enrichment alters organizational features of the forepaw representation in the primary somatosensory cortex of adult rats. *Experimental Brain Research* 121: 191-204
- Coq JO, Xerri C. 1999. Tactile impoverishment and sensorimotor restriction deteriorate the forepaw cutaneous map in the primary somatosensory cortex of adult rats. *Exp Brain Res* 129: 518-31
- Cormery B, Beaumont E, Csukly K, Gardiner P. 2005. Hindlimb unweighting for 2 weeks alters physiological properties of rat hindlimb motoneurones. *The Journal of Physiology* 568: 841-50
- Council IoMNR. 2006. A Risk Reduction Strategy for Human Exploration of Space: A Review of NASA Bioastronautics Roadmap. Washington, DC: The National Academies Press. 162 pp.
- Cousins SL, Papadakis M, Rutter AR, Stephenson FA. 2008. Differential interaction of NMDA receptor subtypes with the post-synaptic density-95 family of membrane associated guanylate kinase proteins. *Journal of Neurochemistry* 104: 903-13
- Coutinho EL, Gomes AR, Franca CN, Salvini TF. 2002. A new model for the immobilization of the rat hind limb. *Braz J Med Biol Res* 35: 1329-32
- Cull-Candy S, Brickley S, Farrant M. 2001. NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. *Current Opinion in Neurobiology* 11: 327-35
- Cull-Candy SG, Leszkiewicz DN. 2004. Role of Distinct NMDA Receptor Subtypes at Central Synapses. *Science's STKE* 2004: re16-re16

D

- D'Amelio F, Fox RA, Wu LC, Daunton NG. 1996. Quantitative changes of GABAimmunoreactive cells in the hindlimb representation of the rat somatosensory cortex after 14-day hindlimb unloading by tail suspension. *Journal of Neuroscience Research* 44: 532-39
- Dalva MB, McClelland AC, Kayser MS. 2007. Cell adhesion molecules: signalling functions at the synapse. *Nature Reviews Neuroscience* 8: 206
- Davis AF, Bai J, Fasshauer D, Wolowick MJ, Lewis JL, Chapman ER. 1999. Kinetics of Synaptotagmin Responses to Ca2+ and Assembly with the Core SNARE Complex onto Membranes. *Neuron* 24: 363-76
- Dawson DR, Killackey HP. 1987. The organization and mutability of the forepaw and hindpaw representations in the somatosensory cortex of the neonatal rat. *J Comp Neurol* 256: 246-56
- De-Doncker L, Kasri M, Falempin M. 2006. Soleus motoneuron excitability after rat hindlimb unloading using histology and a new electrophysiological approach to record a neurographic analogue of the H-reflex. *Experimental Neurology* 201: 368-74

- De Boer MD, Maganaris CN, Seynnes OR, Rennie MJ, Narici MV. 2007. Time course of muscular, neural and tendinous adaptations to 23 day unilateral lower-limb suspension in young men. *The Journal of Physiology* 583: 1079-91
- De Jonghe B, Sharshar T, Lefaucheur J. 2002. Paresis acquired in the intensive care unit: A prospective multicenter study. *JAMA* 288: 2859-67
- Deng Y, Li B, Liu F, Iqbal K, Grundke-Iqbal I, et al. 2008. Regulation between O-GlcNAcylation and phosphorylation of neurofilament-M and their dysregulation in Alzheimer disease. *The FASEB Journal* 22: 138-45
- Dephoure N, Zhou C, Villen J, Beausoleil SA, Bakalarski CE, et al. 2008. A quantitative atlas of mitotic phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 10762-7
- DeSouza CA, Shapiro LF, Clevenger CM, Dinenno FA, Monahan KD, et al. 2000. Regular Aerobic Exercise Prevents and Restores Age-Related Declines in Endothelium-Dependent Vasodilation in Healthy Men. *Circulation* 102: 1351-57
- Desplanches D, Mayet MH, Sempore B, Flandrois R. 1987. Structural and functional responses to prolonged hindlimb suspension in rat muscle. *J Appl Physiol (1985)* 63: 558-63
- Dias WB, Cheung WD, Hart GW. 2012. O-GlcNAcylation of kinases. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 422: 224-28
- Dias WB, Cheung WD, Wang Z, Hart GW. 2009. Regulation of calcium/calmodulin-dependent kinase IV by O-GlcNAc modification. *The Journal of biological chemistry* 284: 21327-37
- Dodd GT, Tiganis T. 2017. Insulin action in the brain: Roles in energy and glucose homeostasis. *Journal of neuroendocrinology* 29
- Dong DL, Hart GW. 1994. Purification and characterization of an O-GlcNAc selective N-acetylbeta-D-glucosaminidase from rat spleen cytosol. *The Journal of biological chemistry* 269: 19321-30
- Donoghue JP, Parham C. 1983. Afferent connections of the lateral agranular field of the rat motor cortex. *The Journal of Comparative Neurology* 217: 390-404
- Donoghue JP, Sanes JN. 1988. Organization of adult motor cortex representation patterns following neonatal forelimb nerve injury in rats. *The Journal of Neuroscience* 8: 3221-32
- Donoghue JP, Wise SP. 1982. The motor cortex of the rat: Cytoarchitecture and microstimulation mapping. *The Journal of Comparative Neurology* 212: 76-88
- Dorfmueller HC, Borodkin VS, Schimpl M, Shepherd SM, Shpiro NA, van Aalten DMF. 2006. GlcNAcstatin: a Picomolar, Selective O-GlcNAcase Inhibitor That Modulates Intracellular O-GlcNAcylation Levels. *Journal of the American Chemical Society* 128: 16484-85
- Duchateau J. 1995. Bed rest induces neural and contractile adaptations in triceps surae. *Medicine and science in sports and exercise* 27: 1581-89
- Dudek SM, Bear MF. 1992. Homosynaptic long-term depression in area CA1 of hippocampus and effects of N-methyl-D-aspartate receptor blockade. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 89: 4363-67
- Dunkley PR, Jarvie PE, Robinson PJ. 2008. A rapid Percoll gradient procedure for preparation of synaptosomes. *Nature protocols* 3: 1718-28
- Dunstan DW, Barr ELM, Healy GN, Salmon J, Magliano DJ, et al. 2009. Television Viewing Time And Mortality. The Ausdiab Study: 591 May 27 1:00 PM 1:15 PM. *Medicine & Science in Sports & Exercise* 41: 21
- Dunstan DW, Salmon J, Healy GN, Shaw JE, Jolley D, et al. 2007. Association of Television Viewing With Fasting and 2-h Postchallenge Plasma Glucose Levels in Adults Without Diagnosed Diabetes. *Diabetes Care* 30: 516-22
- Dupont E, Canu MH, Falempin M. 2002. Atropine prevents the changes in the hindlimb cortical area induced by hypodynamia-hypokinesia. *Brain Res* 926: 51-7
- Dupont E, Canu MH, Falempin M. 2003. A 14-day period of hindpaw sensory deprivation enhances the responsiveness of rat cortical neurons. *Neuroscience* 121: 433-9

- Dupont E, Canu MH, Langlet C, Falempin M. 2001. Time course of recovery of the somatosensory map following hindpaw sensory deprivation in the rat. *Neurosci Lett* 309: 121-4
- Dupont E, Canu MH, Stevens L, Falempin M. 2005. Effects of a 14-day period of hindpaw sensory restriction on mRNA and protein levels of NGF and BDNF in the hindpaw primary somatosensory cortex. *Brain Res Mol Brain Res* 133: 78-86
- Dupont E, Cieniewski-Bernard C, Bastide B, Stevens L. 2011a. Electrostimulation during hindlimb unloading modulates PI3K-AKT downstream targets without preventing soleus atrophy and restores slow phenotype through ERK. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 300: R408-R17
- Dupont E, Stevens L, Cochon L, Falempin M, Bastide B, Canu MH. 2011b. ERK is involved in the reorganization of somatosensory cortical maps in adult rats submitted to hindlimb unloading. *PLoS One* 6: e17564
- Dykes RW. 1997. Mechanisms controlling neuronal plasticity in somatosensory cortex. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 75: 535-45

Ε

- Edbauer D, Cheng D, Batterton MN, Wang CF, Duong DM, et al. 2009. Identification and Characterization of Neuronal Mitogen-activated Protein Kinase Substrates Using a Specific Phosphomotif Antibody. *Molecular & Cellular Proteomics* 8: 681-95
- Ehlers MD, Fung ET, O'Brien RJ, Huganir RL. 1998. Splice variant-specific interaction of the NMDA receptor subunit NR1 with neuronal intermediate filaments. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 18: 720-30
- Ehrlich I, Klein M, Rumpel S, Malinow R. 2007. PSD-95 is required for activity-driven synapse stabilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104: 4176-81
- Ehrlich I, Malinow R. 2004. Postsynaptic density 95 controls AMPA receptor incorporation during long-term potentiation and experience-driven synaptic plasticity. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 24: 916-27
- Elder GA, Friedrich VL, Bosco P, Kang C, Gourov A, et al. 1998. Absence of the Mid-sized Neurofilament Subunit Decreases Axonal Calibers, Levels of Light Neurofilament (NF-L), and Neurofilament Content. *The Journal of Cell Biology* 141: 727-39
- Elgersma Y, Fedorov NB, Ikonen S, Choi ES, Elgersma M, et al. 2002. Inhibitory Autophosphorylation of CaMKII Controls PSD Association, Plasticity, and Learning. *Neuron* 36: 493-505
- Elias GM, Nicoll RA. 2007. Synaptic trafficking of glutamate receptors by MAGUK scaffolding proteins. *Trends in Cell Biology* 17: 343-52
- Elsen NL, Patel SB, Ford RE, Hall DL, Hess F, et al. 2017. Insights into activity and inhibition from the crystal structure of human O-GlcNAcase. *Nat Chem Biol* 13: 613-15
- Erickson JR, Pereira L, Wang L, Han G, Ferguson A, et al. 2013. Diabetic hyperglycaemia activates CaMKII and arrhythmias by O-linked glycosylation. *Nature* 502: 372-6

- Fabri M, Burton H. 1991. Topography of connections between primary somatosensory cortex and posterior complex in rat: a multiple fluorescent tracer study. *Brain Research* 538: 351-57
- Fabrizio G, Federica P, Flaminio C, Monica DL. 2006. Calcium–calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation modulates PSD-95 binding to NMDA receptors. *European Journal of Neuroscience* 24: 2694-704
- Facchini S, Romani M, Tinazzi M, Aglioti SM. 2002. Time-related changes of excitability of the human motor system contingent upon immobilisation of the ring and little fingers. *Clinical Neurophysiology* 113: 367-75
- Feldman DE, Nicoll RA, Malenka RC. 1999. Synaptic plasticity at thalamocortical synapses in developing rat somatosensory cortex: LTP, LTD, and silent synapses. *Journal of Neurobiology* 41: 92-101
- Felten DL, Shetty AN. 2011. Atlas de Neurosciences Humaines de Netter : Neuroanatomie-Neurophysiologie. *Elsevier Masson*
- Fernández-Chacón R, Königstorfer A, Gerber SH, García J, Matos MF, et al. 2001. Synaptotagmin I functions as a calcium regulator of release probability. *Nature* 410: 41
- Fernandez AM, Torres-Alemán I. 2012. The many faces of insulin-like peptide signalling in the brain. *Nature Reviews Neuroscience* 13: 225
- Ferrando AA, Stuart CA, Brunder DG, Hillman GR. 1995. Magnetic resonance imaging quantitation of changes in muscle volume during 7 days of strict bed rest. *Aviation, space, and environmental medicine* 66: 976-81
- Filiou MD, Bisle B, Reckow S, Teplytska L, Maccarrone G, Turck CW. 2010. Profiling of mouse synaptosome proteome and phosphoproteome by IEF. *Electrophoresis* 31: 1294-301
- Fitts RH, Brimmer CJ, Heywood-Cooksey A, Timmerman RJ. 1989. Single muscle fiber enzyme shifts with hindlimb suspension and immobilization. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 256: C1082-C91
- Fitts RH, Riley DR, Widrick JJ. 2000. Physiology of a microgravity environment invited review: microgravity and skeletal muscle. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)* 89: 823-39
- Fitts RH, Riley DR, Widrick JJ. 2001. Functional and structural adaptations of skeletal muscle to microgravity. *J Exp Biol* 204: 3201-8
- Fitts RH, Trappe SW, Costill DL, Gallagher PM, Creer AC, et al. 2010. Prolonged space flightinduced alterations in the structure and function of human skeletal muscle fibres. *J Physiol* 588: 3567-92
- Floyer-Lea A, Wylezinska M, Kincses T, Matthews PM. 2006. Rapid Modulation of GABA Concentration in Human Sensorimotor Cortex During Motor Learning. *Journal of Neurophysiology* 95: 1639-44
- Ford ES, Li C, Zhao G, Pearson WS, Tsai J, Churilla JR. 2010. Sedentary behavior, physical activity, and concentrations of insulin among US adults. *Metabolism Clinical and Experimental* 59: 1268-75
- Forsythe ME, Love DC, Lazarus BD, Kim EJ, Prinz WA, et al. 2006. Caenorhabditis elegans ortholog of a diabetes susceptibility locus: oga-1 (O-GlcNAcase) knockout impacts O-GlcNAc cycling, metabolism, and dauer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 11952-7
- Fox K. 2002. Anatomical pathways and molecular mechanisms for plasticity in the barrel cortex. *Neuroscience* 111: 799-814
- Francisco H, Kollins K, Varghis N, Vocadlo D, Vosseller K, Gallo G. 2009. O-GlcNAc posttranslational modifications regulate the entry of neurons into an axon branching program. *Developmental Neurobiology* 69: 162-73
- Froc DJ, Racine RJ. 2004. N-methyl-d-aspartate receptor-independent long-term depression and depotentiation in the sensorimotor cortex of the freely moving rat. *Neuroscience* 129: 273-81

- Fülöp N, Feng W, Xing D, He K, Nőt LG, et al. 2008. Aging leads to increased levels of protein O-linked N-acetylglucosamine in heart, aorta, brain and skeletal muscle in Brown-Norway rats. *Biogerontology* 9: 139
- Furukawa H, Singh SK, Mancusso R, Gouaux E. 2005. Subunit arrangement and function in NMDA receptors. *Nature* 438: 185
- Futai K, Kim MJ, Hashikawa T, Scheiffele P, Sheng M, Hayashi Y. 2007. Retrograde modulation of presynaptic release probability through signaling mediated by PSD-95–neuroligin. *Nature Neuroscience* 10: 186

G

- Gandy JC, Rountree AE, Bijur GN. 2006. Akt1 is dynamically modified with O-GlcNAc following treatments with PUGNAc and insulin-like growth factor-1. *FEBS Letters* 580: 3051-58
- Gao Y, Wells L, Comer FI, Parker GJ, Hart GW. 2001. Dynamic O-glycosylation of nuclear and cytosolic proteins: cloning and characterization of a neutral, cytosolic beta-N-acetylglucosaminidase from human brain. *The Journal of biological chemistry* 276: 9838-45
- Gardoni F, Schrama LH, Kamal A, Gispen WH, Cattabeni F, Di Luca M. 2001. Hippocampal Synaptic Plasticity Involves Competition between Ca2+/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II and Postsynaptic Density 95 for Binding to the NR2A Subunit of the NMDA Receptor. *The Journal of Neuroscience* 21: 1501-09
- Geerts WH, Pineo GF, Heit JA, Bergqvist D, Lassen MR, et al. 2004. Prevention of Venous Thromboembolism. *CHEST* 126: 338S-400S
- Giachello CNG, Fiumara F, Giacomini C, Corradi A, Milanese C, et al. 2010. MAPK/Erkdependent phosphorylation of synapsin mediates formation of functional synapses and short-term homosynaptic plasticity. *Journal of cell science* 123: 881-93
- Giesler GJ, Nahin RL, Madsen AM. 1984. Postsynaptic dorsal column pathway of the rat. I. Anatomical studies. *J Neurophysiol* 51: 260-75
- Gindrat AD, Chytiris M, Balerna M, Rouiller EM, Ghosh A. 2015. Use-Dependent Cortical Processing from Fingertips in Touchscreen Phone Users. *Current Biology* 25: 109-16
- Giuffrida R, Volsi GL, Perciavalle V. 1988. Influences of cerebral cortex and cerebellum on the red nucleus of the rat. *Behavioural Brain Research* 28: 109-11
- Glover E, Phillips S, Oates B, Tang J, Tarnopolsky M, et al. 2008. Immobilization induces anabolic resistance in human myofibrillar protein synthesis with low and high dose amino acid infusion. *The Journal of Physiology* 586: 6049-61
- Goldspink DF. 1977. The influence of immobilization and stretch on protein turnover of rat skeletal muscle. *J Physiol* 264: 267-82
- Gong CX, Liu F, Iqbal K. 2016. O-GlcNAcylation: A regulator of tau pathology and neurodegeneration. *Alzheimers Dement* 12: 1078-89
- Gordon-Weeks PR, Fournier AE. 2014. Neuronal cytoskeleton in synaptic plasticity and regeneration. *J Neurochem* 129: 206-12
- Graham DL, Gray AJ, Joyce JA, Yu D, O'Moore J, et al. 2014. Increased O-GlcNAcylation reduces pathological tau without affecting its normal phosphorylation in a mouse model of tauopathy. *Neuropharmacology* 79: 307-13
- Granert O, Peller M, Gaser C, Groppa S, Hallett M, et al. 2011. Manual activity shapes structure and function in contralateral human motor hand area. *NeuroImage* 54: 32-41
- Greengard P, Benfenati F, Valtorta F. 1994. Synapsin I, an actin-binding protein regulating synaptic vesicle traffic in the nerve terminal. *Advances in second messenger and phosphoprotein research* 29: 31-45

- Greengard P, Valtorta F, Czernik AJ, Benfenati F. 1993. Synaptic vesicle phosphoproteins and regulation of synaptic function. *Science* 259: 780-5
- Griffith LS, Schmitz B. 1999. O-linked N-acetylglucosamine levels in cerebellar neurons respond reciprocally to pertubations of phosphorylation. *European Journal of Biochemistry* 262: 824-31
- Grillner S. 1985. Neurobiological bases of rhythmic motor acts in vertebrates. *Science (New York, N.Y.)* 228: 143-49
- Groc L, Heine M, Cognet L, Brickley K, Stephenson FA, et al. 2004. Differential activitydependent regulation of the lateral mobilities of AMPA and NMDA receptors. *Nature Neuroscience* 7: 695
- Guo ML, Xue B, Jin DZ, Mao LM, Wang JQ. 2012. Interactions and phosphorylation of postsynaptic density 93 (PSD-93) by extracellular signal-regulated kinase (ERK). *Brain Research* 1465: 18-25
- Gurtler A, Kunz N, Gomolka M, Hornhardt S, Friedl AA, et al. 2013. Stain-Free technology as a normalization tool in Western blot analysis. *Anal Biochem* 433: 105-11

Η

- Hamann KF, Lannou J. 1988. Dynamic Characteristics of Vestibular Nuclear Neurons Responses to Vestibular and Optokinetic Stimulation during Vestibular Compensation in the Rat. *Acta Oto-Laryngologica* 105: 1-19
- Hamann W. 1995. Mammalian cutaneous mechanoreceptors. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 64: 81-104
- Hamburg NM, McMackin CJ, Huang AL, Shenouda SM, Widlansky ME, et al. 2007. Physical Inactivity Rapidly Induces Insulin Resistance and Microvascular Dysfunction in Healthy Volunteers. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 27: 2650-56
- Han W, Rhee JS, Maximov A, Lao Y, Mashimo T, et al. 2004. N-Glycosylation Is Essential for Vesicular Targeting of Synaptotagmin 1. *Neuron* 41: 85-99
- Hanover JA, Krause MW, Love DC. 2010. The hexosamine signaling pathway: O-GlcNAc cycling in feast or famine. *Biochim Biophys Acta* 1800: 80-95
- Hanover JA, Yu S, Lubas WB, Shin SH, Ragano-Caracciola M, et al. 2003. Mitochondrial and nucleocytoplasmic isoforms of O-linked GlcNAc transferase encoded by a single mammalian gene. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 409: 287-97
- Hansen KB, Yi F, Perszyk RE, Furukawa H, Wollmuth LP, et al. 2018. Structure, function, and allosteric modulation of NMDA receptors. *The Journal of General Physiology*
- Hardivillé S, Hart Gerald W. 2014. Nutrient Regulation of Signaling, Transcription, and Cell Physiology by O-GlcNAcylation. *Cell Metabolism* 20: 208-13
- Hargens AR, Vico L. 2016. Long-duration bed rest as an analog to microgravity. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)* 120: 891-903
- Harms KJ, Rioult-Pedotti MS, Carter DR, Dunaevsky A. 2008. Transient Spine Expansion and Learning-Induced Plasticity in Layer 1 Primary Motor Cortex. *The Journal of Neuroscience* 28: 5686-90
- Harper AA, Lawson SN. 1985. Electrical properties of rat dorsal root ganglion neurones with different peripheral nerve conduction velocities. *The Journal of Physiology* 359: 47-63
- Harris RB, Apolzan JW. 2015. Hexosamine biosynthetic pathway activity in leptin resistant sucrose-drinking rats. *Physiol Behav* 138: 208-18
- Hart GW, Slawson C, Ramirez-Correa G, Lagerlof O. 2011. Cross talk between O-GlcNAcylation and phosphorylation: roles in signaling, transcription, and chronic disease. *Annu Rev Biochem* 80: 825-58

- Hauschka EO, Roy RR, Edgerton VR. 1987. Size and metabolic properties of single muscle fibers in rat soleus after hindlimb suspension. *J Appl Physiol (1985)* 62: 2338-47
- Healy GN, Dunstan DW, Salmon J, Cerin E, Shaw JE, et al. 2007. Objectively Measured Light-Intensity Physical Activity Is Independently Associated With 2-h Plasma Glucose. *Diabetes Care* 30: 1384-89
- Henderson AK, Galic MA, Fouad K, Dyck RH, Pittman QJ, Teskey GC. 2011. Larger cortical motor maps after seizures. *Eur J Neurosci* 34: 615-21
- Herbert BR, Molloy MP, Gooley AA, Walsh BJ, Bryson WG, Williams KL. 1998. Improved protein solubility in two-dimensional electrophoresis using tributyl phosphine as reducing agent. *Electrophoresis* 19: 845-51
- Herridge MS, Cheung AM, Tansey CM, Matte-Martyn A, Diaz-Granados N, et al. 2003. Oneyear outcomes in survivors of the acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 348: 683-93
- Herring BE, Nicoll RA. 2016. Long-Term Potentiation: From CaMKII to AMPA Receptor Trafficking. *Annu Rev Physiol* 78: 351-65
- Hespanhol Junior LC, Pillay JD, van Mechelen W, Verhagen E. 2015. Meta-Analyses of the Effects of Habitual Running on Indices of Health in Physically Inactive Adults. *Sports Med* 45: 1455-68
- Hespel P, Op't Eijnde B, Leemputte MV, Ursø B, Greenhaff PL, et al. 2001. Oral creatine supplementation facilitates the rehabilitation of disuse atrophy and alters the expression of muscle myogenic factors in humans. *The Journal of Physiology* 536: 625-33
- Hilfiker S, Pieribone VA, Czernik AJ, Kao HT, Augustine GJ, Greengard P. 1999. Synapsins as regulators of neurotransmitter release. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 354: 269-79
- Hodzic A, Veit R, Karim AA, Erb M, Godde B. 2004. Improvement and Decline in Tactile Discrimination Behavior after Cortical Plasticity Induced by Passive Tactile Coactivation. *The Journal of Neuroscience* 24: 442-46
- Hollenbeck PJ. 1996. The pattern and mechanism of mitochondrial transport in axons. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 1: d91-102
- Hollmann M, Heinemann S. 1994. Cloned Glutamate Receptors. *Annual Review of Neuroscience* 17: 31-108
- Holtmaat A, Svoboda K. 2009. Experience-dependent structural synaptic plasticity in the mammalian brain. *Nat Rev Neurosci* 10: 647-58
- Honkura N, Matsuzaki M, Noguchi J, Ellis-Davies GC, Kasai H. 2008. The subspine organization of actin fibers regulates the structure and plasticity of dendritic spines. *Neuron* 57: 719-29
- Hortobágyi T, Dempsey L, Fraser D, Zheng D, Hamilton G, et al. 2000. Changes in muscle strength, muscle fibre size and myofibrillar gene expression after immobilization and retraining in humans. *The Journal of Physiology* 524: 293-304
- Howard BV, Ruotolo G, Robbins DC. 2003. Obesity and dyslipidemia. *Endocrinol Metab Clin North Am* 32: 855-67
- Hu FB. 2003. Sedentary lifestyle and risk of obesity and type 2 diabetes. *Lipids* 38: 103-08
- Hu JH, Yang L, Kammermeier PJ, Moore CG, Brakeman PR, et al. 2012. Preso1 dynamically regulates group I metabotropic glutamate receptors. *Nature Neuroscience* 15: 836
- Hu X, Ballo L, Pietila L, Viesselmann C, Ballweg J, et al. 2011. BDNF-induced increase of PSD-95 in dendritic spines requires dynamic microtubule invasions. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31: 15597-603
- Hu Y, Suarez J, Fricovsky E, Wang H, Scott BT, et al. 2009. Increased Enzymatic O-GlcNAcylation of Mitochondrial Proteins Impairs Mitochondrial Function in Cardiac Myocytes Exposed to High Glucose. *Journal of Biological Chemistry* 284: 547-55
- Hudmon A, Schulman H, Kim J, Maltez JM, Tsien RW, Pitt GS. 2005. CaMKII tethers to L-type Ca2+ channels, establishing a local and dedicated integrator of Ca2+ signals for facilitation. *The Journal of Cell Biology* 171: 537-47

- Hughson RL, Shoemaker JK. 2015. Autonomic responses to exercise: Deconditioning/inactivity. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical* 188: 32-35
- Hunt CC. 1990. Mammalian muscle spindle: peripheral mechanisms. *Physiol Rev* 70: 643-63
- Hwang H, Rhim H. 2018. Functional significance of O-GlcNAc modification in regulating neuronal properties. *Pharmacological Research* 129: 295-307
- Ishihara A, Ohira Y, Roy RR, Nagaoka S, Sekiguchi C, et al. 1997. Effects of 14 days of spaceflight and nine days of recovery on cell body size and succinate dehydrogenase activity of rat dorsal root ganglion neurons. *Neuroscience* 81: 275-79
- Ishihara A, Yamashiro J, Matsumoto A, Higashibata A, Ishioka N, et al. 2006. Comparison of Cell Body Size and Oxidative Enzyme Activity in Motoneurons between the Cervical and Lumbar Segments in the Rat Spinal Cord after Spaceflight and Recovery. *Neurochemical Research* 31: 411-15
- Islamov RR, Mishagina EA, Tyapkina OV, Shajmardanova GF, Eremeev AA, et al. 2011. Mechanisms of spinal motoneurons survival in rats under simulated hypogravity on earth. *Acta Astronautica* 68: 1469-77

J

- Jacobs K, Donoghue J. 1991. Reshaping the cortical motor map by unmasking latent intracortical connections. *Science* 251: 944-47
- Jacobsen KT, Iverfeldt K. 2011. O-GlcNAcylation increases non-amyloidogenic processing of the amyloid-β precursor protein (APP). *Biochemical and Biophysical Research Communications* 404: 882-86
- Jaglal SB, Kreiger N, Darlington GA. 1995. Lifetime occupational physical activity and risk of hip fracture in women. *Annals of Epidemiology* 5: 321-24
- Jami L. 1992. Golgi tendon organs in mammalian skeletal muscle: functional properties and central actions. *Physiol Rev* 72: 623-66
- Jean Kant G, Eggleston T, Landman-Roberts L, Kenion CC, Driver GC, Meyerhoff JL. 1985. Habituation to repeated stress is stressor specific. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 22: 631-34
- Jeon BT, Heo RW, Jeong EA, Yi CO, Lee JY, et al. 2016. Effects of caloric restriction on O-GlcNAcylation, Ca(2+) signaling, and learning impairment in the hippocampus of ob/ob mice. *Neurobiol Aging* 44: 127-37
- Ji S, Kang JG, Park SY, Lee JH, Oh YJ, Cho JW. 2011. O-GlcNAcylation of tubulin inhibits its polymerization. *Amino Acids* 40: 809-18
- Jiang X, Lautermilch NJ, Watari H, Westenbroek RE, Scheuer T, Catterall WA. 2008. Modulation of CaV 2.1 channels by Ca2+ calmodulin-dependent protein kinase II bound to the C-terminal domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105: 341-46
- Jinek M, Rehwinkel J, Lazarus BD, Izaurralde E, Hanover JA, Conti E. 2004. The superhelical TPR-repeat domain of O-linked GlcNAc transferase exhibits structural similarities to importin alpha. *Nat Struct Mol Biol* 11: 1001-7

- Johnson JW, Ascher P. 1987. Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons. *Nature* 325: 529
- Johnston PA, Sudhof TC. 1990. The multisubunit structure of synaptophysin. Relationship between disulfide bonding and homo-oligomerization. *The Journal of biological chemistry* 265: 8869-73
- Jovanovic JN, Benfenati F, Siow YL, Sihra TS, Sanghera JS, et al. 1996. Neurotrophins stimulate phosphorylation of synapsin I by MAP kinase and regulate synapsin I-actin interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93: 3679-83
- Jovanovic JN, Czernik AJ, Fienberg AA, Greengard P, Sihra TS. 2000. Synapsins as mediators of BDNF-enhanced neurotransmitter release. *Nature Neuroscience* 3: 323

Κ

- Kaasik K, Kivimäe S, Allen Jasmina J, Chalkley Robert J, Huang Y, et al. 2013. Glucose Sensor O-GlcNAcylation Coordinates with Phosphorylation to Regulate Circadian Clock. *Cell Metabolism* 17: 291-302
- Kamat PK, Kalani A, Tyagi N. 2014. Method and validation of synaptosomal preparation for isolation of synaptic membrane proteins from rat brain. *MethodsX* 1: 102-07
- Kaneko F, Murakami T, Onari K, Kurumadani H, Kawaguchi K. 2003. Decreased cortical excitability during motor imagery after disuse of an upper limb in humans. *Clinical Neurophysiology* 114: 2397-403
- Kang MJ, Kim C, Jeong H, Cho BK, Ryou AL, et al. 2013. Synapsin-1 and tau reciprocal O-GlcNAcylation and phosphorylation sites in mouse brain synaptosomes. *Exp Mol Med* 45: e29
- Kanikowska D, Sato M, Iwase S, Nishimura N, Shimizu Y, et al. 2010. Leptin and Ghrelin Levels in Humans During Physical Inactivity Induced by Head-Down Bed Rest. *Aviation, Space, and Environmental Medicine* 81: 383-86
- Kanno T, Yaguchi T, Nagata T, Mukasa T, Nishizaki T. 2010. Regulation of AMPA receptor trafficking by O-glycosylation. *Neurochem Res* 35: 782-8
- Kano M, lino K, Kano M. 1991. Functional reorganization of adult cat somatosensory cortex is dependent on NMDA receptors. *Neuroreport* 2: 77-80
- Kapitein LC, Yau KW, Gouveia SM, van der Zwan WA, Wulf PS, et al. 2011. NMDA receptor activation suppresses microtubule growth and spine entry. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31: 8194-209
- Kappos EA, Sieber PK, Engels PE, Mariolo AV, D'Arpa S, et al. 2017. Validity and reliability of the CatWalk system as a static and dynamic gait analysis tool for the assessment of functional nerve recovery in small animal models. *Brain Behav* 7: e00723
- Karita T, Matsuura A, Kondo Y, Tomimura K, Nakada N, Mori F. 2017. Time course of changes in corticospinal excitability after short-term forearm/hand immobilization. *NeuroReport* 28: 1092-96
- Kelly WG, Dahmus ME, Hart GW. 1993. RNA polymerase II is a glycoprotein. Modification of the COOH-terminal domain by O-GlcNAc. *Journal of Biological Chemistry* 268: 10416-24
- Kelly WG, Hart GW. 1989. Glycosylation of chromosomal proteins: Localization of O-linked Nacetylglucosamine in Drosophila chromatin. *Cell* 57: 243-51
- Khidekel N, Ficarro SB, Clark PM, Bryan MC, Swaney DL, et al. 2007. Probing the dynamics of O-GlcNAc glycosylation in the brain using quantitative proteomics. *Nat Chem Biol* 3: 339-48
- Khidekel N, Ficarro SB, Peters EC, Hsieh-Wilson LC. 2004. Exploring the O-GlcNAc proteome: Direct identification of O-GlcNAc-modified proteins from the brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 13132-37
- Kilgard M. 2003. Cholinergic modulation of skill learning and plasticity. *Neuron* 38: 678-80

- Kim E, Naisbitt S, Hsueh YP, Rao A, Rothschild A, et al. 1997. GKAP, a novel synaptic protein that interacts with the guanylate kinase-like domain of the PSD-95/SAP90 family of channel clustering molecules. *J Cell Biol* 136: 669-78
- Kinoshita E, Kinoshita-Kikuta E, Koike T. 2015. The Cutting Edge of Affinity Electrophoresis Technology. *Proteomes* 3: 42-55
- Kleim JA, Barbay S, Cooper NR, Hogg TM, Reidel CN, et al. 2002. Motor learning-dependent synaptogenesis is localized to functionally reorganized motor cortex. *Neurobiol Learn Mem* 77: 63-77
- Klein AL, Berkaw MN, Buse MG, Ball LE. 2009. O-Linked N-Acetylglucosamine Modification of Insulin Receptor Substrate-1 Occurs in Close Proximity to Multiple SH2 Domain Binding Motifs. *Molecular & Cellular Proteomics* 8: 2733-45
- Klockener T, Hess S, Belgardt BF, Paeger L, Verhagen LA, et al. 2011. High-fat feeding promotes obesity via insulin receptor/PI3K-dependent inhibition of SF-1 VMH neurons. *Nat Neurosci* 14: 911-8
- Knott GW, Holtmaat A, Wilbrecht L, Welker E, Svoboda K. 2006. Spine growth precedes synapse formation in the adult neocortex in vivo. *Nat Neurosci* 9: 1117-24
- Knott GW, Quairiaux C, Genoud C, Welker E. 2002. Formation of Dendritic Spines with GABAergic Synapses Induced by Whisker Stimulation in Adult Mice. *Neuron* 34: 265-73
- Koh TW, Bellen HJ. 2003. Synaptotagmin I, a Ca2+ sensor for neurotransmitter release. *Trends in Neurosciences* 26: 413-22
- Koppelmans V, Bloomberg JJ, De Dios YE, Wood SJ, Reuter-Lorenz PA, et al. 2017. Brain plasticity and sensorimotor deterioration as a function of 70 days head down tilt bed rest. *PLoS One* 12: e0182236
- Kornau HC, Schenker LT, Kennedy MB, Seeburg PH. 1995. Domain interaction between NMDA receptor subunits and the postsynaptic density protein PSD-95. *Science* 269: 1737-40
- Kornfeld R. 1967. Studies on L-glutamine D-fructose 6-phosphate amidotransferase. I. Feedback inhibition by uridine diphosphate-N-acetylglucosamine. *The Journal of biological chemistry* 242: 3135-41
- Kramer A, Gollhofer A, Ritzmann R. 2013. Acute exposure to microgravity does not influence the H-reflex with or without whole body vibration and does not cause vibration-specific changes in muscular activity. *Journal of Electromyography and Kinesiology* 23: 872-78
- Krapivinsky G, Medina I, Krapivinsky L, Gapon S, Clapham DE. 2004. SynGAP-MUPP1-CaMKII Synaptic Complexes Regulate p38 MAP Kinase Activity and NMDA Receptor- Dependent Synaptic AMPA Receptor Potentiation. *Neuron* 43: 563-74
- Krasnov IB. 1994. Chapter 4 Gravitational Neuromorphology In *Advances in Space Biology and Medicine*, ed. SL Bonting, pp. 85-110: Elsevier
- Kreppel LK, Blomberg MA, Hart GW. 1997. Dynamic glycosylation of nuclear and cytosolic proteins. Cloning and characterization of a unique O-GlcNAc transferase with multiple tetratricopeptide repeats. *The Journal of biological chemistry* 272: 9308-15
- Kreppel LK, Hart GW. 1999. Regulation of a cytosolic and nuclear O-GlcNAc transferase. Role of the tetratricopeptide repeats. *The Journal of biological chemistry* 274: 32015-22
- Kristensen AS, Jenkins MA, Banke TG, Schousboe A, Makino Y, et al. 2011. Mechanism of Ca2+/calmodulin-dependent kinase II regulation of AMPA receptor gating. *Nature Neuroscience* 14: 727
- Kubota Y, Fujioka K, Takekawa M. 2017. WGA-based lectin affinity gel electrophoresis: A novel method for the detection of O-GlcNAc-modified proteins. *PLOS ONE* 12: e0180714
- Küchler M, Fouad K, Weinmann O, Schwab ME, Raineteau O. 2002. Red nucleus projections to distinct motor neuron pools in the rat spinal cord. *The Journal of Comparative Neurology* 448: 349-59
- Kwon SE, Chapman ER. 2011. Synaptophysin regulates the kinetics of synaptic vesicle endocytosis in central neurons. *Neuron* 70: 847-54

- Lagerlöf O, Hart GW. 2014. O-GlcNAcylation of Neuronal Proteins: Roles in Neuronal Functions and in Neurodegeneration In *Glycobiology of the Nervous System*, ed. RK Yu, C-L Schengrund, pp. 343-66. New York, NY: Springer New York
- Lagerlöf O, Hart GW, Huganir RL. 2017. O-GlcNAc transferase regulates excitatory synapse maturity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114: 1684-89
- Lagerlof O, Slocomb JE, Hong I, Aponte Y, Blackshaw S, et al. 2016. The nutrient sensor OGT in PVN neurons regulates feeding. *Science* 351: 1293-6
- Landau SM, Harvey D, Madison CM, Koeppe RA, Reiman EM, et al. 2011. Associations between cognitive, functional, and FDG-PET measures of decline in AD and MCI. *Neurobiology of Aging* 32: 1207-18
- Langer N, Hänggi J, Müller NA, Simmen HP, Jäncke L. 2012. Effects of limb immobilization on brain plasticity. *Neurology* 78: 182-88
- Langlet C, Bastide B, Canu MH. 2012. Hindlimb unloading affects cortical motor maps and decreases corticospinal excitability. *Exp Neurol* 237: 211-7
- Langlet C, Canu MH, Falempin M. 1999. Short-term reorganization of the rat somatosensory cortex following hypodynamia-hypokinesia. *Neurosci Lett* 266: 145-8
- Langlet C, Canu MH, Viltart O, Sequeira H, Falempin M. 2001. Hypodynamia–hypokinesia induced variations in expression of fos protein in structures related to somatosensory system in the rat. *Brain Research* 905: 72-80
- Larras B, Praznoczy C. 2018. État des lieux de l'activité physique et de la sédentarité en France Édition 2018 Personnes avançant en âge. *Onaps*
- Lawson SN, Harper AA, Harper EI, Garson JA, Anderton BH. 1984. A monoclonal antibody against neurofilament protein specifically labels a subpopulation of rat sensory neurones. *The Journal of Comparative Neurology* 228: 263-72
- Layne CS, McDonald PV, Bloomberg JJ. 1997. Neuromuscular activation patterns during treadmill walking after space flight. *Exp Brain Res* 113: 104-16
- Lazarus MB, Nam Y, Jiang J, Sliz P, Walker S. 2011. Structure of human O-GlcNAc transferase and its complex with a peptide substrate. *Nature* 469: 564-7
- LeBlanc A, Rowe R, Schneider V, Evans H, Hedrick T. 1995. Regional muscle loss after short duration spaceflight. *Aviation, space, and environmental medicine* 66: 1151-54
- Lee HK. 2006. Synaptic plasticity and phosphorylation. *Pharmacol Ther* 112: 810-32
- Lee HK, Barbarosie M, Kameyama K, Bear MF, Huganir RL. 2000. Regulation of distinct AMPA receptor phosphorylation sites during bidirectional synaptic plasticity. *Nature* 405: 955
- Lee Hough C. 2006. Neuromuscular Sequelae in Survivors of Acute Lung Injury. *Clinics in Chest Medicine* 27: 691-703
- Lee TH, Kato H, Pan LH, Ryu JH, Kogure K, Itoyama Y. 1998. Localization of nerve growth factor, trkA and p75 immunoreactivity in the hippocampal formation and basal forebrain of adult rats. *Neuroscience* 83: 335-49
- Lee TN, Alborn WE, Knierman MD, Konrad RJ. 2006. Alloxan is an inhibitor of O-GlcNAc-selective N-acetyl-beta-D-glucosaminidase. *Biochem Biophys Res Commun* 350: 1038-43
- Leem JW, Willis WD, Chung JM. 1993. Cutaneous sensory receptors in the rat foot. J Neurophysiol 69: 1684-99
- Lefebvre T, Alonso C, Mahboub S, Dupire MJ, Zanetta JP, et al. 1999. Effect of okadaic acid on O-linked N-acetylglucosamine levels in a neuroblastoma cell line. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) General Subjects* 1472: 71-81

- Lehman DM, Fu DJ, Freeman AB, Hunt KJ, Leach RJ, et al. 2005. A single nucleotide polymorphism in MGEA5 encoding O-GlcNAc-selective N-acetyl-beta-D glucosaminidase is associated with type 2 diabetes in Mexican Americans. *Diabetes* 54: 1214-21
- Leonard AS, Lim IA, Hemsworth DE, Horne MC, Hell JW. 1999. Calcium/calmodulindependent protein kinase II is associated with the N-methyl-D-aspartate receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96: 3239-44
- Leterme D, Falempin M. 1996. Contractile properties of rat soleus motor units following 14 days of hindlimb unloading. *Pflügers Archiv* 432: 313-19
- Li B, Li H, Lu L, Jiang J. 2017. Structures of human O-GlcNAcase and its complexes reveal a new substrate recognition mode. *Nat Struct Mol Biol* 24: 362-69
- Li C, Ullrich B, Zhang JZ, Anderson RG, Brose N, Sudhof TC. 1995. Ca(2+)-dependent and independent activities of neural and non-neural synaptotagmins. *Nature* 375: 594-9
- Li XG, Florence SL, Kaas JH. 1990. Areal Distributions of Cortical Neurons Projecting to Different Levels of the Caudal Brain Stem and Spinal Cord in Rats. *Somatosensory & Motor Research* 7: 315-35
- Li Z, Okamoto K-I, Hayashi Y, Sheng M. 2004. The Importance of Dendritic Mitochondria in the Morphogenesis and Plasticity of Spines and Synapses. *Cell* 119: 873-87
- Liepert J, Tegenthoff M, Malin JP. 1995. Changes of cortical motor area size during immobilization. *Clinical Neurophysiology* 97: 382-86
- Light AR, Perl ER. 1979. Spinal termination of functionally identified primary afferent neurons with slowly conducting myelinated fibers. *The Journal of Comparative Neurology* 186: 133-50
- Lim S, Haque MM, Nam G, Ryoo N, Rhim H, Kim YK. 2015. Monitoring of Intracellular Tau Aggregation Regulated by OGA/OGT Inhibitors. *Int J Mol Sci* 16: 20212-24
- Lipnicki DM, Gunga HC. 2009. Physical inactivity and cognitive functioning: results from bed rest studies. *Eur J Appl Physiol* 105: 27-35
- Lisman J, Schulman H, Cline H. 2002. The molecular basis of CaMKII function in synaptic and behavioural memory. *Nature Reviews Neuroscience* 3: 175
- Lisman J, Yasuda R, Raghavachari S. 2012. Mechanisms of CaMKII action in long-term potentiation. *Nat Rev Neurosci* 13: 169-82
- Lissek S, Wilimzig C, Stude P, Pleger B, Kalisch T, et al. 2009. Immobilization Impairs Tactile Perception and Shrinks Somatosensory Cortical Maps. *Current Biology* 19: 837-42
- Liu F, Iqbal K, Grundke-Iqbal I, Hart GW, Gong CX. 2004. O-GlcNAcylation regulates phosphorylation of tau: a mechanism involved in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 10804-9
- Liu Q, Xie F, Siedlak SL, Nunomura A, Honda K, et al. 2004. Neurofilament proteins in neurodegenerative diseases. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* 61: 3057-75
- Liu XY, Mao LM, Zhang GC, Papasian CJ, Fibuch EE, et al. 2009. Activity-Dependent Modulation of Limbic Dopamine D3 Receptors by CaMKII. *Neuron* 61: 425-38
- Liu Y, Li X, Yu Y, Shi J, Liang Z, et al. 2012. Developmental regulation of protein O-GlcNAcylation, O-GlcNAc transferase, and O-GlcNAcase in mammalian brain. *PLoS One* 7: e43724
- Lo DC. 1995. Neurotrophic factors and synaptic plasticity. *Neuron* 15: 979-81
- Lonze BE, Ginty DD. 2002. Function and Regulation of CREB Family Transcription Factors in the Nervous System. *Neuron* 35: 605-23
- Low JST, John LA, Tracey DJ. 1986. Nucleus Z in the rat: Spinal afferents from collaterals of dorsal spinocerebellar tract neurons. *The Journal of Comparative Neurology* 243: 510-26
- Lu SM, Lin RCS. 1993. Thalamic Afferents of the Rat Barrel Cortex: A Light-and Electron-Microscopic Study Using Phaseolus vulgaris Leucoagglutinin as an Anterograde Tracer. *Somatosensory & Motor Research* 10: 1-16
- Lu W, Roche KW. 2012. Posttranslational regulation of AMPA receptor trafficking and function. *Current Opinion in Neurobiology* 22: 470-79

- Lubas WA, Frank DW, Krause M, Hanover JA. 1997. O-Linked GlcNAc transferase is a conserved nucleocytoplasmic protein containing tetratricopeptide repeats. *The Journal of biological chemistry* 272: 9316-24
- Lucchesi W, Mizuno K, Giese KP. 2011. Novel insights into CaMKII function and regulation during memory formation. *Brain Research Bulletin* 85: 2-8
- Ludemann N, Clement A, Hans VH, Leschik J, Behl C, Brandt R. 2005. O-glycosylation of the tail domain of neurofilament protein M in human neurons and in spinal cord tissue of a rat model of amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *The Journal of biological chemistry* 280: 31648-58
- Lund RD, Webster KE. 1967a. Thalamic afferents from the dorsal column nuclei. An experimental anatomical study in the rat. *J Comp Neurol* 130: 301-12
- Lund RD, Webster KE. 1967b. Thalamic afferents from the spinal cord and trigeminal nuclei. An experimental anatomical study in the rat. *J Comp Neurol* 130: 313-28
- Ly CV, Verstreken P. 2006. Mitochondria at the Synapse. *The Neuroscientist* 12: 291-99

Μ

- Ma J, Hart GW. 2014. O-GlcNAc profiling: from proteins to proteomes. *Clin Proteomics* 11: 8
- Ma X, Li H, He Y, Hao J. 2017. The emerging link between O-GlcNAcylation and neurological disorders. *Cellular and Molecular Life Sciences* 74: 3667-86
- Macauley MS, Shan X, Yuzwa SA, Gloster TM, Vocadlo DJ. 2010. Elevation of Global O-GlcNAc in Rodents Using a Selective O-GlcNAcase Inhibitor Does Not Cause Insulin Resistance or Perturb Glucohomeostasis. *Chemistry & Biology* 17: 949-58
- Macauley MS, Vocadlo DJ. 2009. Enzymatic characterization and inhibition of the nuclear variant of human O-GlcNAcase. *Carbohydrate Research* 344: 1079-84
- Macauley MS, Whitworth GE, Debowski AW, Chin D, Vocadlo DJ. 2005. O-GlcNAcase uses substrate-assisted catalysis: kinetic analysis and development of highly selective mechanism-inspired inhibitors. *The Journal of biological chemistry* 280: 25313-22
- MacDermott AB, Mayer ML, Westbrook GL, Smith SJ, Barker JL. 1986. NMDA-receptor activation increases cytoplasmic calcium concentration in cultured spinal cord neurones. *Nature* 321: 519
- Mack KJ, Mack PA. 1992. Induction of transcription factors in somatosensory cortex after tactile stimulation. *Molecular Brain Research* 12: 141-47
- Magnus CR, Barss TS, Lanovaz JL, Farthing JP. 2010. Effects of cross-education on the muscle after a period of unilateral limb immobilization using a shoulder sling and swathe. *J Appl Physiol (1985)* 109: 1887-94
- Malenka RC, Bear MF. 2004. LTP and LTD: an embarrassment of riches. *Neuron* 44: 5-21
- Malenka RC, Lancaster B, Zucker RS. 1992. Temporal limits on the rise in postsynaptic calcium required for the induction of long-term potentiation. *Neuron* 9: 121-28
- Malinow R, Malenka RC. 2002. AMPA Receptor Trafficking and Synaptic Plasticity. *Annual Review of Neuroscience* 25: 103-26
- Mallei A, Failler M, Corna S, Racagni G, Mathe AA, Popoli M. 2014. Synaptoproteomic analysis of a rat gene-environment model of depression reveals involvement of energy metabolism and cellular remodeling pathways. *Int J Neuropsychopharmacol* 18
- Mao T, Kusefoglu D, Hooks BM, Huber D, Petreanu L, Svoboda K. 2011. Long-Range Neuronal Circuits Underlying the Interaction between Sensory and Motor Cortex. *Neuron* 72: 111-23
- Marmonti E, Busquets S, Toledo M, Ricci M, Beltra M, et al. 2017. A Rat Immobilization Model Based on Cage Volume Reduction: A Physiological Model for Bed Rest? *Front Physiol* 8: 184

- Marotta NP, Lin YH, Lewis YE, Ambroso MR, Zaro BW, et al. 2015. O-GlcNAc modification blocks the aggregation and toxicity of the protein alpha-synuclein associated with Parkinson's disease. *Nat Chem* 7: 913-20
- Martin JH, Engber D, Meng Z. 2005. Effect of forelimb use on postnatal development of the forelimb motor representation in primary motor cortex of the cat. *J Neurophysiol* 93: 2822-31
- Martin LJ, Blackstone CD, Levey AI, Huganir RL, Price DL. 1993. AMPA glutamate receptor subunits are differentially distributed in rat brain. *Neuroscience* 53: 327-58
- Martinov T, Mack M, Sykes A, Chatterjea D. 2013. Measuring Changes in Tactile Sensitivity in the Hind Paw of Mice Using an Electronic von Frey Apparatus. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*: 51212
- Maslany S, Crockett DP, Egger MD. 1991. Somatotopic organization of the dorsal column nuclei in the rat: transganglionic labelling with B-HRP and WGA-HRP. *Brain Res* 564: 56-65
- Mayer ML, Westbrook GL, Guthrie PB. 1984. Voltage-dependent block by Mg2+ of NMDA responses in spinal cord neurones. *Nature* 309: 261
- Mayr B, Montminy M. 2001. Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2: 599-609
- McAllister AK, Katz LC, Lo DC. 1999. Neurotrophins and synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci* 22: 295-318
- McClain DA, Crook ED. 1996. Hexosamines and insulin resistance. *Diabetes* 45: 1003-9
- McDonald KS, Blaser CA, Fitts RH. 1994. Force-velocity and power characteristics of rat soleus muscle fibers after hindlimb suspension. *Journal of Applied Physiology* 77: 1609-16
- McGraw RL, Riggs JE. 1994. Osteoporosis, sedentary lifestyle, and increasing hip fractures: Pathogenic relationship or differential survival bias. *Calcified Tissue International* 55: 87-89
- Metz GA, Dietz V, Schwab ME, van de Meent H. 1998. The effects of unilateral pyramidal tract section on hindlimb motor performance in the rat. *Behavioural brain research* 96: 37-46
- Miles L. 2007. Physical activity and health. *Nutrition Bulletin* 32: 314-63
- Miles MP, Clarkson PM, Bean M, Ambach K, Mulroy J, Vincent K. 1994. Muscle function at the wrist following 9 d of immobilization and suspension. *Medicine and science in sports and exercise* 26: 615-23
- Miller CA, Peters BT, Brady RR, Richards JR, Ploutz-Snyder RJ, et al. 2010. Changes in Toe Clearance During Treadmill Walking After Long-Duration Spaceflight. *Aviation, space, and environmental medicine* 81: 919-28
- Miller KE, Sheetz MP. 2004. Axonal mitochondrial transport and potential are correlated. *Journal of cell science* 117: 2791-804
- Miller MW. 1987. The origin of corticospinal projection neurons in rat. *Exp Brain Res* 67: 339-51
- Miller SG, Kennedy MB. 1986. Regulation of brain Type II Ca2+calmodulin-dependent protein kinase by autophosphorylation: A Ca2+-triggered molecular switch. *Cell* 44: 861-70
- Mitchell T, Barlow CE. 2011. Review of the role of exercise in improving quality of life in healthy individuals and in those with chronic diseases. *Curr Sports Med Rep* 10: 211-6
- Molina-Luna K, Hertler B, Buitrago MM, Luft AR. 2008. Motor learning transiently changes cortical somatotopy. *NeuroImage* 40: 1748-54
- Monfils MH, Teskey GC. 2004. Induction of long-term depression is associated with decreased dendritic length and spine density in layers III and V of sensorimotor neocortex. *Synapse* 53: 114-21
- Monfils MH, Teskey GC. 2004. Skilled-learning-induced potentiation in rat sensorimotor cortex: a transient form of behavioural long-term potentiation. *Neuroscience* 125: 329-36
- Monfils MH, VandenBerg PM, Kleim JA, Teskey GC. 2004. Long-term potentiation induces expanded movement representations and dendritic hypertrophy in layer V of rat sensorimotor neocortex. *Cereb Cortex* 14: 586-93

- Monyer H, Burnashev N, Laurie DJ, Sakmann B, Seeburg PH. 1994. Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron* 12: 529-40
- Morey-Holton ER, Globus RK. 2002. Hindlimb unloading rodent model: technical aspects. *J Appl Physiol (1985)* 92: 1367-77
- Morey ER, Sabelman EE, Turner RT, Baylink DJ. 1979. A new rat model simulating some aspects of space flight. *The Physiologist* 22: S23-4
- Muir GD, Whishaw IQ. 2000. Red nucleus lesions impair overground locomotion in rats: a kinetic analysis. *European Journal of Neuroscience* 12: 1113-22
- Mukhamedshina YO, Povysheva TV, Nigmetzyanova MV, Tyapkina OV, Islamov RR, et al. 2014. Astrocytes and microglia of the mouse spinal cord during hind limb suspension. *Dokl Biol Sci* 456: 157-9
- Mulavara AP, Feiveson AH, Fiedler J, Cohen H, Peters BT, et al. 2010. Locomotor function after long-duration space flight: effects and motor learning during recovery. *Exp Brain Res* 202: 649-59
- Mulkey RM, Herron CE, Malenka RC. 1993. An essential role for protein phosphatases in hippocampal long-term depression. *Science* 261: 1051-55
- Murray HM, Gurule ME. 1979. Origin of the rubrospinal tract of the rat. *Neuroscience Letters* 14: 19-23
- Myers SA, Peddada S, Chatterjee N, Friedrich T, Tomoda K, et al. 2016. SOX2 O-GlcNAcylation alters its protein-protein interactions and genomic occupancy to modulate gene expression in pluripotent cells. *Elife* 5: e10647
- Mysoet J, Canu MH, Cieniewski-Bernard C, Bastide B, Dupont E. 2014. Hypoactivity affects IGF-1 level and PI3K/AKT signaling pathway in cerebral structures implied in motor control. *PLoS One* 9: e107631
- Mysoet J, Canu MH, Gillet C, Fourneau J, Garnier C, et al. 2017. Reorganization of motor cortex and impairment of motor performance induced by hindlimb unloading are partially reversed by cortical IGF-1 administration. *Behavioural Brain Research* 317: 434-43
- Mysoet J, Dupont E, Bastide B, Canu MH. 2015. Role of IGF-1 in cortical plasticity and functional deficit induced by sensorimotor restriction. *Behav Brain Res* 290: 117-23

Ν

- Nagatomo F, Fujino H, Kondo H, Suzuki H, Kouzaki M, et al. 2011. PGC-1alpha and FOXO1 mRNA levels and fiber characteristics of the soleus and plantaris muscles in rats after hindlimb unloading. *Histol Histopathol* 26: 1545-53
- Nanda SA, Mack KJ. 2000. Seizures and sensory stimulation result in different patterns of brain derived neurotrophic factor protein expression in the barrel cortex and hippocampus. *Molecular Brain Research* 78: 1-14
- Narici MV, de Boer MD. 2011. Disuse of the musculo-skeletal system in space and on earth. *European journal of applied physiology* 111: 403-20
- Navasiolava NM, Custaud MA, Tomilovskaya ES, Larina IM, Mano T, et al. 2011. Long-term dry immersion: review and prospects. *Eur J Appl Physiol* 111: 1235-60
- Neafsey EJ, Bold EL, Haas G, Hurley-Gius KM, Quirk G, et al. 1986. The organization of the rat motor cortex: A microstimulation mapping study. *Brain Research Reviews* 11: 77-96
- Newman DB, Liu RPC. 1987. Nuclear origins of brainstem reticulocortical systems in the rat. *American Journal of Anatomy* 178: 279-99
- Ngomo S, Leonard G, Mercier C. 2012. Influence of the amount of use on hand motor cortex representation: Effects of immobilization and motor training. *Neuroscience* 220: 208-14

- Nicoll RA, Tomita S, Bredt DS. 2006. Auxiliary Subunits Assist AMPA-Type Glutamate Receptors. *Science* 311: 1253-56
- Nicolopoulos-Stournaras S, Iles JF. 1983. Motor neuron columns in the lumbar spinal cord of the rat. *The Journal of Comparative Neurology* 217: 75-85
- Nikandrova YA, Jiao Y, Baucum AJ, Tavalin SJ, Colbran RJ. 2010. Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase II binds to and phosphorylates a specific SAP97 splice variant to disrupt association with AKAP79/150 and modulate alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid-type glutamate receptor (AMPAR) activity. *The Journal of biological chemistry* 285: 923-34
- Nishiki T, Kuroki K, Masumoto T, Matsui H. 2015. Ca2+ Sensors: Synaptotagmins In *Presynaptic Terminals*, ed. S Mochida, pp. 167-94. Tokyo: Springer Japan
- Nithianantharajah J, Levis H, Murphy M. 2004. Environmental enrichment results in cortical and subcortical changes in levels of synaptophysin and PSD-95 proteins. *Neurobiol Learn Mem* 81: 200-10
- Nolte D, Muller U. 2002. Human O-GlcNAc transferase (OGT): genomic structure, analysis of splice variants, fine mapping in Xq13.1. *Mamm Genome* 13: 62-4
- Nomura T, Kawano F, Ishihara A, Sato Y, Mitarai G, et al. 2001. Enhanced Hoffman-reflex in human soleus muscle during exposure to microgravity environment. *Neuroscience Letters* 316: 55-57
- Nudo RJ, Wise BM, SiFuentes F, Milliken GW. 1996. Neural Substrates for the Effects of Rehabilitative Training on Motor Recovery After Ischemic Infarct. *Science* 272: 1791-94
- Numakawa T, Suzuki S, Kumamaru E, Adachi N, Richards M, Kunugi H. 2010. BDNF function and intracellular signaling in neurons. *Histology and histopathology* 25: 237-58
- Ober WC, Garrison CW, Silverthorn AC. 2012. Human Physiology: An Integrated Approach (2nd Edition). *Silverthorn*
- Oh MC, Derkach VA. 2005. Dominant role of the GluR2 subunit in regulation of AMPA receptors by CaMKII. *Nature Neuroscience* 8: 853
- Oh MC, Derkach VA, Guire ES, Soderling TR. 2006. Extrasynaptic membrane trafficking regulated by GluR1 serine 845 phosphorylation primes AMPA receptors for long-term potentiation. *The Journal of biological chemistry* 281: 752-8
- Ohira Y, Yoshinaga T, Nomura T, Kawano F, Ishihara A, et al. 2002. Gravitational unloading effects on muscle fiber size, phenotype and myonuclear number. *Advances in space research* : the official journal of the Committee on Space Research (COSPAR) 30: 777-81
- Okamoto K, Nagai T, Miyawaki A, Hayashi Y. 2004. Rapid and persistent modulation of actin dynamics regulates postsynaptic reorganization underlying bidirectional plasticity. *Nat Neurosci* 7: 1104-12
- Okuyama R, Marshall S. 2003. UDP-N-acetylglucosaminyl transferase (OGT) in brain tissue: temperature sensitivity and subcellular distribution of cytosolic and nuclear enzyme. *Journal of Neurochemistry* 86: 1271-80
- Opazo P, Sainlos M, Choquet D. 2012. Regulation of AMPA receptor surface diffusion by PSD-95 slots. *Current Opinion in Neurobiology* 22: 453-60
- Orlando LR, Ayala R, Kett LR, Curley AA, Duffner J, et al. 2009. Phosphorylation of the homerbinding domain of group I metabotropic glutamate receptors by cyclin-dependent kinase 5. *J Neurochem* 110: 557-69
- Ortiz-Meoz RF, Jiang J, Lazarus MB, Orman M, Janetzko J, et al. 2015. A Small Molecule That Inhibits OGT Activity in Cells. *ACS Chemical Biology* 10: 1392-97

- Pandit R, Beerens S, Adan RAH. 2017. Role of leptin in energy expenditure: the hypothalamic perspective. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 312: R938-R47
- Paoletti P, Neyton J. 2007. NMDA receptor subunits: function and pharmacology. *Current Opinion in Pharmacology* 7: 39-47
- Pearson JC, Finkel LH, Edelman GM. 1987. Plasticity in the organization of adult cerebral cortical maps: a computer simulation based on neuronal group selection. *The Journal of Neuroscience* 7: 4209-23
- Pekkurnaz G, Trinidad JC, Wang X, Kong D, Schwarz TL. 2014. Glucose regulates mitochondrial motility via Milton modification by O-GlcNAc transferase. *Cell* 158: 54-68
- Pérot C, Almeida-Silveira MI. 1994. The human H and T reflex methodologies applied to the rat. *Journal of Neuroscience Methods* 51: 71-76
- Peterson BW, Maunz RA, Pitts NG, Mackel RG. 1975. Patterns of projection and braching of reticulospinal neurons. *Exp Brain Res* 23: 333-51
- Phillips GR, Huang JK, Wang Y, Tanaka H, Shapiro L, et al. 2001. The presynaptic particle web: ultrastructure, composition, dissolution, and reconstitution. *Neuron* 32: 63-77
- Phillipson M. 1905. L'autonomie et la centralisation dans le système nerveux des animaux. *Trav. Lab. Physio. Inst.*: 1–208
- Pieribone VA, Shupliakov O, Brodin L, Hilfiker-Rothenfluh S, Czernik AJ, Greengard P. 1995. Distinct pools of synaptic vesicles in neurotransmitter release. *Nature* 375: 493
- Polyakov IV, Drobyshev VI, Krasnov IB. 1991. Morphological changes in the spinal cord and intervertebral ganglia of rats exposed to different gravity levels. *The Physiologist* 34: S187-8
- Popoli M, Yan Z, McEwen BS, Sanacora G. 2011. The stressed synapse: the impact of stress and glucocorticoids on glutamate transmission. *Nature Reviews Neuroscience* 13: 22
- Pubols BH, Haring JH. 1995. The raccoon spinocervical and spinothalamic tracts: a horseradish peroxidase study. *Brain Res Brain Res Rev* 20: 196-208

Q

- Qiu XQ. 1990. NMDA antagonists (MK-801) blocks plasticity of motor cortex maps induced by passive limb movement. *Soc Neurosci Abstr* 16: 422

⁻ Qin Y, Zhu Y, Baumgart JP, Stornetta RL, Seidenman K, et al. 2005. State-dependent Ras signaling and AMPA receptor trafficking. *Genes Dev* 19: 2000-15

- Ranson SW, Clark SL. 1959. The Anatomy of the Nervous System. Its Development and Function. *Academic Medicine* 34: 553
- Rasmusson DD. 2000. The role of acetylcholine in cortical synaptic plasticity. *Behav Brain Res* 115: 205-18
- Ren JC, Fan XL, Song XA, Zhao XH, Chen MX, Shi L. 2012. Prolonged hindlimb unloading leads to changes in electrophysiological properties of L5 dorsal root ganglion neurons in rats after 14 days. *Muscle and Nerve* 45: 65-69
- Rengifo J, Gibson CJ, Winkler E, Collin T, Ehrlich BE. 2007. Regulation of the Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor Type I by O-GlcNAc Glycosylation. *The Journal of Neuroscience* 27: 13813-21
- Reschke MF, Bloomberg JJ, Paloski WH, Mulavara AP, Feiveson AH, Harm DL. 2009. Postural reflexes, balance control, and functional mobility with long-duration head-down bed rest. *Aviation, space, and environmental medicine* 80: A45-54
- Rexach JE, Clark PM, Hsieh-Wilson LC. 2008. Chemical approaches to understanding O-GlcNAc glycosylation in the brain. *Nat Chem Biol* 4: 97-106
- Rexach JE, Clark PM, Mason DE, Neve RL, Peters EC, Hsieh-Wilson LC. 2012. Dynamic O-GlcNAc modification regulates CREB-mediated gene expression and memory formation. *Nat Chem Biol* 8: 253-61
- Rexach JE, Rogers CJ, Yu SH, Tao J, Sun YE, Hsieh-Wilson LC. 2010. Quantification of Oglycosylation stoichiometry and dynamics using resolvable mass tags. *Nat Chem Biol* 6: 645-51
- Rey-Lopez JP, Vicente-Rodriguez G, Biosca M, Moreno LA. 2008. Sedentary behaviour and obesity development in children and adolescents. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 18: 242-51
- Rigbolt KT, Prokhorova TA, Akimov V, Henningsen J, Johansen PT, et al. 2011. System-wide temporal characterization of the proteome and phosphoproteome of human embryonic stem cell differentiation. *Sci Signal* 4: rs3
- Rioult-Pedotti MS, Friedman D, Hess G, Donoghue JP. 1998. Strengthening of horizontal cortical connections following skill learning. *Nature Neuroscience* 1: 230
- Rivero-Melian C. 1996. Organization of hindlimb nerve projections to the rat spinal cord: a choleragenoid horseradish peroxidase study. *J Comp Neurol* 364: 651-63
- Robbins A, Pfaff DW, Schwartz-Giblin S. 1992. Reticulospinal and reticuloreticular pathways for activating the lumbar back muscles in the rat. *Exp Brain Res* 92: 46-58
- Roberts DR, Ramsey D, Johnson K, Kola J, Ricci R, et al. 2010. Cerebral Cortex Plasticity After 90 Days of Bed Rest: Data from TMS and fMRI. *Aviation, Space, and Environmental Medicine* 81: 30-40
- Roberts DR, Ricci R, Funke FW, Ramsey P, Kelley W, et al. 2007. Lower limb immobilization is associated with increased corticospinal excitability. *Experimental Brain Research* 181: 213-20
- Rocamora N, Welker E, Pascual M, Soriano E. 1996. Upregulation of BDNF mRNA expression in the barrel cortex of adult mice after sensory stimulation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 16: 4411-9
- Rosahl TW, Spillane D, Missler M, Herz J, Selig DK, et al. 1995. Essential functions of synapsins I and II in synaptic vesicle regulation. *Nature* 375: 488-93
- Rosselet C, Zennou-Azogui Y, Xerri C. 2006. Nursing-induced somatosensory cortex plasticity: temporally decoupled changes in neuronal receptive field properties are accompanied by modifications in activity-dependent protein expression. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 26: 10667-76

- Rossignol S. 2006. Plasticity of connections underlying locomotor recovery after central and/or peripheral lesions in the adult mammals. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 361: 1647-71
- Roth C, Chan S, Offen WA, Hemsworth GR, Willems LI, et al. 2017. Structural and functional insight into human O-GlcNAcase. *Nat Chem Biol* 13: 610-12
- Roy RR, Baldwin KM, Edgerton VR. 1991. The plasticity of skeletal muscle: effects of neuromuscular activity. *Exercise and sport sciences reviews* 19: 269-312
- Roy RR, Bello MA, Bouissou P, Edgerton VR. 1987. Size and metabolic properties of fibers in rat fast-twitch muscles after hindlimb suspension. *Journal of Applied Physiology* 62: 2348-57
- Ruan HB, Dietrich MO, Liu ZW, Zimmer MR, Li MD, et al. 2014. O-GlcNAc transferase enables AgRP neurons to suppress browning of white fat. *Cell* 159: 306-17
- Ruegg DG, Kakebeeke TH, Studer LM. 1997. Activation of muscles and microgravity. *Int J Sports Med* 18 Suppl 4: S329-31
- Ryu IH, Do SI. 2011. Denitrosylation of S-nitrosylated OGT is triggered in LPS-stimulated innate immune response. *Biochem Biophys Res Commun* 408: 52-7

S

- Sabine H, A. PV, Christer N, Paul G, J. CA. 1999. Regulation of Synaptotagmin I Phosphorylation by Multiple Protein Kinases. *Journal of Neurochemistry* 73: 921-32
- Sabio G, Reuver S, Feijoo C, Hasegawa M, Thomas GM, et al. 2004. Stress- and mitogeninduced phosphorylation of the synapse-associated protein SAP90/PSD-95 by activation of SAPK3/p38gamma and ERK1/ERK2. *Biochem J* 380: 19-30
- Sala-Catala J, Torrero C, Regalado M, Salas M, Ruiz-Marcos A. 2005. Movements restriction and alterations of the number of spines distributed along the apical shafts of layer V pyramids in motor and primary sensory cortices of the peripubertal and adult rat. *Neuroscience* 133: 137-45
- Sala C, Piech V, Wilson NR, Passafaro M, Liu G, Sheng M. 2001. Regulation of dendritic spine morphology and synaptic function by Shank and Homer. *Neuron* 31: 115-30
- Sanchez-Villegas A, Ara I, Guillen-Grima F, Bes-Rastrollo M, Varo-Cenarruzabeitia JJ, Martinez-Gonzalez MA. 2008. Physical activity, sedentary index, and mental disorders in the SUN cohort study. *Med Sci Sports Exerc* 40: 827-34
- Sanchez A, Norman GJ, Sallis JF, Calfas KJ, Rock C, Patrick K. 2008. Patterns and correlates of multiple risk behaviors in overweight women. *Prev Med* 46: 196-202
- Sanes JN, Donoghue JP. 2000. Plasticity and Primary Motor Cortex. *Annual Review of Neuroscience* 23: 393-415
- Sanes JN, Suner S, Donoghue JP. 1990. Dynamic organization of primary motor cortex output to target muscles in adult rats I. Long-term patterns of reorganization following motor or mixed peripheral nerve lesions. *Experimental Brain Research* 79: 479-91
- Saporta S, Kruger L. 1977. The organization of thalamocortical relay neurons in the rat ventrobasal complex studied by the retrograde transport of horseradish peroxidase. *The Journal of Comparative Neurology* 174: 187-208
- Sargeant AJ, Davies CT, Edwards RH, Maunder C, Young A. 1977. Functional and structural changes after disuse of human muscle. *Clinical science and molecular medicine* 52: 337-42
- Satoh K. 1979. The origin of reticulospinal fibers in the rat: a HRP study. *Journal fur Hirnforschung* 20: 313-22
- Scheurer S, Gottschall J, Groh V. 1983. Afferent projections of the rat major occipital nerve studied by transganglionic transport of HRP. *Anat Embryol (Berl)* 167: 425-38

- Schiaffino S, Hanzlíková V, Pierobon S. 1970. Relations Between Structure and Function in Rat Skeletal Muscle Fibers. *The Journal of Cell Biology* 47: 107-19
- Schiaffino S, Reggiani C. 2011. Fiber types in mammalian skeletal muscles. *Physiol Rev* 91: 1447-531
- Schivell AE, Batchelor RH, Bajjalieh SM. 1996. Isoform-specific, Calcium-regulated Interaction of the Synaptic Vesicle Proteins SV2 and Synaptotagmin. *Journal of Biological Chemistry* 271: 27770-75
- Schneider C, Devanne H, Lavoie BA, Capaday C. 2002. Neural mechanisms involved in the functional linking of motor cortical points. *Exp Brain Res* 146: 86-94
- Schnell E, Sizemore M, Karimzadegan S, Chen L, Bredt DS, Nicoll RA. 2002. Direct interactions between PSD-95 and stargazin control synaptic AMPA receptor number. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 13902-7
- Scholz R, Berberich S, Rathgeber L, Kolleker A, Kohr G, Kornau HC. 2010. AMPA receptor signaling through BRAG2 and Arf6 critical for long-term synaptic depression. *Neuron* 66: 768-80
- Schrader LA, Birnbaum SG, Nadin BM, Ren Y, Bui D, et al. 2006. ERK/MAPK regulates the Kv4.2 potassium channel by direct phosphorylation of the pore-forming subunit. *Am J Physiol Cell Physiol* 290: C852-61
- Schwenkreis P, Witscher K, Pleger B, Malin JP, Tegenthoff M. 2005. The NMDA antagonist memantine affects training induced motor cortex plasticity--a study using transcranial magnetic stimulation. *BMC Neurosci* 6: 35
- Scott DB, Blanpied TA, Swanson GT, Zhang C, Ehlers MD. 2001. An NMDA Receptor ER Retention Signal Regulated by Phosphorylation and Alternative Splicing. *The Journal of Neuroscience* 21: 3063-72
- Seidenman KJ, Steinberg JP, Huganir R, Malinow R. 2003. Glutamate Receptor Subunit 2 Serine 880 Phosphorylation Modulates Synaptic Transmission and Mediates Plasticity in CA1 Pyramidal Cells. *The Journal of Neuroscience* 23: 9220-28
- Seynnes OR, Maffiuletti NA, Horstman AM, Narici MV. 2010. Increased H-reflex excitability is not accompanied by changes in neural drive following 24 days of unilateral lower limb suspension. *Muscle & nerve* 42: 749-55
- Shackelford LC, LeBlanc AD, Driscoll TB, Evans HJ, Rianon NJ, et al. 2004. Resistance exercise as a countermeasure to disuse-induced bone loss. *Journal of Applied Physiology* 97: 119-29
- Shafi R, Iyer SP, Ellies LG, O'Donnell N, Marek KW, et al. 2000. The O-GlcNAc transferase gene resides on the X chromosome and is essential for embryonic stem cell viability and mouse ontogeny. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 5735-9
- Shen K, Meyer T. 1999. Dynamic Control of CaMKII Translocation and Localization in Hippocampal Neurons by NMDA Receptor Stimulation. *Science* 284: 162-67
- Sheng M, Kim E. 2000. The Shank family of scaffold proteins. *Journal of cell science* 113: 1851-56
- Shepherd GM, Harris KM. 1998. Three-dimensional structure and composition of CA3-->CA1 axons in rat hippocampal slices: implications for presynaptic connectivity and compartmentalization. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 18: 8300-10
- Sherman SM. 2014. The function of metabotropic glutamate receptors in thalamus and cortex. *Neuroscientist* 20: 136-49
- Shi J, Gu JH, Dai CL, Gu J, Jin X, et al. 2015. O-GlcNAcylation regulates ischemia-induced neuronal apoptosis through AKT signaling. *Sci Rep* 5: 14500
- Shibaguchi H, Takemura K, Kan S, Kataoka Y, Kaibara M, et al. 2000. Role of synaptophysin in exocytotic release of dopamine from Xenopus oocytes injected with rat brain mRNA. *Cell Mol Neurobiol* 20: 401-8
- Shimizu S, Hirose D, Hatanaka H, Takenoshita N, Kaneko Y, et al. 2018. Role of Neuroimaging as a Biomarker for Neurodegenerative Diseases. *Frontiers in neurology* 9: 265

- Simon C, Klein C, Wagner A. 2005. La sédentarité des enfants et des adolescents, un enjeu de santé publique. *Journal de Pédiatrie et de Puériculture* 18: 217-23
- Skelton DA. 2001. Effects of physical activity on postural stability. *Age Ageing* 30 Suppl 4: 33-9
- Skibinska A, Lech M, Kossut M. 2001. PSD95 protein level rises in murine somatosensory cortex after sensory training. *Neuroreport* 12: 2907-10
- Skorobogatko Y, Landicho A, Chalkley RJ, Kossenkov AV, Gallo G, Vosseller K. 2014. O-linked beta-N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) site thr-87 regulates synapsin I localization to synapses and size of the reserve pool of synaptic vesicles. *The Journal of biological chemistry* 289: 3602-12
- Slawson C, Lakshmanan T, Knapp S, Hart GW. 2008. A mitotic GlcNAcylation/phosphorylation signaling complex alters the posttranslational state of the cytoskeletal protein vimentin. *Mol Biol Cell* 19: 4130-40
- Smith SM, Struyk A, Jonathan D, Declercq R, Marcus J, et al. 2016. Early clinical results and preclinical validation of the O-GlcNAcase (OGA) inhibitor MK-8719 as a novel therapeutic for the treatment of tauopathies. *Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association* 12: P261
- Song I, Huganir RL. 2002. Regulation of AMPA receptors during synaptic plasticity. *Trends in Neurosciences* 25: 578-88
- Soukup T, Zacharova G, Smerdu V. 2002. Fibre type composition of soleus and extensor digitorum longus muscles in normal female inbred Lewis rats. *Acta Histochem* 104: 399-405
- Spector SA, Simard CP, Fournier M, Sternlicht E, Edgerton VR. 1982. Architectural alterations of rat hind-limb skeletal muscles immobilized at different lengths. *Exp Neurol* 76: 94-110
- Stefani G, Onofri F, Valtorta F, Vaccaro P, Greengard P, Benfenati F. 1997. Kinetic analysis of the phosphorylation-dependent interactions of synapsin I with rat brain synaptic vesicles. *J Physiol* 504 (Pt 3): 501-15
- Stevens L, Bastide B, Kischel P, Pette D, Mounier Y. 2002. Time-dependent changes in expression of troponin subunit isoforms in unloaded rat soleus muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 282: C1025-30
- Stevens RD, Dowdy DW, Michaels RK, Mendez-Tellez PA, Pronovost PJ, Needham DM. 2007. Neuromuscular dysfunction acquired in critical illness: a systematic review. *Intensive Care Med* 33: 1876-91
- Stoney SD, Thompson WD, Asanuma H. 1968. Excitation of pyramidal tract cells by intracortical microstimulation: effective extent of stimulating current. *J Neurophysiol* 31: 659-69
- Strasmann T, van der Wal JC, Halata Z, Drukker J. 1990. Functional Topography and Ultrastructure of Periarticular Mechanoreceptors in the Lateral Elbow Region of the Rat. *Cells Tissues Organs* 138: 1-14
- Strata F, Coq JO, Byl N, Merzenich MM. 2004. Effects of sensorimotor restriction and anoxia on gait and motor cortex organization: implications for a rodent model of cerebral palsy. *Neuroscience* 129: 141-56
- Stuart CA, Shangraw RE, Prince MJ, Peters EJ, Wolfe RR. 1988. Bed-rest-induced insulin resistance occurs primarily in muscle. *Metabolism* 37: 802-6
- Sturgill JF, Steiner P, Czervionke BL, Sabatini BL. 2009. Distinct Domains within PSD-95 Mediate Synaptic Incorporation, Stabilization, and Activity-Dependent Trafficking. *The Journal of Neuroscience* 29: 12845-54
- Su C, Schwarz TL. 2017. O-GlcNAc Transferase Is Essential for Sensory Neuron Survival and Maintenance. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 37: 2125-36
- Südhof TC. 2013. A molecular machine for neurotransmitter release: synaptotagmin and beyond. *Nature Medicine* 19: 1227

- Sugiura Y, Terui N, Hosoya Y, Tonosaki Y, Nishiyama K, Honda T. 1993. Quantitative analysis of central terminal projections of visceral and somatic unmyelinated (C) primary afferent fibers in the guinea pig. *The Journal of Comparative Neurology* 332: 315-25
- Sugiyama Y, Kawabata I, Sobue K, Okabe S. 2005. Determination of absolute protein numbers in single synapses by a GFP-based calibration technique. *Nature Methods* 2: 677
- Suliman IA, Lindgren JU, Elhassan AM, Diab KM, Adem A. 2001. Effects of short- and longterm rat hind limb immobilization on spinal cord insulin-like growth factor-I and its receptor. *Brain Research* 912: 17-23
- Suzuki T, Okumura-Noji K, Nishida E. 1995. ERK2-type mitogen-activated protein kinase (MAPK) and its substrates in postsynaptic density fractions from the rat brain. *Neuroscience Research* 22: 277-85
- Sweatt JD. 2004. Mitogen-activated protein kinases in synaptic plasticity and memory. *Current Opinion in Neurobiology* 14: 311-17
- Swett JE, Wikholm RP, Blanks RHI, Swett AL, Conley LC. 1986. Motoneurons of the rat sciatic nerve. *Experimental Neurology* 93: 227-52

Т

- Tai HC, Khidekel N, Ficarro SB, Peters EC, Hsieh-Wilson LC. 2004. Parallel identification of O-GlcNAc-modified proteins from cell lysates. *J Am Chem Soc* 126: 10500-1

- Takahashi T, Svoboda K, Malinow R. 2003. Experience Strengthening Transmission by Driving AMPA Receptors into Synapses. *Science* 299: 1585-88
- Takakusaki K. 2017. Functional Neuroanatomy for Posture and Gait Control. JMD 10: 1-17
- Takamori S, Holt M, Stenius K, Lemke EA, Gronborg M, et al. 2006. Molecular anatomy of a trafficking organelle. *Cell* 127: 831-46
- Tallent MK, Varghis N, Skorobogatko Y, Hernandez-Cuebas L, Whelan K, et al. 2009. In vivo modulation of O-GlcNAc levels regulates hippocampal synaptic plasticity through interplay with phosphorylation. *The Journal of biological chemistry* 284: 174-81
- Tan AM, Choi JS, Waxman SG, Hains BC. 2009. Dendritic spine remodeling after spinal cord injury alters neuronal signal processing. *J Neurophysiol* 102: 2396-409
- Tan EP, Villar MT, E L, Lu J, Selfridge JE, et al. 2014. Altering O-linked beta-N-acetylglucosamine cycling disrupts mitochondrial function. *The Journal of biological chemistry* 289: 14719-30
- Tanifuji M, Sugiyama T, Murase K. 1994. Horizontal propagation of excitation in rat visual cortical slices revealed by optical imaging. *Science* 266: 1057-9
- Tarbet HJ, Dolat L, Smith TJ, Condon BM, O'Brien ET, et al. 2018. Site-specific glycosylation regulates the form and function of the intermediate filament cytoskeleton. *Elife* 7
- Tarrant MK, Rho HS, Xie Z, Jiang YL, Gross C, et al. 2012. Regulation of CK2 by phosphorylation and O-GlcNAcylation revealed by semisynthesis. *Nat Chem Biol* 8: 262-9
- Tarsa L, Goda Y. 2002. Synaptophysin regulates activity-dependent synapse formation in cultured hippocampal neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99: 1012-16
- Taylor EW, Wang K, Nelson AR, Bredemann TM, Fraser KB, et al. 2014. O-GlcNAcylation of AMPA receptor GluA2 is associated with a novel form of long-term depression at hippocampal synapses. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 34: 10-21
- Templeton GH, Padalino M, Manton J, Glasberg M, Silver CJ, et al. 1984. Influence of suspension hypokinesia on rat soleus muscle. *Journal of Applied Physiology* 56: 278-86
- Tenreiro P, Rebelo S, Martins F, Santos M, Coelho ED, et al. 2016. Comparison of simple sucrose and percoll based methodologies for synaptosome enrichment. *Anal Biochem*

- Tesch PA, Lundberg TR, Fernandez-Gonzalo R. 2016. Unilateral lower limb suspension: From subject selection to "omic" responses. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)* 120: 1207-14
- Teskey GC, Monfils MH, Flynn C, Young NA, van Rooyen F, et al. 2008. Motor maps, seizures, and behaviour. *Can J Exp Psychol* 62: 132-9
- Teskey GC, Monfils MH, VandenBerg PM, Kleim JA. 2002. Motor map expansion following repeated cortical and limbic seizures is related to synaptic potentiation. *Cereb Cortex* 12: 98-105
- Teskey GC, Young NA, van Rooyen F, Larson SE, Flynn C, et al. 2007. Induction of neocortical long-term depression results in smaller movement representations, fewer excitatory perforated synapses, and more inhibitory synapses. *Cereb Cortex* 17: 434-42
- Thiele C, Hannah MJ, Fahrenholz F, Huttner WB. 2000. Cholesterol binds to synaptophysin and is required for biogenesis of synaptic vesicles. *Nat Cell Biol* 2: 42-9
- Thoenen H. 1995. Neurotrophins and Neuronal Plasticity. *Science* 270: 593-98
- Thomas GM, Huganir RL. 2004. MAPK cascade signalling and synaptic plasticity. *Nature Reviews Neuroscience* 5: 173
- Thomas L, Hartung K, Langosch D, Rehm H, Bamberg E, et al. 1988. Identification of synaptophysin as a hexameric channel protein of the synaptic vesicle membrane. *Science* 242: 1050-53
- Tingley WG, Ehlers MD, Kameyama K, Doherty C, Ptak JB, et al. 1997. Characterization of protein kinase A and protein kinase C phosphorylation of the N-methyl-D-aspartate receptor NR1 subunit using phosphorylation site-specific antibodies. *The Journal of biological chemistry* 272: 5157-66
- Toursel T, Stevens L, Granzier H, Mounier Y. 2002. Passive tension of rat skeletal soleus muscle fibers: effects of unloading conditions. *Journal of Applied Physiology* 92: 1465-72
- Tracey D. 2004. CHAPTER 25 Somatosensory System In *The Rat Nervous System (Third Edition)*, ed. G Paxinos, pp. 797-815. Burlington: Academic Press
- Trachtenberg JT, Chen BE, Knott GW, Feng G, Sanes JR, et al. 2002. Long-term in vivo imaging of experience-dependent synaptic plasticity in adult cortex. *Nature* 420: 788
- Tramutola A, Sharma N, Barone E, Lanzillotta C, Castellani A, et al. 2018. Proteomic identification of altered protein O-GlcNAcylation in a triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta*
- Treffort N, Dubreucq G, Canu MH, Guerardel Y, Falempin M, Picquet F. 2006. Variations in amino acid neurotransmitters in the rat ventral spinal cord after hindlimb unloading. *Neuroscience Letters* 403: 147-50
- Tremblay MS, Colley RC, Saunders TJ, Healy GN, Owen N. 2010. Physiological and health implications of a sedentary lifestyle. *Applied physiology, nutrition, and metabolism = Physiologie appliquee, nutrition et metabolisme* 35: 725-40
- Trinel D, Picquet F, Bastide B, Canu M-H. 2013. Dendritic spine remodeling induced by hindlimb unloading in adult rat sensorimotor cortex. *Behavioural Brain Research* 249: 1-7
- Trinidad JC, Barkan DT, Gulledge BF, Thalhammer A, Sali A, et al. 2012. Global identification and characterization of both O-GlcNAcylation and phosphorylation at the murine synapse. *Mol Cell Proteomics* 11: 215-29
- Trinidad JC, Schoepfer R, Burlingame AL, Medzihradszky KF. 2013. N- and O-glycosylation in the murine synaptosome. *Mol Cell Proteomics* 12: 3474-88
- Tsika RW, Herrick RE, Baldwin KM. 1987. Effect of anabolic steroids on skeletal muscle mass during hindlimb suspension. *J Appl Physiol (1985)* 63: 2122-7

U

Ueyama T, Houtani T, Ikeda M, Sato K, Sugimoto T, Mizuno N. 1994. Distribution of primary afferent fibers projecting from hindlimb cutaneous nerves to the medulla oblongata in the cat and rat. *The Journal of Comparative Neurology* 341: 145-58

V

- Vahlsing HL, Feringa ER. 1980. A ventral uncrossed corticospinal tract in the rat. *Experimental Neurology* 70: 282-87
- Vallejo D, Codocedo JF, Inestrosa NC. 2017. Posttranslational Modifications Regulate the Postsynaptic Localization of PSD-95. *Molecular Neurobiology* 54: 1759-76
- Valtorta F, Pennuto M, Bonanomi D, Benfenati F. 2004. Synaptophysin: leading actor or walk-on role in synaptic vesicle exocytosis? *BioEssays* 26: 445-53
- Veldhuizen JW, Verstappen FT, Vroemen JP, Kuipers H, Greep JM. 1993. Functional and morphological adaptations following four weeks of knee immobilization. *International journal of sports medicine* 14: 283-7
- Verdier D, Dykes RW. 2001. Long-term cholinergic enhancement of evoked potentials in rat hindlimb somatosensory cortex displays characteristics of long-term potentiation. *Experimental Brain Research* 137: 71-82
- Viaro R, Budri M, Parmiani P, Franchi G. 2014. Adaptive changes in the motor cortex during and after longterm forelimb immobilization in adult rats. *J Physiol* 592: 2137-52
- Vickers CA, Stephens B, Bowen J, Arbuthnott GW, Grant SGN, Ingham CA. 2006. Neurone specific regulation of dendritic spines in vivo by post synaptic density 95 protein (PSD-95). Brain Research 1090: 89-98
- Volmat V, Pouysségur J. 2001. Spatiotemporal regulation of the p42/p44 MAPK pathway. *Biology of the Cell* 93: 71-79
- Vosseller K, Trinidad JC, Chalkley RJ, Specht CG, Thalhammer A, et al. 2006. O-linked Nacetylglucosamine proteomics of postsynaptic density preparations using lectin weak affinity chromatography and mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics* 5: 923-34
- Vosseller K, Wells L, Lane MD, Hart GW. 2002. Elevated nucleocytoplasmic glycosylation by O-GlcNAc results in insulin resistance associated with defects in Akt activation in 3T3-L1 adipocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99: 5313-18

W

- Walikonis RS, Oguni A, Khorosheva EM, Jeng CJ, Asuncion FJ, Kennedy MB. 2001. Densin-180
 Forms a Ternary Complex with the α-Subunit of Ca2+/Calmodulin-Dependent Protein Kinase
 II and α-Actinin. *The Journal of Neuroscience* 21: 423-33
- Wall JT, Cusick CG. 1984. Cutaneous responsiveness in primary somatosensory (S-I) hindpaw cortex before and after partial hindpaw deafferentation in adult rats. *The Journal of Neuroscience* 4: 1499-515
- Wallace H, Fox K. 1999. Local cortical interactions determine the form of cortical plasticity. *Journal of Neurobiology* 41: 58-63
- Wallace H, Glazewski S, Liming K, Fox K. 2001. The Role of Cortical Activity in Experience-Dependent Potentiation and Depression of Sensory Responses in Rat Barrel Cortex. *The Journal of Neuroscience* 21: 3881-94
- Wang CT, Grishanin R, Earles CA, Chang PY, Martin TF, et al. 2001. Synaptotagmin modulation of fusion pore kinetics in regulated exocytosis of dense-core vesicles. *Science* 294: 1111-5
- Wang Z, Gucek M, Hart GW. 2008. Cross-talk between GlcNAcylation and phosphorylation: site-specific phosphorylation dynamics in response to globally elevated O-GlcNAc. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 13793-8
- Wang Z, Pandey A, Hart GW. 2007. Dynamic Interplay between O-Linked N-Acetylglucosaminylation and Glycogen Synthase Kinase-3-dependent Phosphorylation. *Molecular & Cellular Proteomics* 6: 1365-79
- Wani WY, Chatham JC, Darley-Usmar V, McMahon LL, Zhang J. 2017. O-GlcNAcylation and neurodegeneration. *Brain Res Bull* 133: 80-87
- Warren TY, Barry V, Hooker SP, Sui X, Church TS, Blair SN. 2010. Sedentary Behaviors Increase Risk of Cardiovascular Disease Mortality in Men. *Medicine and science in sports and exercise* 42: 879-85
- Webb AA, Muir GD. 2003. Unilateral dorsal column and rubrospinal tract injuries affect overground locomotion in the unrestrained rat. *European Journal of Neuroscience* 18: 412-22
- Webb AA, Muir GD. 2004. Course of motor recovery following ventrolateral spinal cord injury in the rat. *Behavioural Brain Research* 155: 55-65
- Weibull A, Flondell M, Rosén B, Björkman A. 2011. Cerebral and clinical effects of short-term hand immobilisation. *European Journal of Neuroscience* 33: 699-704
- Weiler N, Wood L, Yu J, Solla SA, Shepherd GM. 2008. Top-down laminar organization of the excitatory network in motor cortex. *Nat Neurosci* 11: 360-6
- Weiss DS, Keller A. 1994. Specific Patterns of Intrinsic Connections between Representation Zones in the Rat Motor Cortex. *Cerebral Cortex* 4: 205-14
- Welker E, Soriano E, Van der Loos H. 1989. Plasticity in the barrel cortex of the adult mouse:
 Effects of peripheral deprivation on GAD-immunoreactivity. *Experimental Brain Research* 74: 441-52
- Wells L, Kreppel LK, Comer FI, Wadzinski BE, Hart GW. 2004. O-GlcNAc transferase is in a functional complex with protein phosphatase 1 catalytic subunits. *The Journal of biological chemistry* 279: 38466-70
- Welsby PJ, Wang H, Wolfe JT, Colbran RJ, Johnson ML, Barrett PQ. 2003. A mechanism for the direct regulation of T-type calcium channels by Ca2+/calmodulin-dependent kinase II. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 23: 10116-21
- Wenthold RJ, Petralia RS, Blahos J II, Niedzielski AS. 1996. Evidence for multiple AMPA receptor complexes in hippocampal CA1/CA2 neurons. *The Journal of Neuroscience* 16: 1982-89
- Wenthold RJ, Prybylowski K, Standley S, Sans N, Petralia RS. 2003. Trafficking of NMDA receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 43: 335-58
- Whelan SA, Lane MD, Hart GW. 2008. Regulation of the O-linked beta-N-acetylglucosamine transferase by insulin signaling. *The Journal of biological chemistry* 283: 21411-7

- Whisenhunt TR, Yang X, Bowe DB, Paterson AJ, Van Tine BA, Kudlow JE. 2006. Disrupting the enzyme complex regulating O-GlcNAcylation blocks signaling and development. *Glycobiology* 16: 551-63
- Whishaw IQ, Gorny B, Sarna J. 1998. Paw and limb use in skilled and spontaneous reaching after pyramidal tract, red nucleus and combined lesions in the rat: behavioral and anatomical dissociations. *Behavioural Brain Research* 93: 167-83
- Whishaw IQ, Metz GA. 2002. Absence of impairments or recovery mediated by the uncrossed pyramidal tract in the rat versus enduring deficits produced by the crossed pyramidal tract. *Behavioural Brain Research* 134: 323-36
- Widlansky ME, Gokce N, Keaney JF, Vita JA. 2003. The clinical implications of endothelial dysfunction. *Journal of the American College of Cardiology* 42: 1149-60
- Wiedenmann B, Franke WW. 1985. Identification and localization of synaptophysin, an integral membrane glycoprotein of Mr 38,000 characteristic of presynaptic vesicles. *Cell* 41: 1017-28
- Williams D, Kuipers A, Mukai C, Thirsk R. 2009. Acclimation during space flight: effects on human physiology. *Canadian Medical Association Journal* 180: 1317-23
- Williams PE. 1988. Effect of intermittent stretch on immobilised muscle. *Annals of the Rheumatic Diseases* 47: 1014-16
- Wilmot EG, Edwardson CL, Achana FA, Davies MJ, Gorely T, et al. 2012. Sedentary time in adults and the association with diabetes, cardiovascular disease and death: systematic review and meta-analysis. *Diabetologia* 55: 2895-905
- Wilson VJ, Yoshida M. 1969. Comparison of effects of stimulation of Deiters' nucleus and medial longitudinal fasciculus on neck, forelimb, and hindlimb motoneurons. *J Neurophysiol* 32: 743-58
- Witzmann FA, Arnold RJ, Bai F, Hrncirova P, Kimpel MW, et al. 2005. A proteomic survey of rat cerebral cortical synaptosomes. *Proteomics* 5: 2177-201
- Woolf CJ. 1987. Central terminations of cutaneous mechanoreceptive afferents in the rat lumbar spinal cord. *The Journal of Comparative Neurology* 261: 105-19

X

- Xerri C. 1998a. Plasticité post-lésionnelle des cartes corticales somatosensorielles: une revue. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Series III - Sciences de la Vie* 321: 135-51
- Xerri C. 1998b. Post-lesional plasticity of somatosensory cortex maps: a review. *C R Acad Sci III* 321: 135-51
- Xerri C. 2008. Imprinting of idyosyncratic experience in cortical sensory maps: Neural substrates of representational remodeling and correlative perceptual changes. *Behavioural Brain Research* 192: 26-41
- Xie S, Jin N, Gu J, Shi J, Sun J, et al. 2016. O-GlcNAcylation of protein kinase A catalytic subunits enhances its activity: a mechanism linked to learning and memory deficits in Alzheimer's disease. *Aging Cell* 15: 455-64
- Xu T, Yu X, Perlik AJ, Tobin WF, Zweig JA, et al. 2009. Rapid formation and selective stabilization of synapses for enduring motor memories. *Nature* 462: 915-9
- Xu W. 2011. PSD-95-like membrane associated guanylate kinases (PSD-MAGUKs) and synaptic plasticity. *Current Opinion in Neurobiology* 21: 306-12

- Yamanaka K, Yamamoto S-i, Nakazawa K, Yano H, Suzuki Y, Fukunaga T. 1999. The effects of long-term bed rest on H-reflex and motor evoked potential in the human soleus muscle during standing. *Neuroscience Letters* 266: 101-04
- Yan Q, Rosenfeld RD, Matheson CR, Hawkins N, Lopez OT, et al. 1997. Expression of brainderived neurotrophic factor protein in the adult rat central nervous system. *Neuroscience* 78: 431-48
- Yang G, Pan F, Gan WB. 2009. Stably maintained dendritic spines are associated with lifelong memories. *Nature* 462: 920
- Yang W, Zhang H. 2016. Effects of hindlimb unloading on neurotrophins in the rat spinal cord and soleus muscle. *Brain Res* 1630: 1-9
- Yang X, Ongusaha PP, Miles PD, Havstad JC, Zhang F, et al. 2008. Phosphoinositide signalling links O-GlcNAc transferase to insulin resistance. *Nature* 451: 964-9
- Yang YR, Song M, Lee H, Jeon Y, Choi EJ, et al. 2012. O-GlcNAcase is essential for embryonic development and maintenance of genomic stability. *Aging Cell* 11: 439-48
- Yang YR, Song S, Hwang H, Jung JH, Kim SJ, et al. 2017. Memory and synaptic plasticity are impaired by dysregulated hippocampal O-GlcNAcylation. *Sci Rep* 7: 44921
- Ygge J. 1989. Central projections of the rat radial nerve investigated with transganglionic degeneration and transganglionic transport of horseradish peroxidase. *J Comp Neurol* 279: 199-211
- Young NA, Vuong J, Flynn C, Teskey GC. 2011. Optimal parameters for microstimulation derived forelimb movement thresholds and motor maps in rats and mice. *Journal of Neuroscience Methods* 196: 60-69
- Yu X, Zuo Y. 2011. Spine plasticity in the motor cortex. *Current Opinion in Neurobiology* 21: 169-74
- Yu Y, Zhang L, Li X, Run X, Liang Z, et al. 2012. Differential effects of an O-GlcNAcase inhibitor on tau phosphorylation. *PLoS One* 7: e35277
- Yuan A, Nixon RA. 2016. Specialized Roles of Neurofilament Proteins in Synapses: Relevance to Neuropsychiatric Disorders. *Brain research bulletin* 126: 334-46
- Yuan A, Sershen H, Veeranna, Basavarajappa BS, Kumar A, et al. 2015. Neurofilament subunits are integral components of synapses and modulate neurotransmission and behavior in vivo. *Mol Psychiatry* 20: 986-94
- Yuan LL, Adams JP, Swank M, Sweatt JD, Johnston D. 2002. Protein kinase modulation of dendritic K+ channels in hippocampus involves a mitogen-activated protein kinase pathway. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 22: 4860-8
- Yuzwa SA, Macauley MS, Heinonen JE, Shan X, Dennis RJ, et al. 2008. A potent mechanisminspired O-GlcNAcase inhibitor that blocks phosphorylation of tau in vivo. *Nature Chemical Biology* 4: 483
- Yuzwa SA, Shan X, Jones BA, Zhao G, Woodward ML, et al. 2014. Pharmacological inhibition of O-GlcNAcase (OGA) prevents cognitive decline and amyloid plaque formation in bigenic tau/APP mutant mice. *Molecular neurodegeneration* 9: 42
- Yuzwa SA, Shan X, Macauley MS, Clark T, Skorobogatko Y, et al. 2012. Increasing O-GlcNAc slows neurodegeneration and stabilizes tau against aggregation. *Nat Chem Biol* 8: 393-9

Ζ

- Zanette G, Manganotti P, Fiaschi A, Tamburin S. 2004. Modulation of motor cortex excitability after upper limb immobilization. *Clin Neurophysiol* 115: 1264-75

- Zehr PE. 2002. Considerations for use of the Hoffmann reflex in exercise studies. *European Journal of Applied Physiology* 86: 455-68
- Zeidan Q, Hart GW. 2010. The intersections between O-GlcNAcylation and phosphorylation: implications for multiple signaling pathways. *Journal of cell science* 123: 13-22
- Zhang X, Bennett V. 1996. Identification of O-linked N-acetylglucosamine modification of ankyrinG isoforms targeted to nodes of Ranvier. *The Journal of biological chemistry* 271: 31391-8
- Zheng F, Gingrich MB, Traynelis SF, Conn PJ. 1998. Tyrosine kinase potentiates NMDA receptor currents by reducing tonic zinc inhibition. *Nature Neuroscience* 1: 185
- Zhong H, Roy RR, Siengthai B, Edgerton VR. 2005. Effects of inactivity on fiber size and myonuclear number in rat soleus muscle. *J Appl Physiol (1985)* 99: 1494-9
- Zhu H, Wang H, Liu Z. 2015a. Effects of real and simulated weightlessness on the cardiac and peripheral vascular functions of humans: A review. *Int J Occup Med Environ Health* 28: 793-802
- Zhu JJ, Qin Y, Zhao M, Van Aelst L, Malinow R. 2002. Ras and Rap Control AMPA Receptor Trafficking during Synaptic Plasticity. *Cell* 110: 443-55
- Zhu Y, Liu TW, Cecioni S, Eskandari R, Zandberg WF, Vocadlo DJ. 2015b. O-GlcNAc occurs cotranslationally to stabilize nascent polypeptide chains. *Nat Chem Biol* 11: 319-25
- Zhu Y, Shan X, Yuzwa SA, Vocadlo DJ. 2014. The emerging link between O-GlcNAc and Alzheimer disease. *The Journal of biological chemistry* 289: 34472-81
- Ziemann U, Meintzschel F, Korchounov A, Ilić TV. 2006. Pharmacological Modulation of Plasticity in the Human Motor Cortex. *Neurorehabilitation and Neural Repair* 20: 243-51
- Zimmerman AD, Harris RB. 2015. In vivo and in vitro evidence that chronic activation of the hexosamine biosynthetic pathway interferes with leptin-dependent STAT3 phosphorylation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 308: R543-55