# THÈSE

## En vue de l'obtention du
## DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

**Délivré par l'Université Toulouse 3 - Paul Sabatier**

---

**Présentée et soutenue par**

**Guillaume BOUISSET**

Le 13 janvier 2023

# Remodelage des interneurones à parvalbumine et de leur matrice extracellulaire : restauration de la mémoire dans un modèle murin de la maladie d'Alzheimer

---

Ecole doctorale : **BSB - Biologie, Santé, Biotechnologies**

Spécialité : **NEUROSCIENCES**

Unité de recherche :
**CRCA - Centre de Recherches sur la Cognition Animale**

Thèse dirigée par
**Laure VERRET**

Jury

**M. Bertrand LAMBOLEZ,** Rapporteur
**Mme Hélène MARIE,** Rapporteure
**Mme Francesca SARGOLINI,** Rapporteure
**M. Vincent FOURCASSIE,** Examinateur
**Mme Laure VERRET,** Directrice de thèse

# REMERCIEMENTS

Dans un premier temps, je souhaite remercier l'ensemble des membres du jury de cette thèse qui ont accepté de m'accompagner dans la fin de cette belle aventure, et d'évaluer ce travail. J'attends avec enthousiasme le jour de la soutenance pour échanger et débattre de ces travaux avec eux. Je souhaite également remercier les membres de mon comité de suivi de thèse, Cécile Dromard Berthézène et Stéphanie Trouche, dont les discussions annuelles ont été d'un grand soutien à ce projet.

C'est certainement la partie de ma thèse que j'ai eu le plus hâte d'écrire, tant elle représente une part importante de ces trois années passées au CRCA. Une thèse n'engage pas seulement un projet scientifique. C'est également des rencontres, des collègues qui deviennent des amis, et un ensemble de liens sociaux qui gravitent autour de ces années de travail, années qui sont vraiment spéciales dans la vie de chacun.

J'aimerais commencer par remercier symboliquement l'ensemble des animaux que j'ai utilisé lors de ma thèse et plus largement, l'ensemble des animaux de laboratoire. Il est, pour moi, très important de ne jamais oublier à quel point c'est grâce à ces êtres vivants que les connaissances humaines progressent, et que nous devons nous efforcer, chaque jour, de prendre la mesure de ce qu'ils représentent dans notre travail.

Je tiens tout particulièrement à remercier l'équipe Remember. Il est impressionnant pour un étudiant d'ouvrir les portes d'un laboratoire de recherche, et de prendre le rythme de sa dynamique, au milieu de chercheurs, d'ingénieurs, de techniciens et de jeunes scientifiques en devenir. Lors de mon arrivée dans l'équipe, j'y ai trouvé un cadre accueillant, dans lequel on peut faire ses premiers pas, entouré de personnes bienveillantes, et d'une ambiance chaleureuse. Avec les années, on s'y intègre, tant dans les aspects scientifiques que les moments à l'extérieur. J'emporte avec moi d'excellents souvenirs de nos journées/soirées d'équipes (surtout quand on gagne), de nos congrès, ou de nos simples échanges dans les couloirs.

Aujourd'hui, cette belle aventure arrive à son terme… et je tiens grandement à te remercier, Laure. Je suis extrêmement reconnaissant de tout ce que nous avons pu partager lors de ma thèse. Il est difficile de souhaiter un meilleur encadrement que celui que tu as pu m'apporter toutes ces années. Tu as su me donner les outils pour que je puisse donner le meilleur de moi-même. Tu sais valoriser les étudiants, et tu n'hésites pas à les encourager, à mettre en avant le travail accompli. Tu as toujours eu le parfait dosage, le parfait équilibre entre l'autonomie que tu as pu me laisser pour apprendre, tout en supervisant avec justesse notre travail. Tu sais laisser autant de porte entrouverte pour pouvoir apprendre de soi-même, comme de ton expérience que j'admire grandement. J'ai toujours eu la chance de pouvoir te faire part de mes doutes, de mes idées, que tu as toujours pris le temps d'écouter pour faire avancer notre projet. En oubliant un peu les manips, j'ai également pu compter sur ton soutien sans failles sur mes questionnements personnels, et m'apporter des pistes de réflexion, sur un plan professionnel bien sûr, mais surtout sur un plan humain. C'est d'ailleurs sur cet aspect-là, que je souhaite te remercier le plus. Tu es toujours attentive à ce qui se passe dans la tête des personnes avec qui tu travailles, et personnellement, cela apporte m'a apporté beaucoup de sérénité. Nous avons eu la chance de pouvoir

communiquer sans détour, et j'ai toujours su que je pouvais avoir confiance en toi lors de nos conversations, tant elles étaient emplies de bienveillance et d'humanité. Si aujourd'hui, la fin de cette thèse signifie également que je vais prendre mon envol (avec une certaine émotion), je sais que je vais emporter avec moi une marque de tous ces échanges. Alors pour tout ce que tu m'as apporté, je l'écris une fois de plus avec une certaine nostalgie déjà, merci.

Pour poursuivre dans l'équipe Remember, je tiens à remercier Claire, notre directrice d'équipe et de laboratoire, pour essayer, sans relâche d'exploiter le potentiel de chacun afin de faire vivre cette équipe et ce laboratoire. Bruno, qui a toujours une bêtise en tête, mais dont l'encadrement de ses étudiants est admirable. Lionel D, dont la discussion est toujours intéressante, et qui n'a jamais hésité à m'adresser un mot d'encouragement lors des présentations que j'ai pu faire. Lionel M, pour sa grande rigueur scientifique, et nos séances d'escalades. Cédrick pour ta bienveillance, et qui, avec Richard B, m'ont donné la chance d'intégrer le master, sans qui je n'aurais certainement pas écrit ces mots aujourd'hui. C'est avec leur confiance que j'ai pu m'épanouir dans ce que je souhaitais faire, et je les en remercie grandement. Je voudrais également remercier Sébastien et Christophe, grâce à qui j'ai pu me former sur un grand nombre de chose lors de ma thèse. Ensuite, je souhaite particulièrement à remercier Camille, qui m'a apporté un grand soutient dans la réalisation des expérimentations présentées dans cette thèse. Car oui, dans une thèse, des petites mains il en faut (et des recrutements pour monter des lames, j'en ai fait !) … alors si je remercie chaleureusement toute l'équipe pour avoir contribué à ces expériences, je souhaite remercier l'ensemble des stagiaires que j'ai eu la chance d'avoir. Benjamin, Fanny, Tatiana, (Zoé, Tom, Claire, Fanny et Lou, pour vos petites contributions également !), cela a une grande joie de vous avoir autour de moi lors de ces mois d'été. Vous avez toujours été volontaires, impliqués. J'ai pu vous faire confiance grâce à votre rigueur, et vous m'avez permis de me dédoubler (ce qui est assez rare dans la vie de tous les jours) alors pour tout ce travail, merci. En sortant un peu de l'équipe, je souhaite également remercier Thomas et Claire, qui m'ont accordé un temps précieux à la plateforme de microscopie, et dont la collaboration a été très instructive, mais également agréable. Je tiens également à remercier Patrick pour sa grande sympathie, et dont les connaissances pour construire le dispositif de stimulation ont été précieuses. Enfin, si je remonte encore les aiguilles de l'horloge, je tiens à remercier Vincent, avec qui j'ai effectué mes premiers stages de recherches dans le laboratoire. Tu as été le premier mentor que j'ai pu avoir dans la recherche, et tu m'as toujours poussé à me dépasser pour donner le meilleur de moi-même. Tu as accepté de faire partie de mon jury de thèse, et c'est un grand honneur pour moi de pouvoir te montrer mes travaux aujourd'hui. La boucle est bouclée. Je remercie également Hugo et Gérard pour leur précieux temps passé à m'aider à mettre en place mes expériences.

Pour toutes ces personnalités, totalement différentes qui façonnent, sans toujours le savoir le scientifique que vous allez devenir, merci.

C'est avec beaucoup d'émotion maintenant, que je souhaite remercier le « bureau ». Ces doctorants, qui vivent à peu de chose près, la même chose que vous lors de leur thèse, et qui passent de collègue de travail à amis en un rien de temps. Vous avez

tous pris une place importante dans mon cœur, et penser à vous tous me donne toujours un sourire qui me motive. Ce n'est pas toujours facile de se faire une place dans un environnement de travail, mais sachez que je n'aurais jamais pu rêver mieux que de vous rencontrer à cette période de ma vie. Je voudrais te remercier, Flora, pour cet incommensurable soutient que nous nous sommes apportés lors de ces années. Basile, j'hésite un peu. Aucun doute que tu as été le thésard de Bruno. Bon, en passant par les œufs de Pâques, le Guatemala, et du nombre infernal de coups bas et de bazar mis dans le bureau de l'un et de l'autre, c'était toujours agréable de t'avoir dans la pièce. Petit détour pour te remercier également Pauline, de ta bienveillance et de ton aide sur ces derniers mois. Seb. Quel phénomène. Tu as vraiment été génial en matière d'intégration lorsque je suis arrivé. On a partagé beaucoup de choses, et je suis vraiment heureux d'avoir passé une grande partie de ma thèse en ta présence. Même si tu faisais preuve de beaucoup de fourberie pendant nos soirées jeux, j'ai toujours pu compter sur toi, et je garde un beau souvenir de tous nos rires et de ces moments partagés. Fafa, je ne compte même plus le nombre de débat que nous avons pu avoir ! Même si nous n'étions pas toujours d'accord (t'es toujours aussi naze en physique <3) tu apportes toujours une argumentation intéressante, et tu as une connaissance incroyable. J'emporte avec moi beaucoup de souvenir de toi, de ton rire franc, mais également d'une gentillesse incommensurable. De nos danses, surement approximative lors des soirées avec les doctorants. Tu donnes toujours le maximum pour les autres. Je sais à quel point nous aimons nous poser des questions sur notre existence, et je te souhaite, avec beaucoup d'émotion le meilleur pour la suite. Célia. Comment peut tourner un laboratoire sans une Célia ? Je sais que je t'ai beaucoup embêté, parfois sans le vouloir (mais c'était souvent volontaire et t'façon, tu me l'as toujours bien rendu) mais je te remercie sincèrement pour tout ce que tu as pu m'apporter, à moi certes, mais également à cette équipe. Tu as toujours été rayonnante et largement dévouée aux autres. Tu apportes un grand équilibre à ce petit groupe de copains que j'aime tant, et je te souhaite sincèrement, de réussir tout ce que tu voudras entreprendre dans le futur. Anna, cela a toujours été un réel plaisir de discuter avec toi, et tu m'as également bien aidé dans mes débuts en EEG. Je voudrais te remercier également, Julie. Tu as été la toute première personne que j'ai pu encadrer, et aujourd'hui, tu voles fièrement de ses propres ailes. J'espère sincèrement que l'avenir te réserve de belles choses dans tes choix futurs. Clémence, si un jour tu parviens à sortir de l'animalerie du laboratoire et à lire ces quelques lignes, sache que ton travail est admirable, et ta gaîté apporte beaucoup de sérénité dans le bureau. Lola et Cathaline, je vous remercie pour nos récentes soirées karaokés, qui sont toujours un bon moyen de se vider la tête. Enfin Romain. Quelle rencontre inattendue. Je te remercie pour tous ces moments passés ensemble récemment. Tu vois et ressens les choses avec une énergie singulière, alors continue à le transmettre aux autres, et à être autant passionné par ce que tu fais.

Plus largement, j'aimerais remercier également l'ensemble des doctorants du laboratoire. C'est une grande famille, dans laquelle on se sent bien, et qui vous accueille toujours à bras ouverts. Cette cohésion contribue largement à la vie du labo', et la rend agréable au quotidien. Alors pour toutes ces soirées, pour tous ces échanges avec chacun d'entre vous, et pour chacune de ces petites anecdotes que j'emporte avec moi, je vous adresse un grand merci.

Il est temps de sortir un peu du laboratoire ! Il y a eu également, lors de ces années de thèse, tant d'amitiés précieuses qui vous aident à avancer, d'une façon ou d'une autre. Je voudrais vous remercier vous, le One BEE Show, pour tous ces moments passés ensemble. Je vous appelle « les amis de la fac » lorsque je parle de vous. Vous êtes tant de personnalités exceptionnelles et rares. Je ne compte plus le nombre d'histoire que je pourrais raconter en repensant à toutes ces années. Les années passées à la fac ont toujours eu cette connotation d'amitiés qui perdurent, de soirées inoubliables, de moments exceptionnels, qui marquent une vie. Sachez bien, que, pour chacun d'entre vous, vous avez marqué la mienne. Vous avez tous partagé mon aventure, à différents niveaux. J'aimerais glisser un mot pour vous, Claire, Olivia et Simon. Vous avez été extrêmement attentif et bienveillant avec moi quant aux grandes questions que j'ai pu me poser sur mon avenir, et je vous en remercie infiniment. Enfin, plus particulièrement, je voudrais vous remercier, Quentin et Lisa pour toutes ces choses partagées ces dernières années. Vous avez toujours été attentifs, valorisants, présents. J'ai dans ma tête tant de conversations qui résonnent, sur nous, nos vies, notre futur. Vous m'avez apporté tant de belles choses dans ma vie d'adulte, je vous souhaite à chacun, du plus profond de mon cœur, un grand bonheur.

Stécy. Les choses ont bien changé depuis 20 ans n'est-ce pas ? Je souhaite sincèrement te remercier pour l'aide précieuse que tu m'apportes lors de la fin de cette aventure. Tu as employé une grande énergie et une grande douceur à me guider ces derniers temps. Demeure le plus longtemps possible dans cet éveil qui t'anime au quotidien, et continue à l'utiliser pour apporter le bien autour de toi, comme tu l'as si bien fait avec moi.

Je souhaite vous remercier également, Mathias, Aurèle, Louise, Alex, Damien et Nina. Toutes ces belles personnes que j'ai rencontrées lors de mes études ou au labo, et qui ont contribué à rendre ces années si exceptionnelles, par nos nombreux souvenirs de soirée, mais également toutes ces conversations sur la science. Je vous souhaite le meilleur, à chacun.

Si l'on remonte encore un peu le calendrier, il y a des amitiés, dont les années ont dépassé les dix ans, et qui sont toujours présentes dans ma vie. Des moteurs de vies, des gens exceptionnels qui sont toujours là pour vous, sans aucun détour, et que j'aime profondément. Max, tu es venu voir l'une de mes mini-conférences, et cela me touche encore beaucoup aujourd'hui. J'étais fier de voir, qu'un ami de longue date vienne voir mon travail, et me dise qu'il est fier de ce que je suis devenu. Merci pour toutes ces années Max, sincèrement. Stick-stick.

Ah. Le trio des grands copains.

Cyril, je me souviens de l'époque où tu te prenais encore des tapes sur la tête parce que tu bavardais beaucoup trop au lycée. Des années, certainement pas bercées par des lectures de Nietzsche, ou ton étude de la thymectomie. Aujourd'hui, nous avons

beaucoup changé, mais il est agréable de voir à quel point certaines choses sont toujours là, qu'importe la distance et les années. J'espère donc avoir la chance de passer ma vie à faire un marathon de jeux de société avec toi à chaque période de Noël. Je te souhaite tout le meilleur du monde, ou que tu iras vivre, quoi que tu feras, et peut-être que la prochaine fois que nous allons nous voir, c'est moi, qui serait proche de là où tu habites actuellement.

David. J'ai tant de précieux souvenirs avec toi. Souvenirs que l'on aime raconter si souvent. Si aujourd'hui, des vies d'adultes se présentent à nous, je sais à quel point nous avons conservé nos âmes d'enfants. Il suffit d'un éclair, d'un regard pour que la même idée nous traverse la tête, et en faire quelque chose de grand. Il existe une singularité de tous ces moments dans ma mémoire, qui ont apporté beaucoup de bonheur dans ma vie. Je t'aime vieux frère.

Théo. Je sais au fond de moi, à quel point tu prêtes attention aux choses qui me sont importantes, et je t'en remercie du fond du cœur. Lors de ces années, nos soirées passées ensemble ont été un bol d'air frais, et ont façonné des souvenirs d'une immense richesse. Je nous souhaite de rire de rien encore longtemps et d'être toujours aussi génialement créatifs. Ton amitié est si précieuse dans ma vie.

Je souhaite également remercier les membres de ma famille qui ont toujours été présents dans ma vie, et dont j'apprécie grandement chaque moment passé avec eux. Cela m'apporte beaucoup de réconfort que de diner avec ce petit groupe de personnes soudées et unies au quotidien. Enfin, je voudrais terminer par remercier ma sœur, Claire, et mes deux parents. Depuis mon enfance, vous avez toujours soutenu chacun de mes choix, chacune de mes décisions. Vous avez toujours cru en moi, et cela m'a beaucoup aidé à donner le meilleur de moi-même à chacune des étapes importantes de ma vie. Tout cet amour que nous partageons, est une chose très précieuse pour moi, qui guide mes pas au quotidien, en sachant qu'il me suffit de lancer un regard en arrière pour savoir que vous êtes là pour moi. Vous êtes mon intangible repère, et je vous aime profondément

Pour vous tous présents dans ces lignes, je souhaite vous l'écrire une dernière fois, tant ces trois années de thèse ont été marquées par votre présence. Merci.

*“ King for a king, eye for an eye*
*The birds still sing when they fall from the sky*
*If I slip a little whisky now into your cup*
*Will you swear that you’ll never grow up? “*

*Will Varley*

# SOMMAIRE

**INTRODUCTION** ..... **1**

I. LA MALADIE D'ALZHEIMER ..... 1
*A. Histoire de la maladie* ..... *1*
*B. Prévalence de la maladie* ..... *2*
1. Quelques chiffres ..... 2
2. Facteurs de risque ..... 2
*C. Altérations cognitives de la maladie* ..... *4*
*D. Altérations cérébrales structurales de la maladie* ..... *7*
1. Dégénérescences neurofibrillaires et protéine Tau ..... 8
2. Le peptide Aβ ..... 10
*E. L'hypothèse de la cascade amyloïde* ..... *12*
1. Peptide Aβ et perturbations neuronales ..... 15
2. Biomarqueurs de la pathologie ..... 18
II. LA MEMOIRE HIPPOCAMPO-DEPENDANTE ..... 21
*A. Systèmes de mémoire* ..... *21*
*B. L'hippocampe* ..... *24*
1. Le Gyrus Denté (DG) ..... 25
2. Les aires CA1 et CA3 ..... 27
3. L'aire CA2 ..... 29
III. LES INTERNEURONES A PARVALBUMINE ..... 33
*A. Les interneurones inhibiteurs* ..... *33*
*B. Interneurones à parvalbumine et oscillations cérébrales* ..... *36*
1. Les oscillations gamma ..... 38
2. Oscillations gamma et maladies neuropsychiatriques ..... 41
*C. Interneurones à parvalbumine et plasticité cérébrale* ..... *45*
IV. LES PERINEURONAL NETS : PNN ..... 47
*A. Découverte et histoire des PNN* ..... *47*
*B. Structure des PNN* ..... *48*
*C. Formation des PNN* ..... *50*
*D. Modulateurs des PNN* ..... *51*
1. Otx2 ..... 51
2. Neuréguline-1 (NRG1) ..... 53
3. La métalloprotéase matricielle 9 (MMP-9) ..... 54
4. La chondroïtinase-ABC (ChABC) ..... 56
*E. Implications des PNN dans la plasticité des interneurones PV* ..... *57*
1. Interneurones PV/PNN et plasticité synaptique ..... 58
2. Interneurones PV/PNN et fonctions mnésiques ..... 59
*F. Interneurones PV/PNN et maladie d'Alzheimer* ..... *63*
V. ENVIRONNEMENT ENRICHI ..... 67
*A. La réserve cognitive chez l'humain* ..... *67*
*B. Stimulation de la réserve cognitive en expérimentation animale : le paradigme d'environnement enrichi* ..... *68*
*C. Effets principaux de l'environnement enrichi chez l'animal* ..... *70*
*D. Effets de l'environnement enrichi sur l'hippocampe* ..... *71*
*E. Effets de l'environnement enrichi sur les modèles Alzheimer* ..... *73*
*F. Environnement enrichi et interneurones PV/PNN* ..... *74*
*G. Les stimulations gamma pour soigner Alzheimer ?* ..... *75*

**OBJECTIFS** ..... **81**

**MÉTHODES** ..... **89**

I. LES SOURIS TG2576, MODELES DE LA MALADIE D'ALZHEIMER ..... 91
II. PROCEDURES CHIRURGICALES ..... 95
*A. Anesthésie gazeuse* ..... *95*
*B. Injections de ChABC dans l'aire CA1 de l'hippocampe* ..... *96*

*C. Injections de NRG1 dans les aires CA1 et CA2 ..... 97*
*D. Implantation des électrodes subdurales pour les enregistrements EEG. ..... 97*
III. TESTS COMPORTEMENTAUX ..... 99
*A. Mémoire spatiale : test de localisation d'objets. ..... 99*
*B. Mémoire sociale : test à 5 ou 7 essais. ..... 100*
*C. Environnement enrichi. ..... 101*
*D. Stimulations visuelles et auditives ..... 102*
IV. HISTOLOGIE ET IMMUNOHISTOCHIMIE ..... 105
*A. Perfusion intracardiaque et préparation des tissus ..... 105*
*B. Immunohistochimie ..... 105*
1. Marquage PV / PNN / PCP4 ..... 106
2. Marquage Iba1 ..... 107
3. Marquage cFos ..... 107
4. Marquage aggrecan ..... 108
5. Marquage Vglut1 ..... 109
6. Marquage Syt2 ..... 109
*C. Analyses microscopiques des marquages immunohistochimiques ..... 111*
1. Quantification par microscopie classique ..... 111
2. Random Illumination microscopy ..... 111

**RESULTATS ..... 115**

I. LES EFFETS BENEFIQUES DE L'EE SUR LES CAPACITES COGNITIVES DES TG2576 SONT-ILS LIES A LA RESTAURATION DU NOMBRE D'INTERNEURONES PV ET DES PNN DANS L'HIPPOCAMPE ? ..... 117
*A. Une injection de ChABC dans l'aire CA1 de l'hippocampe empêche le remodelage EE-dépendant des interneurones PV et de leur PNN ..... 118*
*B. L'injection de ChABC dans l'aire CA1 empêche l'amélioration EE-dépendante de la mémoire spatiale et le remodelage des interneurones PV/PNN chez les souris Tg2576 ..... 126*
1. Tests comportementaux ..... 126
2. Analyse histologique ..... 132
*C. L'injection de ChABC dans CA1 n'affecte pas la restauration de PV+/PNN+ dans l'aire CA2 après l'EE ..... 138*
*D. L'injection de ChABC dans l'aire CA1 n'empêche pas les bénéfices cognitifs de l'EE sur la mémoire sociale des souris Tg2576 ..... 142*
1. Tests de mémoire sociale ..... 142
2. Analyse histologique ..... 146
*E. Effets de l'injection de NRG1 dans l'aire CA1 sur la présence de PV/PNN et la mémoire des souris Tg2576 ..... 151*
1. Effet de l'Injection de NRG1 5 jours avant les tests comportementaux ..... 151
2. Effets de l'Injection de NRG1 40 jours avant les tests comportementaux ..... 156
*F. Discussion ..... 159*
..... 160
II. LES STIMULATIONS SENSORIELLES MULTIMODALES A 40HZ MIMENT-ELLES LES EFFETS DE L'EE SUR LES NEURONES PV ET LES PERFORMANCES DE MEMOIRE DES SOURIS TG2576 ? ..... 167
*A. Effets de stimulations lumineuses à 40 Hz sur les neurones PV des souris Tg2576 ..... 167*
*B. Effets de stimulations multi-modales à 40 Hz sur l'activité cérébrale ..... 170*
*C. Discussion ..... 172*
III. QUELLE EST LA CONSEQUENCE DES CONDITIONS EXPERIMENTALES TESTEES (EE, CHABC, NRG1) SUR LES MODIFICATIONS SYNAPTIQUES DES NEURONES PV ET LA STRUCTURE DES PNN DANS L'HIPPOCAMPE DES SOURIS NTG ET TG2576 ? ..... 175
*A. Discussion ..... 178*

**DISCUSSION GÉNÉRALE ..... 181**

*A. Effet de l'EE sur les réseaux PV-dépendants de l'aire CA1 de l'hippocampe ..... 187*
*B. Les neurones PV/PNN des souris Tg2576 après enrichissement ont-ils les mêmes propriétés que des neurones sains ? ..... 191*

*C. Ouverture sur d'autres approches expérimentales..... 192*
*D. L'environnement enrichi : une approche expérimentale de la réserve cognitive..... 194*

**RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES..... 199**

**ANNEXES ..... 243**

# ABRÉVIATIONS

| | |
|---|---|
| **Aβ** | Peptide bêta-amyloïde |
| **Aη** | Peptide Aeta |
| **AICD** | Protéine précurseur β-amyloïde dans le domaine intracellulaire |
| **AMTS** | Test mental abrégé |
| **AP** | Antéropostérieur |
| **APOE4** | Alipoprotéine E4 |
| **APP** | Protéine précurseur de l'amyloïde |
| **CA** | Corne d'Ammon |
| **ChABC** | Chondroïtinase-ABC |
| **CP** | Cellule principale |
| **CS** | Chondroïtines sulfate |
| **CSF** | Liquide cérébrospinal |
| **CSPG** | chondroïtines sulfate protéoglycan |
| **DG** | Gyrus Denté |
| **DMN** | Default mode network |
| **DV** | Dorsoventral |
| **ECM** | Matrice extracellulaire |
| **EE** | Environnement enrichi |
| **EEG** | Électroencéphalogramme |
| **ErbB4** | Récepteur Tyrosine Kinase 4 |
| **FAD** | Forme familiale de la maladie d'Alzheimer |
| **FFT** | Transformée de Fourier |
| **GAG** | glycosaminoglycanes |
| **GalNac** | N-acetylgalactosamine |

| | |
|---|---|
| **GMS** | Test d’état mental gériatrique |
| **HAS** | hyaluronane synthase transmembranaire |
| **HM** | Henry Gustav Molaison |
| **iLTD** | LTD inhibitrice |
| **IRM** | Imagerie à résonance magnétique |
| **IRMf** | Imagerie à résonance magnétique fonctionnelle |
| **KI** | Knock-in |
| **KO** | Knock-out |
| **L** | Latéral |
| **LFP** | Potentiel de champ local |
| **LTD** | Dépression à long terme |
| **LTP** | Potentialisation à long terme |
| **IPSC** | Courants post-synaptiques inhibiteurs |
| **MA** | Maladie d’Alzheimer |
| **MCI** | Mild cognitive impairment |
| **mEPSC** | Courants post-synaptiques excitateurs miniatures |
| **MGE** | Éminence ganglionnaire médiane |
| **MMP-9** | Métalloprotéase matricielle 9 |
| **MMSE** | Mini mental state examination |
| **NFT** | Dégénérescences neurofibrillaires |
| **NRG1** | Neuréguline-1 |
| **NTg** | Non-transgénique |
| **PB** | Phosphate buffer |
| **PBS** | Phosphate buffer saline |

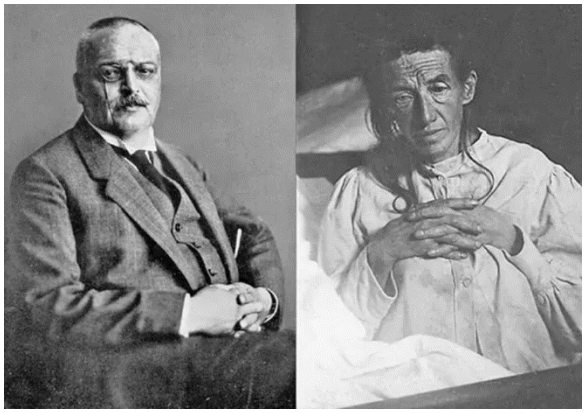
| | |
|---|---|
| **PBST** | Phosphate buffer saline Triton |
| **PCP4** | Purkinje Cell Protein 4 |
| **PFA** | Paraformaldéhyde |
| **PNN** | Perineuronal net |
| **PS1** | présénilines 1 |
| **PS2** | présénilines 2 |
| **PV** | Parvalbumine |
| **Otx2** | Protéine 2 de l'homéobox de l'orthodenticule |
| **SWR** | Sharp waves ripples |
| **TEP** | Tomographie par émission de positons |
| **Tn-R** | Tenascine-R |
| **VIP** | Intestinal vasoactif |
| **WFA** | *Wisteria floribunda agglutinin* |

# INTRODUCTION

# I. La maladie d'Alzheimer

## A. Histoire de la maladie

Dans nos sociétés modernes, les progrès de la médecine et l'amélioration des conditions de vie nous ont permis d'accroître considérablement notre espérance de vie. L'une des conséquences négatives de ces avancées est l'augmentation du nombre de personnes atteintes par des maladies neurodégénératives, dont les symptômes les plus handicapants s'aggravent avec les années. Aujourd'hui, l'une des plus prépondérantes dans les questions de santé publique est la maladie d'Alzheimer (MA). Cette maladie neurodégénérative a été décrite par le docteur Alois Alzheimer en 1906 suite à ses travaux avec la patiente Auguste Deter (**Fig.1**).



« Je lui montre une clé, un crayon et un livre et elle les nomme correctement. […] Je lui montre 3 doigts : combien de doigts ? *3*. Êtes-vous toujours anxieuse ? *Oui*. Combien de doigts est-ce que je vous ai montré ? *Eh bien, c'est Francfort-sur-le-Main*. »

*Figure 1 Le Dr. Alois Alzheimer, médecin psychiatre neurologue à gauche (1864-1915) et sa patiente Auguste Deter (1850-1906) à l'hôpital de Francfort-sur-le-Main en Allemagne. En bas, un extrait des échanges entre le docteur Alzheimer et sa patiente (italique) (d'après Maurer et al., 1997).*

Il a nommé cette pathologie « maladie de l'oubli » car elle se caractérise par des altérations progressives des capacités cognitives, et principalement la mémoire, avant qu'elle ne porte son nom grâce à Emil Kraepelin. Auguste fut admise à l'âge de 51 ans, et présentait des déficits cognitifs, des troubles mnésiques, une désorientation, une aphasie, de la paranoïa, des hallucinations, un comportement imprévisible, et un isolement social. Lors des entretiens avec sa patiente, Alois Alzheimer lui demande

de réaliser des tests psychophysiques, dont les échanges seront publiés en 1997 (**Fig.1** ; Maurer et al., 1997).

Dans cette publication, les échanges avec la patiente témoignent de grosses difficultés à comprendre le sens de certains mots, ainsi qu'à les écrire. Elle devait répéter l'ordre des mots pour pouvoir écrire une phrase correctement. Elle était toujours capable d'effectuer des calculs simples, mais pouvait être parfois désorientée sur des questions personnelles comme son adresse, ou sur son mari.

## B. Prévalence de la maladie

### 1. Quelques chiffres

Pendant plus d'un demi-siècle, l'étude de la MA est restée en suspens. C'est seulement dans les années 1970-1980, avec les progrès de la médecine qu'est apparue une nouvelle dynamique, en raison de l'augmentation du nombre de cas en lien avec le vieillissement de la population. C'est à nos jours la maladie neurodégénérative la plus répandue : elle représente 70% des démences au niveau européen dont 2 personnes sur 3 sont des femmes. On dénombre 900 000 personnes atteintes en France, dont 225 000 nouveaux cas chaque année, 6,8 millions en Europe et 35,6 millions dans le monde (d'après les données épidémiologiques de la PAQUID et de France Alzheimer). Avec le vieillissement de la population, ces chiffres seraient amenés à doubler d'ici 2050 (selon l'OMS et Wolters et al., 2018). La probabilité de développer la maladie après 75 ans est de 17,8% (Ramaroson et al., 2003). Il existe deux formes de la pathologie : la forme sporadique (97%) et la forme familiale, qui est donc génétique (3%).

### 2. Facteurs de risque

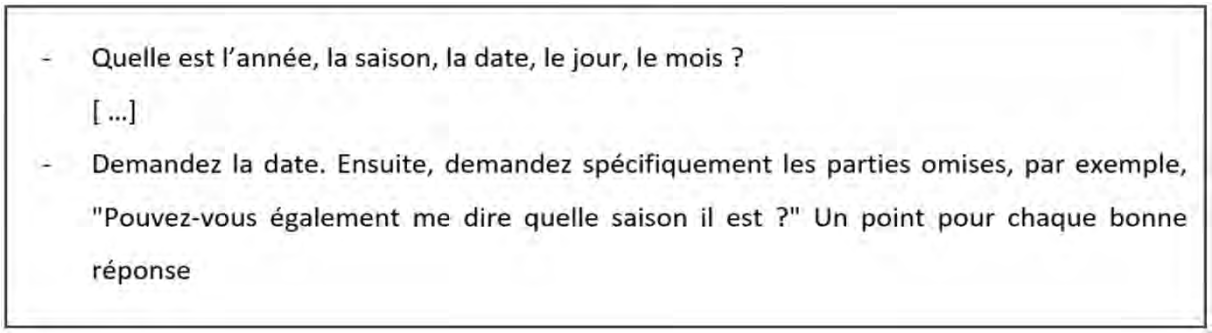
La MA étant une maladie neurodégénérative liée au vieillissement, l'âge est le principal facteur de risque de la pathologie (15% de la population à 80 ans). Elle se manifeste généralement à l'âge de 65 ans, et le risque de développer la forme sporadique de la maladie double ensuite tous les 5 ans (Querfurth & LaFerla 2010). Il existe ensuite une multitude de facteurs influant sur le risque de développer la maladie. On retrouve des facteurs cardiovasculaires largement décrits, comme l'hypertension, l'obésité, le diabète ou les syndromes métaboliques (Reitz et al., 2011). Sont également incriminés

des facteurs liés à nos modes de vies comme une mauvaise alimentation, l'alcool et le tabac, le manque d'activité physique et le stress chronique (Reitz et al., 2011 ; Mistridis et al., 2017), mais aussi des facteurs psychologiques, comme l'isolement social et les symptômes dépressifs (Fratiglioni et al., 2004 ; Mistridis et al., 2017). Enfin, les femmes semblent être plus touchées par la pathologie que les hommes, d'une part car leur longévité est plus élevée, mais également du fait du déficit œstrogénique post-ménopause (Tang et al., 1996 ; Snyder et al., 2016).

L'un des facteurs de risque majeur de la MA est la présence de l'allèle 4 du gène *APOE* (APOE4), codant pour l'alipoprotéine E, produite par les neurones et les astrocytes. Le gène *APOE* possède 3 allèles, E2, E3 (qui est le plus fréquent) et E4, et c'est cette dernière forme qui augmente les risques de développer la MA. Selon une étude Européenne et Américaine, 10% des porteurs d'une copie de l'allèle E4 auront développé la MA à 75 ans, et chez les homozygotes ce nombre passe à 33% ; cette probabilité de développer la MA passe à 50 voire 70% à l'âge de 85 ans (Genin et al., 2011). L'alipoprotéine E4 est la forme la plus efficace dans la fonction de détoxification des neurones en collectant leurs déchets lipidiques, puis les transportant aux astrocytes, où ils sont détruits. Avec le vieillissement, APOE serait détournée de sa fonction principale, sécrétant des triglycérides nocifs, entrainant de la mort neuronale (Lindner et al., 2022). Ce phénomène serait alors accru avec la forme E4 de la protéine. Cet allèle E4 présente des différences intersexuelles, avec un risque de développer la pathologie plus élevé chez la femme, indépendemment de la longévité (Farrer et al., 1997). De plus, les modèles transgéniques ou Knock-In (KI) d'APOE4 chez la souris révèlent des problèmes de mémoire, notamment spatiale (Leung et al., 2012 ; Raber et al., 2000), dont la gravité est accrue chez les femelles, pouvant s'expliquer par des différences hormonales dans la morphologie et la fonction de l'hippocampe (McEwen, 1997). De plus, la présence d'APOE4 augmente l'accumulation du peptide bêta-amyloïde (Aβ) dans la MA (Ye et al., 2005 ; Huang et al., 2011). La mort neuronale liée à la présence d'APOE4 affecte particulièrement les interneurones, et la transplantation de progéniteurs d'interneurones embryonnaires dans le hile hippocampique restaure les capacités mnésiques des souris (Tong et al., 2014). Cela souligne également l'importance de l'altération des interneurones dans la MA (cf Introduction IV.D).

## C. Altérations cognitives de la maladie

Le trouble cognitif le plus représentatif de la pathologie est l'altération de la mémoire. En effet, la maladie cause une perturbation progressive de la mémoire épisodique (Dubois & Albert, 2004), jusqu'à générer plus tardivement des troubles de la mémoire sémantique (Hirni et al., 2013). Si historiquement, les médecins devaient éliminer toutes les autres causes possibles de démence avant de pouvoir diagnostiquer la MA, c'est en 1975 que Folstein propose un test neuropsychologique qui permet de réaliser un « screening » cognitif, le MMSE pour « Mini Mental State Examination », afin de déterminer si la personne est atteinte de la MA (Folstein et al., 1975). Ce test rapide a pour objectif d'évaluer les capacités d'apprentissage, de calcul, d'attention, de langage et de mémoire à court terme. Il comporte des questions ainsi que des indications pour l'expérimentateur (**Fig.2**).


- Quelle est l'année, la saison, la date, le jour, le mois ?

  [ ...]
- Demandez la date. Ensuite, demandez spécifiquement les parties omises, par exemple, "Pouvez-vous également me dire quelle saison il est ?" Un point pour chaque bonne réponse

*Figure 2 Extrait de questions provenant du test MMSE de Folstein. La première phrase correspond à l'une des questions posées de la catégorie « Orientation ». La seconde correspond aux indications à respecter par l'expérimentateur pour la poser (d'après Folstein et al., 1975).*

Chaque question se voit attribuer un nombre de points, et le score maximum est 30. La moyenne chez les personnes saines est de 27 ; en deçà, on considère qu'il existe un risque de développer la MA (Feldman & Woodward, 2005). On retrouve les différentes classifications ainsi que les troubles cognitifs associés dans la **figure 3**. Ce test MMSE présente cependant quelques limitations, car les résultats sont particulièrement influencés par le niveau d'éducation et l'âge des individus, et il présente un manque de sensibilité aux troubles cognitifs légers. D'autres tests lui sont alors associés, comme le test mental abrégé (AMTS) (Hodkinson et al., 1972) ou le test d'état mental gériatrique (GMS) (Copeland et al., 1988).

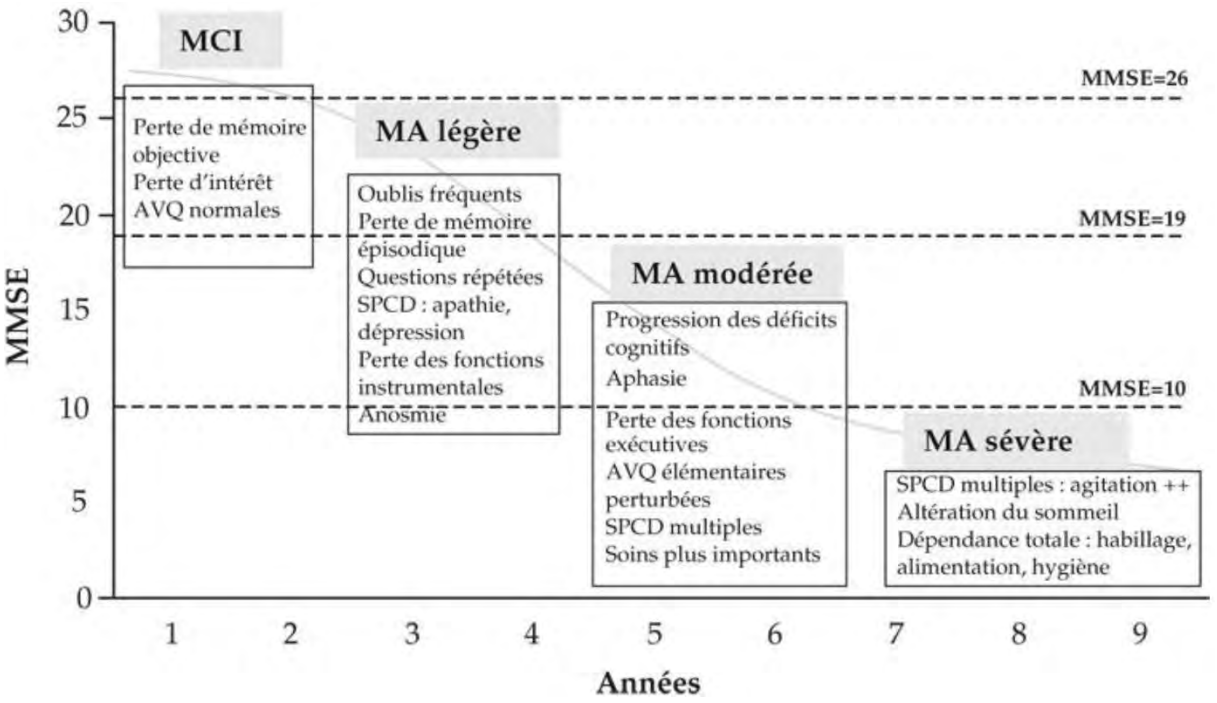



*Figure 3 Classification des patients en fonction du score obtenu au test MMSE (Folstein et al., 1975). MMSE : Mini Mental State Examination ; MCI : Mild Cognitive Impairment ; AVQ : Activités de la Vie Quotidienne ; SPCD : Symptômes psychologiques et comportementaux de démences (d'après Feldman & Woodward, 2005).*

Dans les années qui suivirent, certaines grilles comme le NINCDS-ADRDA (McKhann et al., 1984) vinrent compléter le MMSE, ajoutant ainsi des critères d'inclusion pour les patients (**Fig.4**).

Ces différents tests permettent de mieux diagnostiquer les patients atteints de la MA, mais également de définir l'avancement de la maladie, et les dommages occasionnés pour les personnes qui en souffrent. Dans un but préventif, il est aujourd'hui un enjeu majeur de détecter la pathologie dans les stades précoces. Des études comparatives tentent de déterminer et d'établir de nouveaux tests (MoCA) qui seraient plus précis que le MMSE pour détecter les MCI (Mild Cognitive Impairment) (Pinto et al., 2019), survenant dans les tous premiers stades.

1. Critères de maladie d'Alzheimer probable :
- syndrome démentiel établi sur des bases cliniques et documenté par le *Mini-Mental State Examination,* le *Blessed Dementia Scale* ou tout autre test équivalent et confirmé par des preuves neuropsychologiques
- déficit d'au moins deux fonctions cognitives
- altérations progressives de la mémoire et des autres fonctions cognitives
- absence de trouble de conscience
- survenue entre 40 et 90 ans, le plus souvent au-delà de 65 ans
- en l'absence de désordres systémiques ou d'une autre maladie cérébrale pouvant rendre compte par eux-mêmes, des déficits mnésiques et cognitifs progressifs

2. Ce diagnostic de maladie d'Alzheimer probable est renforcé par :
- la détérioration progressive des fonctions telles que le langage (aphasie), les habilités motrices (apraxie) et perceptives (agnosie)
- la perturbation des activités de la vie quotidienne et la présence de troubles du comportement
- une histoire familiale de troubles similaires surtout si confirmés histologiquement
- le résultat aux examens standards suivants :
  - normalité du liquide céphalo-rachidien
  - EEG normal ou siège de perturbations non spécifiques comme la présence d'ondes lentes
  - présence d'atrophie cérébrale d'aggravation progressive

3. Autres caractéristiques cliniques compatibles avec le diagnostic de maladie d'Alzheimer probable après exclusion d'autres causes :
- période de plateaux au cours de l'évolution
- présence de symptômes tels que dépression, insomnie, incontinence, idées délirantes, illusions, hallucinations, réactions de catastrophe, désordres sexuels et perte de poids. Des anomalies neurologiques sont possibles surtout aux stades évolués de la maladie, notamment des signes moteurs tels qu'une hypertonie, des myoclonies ou des troubles de la marche.
- crises comitiales aux stades tardifs
- scanner cérébral normal pour l'âge

4. Signes rendant le diagnostic de maladie d'Alzheimer probable incertain ou improbable :
- début brutal
- déficit neurologique focal tel que hémiparésie, hypoesthésie, déficit du champ visuel, incoordination motrice à un stade précoce
- crises convulsives ou troubles de la marche en tout début de maladie

5. Le diagnostic clinique de la maladie d'Alzheimer possible :
- peut être porté sur la base du syndrome démentiel, en l'absence d'autre désordre neurologique, psychiatrique ou systémique susceptible de causer une démence, en présence de variante dans la survenue, la présentation ou le cours de la maladie ;
- peut être porté en présence d'une seconde maladie systémique ou cérébrale susceptible de produire un syndrome démentiel mais qui n'est pas considérée comme la cause de cette démence ;
- et pourrait être utilisé en recherche clinique quand un déficit cognitif sévère progressif est identifié en l'absence d'autre cause identifiable.

6. Les critères pour le diagnostic de maladie d'Alzheimer certaine sont :
- les critères cliniques de la maladie d'Alzheimer probable ;
- et la preuve histologique apportée par la biopsie ou l'autopsie.

*Figure 4 Critères d'inclusion et d'exclusion NINCDS-ADRDA permettant de compléter le test MMSE pour le diagnostic de la maladie d'Alzheimer*

## D. Altérations cérébrales structurales de la maladie

Après le décès de sa patiente, Alois Alzheimer a demandé à la famille d'Auguste l'autorisation d'autopsier son cerveau (Alzheimer, 1907 ; Stelzmann et al., 1995). Il a pu observer, comme visibles sur les photos suivantes, des atrophies du cortex cérébral et de l'hippocampe, associées à un élargissement des ventricules (**Fig.5**). Il a également observé plusieurs altérations cérébrales (**Fig.6A**), comme une rigidité artériosclérotique, des dépôts extracellulaires que sont les plaques bêta-amyloïdes (Aβ) (**Fig.6B**), ou des dégénérescences neurofibrillaires (**Fig.6C**).

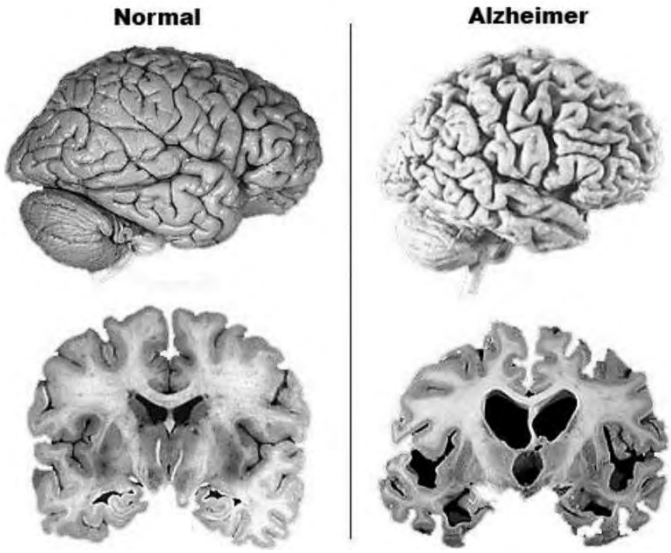



*Figure 5 À gauche, une photographie du cerveau d'un individu sain avec une coupe coronale en bas. À droite, celui d'un patient Alzheimer, où l'on constate l'atrophie du cortex et de l'hippocampe, ainsi qu'un élargissement des ventricules (d'après Mayur et al., 2013).*

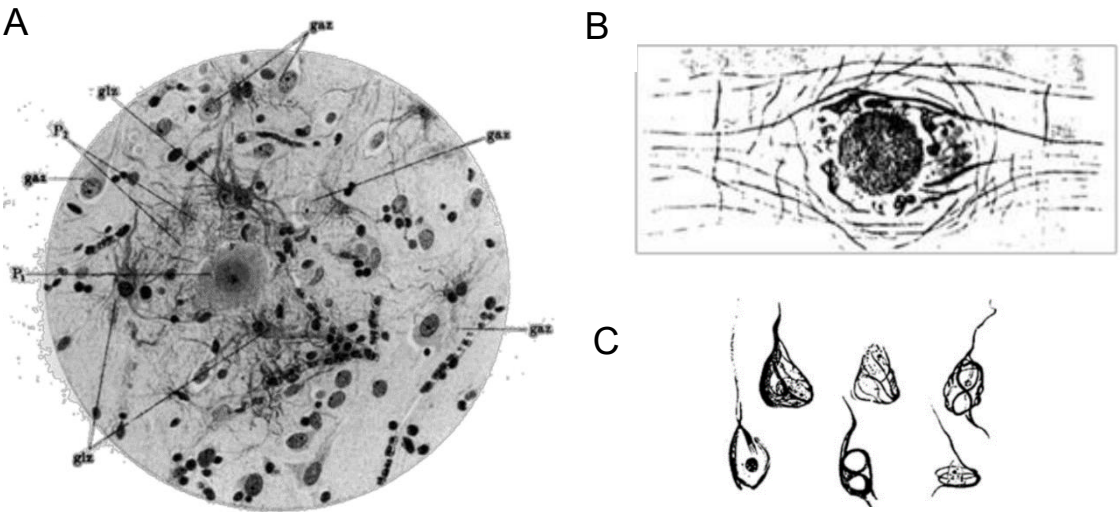



*Figure 6 Observations (A) et dessins des plaques séniles et des dégénérescences neurofibrillaires (B et C) observées dans le cerveau d'Auguste Deter par le docteur Alzheimer (d'après Alzheimer, 1907 et Stelzmann et al., 1995)*

### 1. Dégénérescences neurofibrillaires et protéine Tau

Les dégénérescences neurofibrillaires (neurofibrillary tangles, NFT) sont des enchevêtrements de protéines Tau hyperphosphorylées. Tau est une composante du cytosquelette neuronal qui est impliquée dans l'assemblage des microtubules avec les filaments d'actine (Hirokawa et al., 1988 ; Elie et al., 2015). Chez les patients MA, on retrouve une protéine Tau hyperphosphorylée, de par l'action de kinases, comme GSK-3β (Gao et al., 2018). Cette hyperphosphorylation entraine une incapacité de Tau à se lier aux microtubules, causant leur déstructuration (Mohktar et al., 2013 ; Querfurth & LaFerla, 2010). Ces filaments de protéines Tau hyperphosphorylées vont alors s'agréger et former des NFT (**Fig.7**) qui dont la présence contribue aux troubles cognitifs de la MA (Brion et al., 1985 ; Buee et al., 2000). Les tauopathies sont plus largement impliquées dans la diminution de l'activité des réseaux neuronaux et l'agrégation de Tau présente des effets neurotoxiques (Krüger & Mandelkow, 2016 ; Gao et al., 2018).

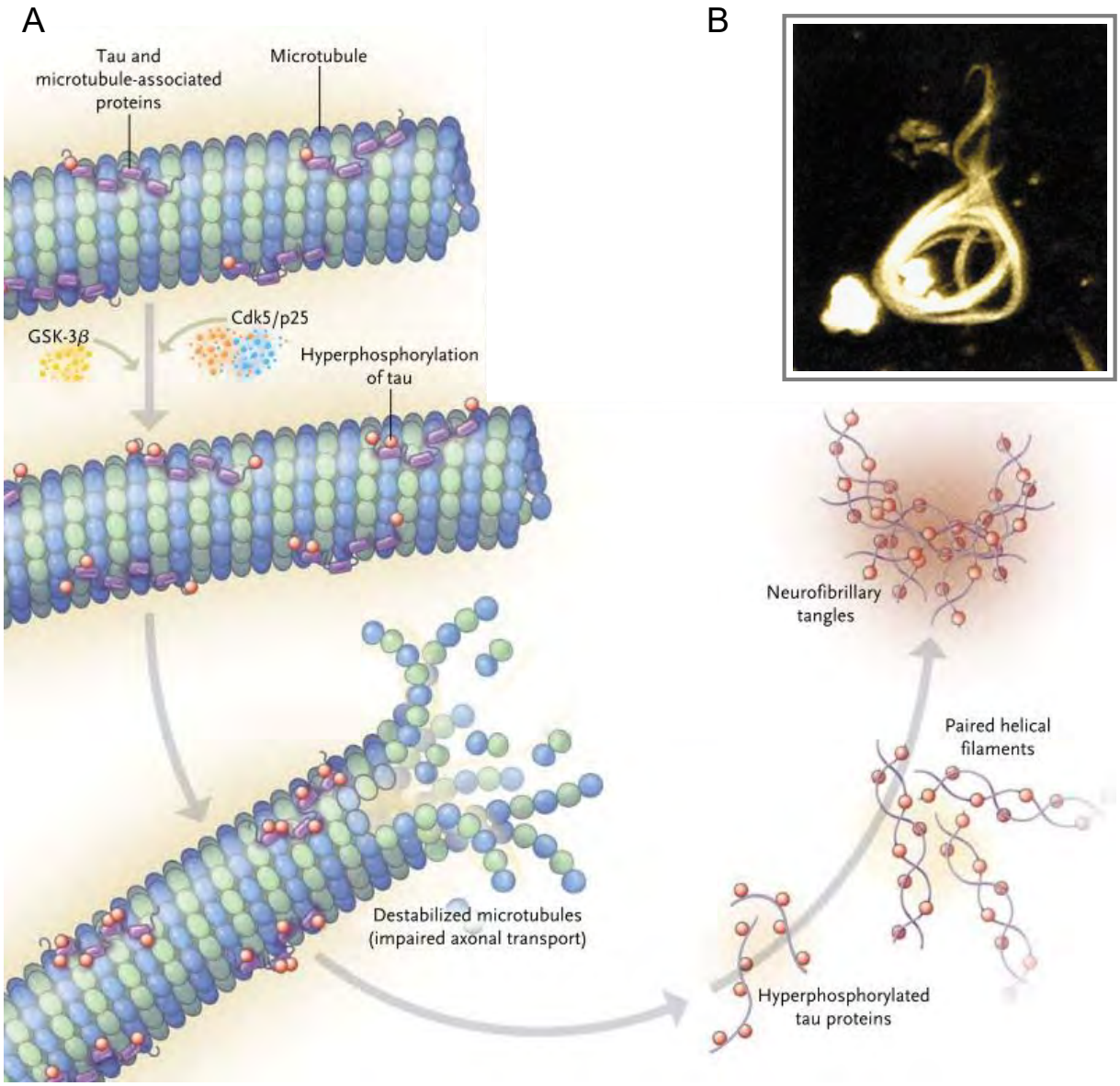



*Figure 7 Représentation de la phosphorylation de Tau et de son dysfonctionnement dans la maladie d'Alzheimer. La protéine Tau phosphorylée vient se déposer sur les microtubules, assurant leur assemblage. Dans le cadre de la pathologie, la protéine Tau est hyperphosphorylée, et perd sa fonction principale, déstructurant ainsi les microtubules. De plus, ces filaments de Tau vont s'agréger, formant ainsi les NFT (B) (d'après Querfurth & LaFerla, 2010 et https://en-academic.com/dic.nsf/enwiki/1129941).*

## 2. Le peptide Aβ

Les plaques séniles observées par le Dr. Alzheimer ont monopolisé une grande partie de l'attention des chercheurs. Ces plaques séniles, sont constituées de peptides bêta-amyloïdes (Aβ), dont on trouve la production dans l'ensemble du corps humain, comme par exemple dans les hépatocytes (Benson & Kleiner, 1980) et bien sûr dans le cerveau. (Stelzmann et al., 1995). L'origine de la formation du peptide Aβ provient de la protéine précurseur de l'amyloïde (APP) dont les voies protéolytiques sont largement décrites (**Fig.8**).

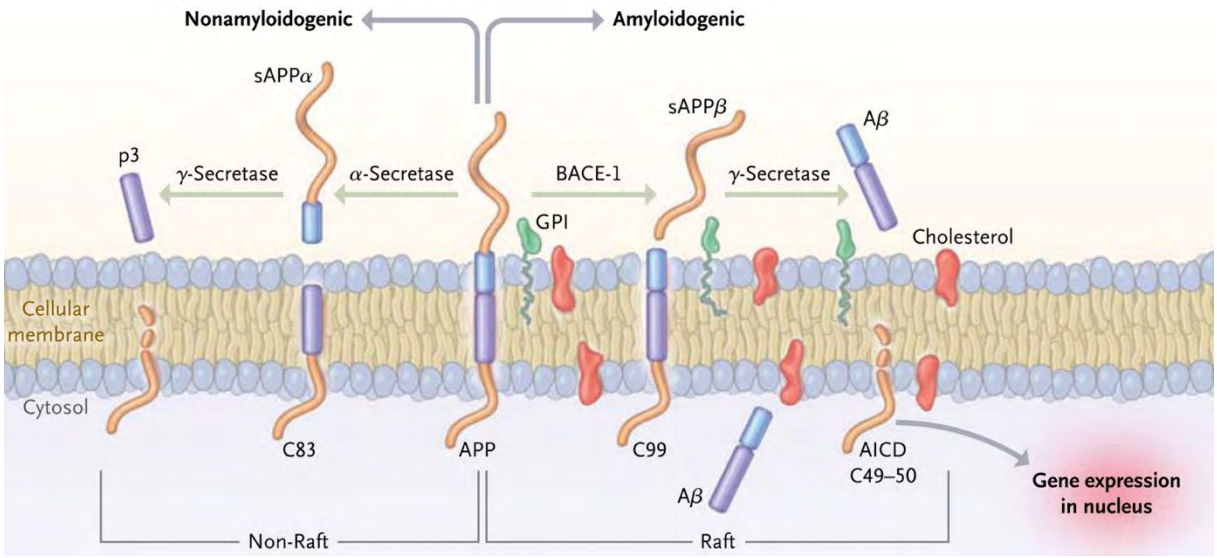



*Figure 8 Description des deux voies de protéolyse du précurseur du peptide amyloïde (APP). Dans la partie de gauche pour la voie non-amyloïdogène, l'APP est successivement clivé par l'α–sécrétase et la γ-sécrétase en peptide p3 libéré dans le milieu extracellulaire. Dans la voie amyloïdogène à droite, on retrouve le clivage par la ß-sécrétase (BACE-1) et le clivage par la γ-sécrétase résultant à la libération du peptide Aß et l'AICD. D'après (Querfurth et LaFerla, 2010).*

La protéine précurseur de l'APP connait donc deux voies de protéolyse possibles, la voie non-amyloïdogène, majoritaire et non pathogène, et la voie amyloïdogène, minoritaire et résultant en la production de peptides Aβ. Concernant la voie majoritaire, l'APP est successivement clivée par l'α–sécrétase en une protéine précurseur soluble sAPPα et un complexe C83 carboxy-terminal de 83 résidus, restant ancré au niveau de la membrane plasmique, puis clivé par la γ-sécrétase, libérant le peptide p3 en milieu extracellulaire d'une part, et le domaine intracellulaire de l'amyloïde (AICD) d'autre part. Dans la voie pathogène, le clivage de l'APP est effectué par l'enzyme β-sécrétase sur le site BACE-1, en une version plus courte de la sAPPβ et un complexe C99 carboxy-terminal de 99 résidus. Ce fragment, plus long que son homologue C83 dans la voie non pathologique, est clivé par la γ-sécrétase en peptide Aβ et en AICD

(Querfurth & LaFerla 2010). Le peptide Aβ se compose d'une quarantaine d'acides aminés, et certaines de ces formes majoritaires, comme Aβ40 (~90%) ou Aβ42 (~10%) (**Fig.9** ; Citron et al., 1996), sont plus ou moins enclines à former des fibrilles puis des plaques (**Fig.10**). Des études récentes tentent de comprendre les mécanismes d'agrégation des formes Aβ40 et Aβ42, bien que ces deux formes ne semblent pas former de co-fibrilles en condition physiologique (Cukalevsi et al., 2015 ; Cerofolini et al., 2020).

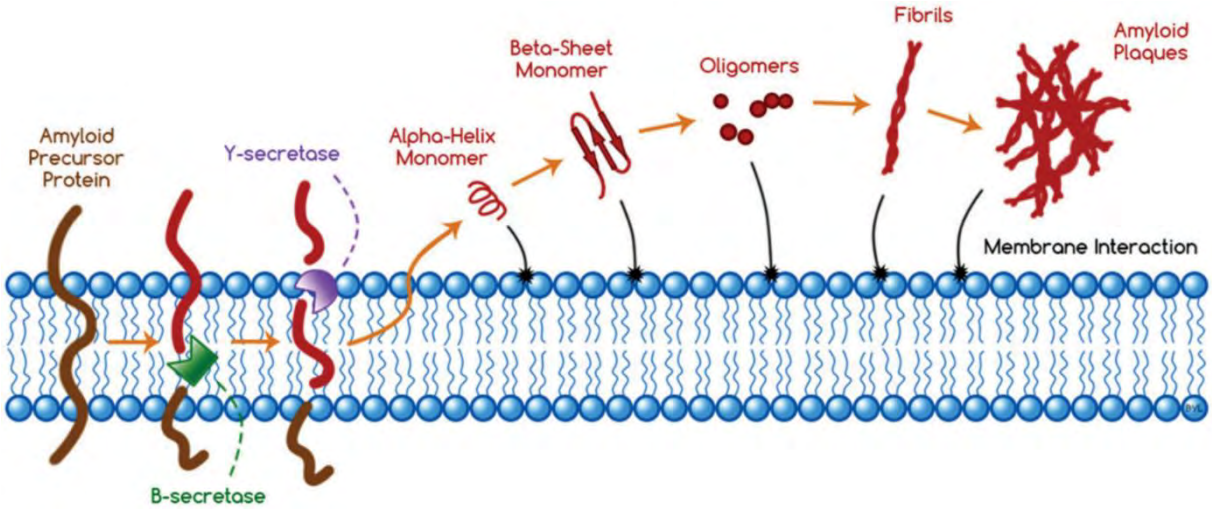



*Figure 9 Représentation de la formation des plaques amyloïdes, à la suite de la formation du peptide Aß. L'accumulation du peptide forme graduellement des oligomères, conduisant à la formation de fibrilles, eux-mêmes conduisant à la formation de plaques séniles,* via *leur agrégation. Ces différentes structures peuvent toutes avoir des interactions dites toxiques avec la membrane plasmique (d'après Drolle et al., 2014).*

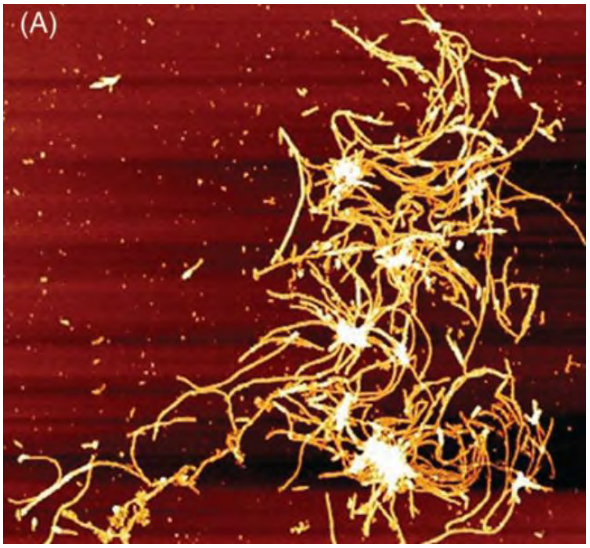



*Figure 10 Peptide Aß (1–42) vue par microscopie à force atomique, montrant des fibrilles agrégées, formant parfois des clusters (d'après Drolle et al., 2014).*

Le peptide se polymérise alors, formant différents assemblages de quelques peptides (des oligomères), jusqu'à former des polymères de fibrilles insolubles qui constituent les plaques amyloïdes (Blennow et al., 2006).

En parallèle, des études s'orientent sur l'implication de l'AICD dans la pathologie. En effet, cette protéine joue un rôle dans la régulation de l'expression des gènes, notamment ceux associées à la MA (Penke et al., 2019), comme la production et la dégradation d'Aβ, ainsi que l'hyperphosphorylation de Tau. L'AICD est présente en excès dans la pathologie, et pourrait contribuer aux déficits associés à la maladie, et constitue donc également une cible thérapeutique potentielle (Konietzko, 2012).

L'origine du changement dans la protéolyse d'APP de la voie non-amyloïdogène vers la voie amyloïdogène reste inconnue. Cette interrogation reste fortement liée au fait que, dans la quasi-totalité des cas (97%), ce changement survient de manière sporadique. Cependant, il existe aussi une forme familiale de la maladie d'Alzheimer (FAD), liée à des mutations génétiques. Certaines mutations peuvent survenir sur le gène codant pour la protéine APP ou sur les gènes codants pour les présénilines 1 (PS1) et 2 (PS2), partie intégrante du corps catalytique de l'enzyme γ-sécrétase. En revanche, les déficits cognitifs et l'ensemble des processus neurodégénératifs sont relativement similaires entre la forme sporadique et la forme FAD de la MA, bien que l'apparition des symptômes soit plus précoce (avant 45 ans) chez les patients FAD.

### E. L'hypothèse de la cascade amyloïde

Historiquement, c'est dans la publication de Hardy et Higgins en 1992 qu'apparait l'hypothèse de la cascade amyloïde, puis celle-ci fut développée dans un article paru en 2002 (**Fig.11** ; Hardy & Higgins, 1992 ; Hardy & Selkoe, 2002). Les auteurs relient la MA au syndrome de Down, relatant la première caractérisation de l'Aβ 20 ans avant leur publication, dans des prélèvements sanguins de patients Alzheimer et atteints de trisomie 21. Pour cause, le gène codant pour l'APP est localisé sur le chromosome 21 (Kang et al., 1987). Il existe également des publications reliant certaines mutations sur les présénilines à des symptômes spécifiques comme la paraparésie (faiblesse spastique, affaiblissement des membres inférieurs) (Crook et al., 1998).

D'après l'hypothèse de la cascade amyloïde, le basculement de la voie non-amyloïdogène vers la voie amyloïdogène entraine l'accumulation du peptide Aβ cérébral, causant alors des dégénérescences neurofibrillaires, le dysfonctionnement des neurones et synapses, la perte neuronale et les symptômes démentiels.

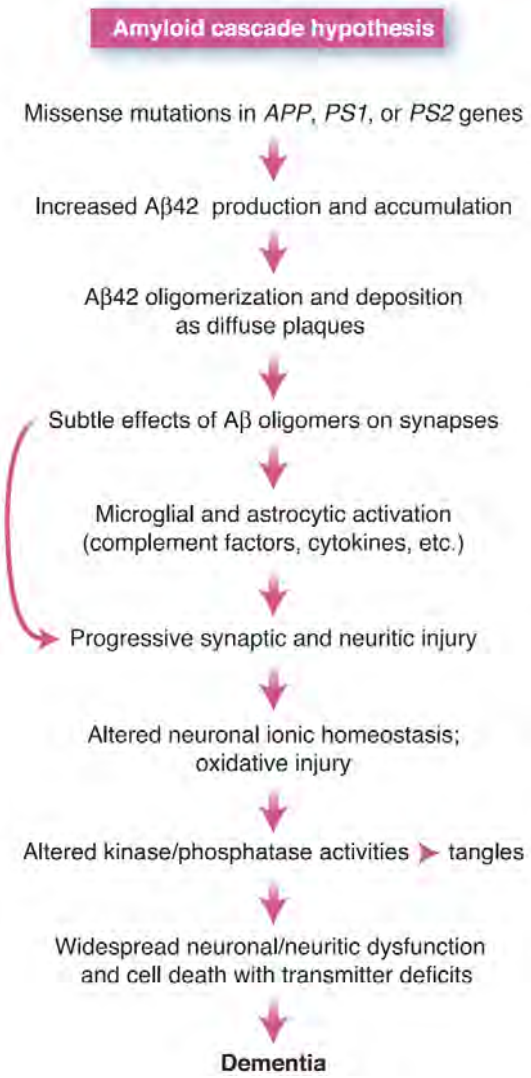



*Figure 11 Chronologie de l'hypothèse de la cascade amyloïde. La flèche violette sur la gauche indique que les oligomères Aβ peuvent directement causer des dysfonctions synaptiques (d'après Hardy et Selkoe, 2002).*

Cependant, il demeure des limitations à l'hypothèse de la cascade amyloïde, qui proviennent de la base même de cette hypothèse. Une récente revue invite même à la réflexion quant à l'utilisation des modèles murins de la MA pour la recherche préclinique. En effet, ceux-ci sont généralement des modèles d'amyloïdopathie, pouvant expliquer les difficultés à traduire les connaissances accumulées sur ces modèles en thérapies chez l'humain (Götz et al., 2018). Les auteurs soulignent par exemple, des différences structurelles possibles dans les isoformes des filaments Tau

dans les différents modèles murins, les rendant plus ou moins proches de ce qui est observé chez l'humain, suggérant donc une meilleure adéquation de certains modèles comme un modèle translationnel. De plus, les modèles murins présentent une faible mortalité neuronale en comparaison avec la pathologie humaine (Duyckaerts et al., 2008).

Par ailleurs, la causalité entre la MA et l'accumulation des plaques séniles est discutée car le degré de sévérité de démence n'est pas corrélé au nombre de plaques séniles (Terry et al., 1991). Ceci a été confirmé plus récemment par le fait que la présence de plaques amyloïdes cérébrales détectées *in vivo*, *via* tomographie par émission de positrons (TEP), n'est pas corrélée au déclin cognitif et à la neurodégénérescence (Rabinovici & Jagust, 2009). De récents travaux publiés dans *Nature Immunology* proposent d'ailleurs une théorie selon laquelle les plaques amyloïdes ont un rôle protecteur pour le cerveau. D'après cette étude (Huang et al., 2021), les « plaques à noyau dense » seraient formées à partir des plaques diffuses *via* la microglie. Celle-ci utiliserait la signalisation Gas6 émise par ces plaques amyloïdes pour les détecter *via* leur récepteur TAM afin de les éliminer (**Fig.12**).

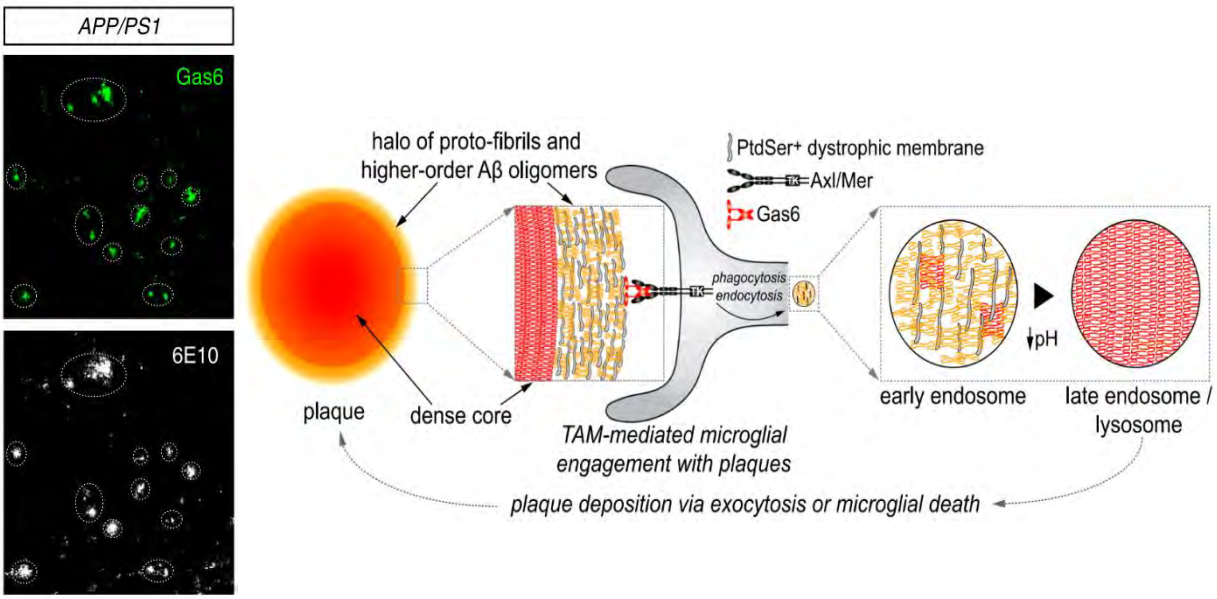



*Figure 12 À gauche, on observe la co-localisation de la protéine Gas6 avec les plaques Aß (détectées avec l'anticorps 6E10) chez les souris APP/PS1. À droite, un modèle de la signalisation de TAM/Gas6 permettant l'élimination des plaques Aß via l'action de la microglie (d'après Huang et al., 2021).*

D'après ces travaux, les plaques seraient donc une étape nécessaire à la dégradation d'Aβ par les cellules microgliales. En outre, et en accord avec cette idée, il a été montré que ce sont les niveaux d'Aβ sous forme d'oligomères qui corrèlent avec l'aggravation

des déficits cognitifs, et non la présence de plaque (Näslund et al., 2000 ; Bayer & Wirths, 2010).

Enfin, les différents essais cliniques ayant pour cible pharmacologique le peptide Aβ présentent toujours des échecs quant à leur efficacité (Makin, 2018 ; Rey et al., 2020). Cependant, malgré les limitations qui s'opposent à l'hypothèse de la cascade amyloïde et aux questionnements des modèles utilisés, les souris transgéniques comme modèle d'amyloïdopathie ont largement contribué à la compréhension de l'impact du peptide Aβ sur le fonctionnement cérébral.

Récemment, un article publié dans *Science* (Piller, 2022) a levé le voile sur des travaux *a priori* volontairement faussés concernant un oligomère particulier, Aβ*56, décrit par les auteurs de ces travaux comme l'unique forme toxique du peptide Aβ et responsable de la MA. L'injection de cet oligomère dans le cerveau de souris aurait entrainé un déclin cognitif, renforcant l'hypothèse de la cascade amyloïde (Lesné et al., 2006). Cette fraude, bien que coûteuse pour les nombreuses recherches qui en ont découlé, ne remet en question que cet oligomère précis, et ne doit pas porter atteinte aux nombreuses études à travers le monde, qui poursuivent leurs expérimentations sur la toxicité des peptides Aβ.

### 1. Peptide Aβ et perturbations neuronales

C'est à travers l'utilisation de modèle génétique de la MA que les altérations cérébrales causées par l'accumulation du peptide Aβ ont pu être déterminées. Cependant, la fonction de ce peptide en condition physiologique reste encore mal connue. Premièrement, Aβ exerce des effets neurotoxiques dans les différents modèles murins de la MA ainsi que chez les patients. La présence de plaques amyloïdes active la microglie, qui libére alors des cytokines (par exemple IL-1β et TNF-α) pouvant activer les astrocytes et traverser la barrière hémato-encéphalique, induisant la production de α1-antichymotrypsine (ACT) et α2-macroglobuline (α2M), marqueurs de l'inflammation. On retrouve également des biomarqueurs de stress oxydatif comme des sous-produits de la peroxydation lipidique (isoprostanes) et de l'oxydation de l'ARN (8-hydroxyguanine) (Perrin et al., 2009 ; Benilova et al., 2012). Également, il est possible que les plaques impliquent une séquestration de protéines cruciales conduisant à un dysfonctionnement et/ou une mort cellulaire.

Concernant les conséquences de la présence d'Aβ sur l'activité synaptique, celle-ci semble relativement complexe à décrire. De plus, la grande diversité des modèles d'amyloïdopathie permet d'étudier des phénomènes biologiques délétaires spécifiques, qui sont distinctement liés à la composition de l'Aβ soluble (Benilova et al., 2012). À faible dose (picomolaires), l'Aβ semble moduler positivement l'activité synaptique, facilitant alors la potentialisation à long terme (LTP) (Puzzo et al., 2008). En revanche, des études réalisées sur tranches hippocampiques indiquent que stimuler l'activité des neurones augmente la production d'Aβ, qui exerce un rétrocontrôle négatif sur l'activité synaptique, selon un mécanisme qui n'est pas encore compris (Kamenetz et al., 2003). Aβ étant largement surexprimé en condition pathologique, sa présence induirait alors une dépression de la transmission synaptique, diminuant la potentialisation à long-terme (LTP) (Chapman et al., 1999).

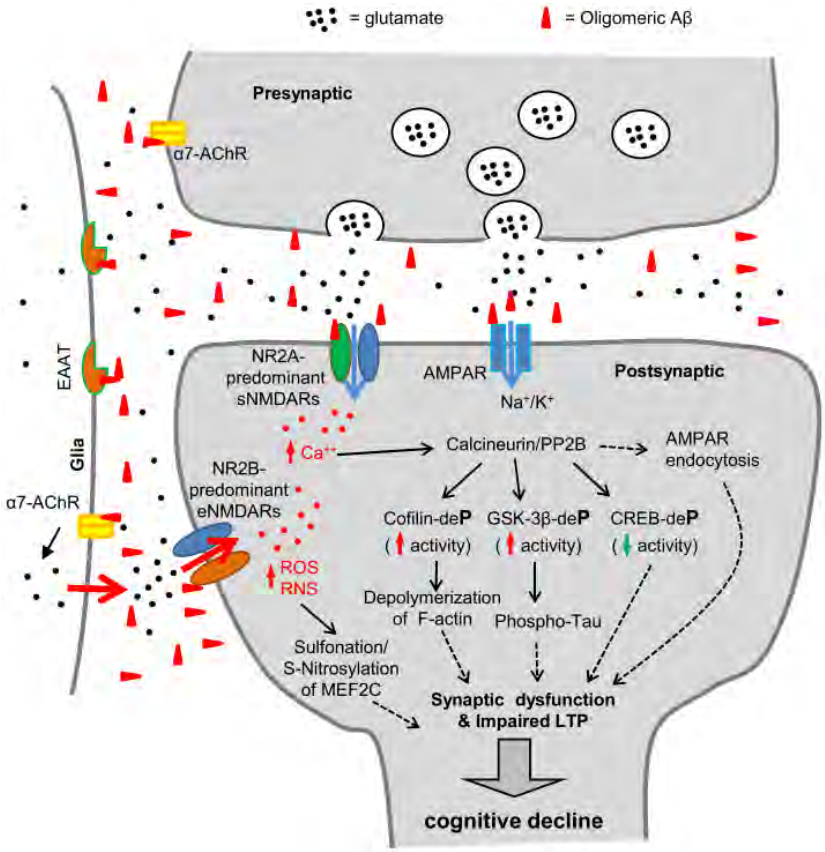



*Figure 13 Altérations astrocytaires, microgliales et synaptiques* via *la présence d'Aβ. L'activation aberrante des récepteurs NMDA engendre l'activation de voies de signalisation délétères pour la synapse, et des augmentations du flux calcique. Ces réactions entrainent une oxydoréduction, une dépolarisation de l'actine F, une endocytose des récepteurs NMDA et une hyperphospohrylation de Tau, conduisant alors à un dysfonctionnement synaptique, qui serait responsable des troubles cognitifs (d'après Tu et al., 2014).*

Les concentrations élevées d'Aβ extracellulaire s'accompagnent d'une hausse de l'activité des récepteurs glutamatergiques NMDA conduisant à une augmentation de

la concentration de calcium et de radicaux libres au niveau post-synaptique (Li et al., 2011). Ceci a pour conséquence d'engendrer l'activation de différentes voies de signalisation, entrainant des altérations de la fonction mitochondriale et du métabolisme énergétique, ainsi que des dégénérescences synaptiques (**Fig.13** ; Tu et al., 2014).

Les oligomères Aβ modifient également les propriétés électriques des neurones *in vitro* et *in vivo* (Hartley et al., 1999 ; Stern et al., 2004 ; Brouillette et al., 2012) en perturbant l'intégrité membranaire des cellules, soit en formant une barrière physique à leur surface, soit en y formant des pores, altérant l'homéostasie ionique de la cellule (**Fig.14** ; Inoue, 2008 ; Kayed et al., 2009 ; Drolle et al., 2014).

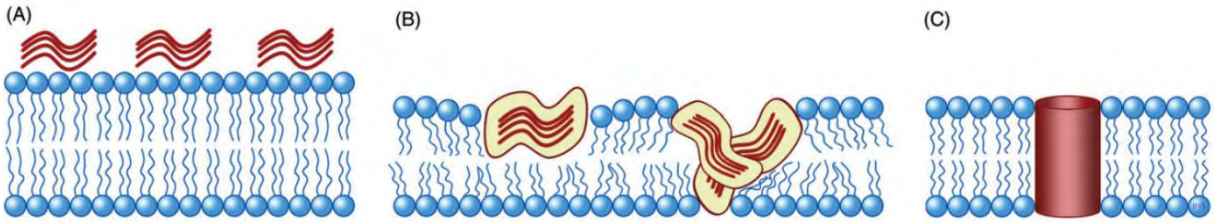



*Figure 14 Représentation schématique de l'accumulation (A) et de l'intégration (B) du peptide Aβ dans la membrane cellulaire, altérant ainsi l'intégrité de la membrane et formant des pores, ainsi que des canaux ioniques (C) (d'après Drolle et al., 2014).*

Concernant l'activité des neurones, il existe également une forme du peptide nommé Aeta (Aη), qui affecterait les récepteurs post-synaptiques glutamatergiques et conduirait à une hypoactivité des neurones, bien que les mécanismes d'action soient inconnus à ce jour (Willem et al., 2015 ; Harris et al., 2020). Ces différents effets, qui conduisent vers une hyper- ou hypoexcitabilité neuronale, convergent vers le fait que l'on s'éloigne des niveaux d'activités normaux et d'un équilibre dans la balance excitation/inhibition (**Fig.15**).

L'ensemble des altérations décrites précédemment contribuent aux déficits que l'on observe lors des différents stades de la MA. Il est intéressant de noter qu'il n'existe pas, dans les modèles murins APP ou présénilines, de corrélation entre la quantité de plaques amyloïdes et les altérations cognitives ou neurodégénératives (Benilova et al., 2012). En revanche, l'âge des individus reste un facteur déterminant de l'aggravation des différentes altérations causées par la MA.

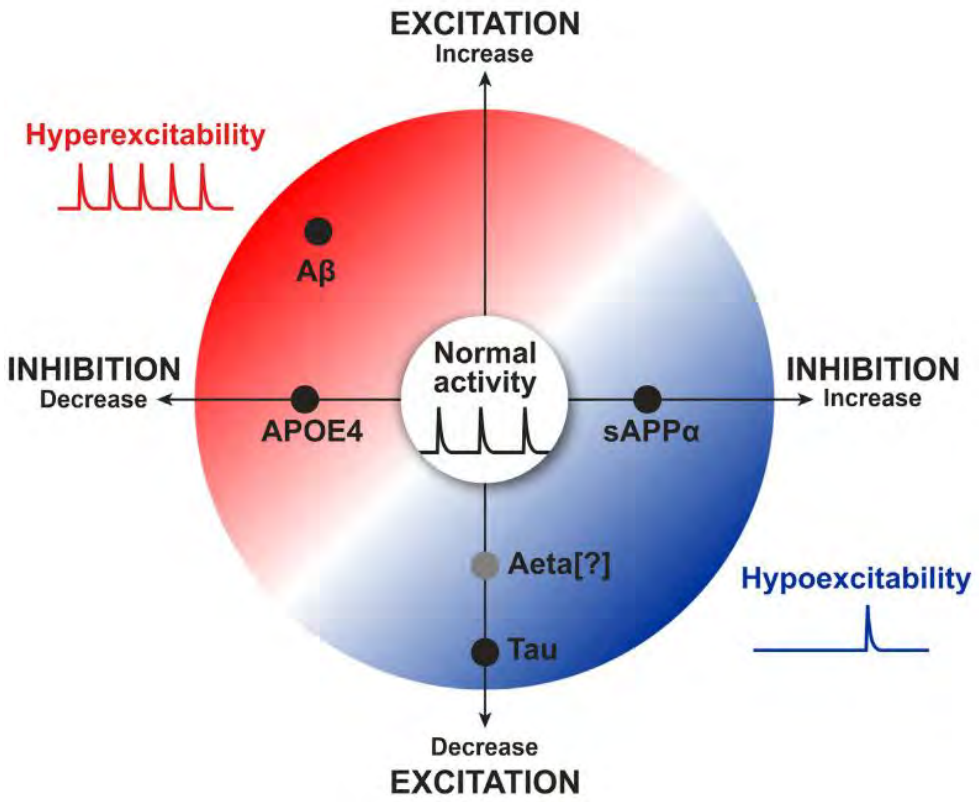



*Figure 15 Représentation des différents effets des peptides impliqués dans la MA dans l'activité neuronale. Au centre, on retrouve l'activité normale dans un cerveau sain. Dans la partie rouge, on tend vers une hyperexcitabilité (APOE4, Aß), alors que le bleu représentente l'hypoexcitabilité du réseau cérébral (Aeta, Tau) (d'après Harris et al., 2020).*

### 2. Biomarqueurs de la pathologie

Avec le développement de nouvelles technologies, la recherche s'est concentrée sur des facteurs neurologiques ou des biomarqueurs comme indicateurs des stades précoces de la pathologie (**Fig.16** ; Frisoni et al., 2010). En se basant sur l'atrophie cérébrale observée chez les patients âgés, des études se penchent sur les changements structuraux présents avant l'apparition de la MA et chez les sujets MCI, qui pourrait prédire le déclenchement de la pathologie. Grâce à l'imagerie à résonance magnétique (IRM), des études montrent une diminution du volume des lobes temporaux médians, du cortex cingulaire postérieur, du cortex orbitofrontal, ainsi que de l'hippocampe (Shi et al, 2009 ; Tondelli et al., 2012). Ces effets peuvent s'avérer subtils en fonction des régions hippocampiques, comme une susceptibilité accrue de l'aire CA1 dans ses changements structuraux par rapport au reste de l'hippocampe, dans les stades de pré-démence, bien que ces changements structuraux soient non-spécifiques à la MA (La Joie et al, 2013). Avec l'IRM fonctionnelle (IRMf), on peut mesurer des réductions de l'activation de régions cérébrales, telles que l'hippocampe

(Celone et al., 2006). On observe également des perturbations du « default mode network » (DMN), qui est une mesure de l'activité neuronale basale de régions cérébrales en interaction lorsque les pensées d'un sujet ne sont pas concentrées vers un objectif précis, autrement dit lorsqu'il rêvasse. Ce réseau est normalement désactivé lorsque l'on demande au sujet d'encoder de nouvelles informations, ou que l'on dirige ses pensées (Raichle et al, 2001). L'imagerie par IRMf a montré une hyperactivation de l'hippocampe, ainsi qu'une désactivation réduite du DMN dans les stades présymptomatiques de patients FAD (Quiroz et al., 2010), ainsi que chez les sujets MCI (Bakker et al., 2012). Ces altérations du DMN pourraient participer aux troubles cognitifs qui surviennent dans la MA.

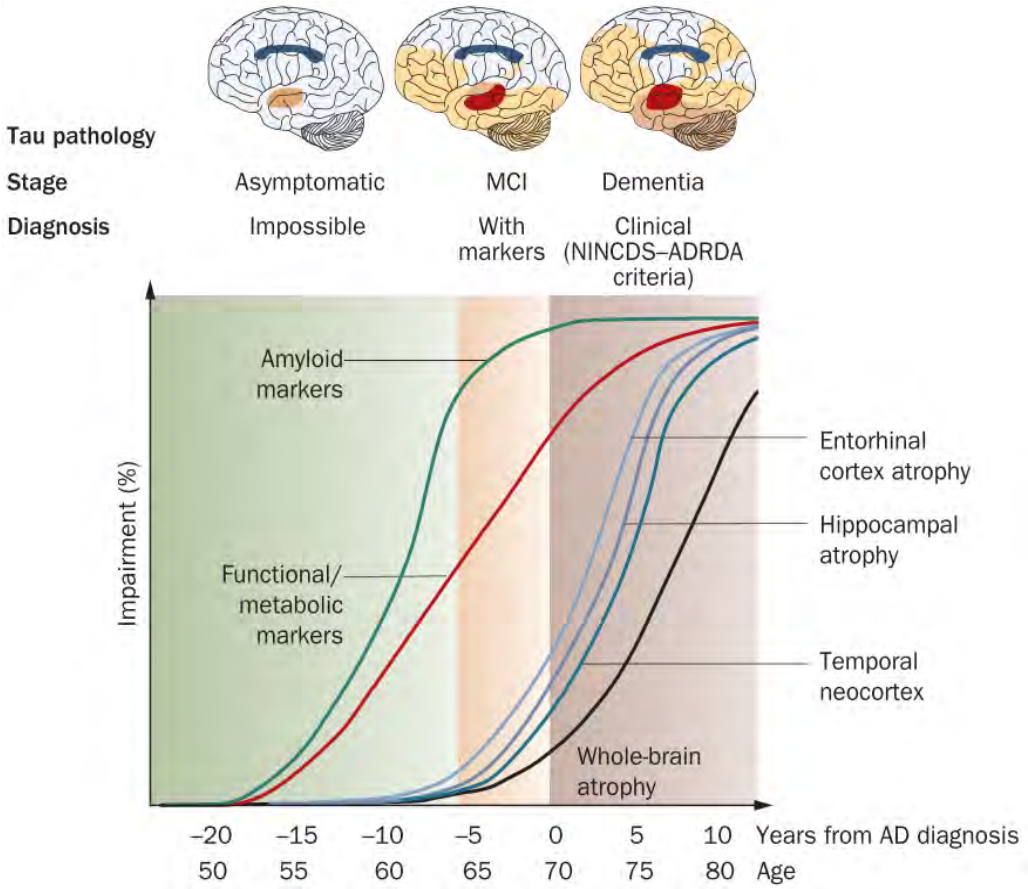



*Figure 16 Progression des marqueurs cognitifs et biologiques en fonction des différents stades de la maladie d'Alzheimer. La détection de chacun des marqueurs augmente avec l'âge, et cette représentation permet de voir ceux qui sont détectables avant l'apparition des symptomes de la maladie, ou chez les individus MCI (d'après Frisoni et al., 2010).*

Il est possible que l'hyperactivité de l'hippocampe observée chez les sujets MCI et les patients MA traduise une synchronisation excessive de l'activité des populations neuronales locales. Ces activités neuronales aberrantes que l'on peut observer par électroencéphalographie (EEG) chez l'humain (Vossel et al., 2013) et la souris

(Bezzina et al., 2015a) font l'objet d'un vaste champ d'étude sur les liens entre la MA et l'épilepsie (Cipriani et al., 2011 ; Szabo et al., 2022).

L'utilisation de la TEP et/ou la détection de protéines et peptides dans le liquide cérébrospinal (CSF) a également contribué à la compréhension de l'évolution des biomarqueurs en fonctions des stades de la pathologie (**Fig.17**). Des études par TEP ont permis d'observer une réduction du métabolisme neuronal chez les patients MA, et en particulier une baisse de consommation de glucose (Craig-Schapiro et al., 2009 ; Chen et al., 2013). Dans le CSF, on peut mesurer les niveaux d'Aβ42 ou de Tau, mais également de marqueurs de l'inflammation tel que l'ACT, un inhibiteur de sérine protéase colocalisant avec Aβ dans les plaques séniles (Abraham et al., 1988). La liste des biomarqueurs possibles prennant de l'ampleur avec les années, des études se penchent sur des technologies de « machine-learning », afin d'augmenter la précision des analyses, et d'identifier la cohérence de ces marqueurs dans le diagnostic de la pathologie (Chang et al., 2021).

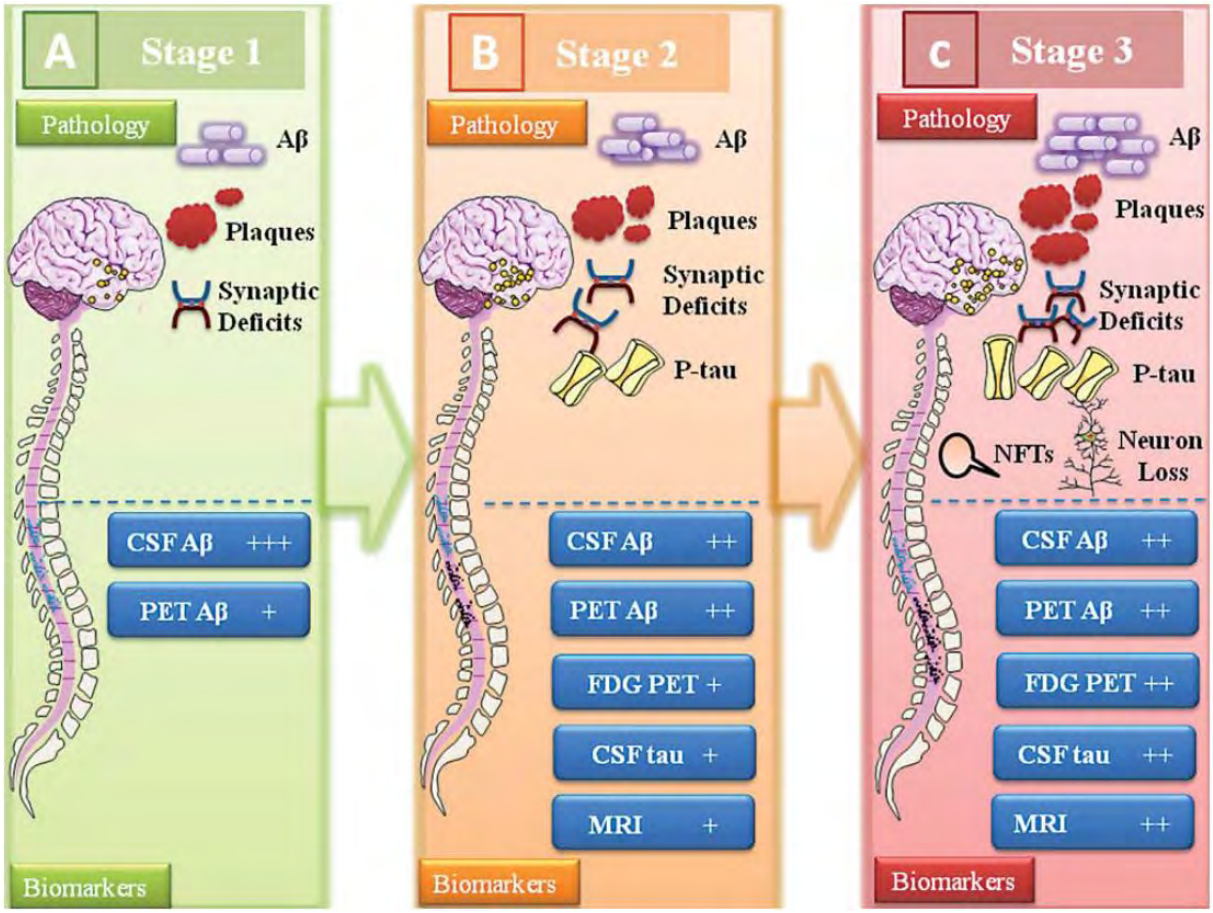



*Figure 17 Évolution des biomarqueurs mesurables en fonction des différents stades de la MA. Le stade 1 correspond à une amylose cérébrale asymptomatique. Le stade 2 comporte des dépôts amyloïdes ainsi que des dysfonctionnements synaptiques et/ou de neurodégénérescence précoce. Le stade 3 est accompagné de dépôts amyloïdes et d'une neurodégénérescence avancée (d'après Tan et al., 2014).*

# II. La mémoire hippocampo-dépendante

Dans le cadre de la MA, il existe un grand nombre de troubles cognitifs, comme les troubles de la mémoire, dont les différents systèmes et sous-régions associées vont être décrits ci-dessous, ainsi que leurs liens avec la pathologie.

## A. Systèmes de mémoire

La mémoire peut être segmentée en différents systèmes qui font appel à des mécanismes et des corrélats neuroanatomiques particuliers. La mémoire est distribuée sur cinq systèmes mnésiques (Schacter & Tulving, 1994), en fonction des fonctions comportementales et cognitives, du type d'informations traitées et représentées, ainsi que des substrats anatomiques mis en place (Squire, 1992 ; Jaffar, 2011). Lors de l'acquisition de nouvelles informations, celles-ci sont de prime abord maintenues à court terme, sous la forme notamment de mémoire de travail qui peut se définir comme un système de maintien temporaire et de manipulation de plusieurs types d'informations nécessaires à la réalisation d'une activité cognitive. Ces informations ne sont pas destinées à être intégrées pour une longue durée, comme un numéro de téléphone ou de carte bleue par exemple. En revanche, si ces informations sont répétées, et/ou si leur contenu le nécessite, elles peuvent alors être stockées sous forme de mémoire à long terme, autrement dit consolidées. Les souvenirs ainsi stockés se distinguent par une première grande subdivision de système de mémoire : la mémoire non-déclarative et la mémoire déclarative (**Fig.18**).

La mémoire non-déclarative est composée de plusieurs sous-systèmes de mémoire indépendants. Premièrement, on y retrouve la mémoire procédurale, faisant appel aux automatismes que nous avons acquis par l'habitude et la pratique (jouer d'un instrument, monter à vélo). Elle comprend également les amorçages perceptifs, qui facilitent le traitement d'une information familière, comme la forme visuelle des mots. En outre, la mémoire procédurale concerne certains apprentissages simples comme des conditionnements classiques, à la fois musculaire et émotionnel. Enfin, elle comprend des apprentissages qui sont non-associatifs, pouvant se traduire par une augmentation ou une disparition d'une réponse à un stimulus répété. Pour résumer, dans le cadre de la mémoire non-déclarative, le rappel de l'information ne se fait pas consciemment.

En revanche, la mémoire déclarative fait appel à un rappel conscient des souvenirs stockés. Elle peut se distinguer sous la forme de mémoire sémantique, qui fait appel aux faits, au language et au sens des mots (connaissances générales).

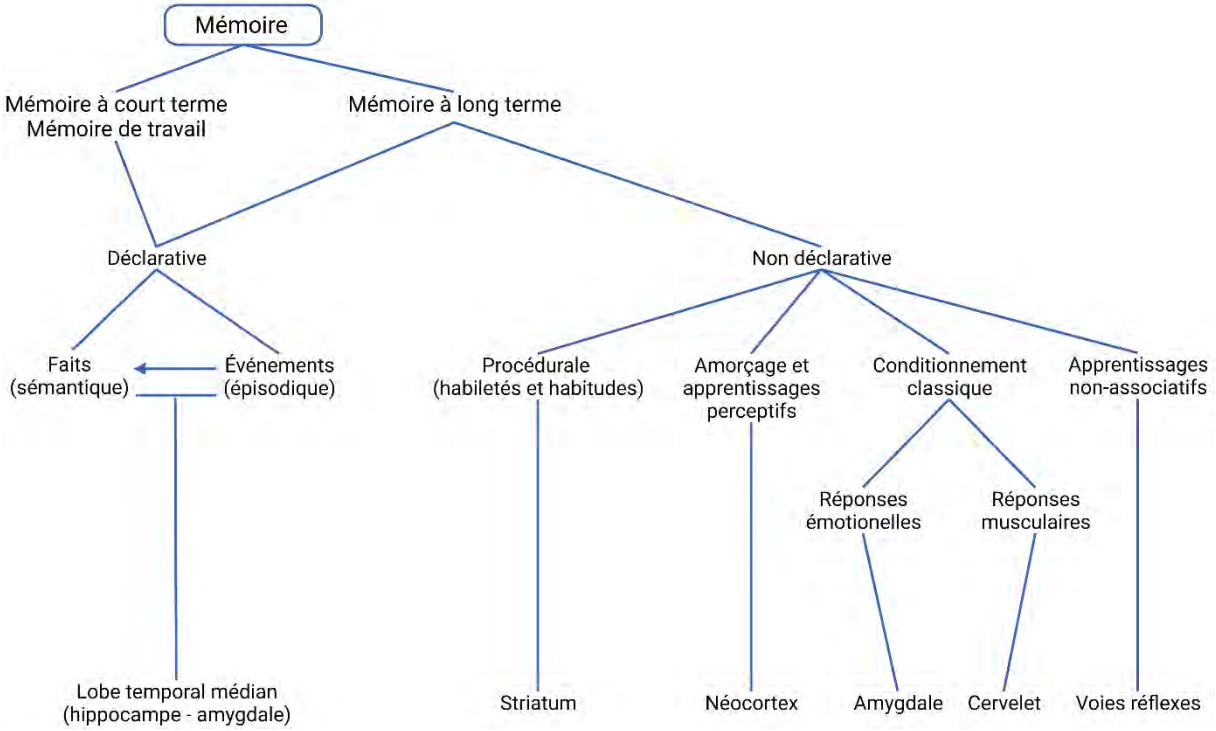



*Figure 18 Modèles des différents systèmes de mémoire ainsi que les substrats neuronaux qui leur sont spécifiques (d'après Squire, 1992 ; Jaffar, 2011).*

Elle comprend également la mémoire épisodique, qui fait appel aux évenements que nous vivons, comme leur contexte ou notre état émotionnel, par exemple. Chez l'humain, la mémoire épisodique peut se former vers l'âge de 3 à 5 ans, et au fur et à mesure du temps, elle a une propension à perdre les détails des souvenirs, pour n'en tirer que les traits communs à d'autres souvenirs et devenir ainsi des connaissances générales.

De plus, la dichotomie des systèmes de mémoire à long terme est associée à des structures cérébrales spécifiques. Selon Eichenbaum, 1992 et Squire, 1992, la mémoire déclarative engage l'hippocampe ainsi que l'amygdale, alors que les systèmes de mémoire non-déclaratifs seraient indépendants de l'hippocampe (**Fig.18**). Une contribution aux avancées sur la compréhension de la mémoire déclarative est due au cas du patient Henry Gustav Molaison, connu sous le nom de patient HM. Celui-ci souffrait depuis l'enfance d'une forme d'épilepsie

pharmacorésistante qui, une fois à l'âge adulte, était devenue si handicapante que HM a subi à l'âge de 27 ans une résection bilatérale du lobe temporal médian avec exérèse de l'amygdale, de l'uncus, du gyrus hippocampique et des deux tiers antérieurs de l'hippocampe pour retirer les foyers épileptiques. À son réveil, il était certes guéri de son épilepsie, mais il s'est retrouvé atteint d'une amnésie antérograde quasi-totale, ainsi qu'une amnésie rétrograde d'environ 11 ans. Il pouvait cependant retenir certaines informations à forte charge émotionnelle, comme le décès de ses parents, ce qui pourrait signifier que d'autres structures que l'hippocampe auraient été engagées pour retenir cette information. De plus, sa mémoire de travail était intacte (Corkin, 1984). Les travaux sur ce patient ont permis de réaliser des avancées majeures dans la compréhension du rôle de l'hippocampe et des structures para-hippocampiques dans les processus de mémorisation.

Dans le cadre de la MA, toutes les différentes formes de mémoire sont altérées. Cela commence par des difficultés à retenir de nouvelles informations et donc à apprendre, ce qui constitue une altération de la mémoire déclarative à court terme. La progression de la maladie cause ensuite une altération progressive de la mémoire épisodique à long terme, qui va remonter de plus en plus loin dans le passé des individus, les amenant à vivre dans le passé (Dubois & Albert 2004). Dans les stades avancés de la pathologie, on retrouve des altérations des mémoires sémantiques et procédurales (Hirni et al., 2013). Ces différents troubles sont associés à des atteintes des régions subhippocampiques et hippocampiques chez les patients MA. Ils souffrent également de fragilités de l'encodage de l'information, ainsi que de sa récupération (Sahakian et al., 1988) qui sont des processus « non-hippocampiques » (DeVille et al., 2018 ; Dolan et Fletcher, 1997) en communication avec l'hippocampe (Reagh & Ranganath, 2018).

## B. L'hippocampe

L'hippocampe est une structure du télencéphale des mammifères qui se situe chez l'humain et les autres primates dans le lobe temporal médian (**Fig.19**). Il appartient au système limbique et joue un rôle central dans la mémoire épisodique ainsi que la navigation spatiale.

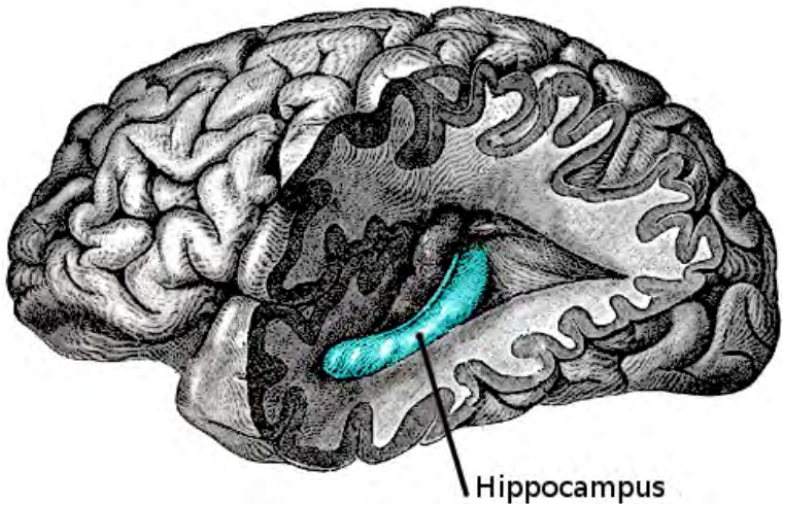



*Figure 19 Localisation de l'hippocampe dans un cerveau humain (d'après Gray, 1918)*

L'hippocampe se subdivise en différentes régions, qui répondent à des fonctions spécifiques. On y retrouve le subiculum, la corne d'Ammon (CA) composée des aires CA1, 2, et 3, ainsi que le gyrus denté (DG) (**Fig.20**) On appelle les connexions entre le DG et les cornes d'Ammon 1, 2 et 3 la boucle trisynaptique de l'hippocampe. La principale voie afférente à l'hippocampe est la voie perforante en provenance du cortex entorhinal, qui garantit l'entrée des signaux multisensoriels vers l'hippocampe, *via* la couche moléculaire du DG, contenant les dendrites des cellules granulaires.

Les neurones granulaires du DG sont de petites cellules de forme arrondie dont les projections axonales se regroupent pour former les fibres moussues, qui projettent vers la couche *radiatum* de CA3. Les axones des neurones pyramidaux de CA3 forment quant à eux les collatérales de Schaffer, qui s'étendent jusqu'aux dendrites des neurones pyramidaux de CA2, et aux dendrites des neurones pyramidaux de CA1. Il existe également des boucles de récurrence au niveau des neurones de CA2, ainsi que des projections directes CA2→CA3. Enfin, il existe des connexions CA1/subiculum vers les couches profondes du cortex entorhinal, celui-ci étant à la fois une porte d'entrée et de sortie principales entre le néo-cortex et l'hippocampe.

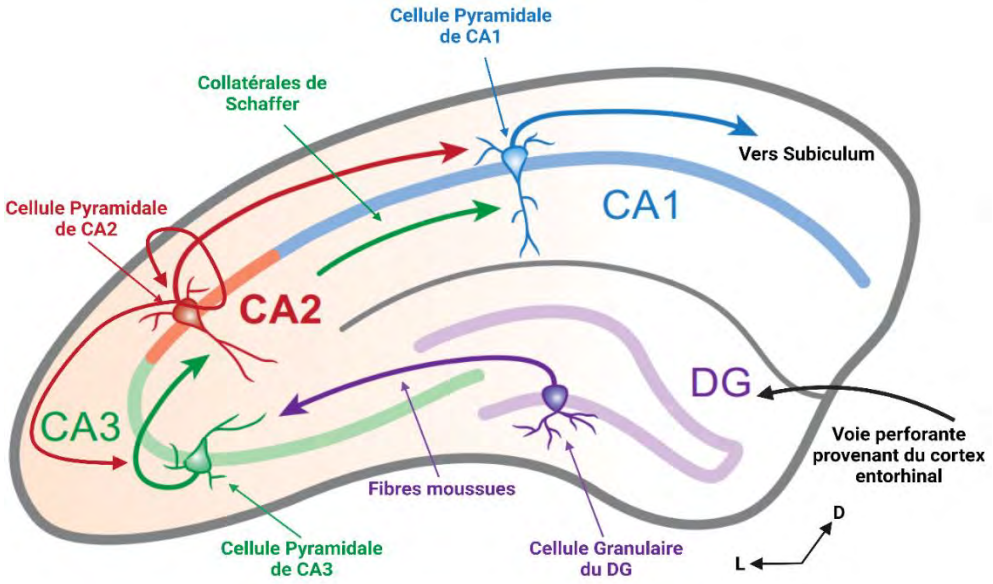



*Figure 20 Modèle simplifié du réseau hippocampique, avec la représentation des régions du DG, CA1, 2 et 3, ainsi que les connexions entre ces régions. Les flèches indiquent la direction principale du flux d'informations à travers le circuit (D, dorsal ; L, latéral) (d'après Caruana et al., 2012).*

### 1. Le Gyrus Denté (DG)

Le DG sert de premier relai entre le cortex temporal médian et la formation hippocampique. Dans la couche sous-granulaire du DG, on retrouve une population de progéniteurs neuraux, qui sont à l'origine de la neurogénèse adulte (**Fig.21** ; Kaplan & Hinds, 1977).

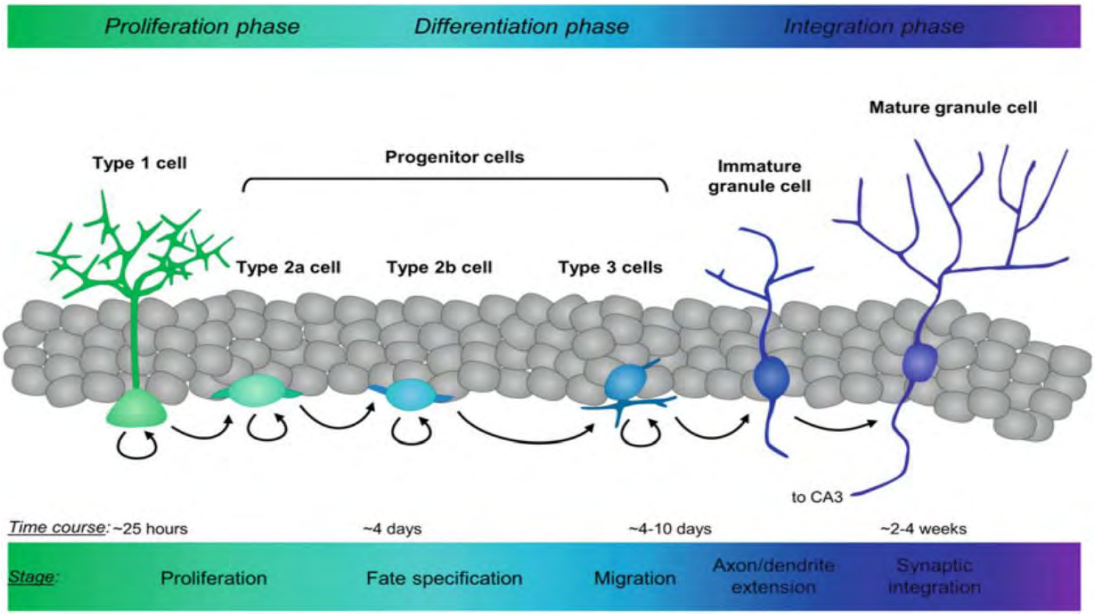



*Figure 21 Représentation des différentes phases de la neurogenèse hippocampique adulte. On retrouve la phase de prolifération, puis de différenciation des progéniteurs neuraux. Vient ensuite la phase de migration entre le 4ème et le 10ème jour, où la cellule néoformée est immature. Enfin, l'expansion dendritique et axonale vont conduire la cellule à son stade mature, autour de 4 semaines afin que cette dernière s'intégre dans le réseau neuronal préexistant (Ribeiro & Xapelli, 2021).*

Chez l'humain adulte, cette formation de nouveaux neurones serait de 700 neurones par jour et par hippocampe, soit une augmentation d'environ 1,75 % par an (Spalding et al., 2013). La neurogenèse adulte dans le DG est impliquée dans des tâches de mémoire épisodique ou contextuelle, et elle est essentielle au processus de « pattern separation » (**Fig.22**), qui est la capacité à distinguer deux évènements similaires ou à faire la différence entre des connaissances analogues (Aimone et al, 2011 ; Raegh et al., 2018 ; van Dijk & Fenton, 2018).

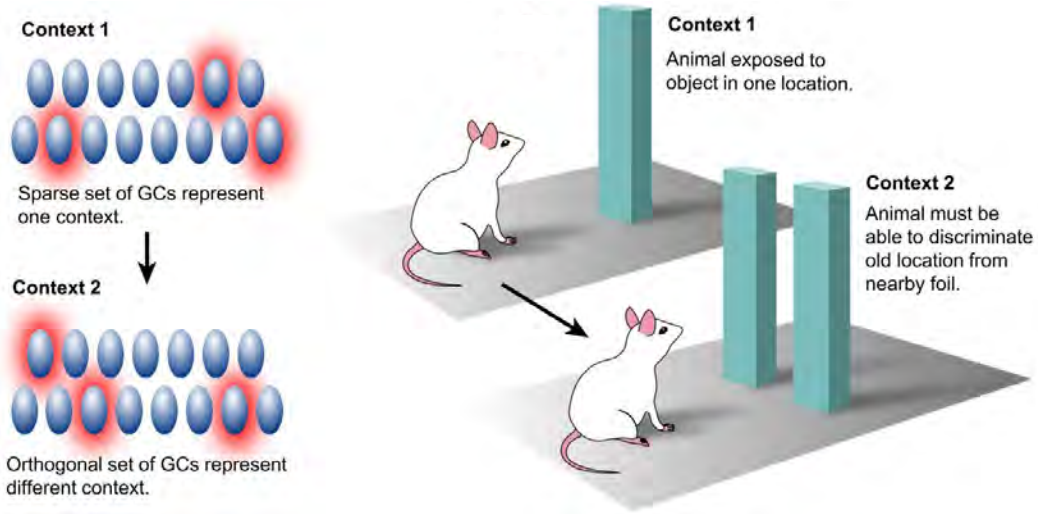



*Figure 22 En haut, les activations des cellules granulaires immatures (GCs) dans le cadre du contexte 1, où l'animal est exposé à la présence d'un objet. Dans le contexte 2, un deuxième objet est ajouté, rendant le contexte similaire, mais pas identique au contexte 1. L'activité des GCs va donc être différente (d'après Aimone et al., 2011).*

En ce qui concerne la neurogenèse hippocampique dans le contexte de la MA, les études sur les modèles murins et sur les patients présentent des résultats divergents. Certaines études rapportent une augmentation de l'expression de marqueurs protéiques de neurones immatures dans le DG (doublecortine), et d'autres une diminution (Sung et al., 2020). En revanche, il semble exister un consensus sur la survie des nouveaux neurones, qui apparait altérée dans la MA, probablement en raison de l'environnement pathogène due à l'amyloïdopathie (Verret et al., 2007 ; Krezymon et al., 2013). Cela se traduit notamment par des altérations morphologiques au niveau des épines et des dendrites (Krezymon et al., 2013 ; Bonds et al., 2015). De façon intéressante, la restauration de ces épines par la surexpression de facteurs favorisant la survie neuronale est associée à une amélioration des performances mnésiques des souris modèles de la MA (Richetin et al., 2015). Les altérations du DG chez les individus atteints de la MA pourraient donc jouer un rôle dans les troubles cognitifs engendrés par la pathologie.

### 2. Les aires CA1 et CA3

L'aire CA3 est impliquée dans l'élaboration de la représentation du contexte lors d'une acquisition (Daumas et al., 2005). Elle est également impliquée dans la restauration de mémoires stockées à partir d'indices partiels ou dégradés de l'environnement, processus appellé « pattern completion » (Gold et al., 2005 ; Guzman et al., 2016), qui est lié aux oscillations gamma dans l'hippocampe humain (Balleza-Tapia et al., 2022). De plus, l'aire CA3 participerait à la fonction de « pattern separation » en interaction avec le DG (Leutgeb et al., 2007 ; Reagh et al., 2018). De façon complémentaire, CA1 participerait à la détection et la mémorisation de changements de configuration et/ou d'organisation spatiale d'objets familiers dans des environnements connus comme inconnus (Dimsdale-Zucker et al., 2018). Cette région permettrait de décoder des contextes (Barrientos et al., 2016) et les séquences d'évenements (Allen et al., 2016). Elle intéragit avec le cortex postrhinal pendant l'exploration d'objets familiers disposés dans une nouvelle configuration, alors que l'exploration d'un nouvel objet active préférentiellement le cortex périrhinal (Wan et al., 1999). Les aires CA1 et CA3 sont également largement impliquées dans la représentation de l'environnement, la navigation et la mémoire spatiale. De plus, le substrat neuronal permettant la représentation des caractéristiques spatiales du contexte et son implication dans la mémoire ont largement été étudiés depuis la découverte des « place cells » ou cellules de lieu dans l'hippocampe (O'Keefe & Dostrovsky, 1971), ainsi que des « grid cells » ou cellules de grille dans le cortex entorhinal (Hafting et al., 2005). Les cellules de lieu déchargent lorsque l'animal est présent dans une localisation précise de l'environnement. Lorsqu'on enregistre l'activation d'une cellule de lieu, cela permet d'établir une carte qui représente la distribution spatiale de son activité, ainsi que son champ de lieu (**Fig.23** ; Fenton et al., 2008 ; Moser et al., 2015). Des processus de LTP contribuent également à la formation, au maintien et à la plasticité de l'activité des cellules de lieu ainsi que de leur champ de lieu (Cobar et al., 2017).

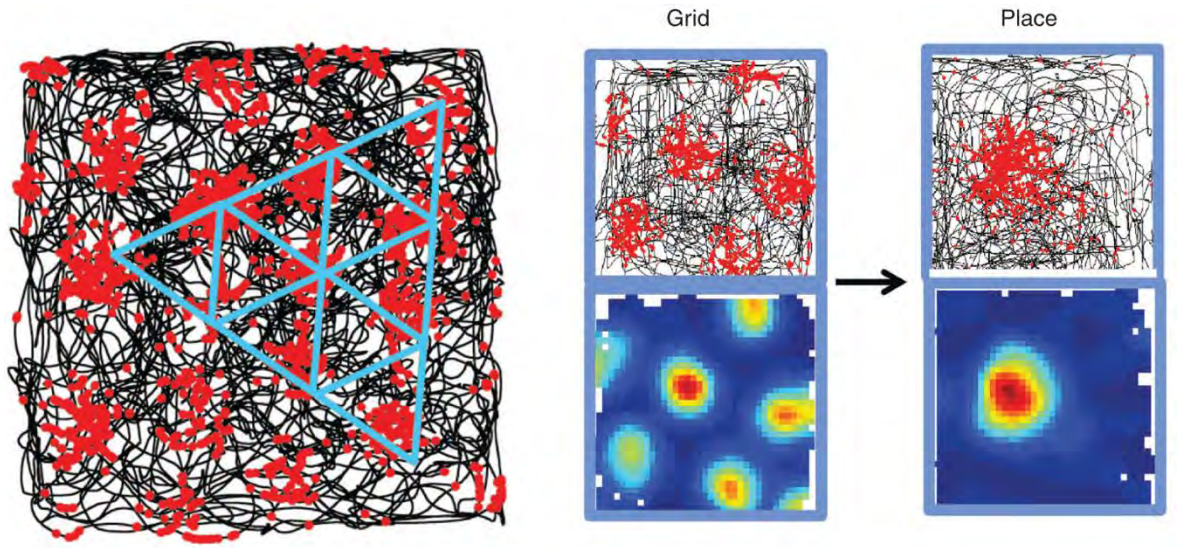



*Figure 23 À gauche, une cellule de grille du cortex entorhinal d'un cerveau de rat. La trace noire représente la trajectoire du rat lors d'une tâche de recherche de nourriture. Les zones de décharge de la cellule de grille (points rouges) sont superposées sur la trajectoire. Les triangles bleus illustrent la structure hexagonale régulière que forme la cellule de grille. Plus précisement, à droite on observe les trajectoires ainsi que les zones de décharge d'une cellule de grille et d'une cellule de lieu. En dessous, une représentation avec un code couleur correspondant aux zones d'activité des cellules, soit leur champ de lieu. Les cellules de grille pourraient fournir une partie de l'information du cortex entorhinal vers les cellules de lieu (Moser et al., 2015).*

Lors d'un comportement d'exploration d'un nouvel environnement, les cellules de CA3, peu modulables, codent une représentation strictement spatiale de l'environnement (Dupret et al., 2010). En revanche, dans l'aire CA1, l'activation des cellules de lieu est modulée par la motivation de l'animal à se déplacer, permettant une plasticité des champs de lieu (Kobayashi et al., 2003 ; Kennedy & Shapiro, 2009). La motivation de l'animal semble ainsi importante pour la capacité d'encodage et de stockage à long terme de l'information (Chun & Turk-Browne, 2007). La consolidation de la mémoire spatiale commence par une faible potentialisation synaptique des neurones de CA3, lors des oscillations thêta pendant le comportement exploratoire. Quelques heures plus tard, lors de phase de sommeil ou de repos, l'activité de ces cellules augmente, et les synapses faiblements potentialisées participent alors à des activités appellées « sharp waves ripples » (SWR) dans CA1. Ces activités oscillatoires induisent une LTP des synapses efférentes aux neurones de CA1, incluant éventuellement des connexions dans le cortex. Ces circuits néocorticaux sont ainsi impliqués dans le stockage à long terme des souvenirs hippocampiques (McClelland et al., 1995 ; Frankland et al., 2001).

Chez l'humain, la comparaison d'individus jeunes adultes (23 ans) et âgés (73 ans) indique la présence d'une légère altération des capacités de navigation avec le vieillissement, alors que le score de MMSE reste similaire entre les deux groupes d'âge

(Cushman et al., 2008). En ce qui concerne les patients atteints par la MA, ils présentent d'abord une altération de la mémoire de reconnaissance d'objet (Didic et al., 2011), puis développent de grandes difficultés lors de tests d'orientation et de localisation spatiale (Cushman et al., 2008 ; Possin et al., 2016). Ces perturbations seraient liées à l'atrophie de l'hippocampe qui survient dans la pathologie, et qui touche CA1 et CA3 dans les stades précoces de la maladie (de Flores et al., 2015). La perte neuronale est importante dans ces aires hippocampiques (Padurariu et al., 2012), et les neurones qui survivent présentent des altérations synaptiques (Scheff et al., 2007). Par ailleurs, des déficits de mémoire spatiale ont été observés dans un grand nombre de modèles murins de la MA (Ashe et al., 2001 ; Good et al., 2007 ; Cacucci et al., 2008 ; Verret et al., 2013 ; Possin et al., 2016 ; Hijazi et al., 2020).

### 3. L'aire CA2

L'aire CA2 a été identifiée en 1934 par Lorente de Nò en utilisant les techniques anatomiques de Golgi (Lorente de Nò, 1934). Ce n'est qu'en 2007 que le profil d'expression génique de CA2 a été élaboré, permettant d'identifier des marqueurs spécifiques de la région comme PCP4 (Lein et al., 2007 ; San antonio et al., 2014), et de développer des souris transgéniques pour manipuler ses neurones spécifiquement.

L'aire CA2, contient également des cellules de lieu, mais qui ne codent pas aussi efficacement l'information spatiale que les cellules de CA1 ou CA3 (Mankin et al., Neuron 2015). Ainsi, les cellules de lieu enregistrées dans l'aire CA2 seraient plutôt impliquées dans les changements contextuels, c'est-à-dire que leur champ de lieu est remodelé lorsque l'animal est confronté à un nouveau contexte. Chez le rongueur, ce nouveau contexte peut être un changement spatial (un nouvel objet), mais également être associé à la présence d'un nouvel individu dans l'environnement familier (Lu et al., 2015 ; Alexander et al., 2016). Enfin, il existe dans l'aire CA2 des populations neuronales qui sont actives lors des périodes d'immobilité, impliquées dans la représentation de l'environnement associé à une expérience en absence de locomotion (Kay et al., 2016).

Depuis quelques années, des approches expérimentales ont permis d'établir le rôle prépondérant de CA2 dans l'encodage, la consolidation et le rappel de la mémoire sociale (Hitti & Siegelbaum, 2014 ; Meira et al., 2018). En effet, induire des lésions *via* l'injection de NMDA dans l'aire CA2 altère la reconaissance et la mémoire sociale des

souris (Stevenson & Caldwell, 2014). La même année, une autre étude démontre qu'inactiver spécifiquement les neurones pyramidaux de CA2 induit une incapacité des animaux à reconnaitre un congénère et à former une mémoire sociale, sans que cela n'altére par ailleurs la sociabilité des souris (Hitti & Siegelbaum, 2014). La mémoire sociale comporte également des composantes émotionnelles, codées en particulier par les systèmes vasopressine et ocytocine, qui modulent et favorisent l'encodage des informations sociales. Par exemple, chez la souris, l'activation par optogénétique des fibres vasopressinergiques dans CA2 augmente la durée de la mémoire sociale (Smith et al., 2016). De même, l'inhibition des récepteurs à ocytocine (Otxr) dans CA2 perturbe la reconnaissance sociale (Raam et al., 2017). Enfin, on retrouve des implications de l'aire CA2 dans la modulation de l'agressivité sociale (Leroy et al., 2018). Expérimentalement, on pourrait ainsi définir la mémoire sociale chez le rongueur comme la capacité à se souvenir d'avoir été en contact avec un individu, de sorte que lorsque cet individu lui est à nouveau présenté, son comportement en est modifié.

Chez les sujets MA, on observe des altérations de la mémoire sociale, bien que l'on retrouve peu d'études sur le sujet. Les patients ont des difficultés à reconnaitre des visages qui leur sont familier (Kurth et al., 2015 ; Mendez et al., 1992), ce qui est parfois considéré comme de la prosopagnosie (Ringman et al., 2017), ou attribué à une altération de la mémoire épisodique et sémantique (Werheid et Clare, 2007). Dans la MA, on retrouve cependant des altérations de l'aire CA2, comme des diminutions de calbindine D28K, une protéine de fixation du calcium (Maguire-Zeiss et al., 1995). Les modifications de l'homéostasie calcique vont alors altérer les processus cellulaires, conduisant à une dysfonction et une mort neuronale (Heizmann & Braun, 1992). De plus, ces modifications de la signalisation calcique sont susceptibles d'être associées aux actions délétères des oligomères Aβ dans les neurones et aux dysfonctionnements des mitochondries (Popugaeva et al., 2018). L'aire CA2 subit donc des pertes de transmission neuronale, ainsi qu'une mort neuronale (Bobinski et al., 1995) qui peuvent mener à une hyperexcitabilité de l'hippocampe (Boehringer et al., 2017), et aux déficits cognitifs précoces de la MA. Enfin, chez les souris modèles de la MA, on retrouve également des déficits de mémoire sociale (Deacon et al., 2009) et de sociabilité (Filali et al., 2021). Dans le modèle Tg2576, ces altérations de mémoire sociale sont associées à une dysfonction des interneurones inhibiteurs, dont

la restauration de l'activité conduit à une amélioration de la mémoire sociale (Rey et al., 2022).

La formation hippocampique est donc primordiale pour l'élaboration de nouvelles mémoires. L'activité des neurones de cette région donc être finement orchestrée, et ceci est assuré par les neurones inhibiteurs dont la présence permet d'organiser le flux d'informations.

# III. Les interneurones à parvalbumine

## A. Les interneurones inhibiteurs

Dans le télencéphale, les interneurones inhibiteurs constituent une grande famille de cellules différenciées en plus d'une vingtaine de classes. L'hétérogénéité de ces interneurones se définit par des caractérisations morphologiques, mais également par leur fonctionnement neurochimique (glycinergique ou GABAergique) et leur activité électrophysiologique. Ces neurones représentent approximativement 20 à 30% de la population neuronale du cortex cérébral (Gonchar et al., 2008), et vont inhiber localement les cellules principales *via* des rythmes de décharge différents, permettant de moduler leur activité (Ren et al., 1992 ; Freund & Buzsáki, 1996 ; Kawaguchi & Kubota, 1997 ; Markram et al., 2004 ; Arlotta et al, 2005 ; Somogyi & Klausberger, 2005 ; Ascoli et al., 2008 ; Kelsom & Lu, 2013 ; Kepecs & Fishell, 2014).

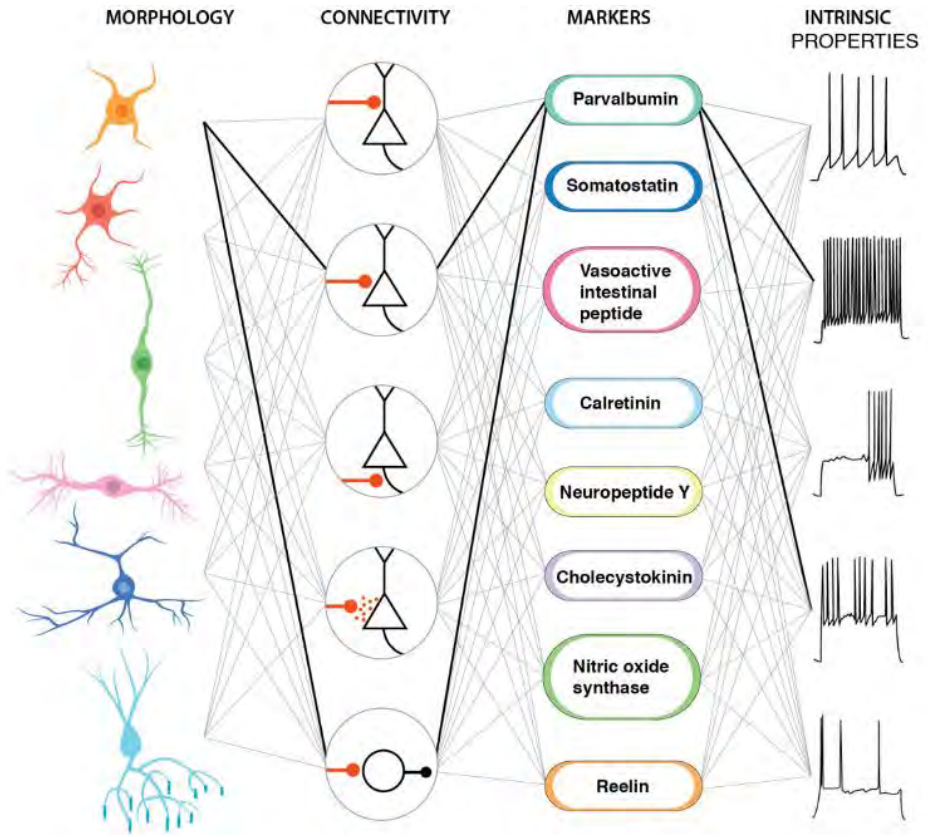



*Figure 24 Représentation des différentes classes d'interneurones* via *leur caractéristiques morphologiques, leur mode de connectivité, les marqueurs spécifiques de ces cellules, et la rythmicité de leur activité (d'après Kepecs & Fishell, 2014).*

Une partie de l'hétérogénéité des interneurones provient des patrons de migration et de dispersion de ces cellules lors de l'embryogenèse. En effet, lors de leur migration pendant leurs stades transitoires, ces neurones sont soumis à des facteurs de

croissance et de plasticité leur permettant de s'adapter à l'environnement local (Kepecs & Fishell, 2014). Ils présentent ensuite une grande diversité morphologique et connectique (dendritique, somatique, péri-somatique, ou axo-axonique), ainsi que de la cinétique des canaux membranaires présents (Rotstein et al., 2005), qui est liée à la nature des canaux ioniques voltage-dépendants et à la présence de protéines se liant au calcium intracellulaire (parvalbumine, calbindine, etc…) (**Fig.24**).

L'ensemble de ces caractérisations neuronales est associé à l'émergence des oscillations cérébrales (Pittman-polletta et al., 2015). En effet, ces différents interneurones vont exercer un contrôle inhibiteur des neurones excitateurs, engendrant l'activité synchrone de populations de neurones, organisant ainsi le flux d'information de façon spatiotemporelle. Les interneurones inhibiteurs vont cibler le soma et les dendrites proximales des neurones pyramidaux, mais également d'autres interneurones (**Fig.25** ; Freund & Katona, 2007 ; Kullmann & Lamsa, 2007).

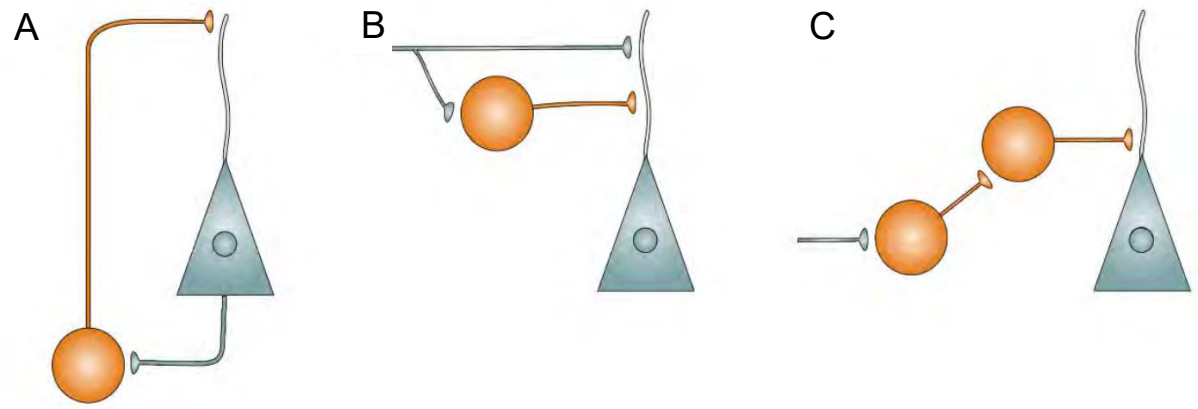



*Figure 25 Représentation des différentes boucles de rétroaction des interneurones (orange) avec les neurones pyramidaux (bleu). A : feedback inhibition ; B : feed-forward inhibition ; C : levée d'inhibition (d'après Kullmann & Lamsa, 2007).*

Ces connexions neuronales sont largement étudiées, en partie en ce qui concerne les processus de plasticité impliquant ces interneurones, et leur fonction. Pour citer un exemple, on retrouve des travaux indiquant que la LTP des synapses au niveau des interneurones peut aider à affiner les traces de mémoire en potentialisant l'inhibition disynaptique (feed-forward inhibition) de certaines cellules pyramidales. On aurait ainsi d'une part l'émergence de potentialisation de l'activité d'un sous-ensemble de cellules principales (**Fig.26**, **centre**), tout en améliorant simultanément cette trace de mémoire *via* l'inhibition des cellules environnantes par les interneurones (**Fig.26, droite**).

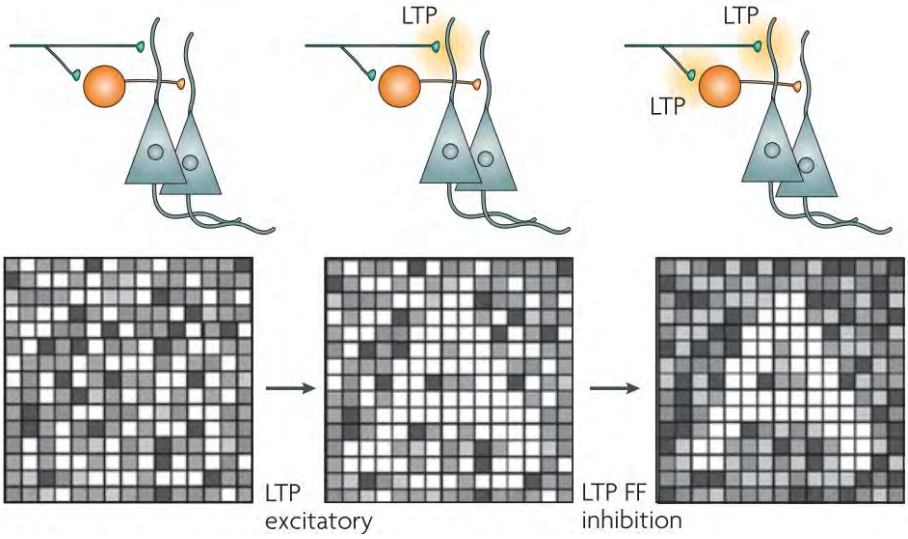



*Figure 26 Schéma de l'affinement du flux d'information grâce aux processus de LTP au niveau des interneurones (orange) et des neurones pyramidaux (bleu). La LTP peut renforcer l'excitation d'un sous-ensemble de cellules pyramidales (tuiles blanches dans le panneau du milieu). La saillance du motif, représentant ici la netteté de la trace mnésique, est améliorée avec la potentialisation simultanée de l'inhibition des cellules environnantes (tuiles sombres dans le panneau de droite). FF : feedforward inhibition (d'après Kullman & Lamsa, 2007).*

Parmi les différentes classes d'interneurones GABAergiques, on trouve les interneurones à parvalbumine (PV), largement représentés et étudiés, et dont l'implication dans la MA présente un intérêt croissant ces dernières années. Ces neurones sont apparentés aux cellules en panier ou « basket cells », et peuvent innerver de façon péri-somatique des centaines voire milliers de cellules pyramidales (Klausberger & Somogyi, 2008 ; Chamberland & Topolnik, 2012). Les basket cells possèdent une arborisation axonale complexe (~1042µm² dans la couche pyramidale de l'hippocampe, Sik et al., 1995). Les neurones PV sont majoritairement présents dans l'hippocampe (24% des interneurones dans CA1 et 2,6% de la population neuronale totale, Hu et al., 2014) et expriment donc la parvalbumine (9-11kDa), une protéine proche de l'albumine qui fixe le calcium. Ainsi, l'expression en parvalbumine dans le soma des interneurones PV est dépendante de l'activité de ces neurones (Patz et al., 2004). La protéine PV est également exprimée dans les muscles à contraction rapide en concentration plus élevée et dans certains tissus endocrines.

Les neurones PV ont la capacité d'émettre des potentiels d'action à haute fréquence et sont ainsi « fast spiking » (Kawaguchi et al., 1987 ; Caroni et al., 2015). Ces décharges rapides sont permises par l'expression de plusieurs canaux voltage-dépendants spécifiques. Cela comprend les canaux potassiques Kv1 et particulièrement Kv3 qui permettent à la membrane de la cellule de repolariser

rapidement (Du et al., 1996 ; Rudy & Mcbain, 2001), et les canaux sodiques Nav1.1 et Nav1.6 (Hu & Jonas, 2014 ; Ogiwara et al., 2007). L'aptitude à émettre des potentiels d'action à haute fréquence confère aux interneurones PV la capacité de contrôler temporellement les entrées sensorielles lors de la stimulation de neurones corticaux (Higley & Contreras, 2006), notamment en exerçant une inhibition de type feed-foward au niveau des entrées excitatrices de la voie thalamo-corticale, imposant ainsi des limites temporelles strictes (**Fig.27** ; Wehr & Zador, 2003).

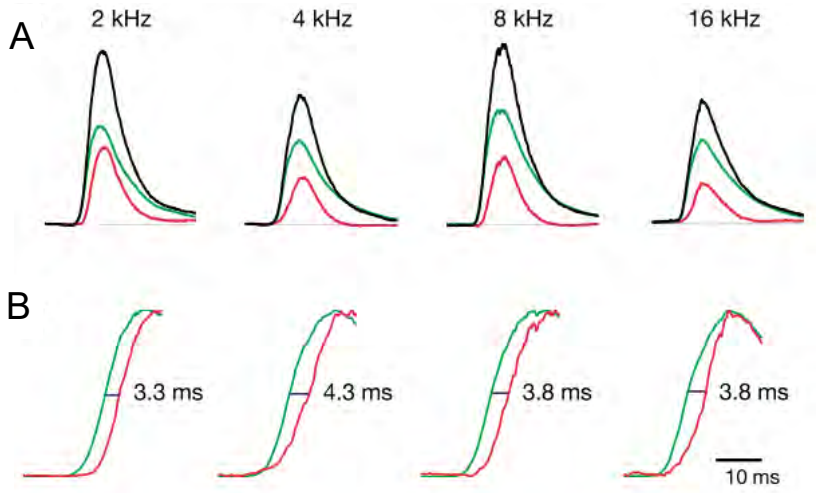



*Figure 27 (A) Conductance excitatrice (vert) qui précède la conductance inhibitrice (rouge) dans des du cortex auditif primaire après émission de sons purs sur des rats anesthésiés de 17-24 jours. (B) On peut ainsi observer le faible délai entre la conductance excitatrice, et inhibitrice. Cette activité succinte des neurones représente une séquence temporelle précise et stéréotypée, mettant en évidence la fonction des neurones inhibiteurs dans l'organisation temporelle du flux d'information (d'après Wehr & Zador, 2003).*

Ces caractéristiques fonctionnelles des interneurones PV sur le contrôle temporel des entrées sensorielles, sont largement étudiées dans le cadre de l'élaboration des processus mnésiques, ainsi que l'acquisition d'informations chez la souris et l'humain (Barron, 2021). Ils sont par exemple, impliqués dans le codage d'informations spatiales et visuelles (Agestuma et al., 2017 ; Rupert et al., 2022). Ainsi, ces contrôles temporels des réponses sensorielles sont autant de modulations de l'activité corticale par les interneurones PV qui sont associées à l'émergence des oscillations cérébrales (Cardin, 2018).

### B. Interneurones à parvalbumine et oscillations cérébrales

Les oscillations cérébrales émergent de l'activité synchrone de grandes populations de neurones, qui s'observent sur un spectre de fréquences allant de 0,5 à 600 Hz chez l'humain. La fréquence et la puissance des oscillations mesurées sur l'EEG ou

l'enregistrement local de potentiels de champs (LFP) caractérisent ainsi le comportement de l'individu (Buzsáki & Watson, 2012).

Les bandes de fréquences précises pour les différentes oscillations cérébrales peuvent varier d'une espèce à l'autre. Chez l'humain, on observe les oscillations delta (0,5-4 Hz), les oscillations thêta (4-8 Hz), les oscillations alpha (8-12 Hz), les oscillations bêta (10-25 Hz), les oscillations gamma (30-80 Hz), les oscillations (gamma) rapides (80-200 Hz) et ultra-rapides (200-600 Hz) (**Fig.28** ; Buzsáki & Draguhn, 2004 ; Thomson, 2018).

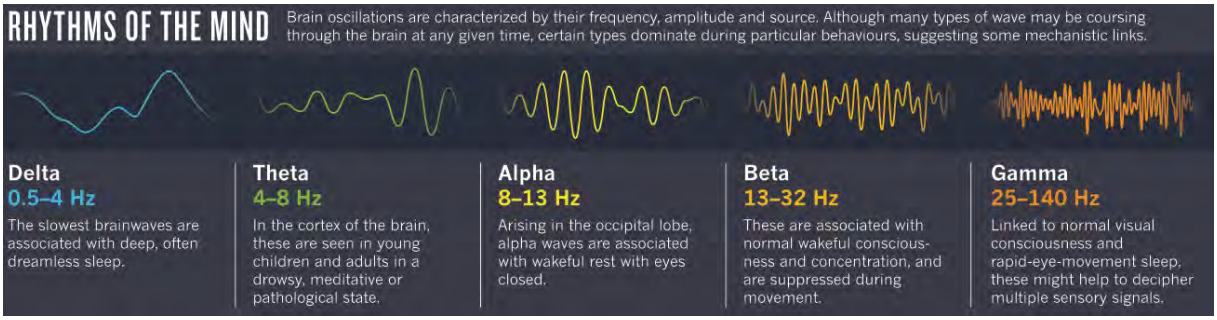



*Figure 28 Spectre des différentes oscillations cérébrales (delta, thêta, alpha, beta et gamma) et les comportements qui leur sont associés (d'après Thomson, 2018).*

La puissance de ces oscillations observées par EEG ou LFP peut être mesurée par une analyse spectrale avec la transformée de Fourier (FFT), qui permet d'obtenir un spectre fréquentiel à partir d'un signal (**Fig.29**). En transformant une fonction intégrable définie sur $\mathbb{R}$, le signal oscillatoire est alors décomposé en une somme de fonctions sinusoïdales d'une fréquence donnée.

Dans cette thèse, nous allons nous intéresser plus particulièrement aux oscillations gamma, impliquées dans la stabilité du réseau cérébral, et dans la perception et l'apprentissage conscient/engagé.

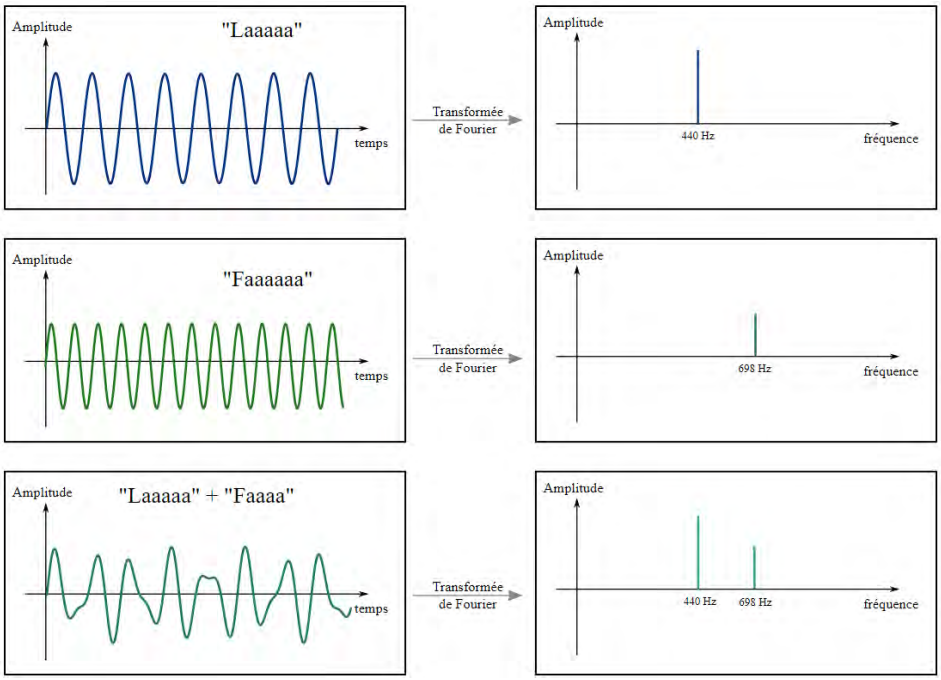



*Figure 29 À gauche, les oscillations au cours du temps d'une note pure "la" à 440 Hz, puis un "fa" à 698 Hz, puis la combinaison (affreuse à l'oreille) d'un "la" et d'un "fa". À droite, les transformées de Fourier de ces signaux, avec une amplitude différente des pics selon l'amplitude des notes, ainsi que leur fréquence. Ces notes étant pures, toutes les autres valeurs sont nulles (d'après http://polgm.free.fr/petitescuriesdunet/index.php?post/2015/02/La-transform%C3%A9e-de-Fourier).*

### 1. Les oscillations gamma

Les oscillations gamma sont des oscillations rapides et de faible amplitude dont l'émergence est associée à l'activité des interneurones PV (**Fig.28**). De façon intéressante, on observe une augmentation de l'activité gamma lors de l'engagement dans des fonctions cognitives (Engel & Singer, 2001 ; Fries, 2009). Chez l'humain, on enregistre une augmentation de l'activité gamma lors d'une tâche de mémoire de travail (Howard et al., 2003), y compris dans l'hippocampe (van Vugt et al., 2010), et également lors de la formation de la mémoire déclarative (Fell et al., 2006). On enregistre également une augmentation de la puissance de gamma dans l'hippocampe en prédiction d'un encodage réussi de mémoire verbale (Sederberg et al., 2007). Plus récemment, des stimulations transcrâniennes aux fréquences gamma au niveau du cortex pariétal chez l'humain ont montré une amélioration globale des performances dans un test de mémoire de travail par rapport à des individus soumis à des stimulations aux fréquence alpha (Thompson et al., 2021). Cette étude montre en outre que certains individus (50% de l'échantillon) sont plus réceptifs aux stimulations transcrâniennes à la fréquence gamma, montrant un rappel de la tâche plus précis, qui est même plus élevé lorsque l'indice pour faciliter le rappel est un indice invalide.

Chez les rongeurs, des études montrent une implication des oscillations gamma dans la mémoire spatiale, notamment dans l'encodage et le rappel de celle-ci (Colgin & Moser, 2010). Les auteurs suggèrent que ce sont les oscillations rapides et synchrones du gamma entre le cortex entorhinal médian et la région CA1 de l'hippocampe qui contribueraient à l'encodage de la mémoire spatiale. Ces oscillations seraient modulables en puissance et en cohérence en fonction du comportement de l'animal (Montgomery & Buzsáki, 2007). Par exemple, on observe une augmentation de la puissance des oscillations gamma dans l'aire CA1 de l'hippocampe lorsque l'individu initie son choix vers le bras récompensé d'un labyrinthe en T, permettant de prédire la réussite de la souris dans une tâche de mémoire spatiale (**Fig.30**) (Yamamoto et al., 2014). Les oscillations gamma sont donc liées aux apprentissages engagés, ou conscients, lors des expériences vécues par un individu.

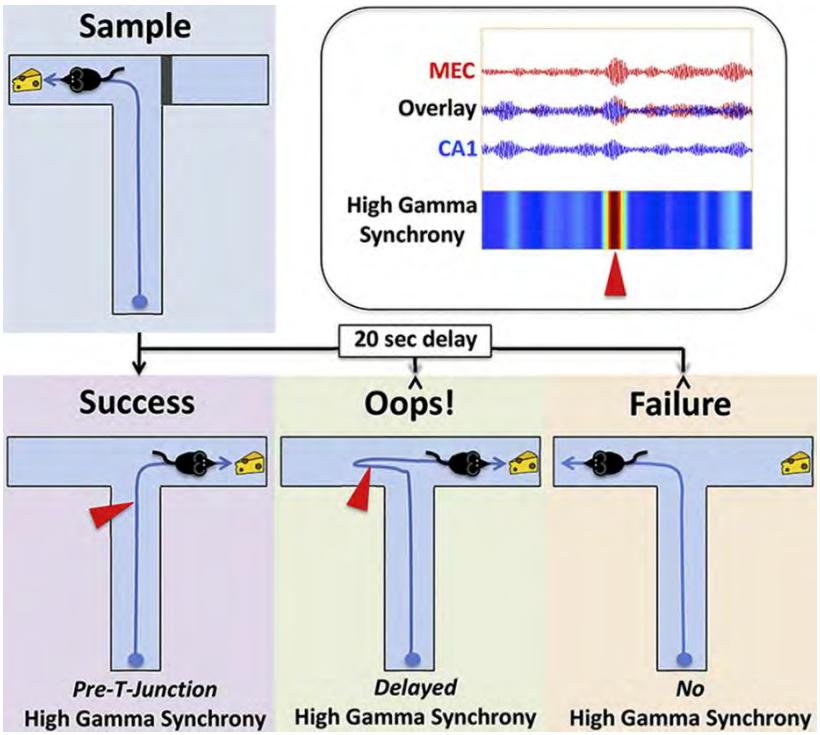



*Figure 30 Schéma représentant l'augmentation de la puissance des oscillations gamma entre l'aire CA1 et le cortex entorhinal médian lors d'une tâche d'exploration avec récompense sous forme de mémoire de travail. L'augmentation de la puissance des oscillations gamma peut être prédictive de la capacité de l'animal à réussir la tâche (Success et Oops !), et l'absence de synchronisation de cette même oscillation traduit un échec (Failure) (d'après Yamamoto et al., 2014).*

Le développement d'une lignée de souris PV-Cre par le groupe de Silvia Arber (Hippenmeyer et al., 2005) a ouvert la possibilité de manipuler spécifiquement l'activité des neurones PV et d'en observer les conséquences physiologiques et

comportementales, et en particulier de caractériser plus précisemment leur lien avec les oscillations gamma. C'est ainsi qu'en 2009, deux publications sorties en « back-to-back » dans la revue *Nature* ont permis d'établir le lien entre l'émergence des oscillations gamma et l'activité des interneurones PV. De façon générale, inhiber l'activité des neurones PV supprime les oscillations gamma *in vivo*, alors que les activer par optogénétique est suffisant pour générer des ondes gamma dans le cortex pariétal (Cardin et al., 2009 ; Sohal et al., 2009). Dans la première publication (Cardin et al., 2009), les auteurs démontrent que l'inactivation des interneurones PV lors d'une entrée sensorielle supprime le processus de traitement sensoriel par les neurones pyramidaux locaux chez la souris *in vivo*. À l'inverse, les auteurs démontrent que l'activation des interneurones PV *via* des stimulations optogénétiques à 40Hz augmentent la puissance d'oscillations gamma à 40Hz dans les LFP du cortex pariétal (**Fig.31A**). De plus, l'entrée d'une information sensorielle *via* une stimulation des vibrisses dans un cycle de gamma, induit par l'activation optogénétique des neurones PV, augmente l'amplitude et la précision de la réponse évoquée dans les cellules pyramidales du cortex sensoriel (**Fig.31B**).

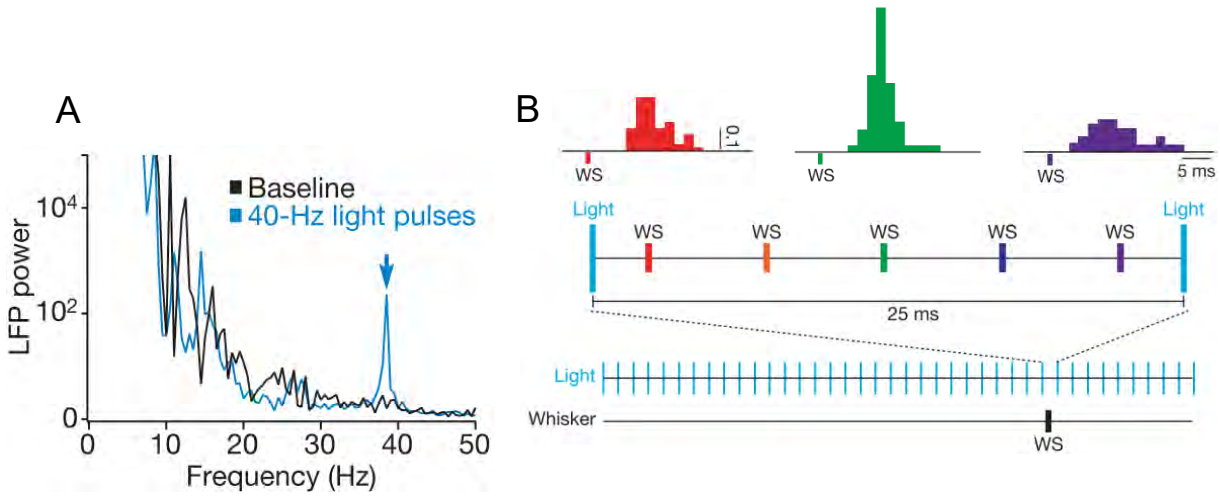



*Figure 31 (A) Augmentation de la puissance des oscillation gamma (40Hz) sur un enregistrement LFP lors de stimulations optogénétiques à 40Hz des neurones PV. (B) Modulation des réponses sensorielles des neurones corticaux pyramidaux lorsque celles-ci coïncident avec le pic de la phase gamma. Ainsi, les stimulations optogénétiques (bleu) sont couplées à une stimulation des vibrisses (Whisker Stimulation, WS) à différents moments de l'intervalle entre deux stimulations. La réponse sensorielle est amplifiée lorsque la stimulation survient au pic de la phase gamma (12.5s, en vert) et est réduite en début (rouge) et fin de phase (vert) (d'après Cardin et al., 2009).*

Dans la seconde étude (Sohal et al., 2009), il est montré que l'activation optogénétique des neurones pyramidaux avec des stimulations à 40Hz permet d'activer les interneurones PV. Ceci résulte en des modifications de l'activité gamma, permettant

alors une diminution du bruit, et une meilleure transmission de l'information (**Fig.32**). Ces études majeures ont permis d'établir le rôle des interneurones PV dans l'émergence des oscillations gamma. Ces travaux démontrent en outre que ces neurones pourraient jouer un rôle important dans les processus d'apprentissage *via* l'optimisation de l'intégration des informations sensorielles.

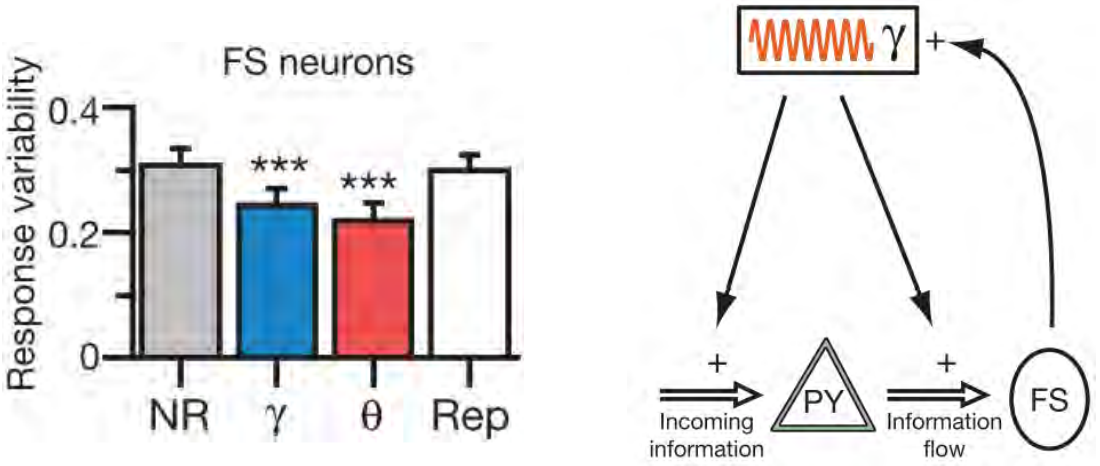



*Figure 32 À gauche, on observe une diminution de la variabilité de la réponse des interneurones « fast spiking » (FS) lors d'une stimulation optogénétique thêta (8Hz) et gamma (40Hz) comparée à des stimulations non rythmées (NR) et répétées (Rep). À droite, un schéma représentant les interactions entre les neurones pyramidaux (PY) et les interneurones PV à décharge rapide (FS), ainsi que l'émergence des oscillations gamma et les modifications sur le flux d'information qui y sont associées (d'après Sohal et al., 2009).*

### 2. Oscillations gamma et maladies neuropsychiatriques

Des fluctuations aberrantes des oscillations gamma ont été observées chez les patients atteints par une maladie neuropsychiatrique (Herrmann & Demiralp, 2005). La puissance de ces oscillations est ainsi augmentée dans le cadre de la schizophrénie pendant le sommeil (Tekell et al, 2005), ou l'épilepsie (Kobayashi et al., 2007). En revanche, on observe une diminution de la puissance des oscillations gamma dans les troubles de spectre autistique (Grice et al., 2001), mais aussi le vieillissement de façon générale, et la MA en particulier (Koenig et al., 2005 ; Nimmrich et al., 2015). Cependant, il arrive également que des augmentations aberrantes de la puissance des oscillations gamma soient mesurées chez les patients MA, et ce dans les mêmes conditions que les études précédentes, à savoir au repos (van Deursen et al., 2011). Ces résultats, pourtant contradictoires, s'accordent à dire que le contrôle de l'activité

neuronale exercé par les interneurones est fortement perturbé, et que cela pourrait influer sur les troubles cognitifs de la pathologie.

Ces perturbations des oscillations gamma dans le cadre la MA pourraient être liées à la présence du peptide Aβ, dont la complexité de l'agrégation est corrélée à la diminution de la puissance des oscillations gamma évoquées dans l'hippocampe de souris (Kurudenkandy et al., 2014). On retrouve dans les modèles murins les mêmes perturbations de l'activité gamma constatées chez les humains. Plus précisément, une diminution de la puissance des oscillations gamma est observée sur l'EEG de souris Tg2576 âgées de 12 mois (**Fig.33A** ; Cramer et al., 2012), ainsi que dans le modèle 5xFAD, et ce avant les perturbations de l'apprentissage spatial (**Fig.33B** ; Schneider et al., 2014 ; Wang et al., 2020). Dans le modèle TgCRND8, la diminution de la puissance des oscillations gamma survient avant l'apparition des déficits cognitifs et l'accumulation d'Aβ (**Fig.33C** ; Hamm et al., 2017), soit au stade prodromique, ce que l'on retrouve également dans le modèle APP/PS1 (à l'âge de 4-5 mois) (**Fig.33D** ; Klein et al., 2016). Une altération du couplage thêta-gamma a également été mesurée dans des souris APP-KI anesthésiées (Nakazono et al., 2017). Enfin, dans le modèle hAPPJ20, l'activité gamma subit des fluctuations aberrantes lors de comportement d'exploration des souris (**Fig.33E** ; Verret et al., 2012).

De par le lien causal entre l'activité des neurones PV et la présence d'oscillations gamma, le fait que de nombreuses perturbations des oscillations gamma soient observées chez l'humain et la souris suggère fortement que la MA cause une altération du fonctionnement des interneurones PV. C'est avec le modèle hAPPJ20 que le lien entre l'activité des interneurones PV, l'émergence des oscillations gamma, et les fonctions cognitives a été établi (Verret et al., 2012). Les souris hAPPJ20 présentent ainsi des activités gamma aberrantes, sans lien avec le comportement de l'animal, ainsi que des activités épileptiques lors des creux d'activité des ondes gamma, suggérant une altération de la balance E/I, et donc des interneurones PV.

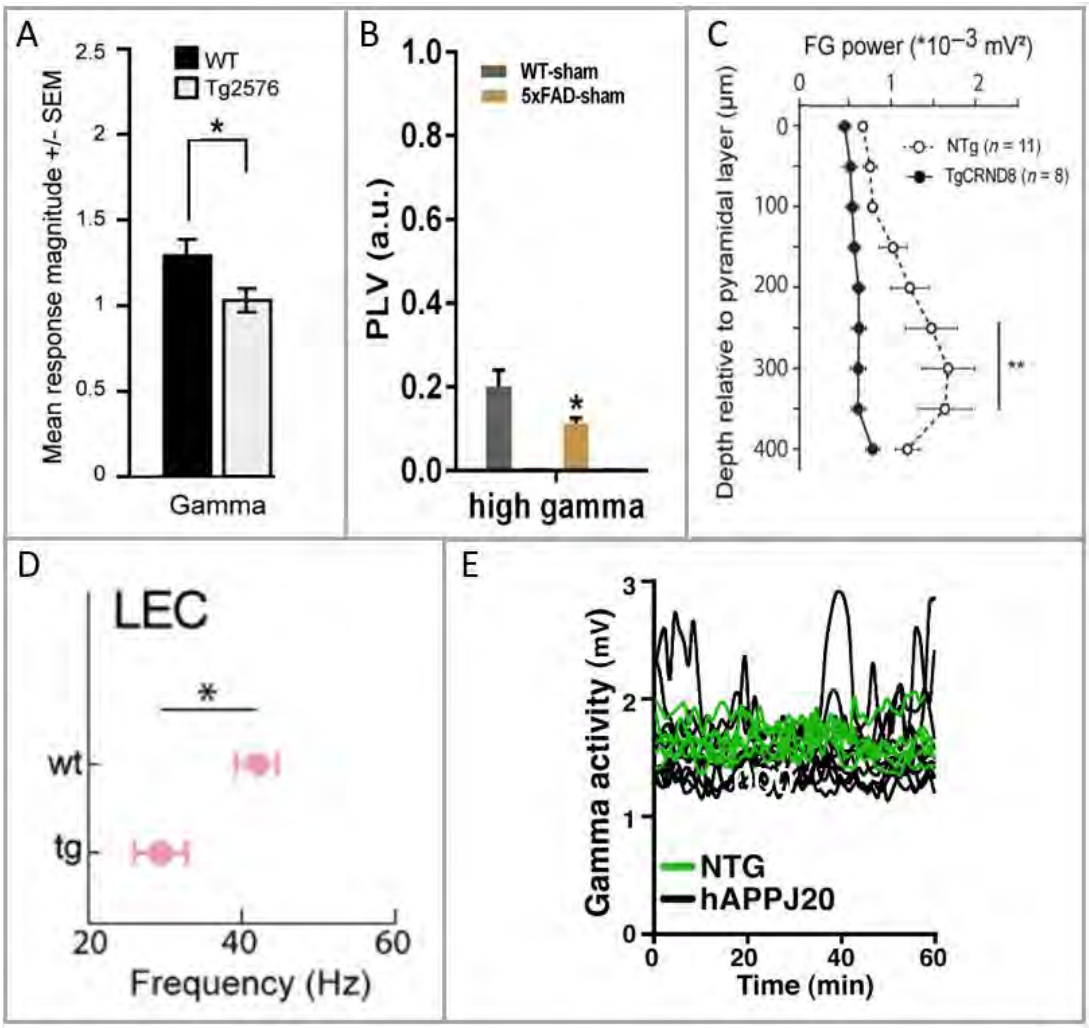



*Figure 33 (A) Différence de réponse gamma évoquée par une odeur observée sur les enregistrements LFP dans le cortex de souris Tg2576. (B) Diminution de la « phase locking values (PLV), paramètre statistique qui évalue les changements induits par une tâche dans la synchronisation neuronale, chez des souris 5XFAD. (C) Diminution de la puissance des oscillations gamma (FG : fast-gamma) observée chez les souris TgCRND8. (D) Diminution du pic de fréquence du spectre gamma dans le cortex entorhinal latéral chez des souris APP/PS1. (E) Fluctuations aberrantes des oscillations gamma chez les souris hAPPJ20 (d'après A : Cramer et al., 2012 ; B : Wang et al., 2020 ; C : Hamm et al., 2017 ; D : Klein et al., 2016 ; E : Verret et al., 2012).*

En accord avec cette idée, une diminution de l'expression de la sous-unité Nav1.1 des canaux sodiques par les interneurones PV (qui leur est spécifique ; Ogiwara et al., 2007) a été mesurée dans ce modèle (hAPPJ20, Verret et al., 2012), et confirmée dans d'autres modèles (Tg2576, Corbett et al., 2017 et TgCRND8, Hamm et al., 2017), mais également chez les patients MA (Verret et al., 2012). Cette diminution des niveaux d'expression de Nav1.1 est associée au dysfonctionnement des interneurones PV résultant en la diminution de la puissance des oscillations gamma, aux activités épileptiformes et aux déficits cognitifs (Verret et al., 2012). En croisant les souris hAPPJ20 avec une lignée surexprimant le canal Nav1.1 (Nav1.1-BAC ; Tang et al., 2009), les auteurs ont pu démontrer que restaurer l'expression de Nav1.1 dans les

interneurones PV permettait d'améliorer la transmission inhibitrice, d'augmenter la puissance des oscillations gamma, et de réduire les activités épileptiformes, ainsi qu'induire une nette amélioration des fonctions cognitives (Verret et al., 2012). Par la suite, les auteurs ont démontré que la greffe intracérébrale d'interneurones embryonnaires surexprimant Nav1.1 était suffisante pour augmenter l'activité synaptique des interneurones PV, restaurer les oscillations gamma, et améliorer les capacités mnésiques des animaux (**Fig.34** ; Verret et al., 2012 ; Martinez-Losa et al., 2018).

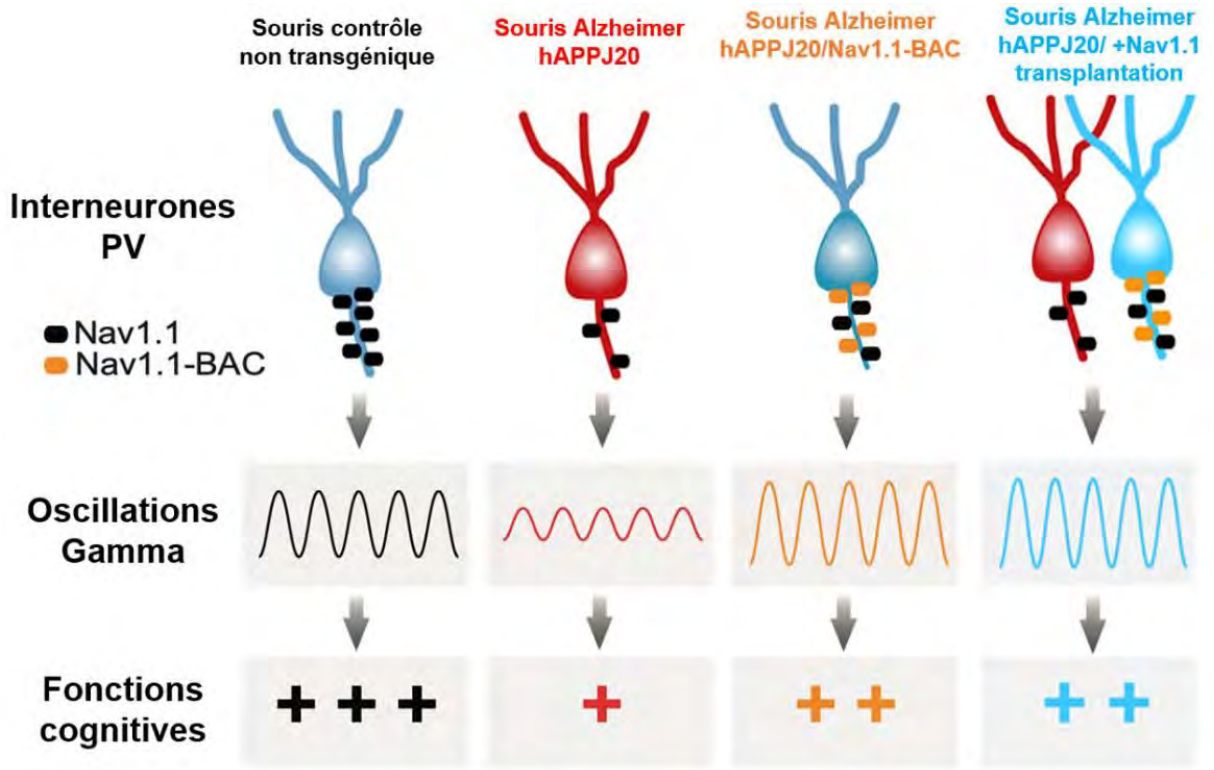



*Figure 34 Implication des interneurones PV dans l'émergence des oscillations gamma et les fonctions cognitives. Les souris non-transgéniques (à gauche, noir) présentent des niveaux d'expression de Nav1.1 normaux. Dans la lignée hAPPJ20 (rouge), ces niveaux sont diminués. Les souris bigéniques (orange) hAPPJ20/Nav1.1-BAC montrent une amélioration des oscillations gamma et fonctions cognitives suite à la restauration de Nav1.1 dans les interneurones PV (carrés orange et noir). Cette amélioration est visible également chez les souris hAPPJ20 transplantées avec des interneurones surexprimant Nav1.1 (d'après Verret et al., 2012 ; Martinez-Losa et al., 2018).*

L'ensemble de ces études montrent donc que les interneurones PV sont étroitement liés à l'émergence des oscillations gamma, et que restaurer la fonction inhibitrice des neurones PV permet d'améliorer les performances cognitives des animaux modèles de la MA.

### C. Interneurones à parvalbumine et plasticité cérébrale

Les premières évidences du rôle des interneurones PV dans la plasticité cérébrale concernent la mise en place de la dominance oculaire au sein du cortex visuel primaire. La maturation postnatale du système visuel chez les mammifères juvéniles est dépendante de l'expérience vécue par les individus. Ces maturations sont un ensemble de réorganisation des circuits neuronaux, permettant l'émergence de fonctions spécifiques. Elles se déroulent pendant une fenêtre de temps précise lors du développement d'un individu que l'on appelle période critique, au cours de laquelle l'expérience sensorielle va jouer un rôle majeur (Micheva & Beaulieu, 1997). Pour étudier cela, on effectue une tarsorraphie, c'est-à-dire une suture des paupières pour priver l'animal de l'un de ses yeux pendant quelques jours (Wiesel & Hubel, 1963). Si cette privation monoculaire est effectuée avant la huitième semaine chez le primate, elle induit une amblyopie durable et donc un déséquilibre d'acuité visuelle entre les deux yeux. En revanche, retirer les sutures pendant cette même période permet de restaurer la fonction de l'œil amblyope (Hubel et al, 1977). Une autre méthode consiste à élever les animaux dans l'obscurité totale, ce qui permet de prolonger la période de sensibilité de la dominance oculaire et donc la période critique (Cynader & Mitchell, 1980 ; Fagiolini et al., 1994). Ces travaux ont permis par la suite, de mettre en évidence l'implication du système inhibiteur dans les réorganisations neuronales sensibles à l'expérience pendant ces périodes critiques. Dans les travaux de Hensch et al., 1998, des souris qui ont une déficience de l'isoforme de l'enzyme de synthèse du GABA (GAD65-KO) ne présentent pas de décalage de la période critique lorsqu'elles sont élevées dans le noir. À l'inverse, en injectant dans le cortex visuel de souris GAD65-KO, un activateur allostérique des sites benzodiazépine (diazépam), permettant de potentialiser la réponse des récepteurs GABA, les auteurs ont pu rétablir la dominance oculaire (**Fig.35** ; Hensch et al., 1998). Enfin, lorsque l'on réduit la transmission inhibitrice dans le cortex visuel chez le rat adulte avec un inhibiteur de la GAD (3-MPA), on peut rouvrir la période critique de dominance oculaire chez l'animal (Harauzov et al., 2010).

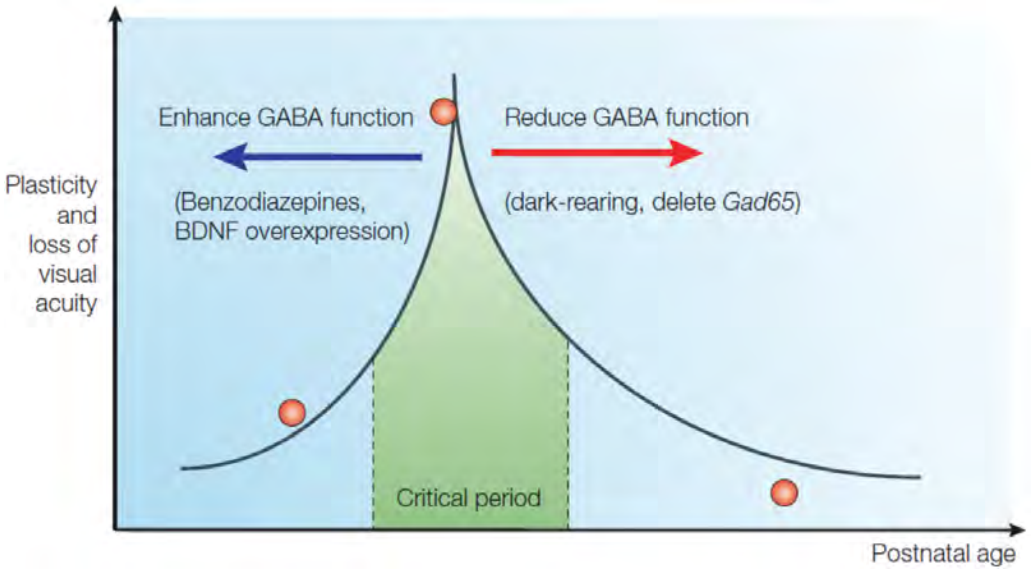


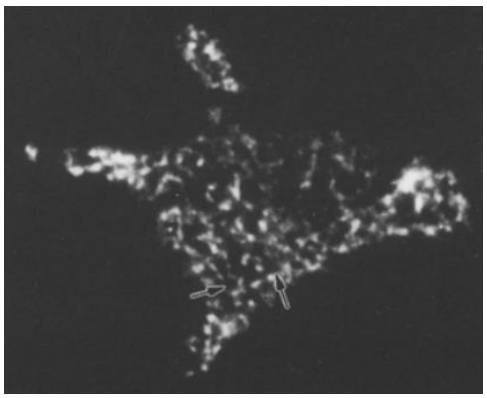

*Figure 35 Modulation de la période critique du système visuel. La période critique (encadré vert) apparait pendant une fenêtre de temps du développement post-natal (13ème jour chez la souris) et est dépendante de la maturation du système inhibiteur. Les cercles rouges indiquent l'apparition, le pic et la fin de l'amblyopie résultant d'une privation monoculaire. L'apparition de la plasticité peut être retardée en empêchant directement la maturation de la transmission médiée par le GABA (par suppression ciblée du gène de Gad65), ou par l'élevage à l'obscurité dès la naissance (flèche rouge). À l'inverse, la période critique peut être avancée en potentialisant la transmission du GABA avec des benzodiazépines juste après l'ouverture des yeux ou en favorisant la maturation rapide des interneurones par le biais de la surexpression du facteur neurotrophique BDNF (flèche bleue) (d'après Hensch, 2005).*

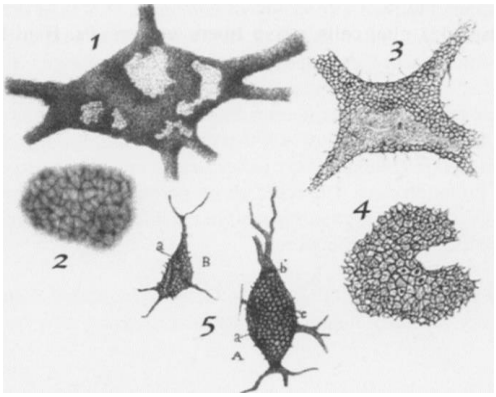
Plusieurs études se sont penchées sur l'implication des interneurones PV du néocortex dans les périodes critiques (Hensch, 2005). En effet, chez les rongeurs, l'ouverture des yeux (11-12 jours après la naissance) coïncide avec la capacité à détecter les interneurones PV dans le cortex visuel, suggérant que les informations sensorielles induisent l'expression de la parvalbumine dans ces interneurones (del Rio & DeFelipe, 1994 ; Cardin et al., 2009). La privation monoculaire induit chez les souris juvéniles un ralentissement de la maturation de ces interneurones PV, soit la mise en place du contrôle inhibiteur qu'ils excercent sur les neurones principaux. Ainsi l'absence d'entrée sensorielle pendant la période critique altère la capacité de ces cellules à devenir matures. En revanche, des souris sur-exprimant le facteur neurotrophique BDNF montrent une accélération de la mise en place du système visuel et une période critique anticipée (Cabelli et al., 1995), ainsi qu'une maturation des interneurones PV (**Fig.35** ; Huang et al., 1999). L'exemple de la maturation du système visuel, indique que la plasticité induite par l'expérience sensorielle vécue par l'individu est étroitement liée au processus de maturation des interneurones PV, et donc aux différents modulateurs de cette plasticité, comme la matrice extracellulaire qui les entoure.

# IV. Les perineuronal nets : PNN

## A. Découverte et histoire des PNN

Chez les mammifères adultes, les interneurones PV sont très souvent associés à une matrice extracellulaire spécialisée : les peri-neuronal nets ou PNN (**Fig.36**, **haut**). Cette matrice fut décrite en 1882 par Camillo Golgi et étudiée en 1898 par Santiago Ramón y Cajal, qui apporta également sa description (**Fig.36**, **bas**).






« Une délicate structure principalement réticulée, mais aussi prenant la forme de petits carreaux imbriqués ou d'une enveloppe continue enveloppant le corps de toutes les cellules nerveuses qui s'étendent des prolongements protoplasmiques jusqu'aux arborisations de deuxième et troisième ordre »

*Figure 36 À gauche, une photo des PNN dans le cortex cérébral d'un rat prise par microscopie confocale. À droite, les dessins des articles de Golgi, Donaggio et Ramón y Cajal représentant la structure des PNN. En bas, la description des PNN faite par Santiago Ramón y Cajal (d'après Vitellaro-Zucarello et al., 1998).*

Dans l'article « *One hundred years of Golgi's "perineuronal net : History of a denied structure* » de Vitellaro-Zucarello paru en 1998, les auteurs retracent la controverse de l'époque autour de l'intérêt porté à cette structure (**Fig.37**), longtemps considérée comme un artefact généré par les techniques cytologiques (Vitellaro-Zucarello et al., 1998). Les PNN ont suscité l'intérêt de Golgi en raison de son opinion que les PNN n'étaient pas des neurones, mais plutôt une "sorte de corset de neurokératine qui empêchait la propagation du courant de cellule à cellule". Malgré le débat sur le sujet, Ramón y Cajal a affirmé que les PNN étaient simplement un artefact de coloration dérivé de la coagulation des fluides extracellulaires. L'intérêt pour les PNN n'a réellement émergé qu'au cours des années 1990 lorsque leurs caractéristiques ont été

décrites (Atoji & Suzuki, 1992), et qu'il a été découvert qu'ils constituaient des marqueurs de neurones physiologiquement matures (Hockfield & McKay, 1983 ; Atoji et al., 1989 ; Nicholson & Syková, 1998). Aujourd'hui, les matrices extracellulaires constituent un large champ d'étude dans le domaine des troubles neurologiques, avec l'idée que les altérations neuronales ne dépendent pas uniquement de l'intégrité des neurones, de la glie et d'autres types de cellules cérébrales, mais qu'elles sont également fortement influencées par la matrice extracellulaire environnante, qui constitue 20% du volume total de notre cerveau (Nicholson & Syková, 1998).

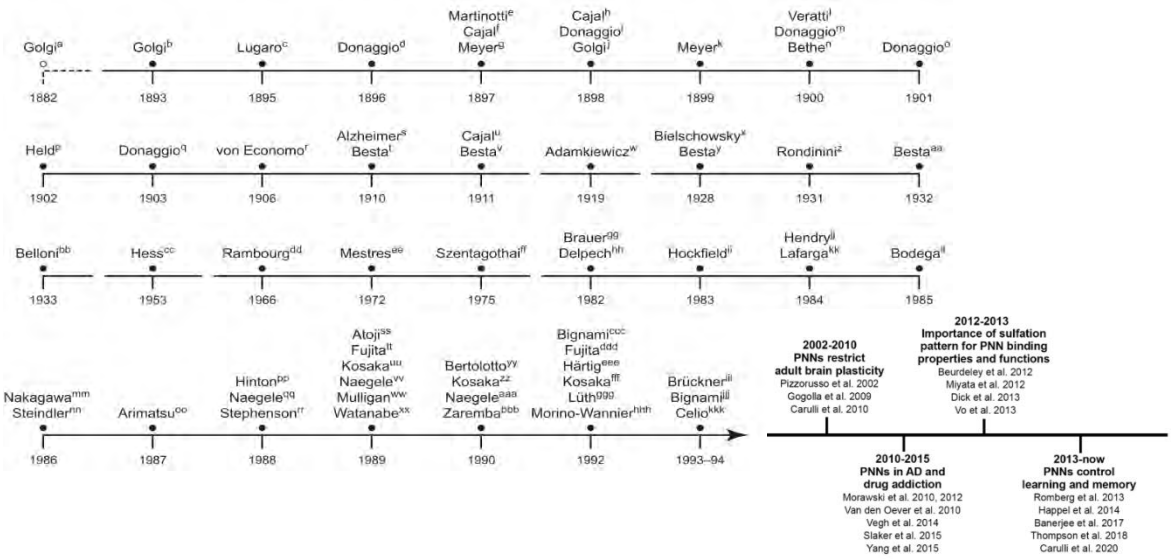



*Figure 37 Frise chronologique des publications sur les PNN durant les 100 dernières années (d'après Celio et al., 1998 ; Carulli et al., 2021)*

## B. Structure des PNN

Les PNN sont donc une matrice extracellulaire qui s'organise comme une maille, majoritairement autour des interneurones PV (**Fig.38, gauche**), bien que l'on en trouve aussi autour de certains neurones moteur de la corde spinale (Takahashi-Iwanaga et al., 1998), de neurones pyramidaux du cortex pariétal (Wegner et al., 2003), et également autour des neurones du noyau médial du corps trapézoïdal impliqué dans l'audition (Hartig et al., 2001). Les PNN (**Fig.38, droite**) s'articulent autour d'un squelette de hyaluronanes (polymère d'acide hyaluronique, similaire à ce qui est retrouvé dans le cartilage) synthétisé par l'hyaluronane-synthase transmembranaire (HAS) qui est exprimée à la surface des neurones (Kwok et al., 2011). Sur ce squelette vient se fixer grâce à des protéines de liaison (*Link*, *HAPLN1/4*, Kwok et al., 2010), les chondroïtines sulfates protéoglycans (CSPG, aggrecan, brevican, neurocan, versican, et phosphacan, Day & Prestwich, 2002), sur lesquels on retrouve un nombre variable

de chaines de polysaccharides glycosaminoglycanes (GAG) composées d'unités répétitives de disaccharides, elles-mêmes constituées d'acide uronique et de N-acetylgalactosamine (GalNac) (Kwok et al., 2011, Testa et al., 2019). Ces structures peuvent alors être fixées entre elles avec la tenascine-R (Tn-R) en C-terminal (**Fig.38** ; Lundell et al., 2004). La production de ces composants des PNN provient des neurones eux-mêmes, mais également des oligodendrocytes (phosphacan, versican, tenascin-R) et des astrocytes (brevican, neurocan, etc…) (**Fig.39**). Les protéoglycans sont traduits et glycosylés au niveau intracellulaire et ensuite sécrétés par exocytose dans l'espace extracellulaire.

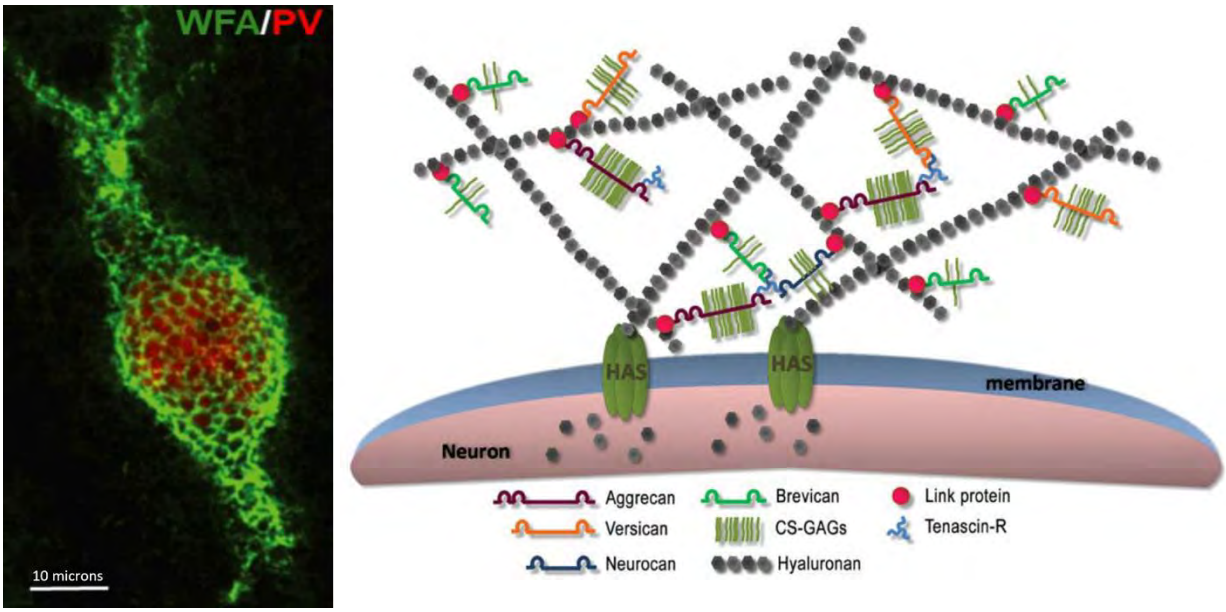



*Figure 38 À gauche, une photo d'un interneurone à parvalbumine (rouge) avec sa matrice extracellulaire (PNN), marquée avec la Wisteria Floriunda Agglutinin (WFA, vert). À droite, un schéma reprenant la structure complète des PNN. On peut y voir les CSPG et leurs chaines de polysaccharides fixées à l'acide hyaluronique, liés entre eux par les protéines de liaison et les Tenascin-R (d'après Kwok et al., 2011 ; Thompson et al., 2018).*

Cette matrice extracellulaire peut être marquée par une lectine, l'agglutinine de *Wisteria floribunda* (WFA) qui est isolée à partir de graines de glycine du Japon. Celle-ci reconnait les résidus N-acetylgalactosamine des chaines de sucre présents dans une grande majorité des PNN (>80%, Testa et al., 2019).

La formation des PNN à la surface des neurones est encore un mécanisme qu'il reste à définir, notamment lorsqu'on s'interroge sur le recrutement des différents composants et leur organisation structurelle. Par exemple, les approches immunohistochimiques ne permettent pas de montrer une corrélation entre la présence de récepteurs aux différentes protéines qui composent les PNN (récepteurs au phosphacan, brevican mais également récepteurs CD44 et RHAMM pour l'acide

hyaluronique) et leur formation autour des neurones. En revanche, il existe des isoformes des HAS qui peuvent conférer des mécanismes fonctionnels et structurels différents aux PNN (Kwok et al., 2011, Testa et al., 2019).

### C. Formation des PNN

Pour reprendre l'exemple du système visuel évoqué plus haut (cf Introduction III.C), la formation des PNN autour des interneurones PV s'effectue au cours du développement post-natal du cerveau et leur maturation, soit la mise en place du contrôle inhibiteur, coïncide avec la fermeture des périodes critiques (Hockfield et al., 1990 ; Hensch, 2005). La présence de cette matrice apparait nécessaire à la maturation des interneurones PV, et sa formation va dépendre de l'expérience vécue par les individus ainsi que de l'activité des interneurones PV (Celio et al., 1998 ; Pizzorusso et al., 2002).

Ainsi, la privation sensorielle induite par l'élevage des animaux dans l'obscurité permet de décaler l'apparition des PNN autour des interneurones PV du cortex visuel (Guimaraes et al., 1990) et par conséquent, de reculer la fin de la période critique. Plus récemment, les privations associées à d'autres modalités sensorielles démontrent également une diminution du nombre de PNN dans les aires corticales associées. Ainsi, les privations somatosensorielles induisent une réduction de la présence de PNN dans le cortex en barillet (McRae et al., 2007), et l'isolement social est associé à moins de PNN dans l'hippocampe et le cortex préfrontal (Ueno et al., 2017). De plus, l'entrée de Ca2+ par les récepteurs AMPA ou par la dépolarisation chronique, provoque la formation des PNN autour des interneurones PV (Dityatev et al., 2007 ; Giamanco et Matthews, 2012), suggérant que celle-ci est dépendante de l'activité des neurones. Les entrées sensorielles semblent donc réguler la formation des PNN, conduisant à leur maturation et à celle des neurones PV.

Dans le même esprit, dégrader la matrice extracellulaire avec une enzyme, la chondroïtinase-ABC (ChABC), induit une dominance oculaire après une privation monoculaire et permet donc de rouvrir la période critique chez le rat adulte (Pizzorusso et al., 2002). La ChABC permet de reproduire un phénotype moléculaire immature dans les neurones corticaux en culture, correspondant au phénotype avant la fermeture de la période critique (Willis et al., 2022). Ces résultats démontrent que la

formation des PNN est sensible aux entrées sensorielles, que la maturation de cette matrice limite la plasticité du réseau, et que la dégradation de cette dernière permet de rouvrir ces périodes de sensibilité. Certaines études suggèrent que la dépolarisation des interneurones PV provoquée par les stimulations sensorielles induit la formation des PNN par élévation du potassium extracellulaire (Brückner & Grosche, 2001 ; Dityatev et al., 2007). Une autre possibilité quant à la formation des PNN est l'augmentation de l'expression de *Hapln1*, elle-même activité-dépendante (Carulli et al., 2010). La formation des PNN est aussi modulée par d'autres systèmes permettant d'organiser et réorganiser l'agencement structural de la matrice autour des interneurones PV (**Fig.39**).

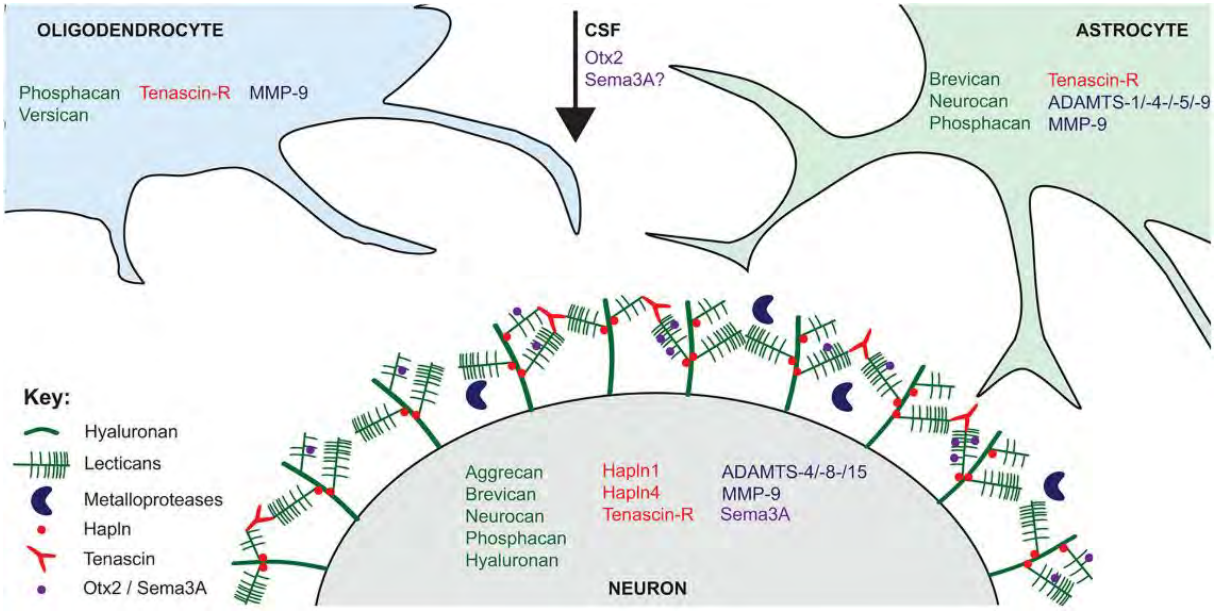



*Figure 39 Représentation des différentes cellules exprimant les différents composants des PNN (vert), les protéines qui permettent leur fixation (rouge), ainsi que les modulateurs de la plasticité de la matrice, provenant des interneurones eux-mêmes, des oligodendrocytes, des astrocytes ou du liquide cérébrospinal (d'après Testa et al., 2019).*

### 1. Otx2

Otx2, la protéine 2 de l'homéobox de l'orthodenticule, est largement décrite dans la littérature comme étant impliquée dans la maturation des interneurones PV, ainsi que dans la période critique et la plasticité du système visuel (Sugiyama et al., 2008 ; Bernard et al., 2016a). Chez l'individu adulte, cette homéoprotéine est sécrétée dans le liquide cérébrospinal par les plexus choroïdes, avant de diffuser dans le parenchyme et d'être spécifiquement capturée par les interneurones PV. On retrouve également cette protéine dans les régions impliquées dans le système visuel, à savoir la rétine, le corps géniculé dorso-latéral, le colliculus supérieur, et le cortex visuel (**Fig.40** ;

Rebsam et al., 2008 ; Sugiyama et al., 2008 ; Spatazza et al., 2013). Otx2 contient des séquences de sécrétion et d'internalisation qui lui confère la capacité à se déplacer de cellule en cellule et à migrer au sein des tissus (Joliot et Prochiantz, 2004 ; Brunet et al., 2007). On peut ainsi l'observer dans plusieurs régions corticales (préfrontal, auditif, somatosensoriel, visuel, amygdale basolatérale et hippocampe) (Spatazza et al., 2013).

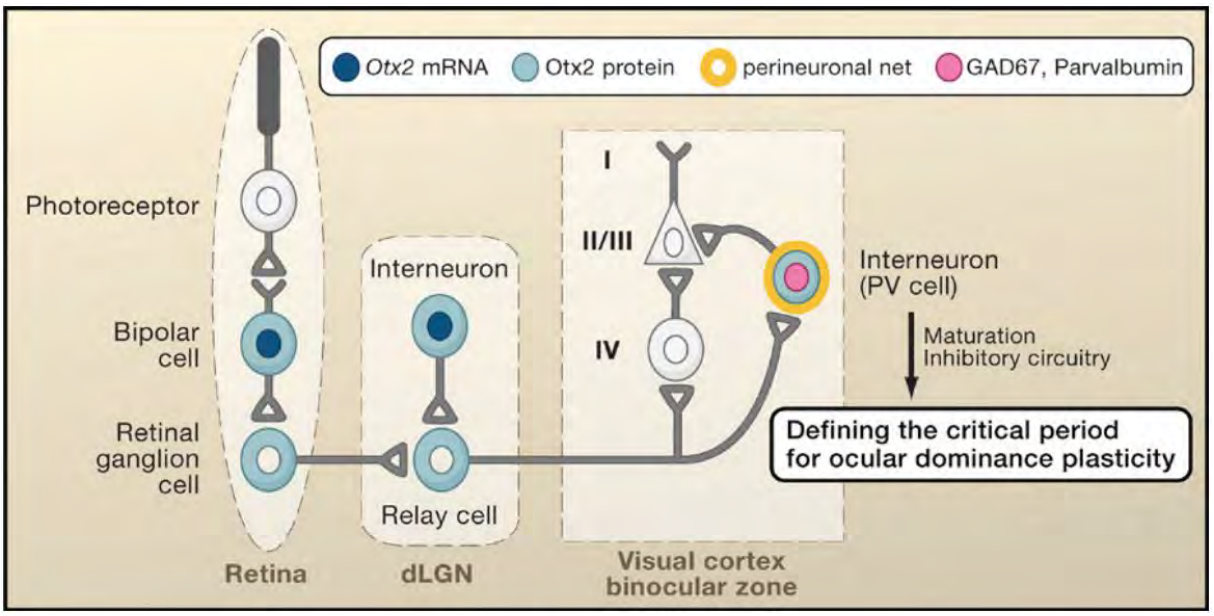



*Figure 40 Chez la souris, la protéine Otx2 est présente dans les cellules bipolaires et les cellules ganglionnaires rétiniennes, alors que l'ARNm Otx2 n'est présent que dans les cellules bipolaires. De façon similaire, dans le noyau géniculé latéral dorsal (dLGN) du thalamus, l'ARNm d'Otx2 est exprimé par les interneurones GABAergiques, tandis que la protéine Otx2 est présente dans les interneurones, mais également certaines cellules relais. Dans le cortex visuel, l'ARNm d'Otx2 ne se trouve dans aucun type de cellule, mais s'accumule dans les interneurones, coïncidant avec l'expression de la parvalbumine et de GAD67 pendant la période critique pour la plasticité de la dominance oculaire. La protéine Otx2 induit la maturation des cellules PV, entraînant une expression accrue de la parvalbumine. Une source possible de protéine corticale Otx2 est la rétine, via des connexions avec le dLGN. Otx2 peut être relayé par des axones thalamocorticaux qui forment des synapses sur les interneurones inhibiteurs au cours du développement. La spécificité de l'internalisation d'Otx2 peut être liée aux réseaux périneuronaux entourant les cellules PV dans le cortex visuel (d'après Redsam et al., 2008).*

La production d'Otx2 n'est pas dépendante de l'activité des cellules de la rétine, en revanche, les entrées sensorielles visuelles sont associées à sa migration, jusqu'à l'internalisation dans les interneurones PV du cortex visuel, médiée par les PNN (Beuderley et al., 2012) avec lesquels Otx2 possède une boucle de rétroaction positive (Bernard et al., 2016b). En effet, une injection d'Otx2 dans cortex controlatéral à une privation monoculaire provoque une restauration du nombre d'interneurones PV, et la formation de PNN autour de ces cellules augmente (Sugiyama et al., 2008), alors que la présence de PNN diminue si les niveaux d'Otx2 sont réduits (Spatazza et al., 2013 ; Bernard et al., 2016a). L'affinité d'Otx2 pour les interneurones PV et les PNN dépend

de la présence d'un homéodomaine, le motif RK (Beurdeley et al., 2012). En effet, injecter le peptide RK provoque une saturation de ces domaines, et entraine une diminution de l'expression de PV ainsi qu'une diminution du marquage PNN (**Fig.41**).

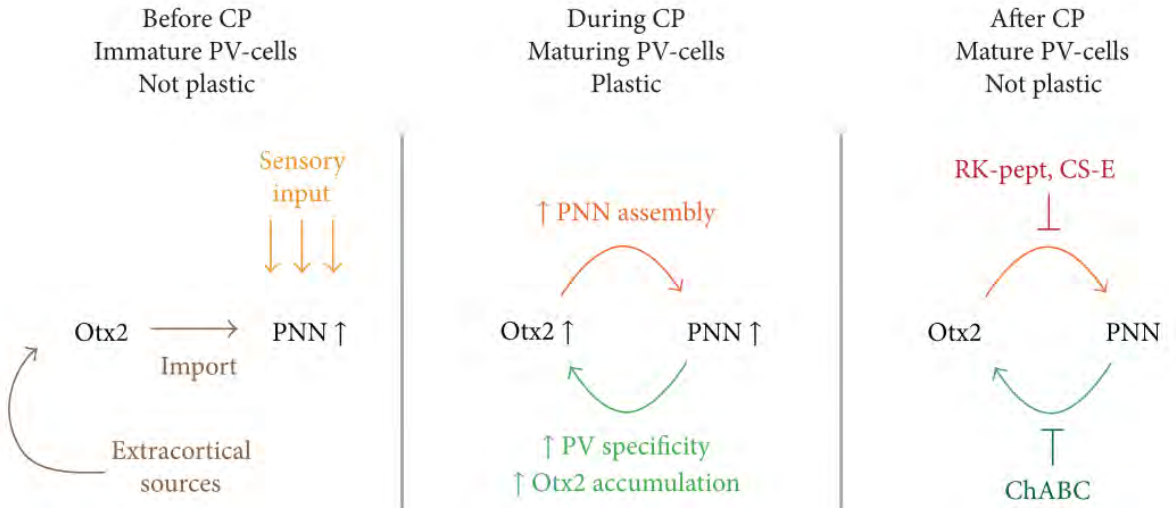



*Figure 41 Boucle de rétroaction positive entre Otx2 et la formation de PNN autour des interneurones PV. Avant l'ouverture de la période critique (CP), les entrées sensorielles induisent la formation initiale des PNN avec la migration et l'internalisation d'Otx2. Pendant la période critique, l'augmentation d'Otx2 induit la formation de PNN autour des interneurones PV, qui a son tour permet d'augmenter l'accumulation d'Otx2 dans les interneurones PV. Chez l'adulte, ce tonus d'Otx2 vers les interneurones PV maintient un état mature des cellules, mais diminue leur plasticité. En revanche, il est possible de rouvrir la période critique en dégradant les PNN avec la ChABC, en saturant le domaine RK, ou en utilisant un analogue CS-E qui bloque Otx2 (d'après Bernard et al., 2016b)*

### 2. Neuréguline-1 (NRG1)

La plasticité des PNN peut également être stimulée par des facteurs neurotrophiques comme la neuréguline-1 (NRG1), exprimée tout au long du développement embryonnaire et post-natal (Pantazopoulos & Berretta, 2016). Chez la souris, à partir de la 2ème semaine de développement embryonnaire, la NRG1 permet la migration des précurseurs d'interneurones issus de l'éminence ganglionnaire médiane (MGE) vers le cortex, au sein duquel ils se différencient en interneurones PV (Marín, 2013). La NRG1 est exprimée principalement par les neurones excitateurs de manière dépendante de l'activité (Mei & Xiong, 2008 ; Mei & Nave, 2014 ; Ting et al., 2011). Elle permet alors de réguler l'activité des interneurones PV *via* l'activation des récepteurs à tyrosine kinase ErbB4 (Fazzari et al., 2010 ; Gu et al., 2016 ; Sun et al., 2016), dont l'expression est spécifique aux interneurones GABAergiques, et en particulier les interneurones PV (Bean et al., 2014 ; Fazzari et al., 2010). La signalisation NRG1/ErbB4 contrôle le développement du circuit inhibiteur en régulant

la maturation des interneurones PV et de leur PNN (Mei & Nave, 2014), et est donc impliquée dans la fermeture de la période critique.

Les expériences de privation monoculaire induisent un ralentissement de la maturation des interneurones PV dans le cortex visuel controlatéral à la privation sensorielle qui se traduit par une diminution de l'expression de la NRG1 et de son récepteur ErbB4 sous sa forme phosphorylée par les interneurones PV. Injecter de la NRG1 dans le cortex visuel permet de restaurer la maturation et l'activité des interneurones PV en augmentant les entrées excitatrices sur ces cellules (Sun et al., 2016), ainsi qu'une augmentation des courants post-synaptiques excitateurs miniatures (mEPSC) (Ting et al., 2011). Sur tranche d'hippocampe, la NRG1 augmente l'amplitude des courants post-synaptiques inhibiteurs (IPSC) sur les neurones pyramidaux de l'aire CA1, suggérant une augmentation de l'activité des interneurones inhibiteurs (Chen et al., 2010). À l'inverse, des modèles murins dans lesquels l'expression d'ErbB4 est supprimée dans les interneurones PV montrent une réduction du nombre de synapses excitatrices sur ces neurones (Fazzari et al, 2010), ainsi qu'une diminution du marquage PV et une diminution de l'activité des oscillations gamma induites par le kainate (Fisahn et al., 2009). De plus, l'ablation spécifique d'ErbB4 dans les neurones PV réduit les rapports eIPSC/eEPSC et peut altérer un apprentissage contextuel de conditionnement de peur (Lu et al., 2014). Concernant les fonctions cognitives, la maturation des PNN ainsi que l'expression de la voie NRG1/ErbB4 est parfois nécessaire à la plasticité, permettant par exemple la formation d'une mémoire sociale (Domínguez et al., 2019). De plus, une injection unique de NRG1 dans l'aire CA2 de souris modèles de la MA (Tg2576) permet de restaurer le nombre de cellules PV+/PNN+ observables ainsi que la mémoire sociale des souris (Rey et al., 2022).

L'ensemble de ces études démontrent donc l'implication de la voie NRG1/ErbB4 dans la plasticité des interneurones PV, ainsi que dans les fonctions cognitives associées.

### 3. La métalloprotéase matricielle 9 (MMP-9)

Parmi les métalloprotéinases, une famille d'enzyme de la classe des peptidases, la métalloprotéase matricielle 9 (MMP-9) est un acteur important de la modulation des PNN dans l'hippocampe, de par sa capacité à dégrader une grande partie de leurs composants (Howell et al., 2012). MMP-9 est exprimée par les neurones eux-mêmes, ainsi que les cellules gliales (**Fig.39** ; Alaiyed et al., 2019 ; Testa et al., 2019). Cette

expression peut venir en réponse à l'activité des neurones lors d'apprentissages ou de la mémorisation (Kaczmarek et al., 2002), comme lors d'un conditionnement de peur chez le rongeur (Ganguly et al., 2013). De plus, après un séjour dans un environnement enrichi (EE), les niveaux de MMP-9 sont plus importants autour des interneurones PV qui ont peu de PNN autour d'eux, suggérant l'implication de cette métalloprotéinase dans la réduction de la présence de PNN suite à un EE (Foscarin et al., 2011). De plus, la déplétion de la microglie conduit à une accumulation considérable de PNN dans le cortex et empêche la diminution de PNN dans le cortex de souris modèles de la maladie de Huntington (Crasper et al., 2020). Les cellules microgliales pourraient donc être des régulateurs importants du maintien des PNN et de leur dégragation, ainsi que dans la plasticité synaptique. Les métalloprotéinases pourraient également conduire aux changements locaux rapides des PNN lors de processus de plasticité. Leur implication a récemment été étudiée dans des pathologies cérébrales, telles que la MA, la schizophrénie ou les troubles de l'addiction (**Fig.42** ; Vafadari et al., 2019 ; Ringland et al., 2021).

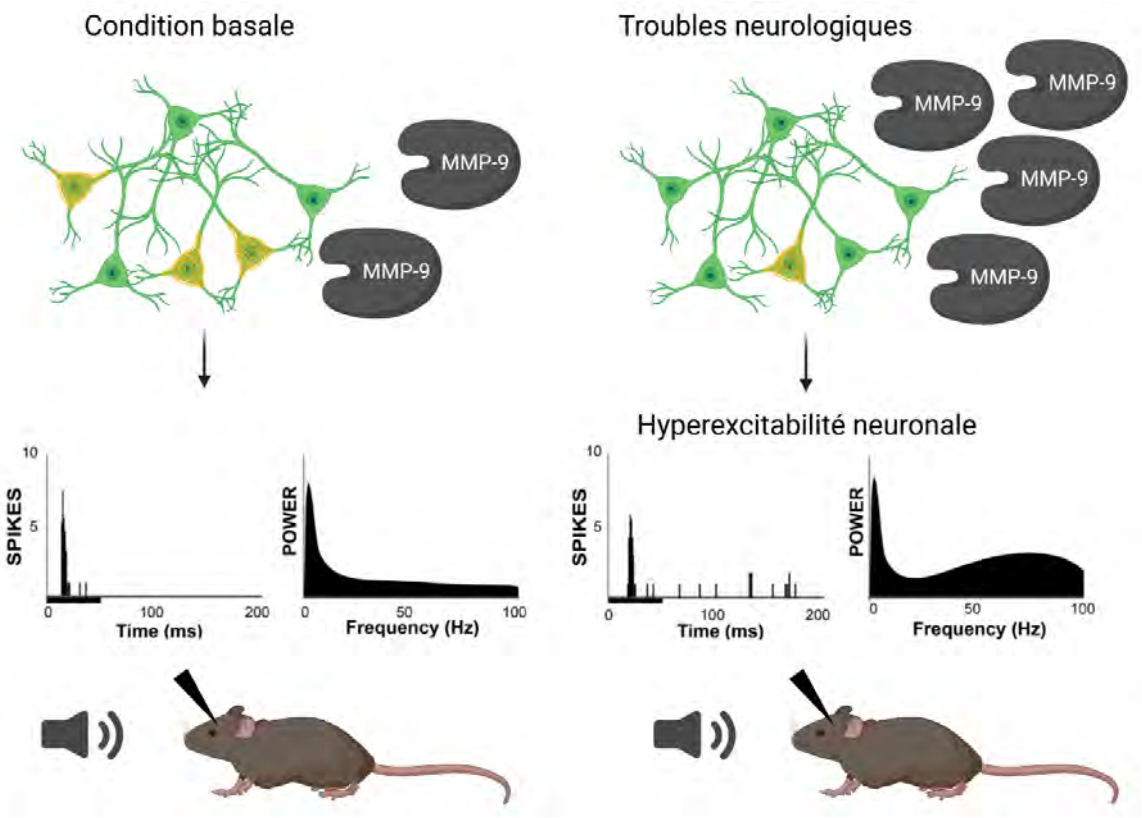



*Figure 42 Représentation de la modulation des interneurones PV et de leur PNN par MMP-9. En condition pathologique (ici, syndrôme de l'X fragile), MMP-9 est surexprimée et on retrouve peu de PNN autour des interneurones PV. Cela conduit à une hyperexcitabilité neuronale, que les auteurs mesurent avec des réponses unitaires (chaque ligne verticale est un potentiel d'action dans l'histogramme de temps post-stimulus) au stimulus sonore (barre noire sous l'abscisse), ainsi qu'avec la puissance spectrale des EEG en condition basale (d'après Wen et al., 2018).*

### 4. La chondroïtinase-ABC (ChABC)

Concernant la fonction des PNN dans les processus de plasticité, l'utilisation de la ChABC a permis de faire progresser les connaissances au cours des dernières décennies. La ChABC est une enzyme bactérienne isolée de *Proteus vulgaris* (Yamagata et al., 1968), qui digère la chaîne de chondroïtine sulfate (CS) dans ses unités disaccharidiques de base, supprimant ainsi la chaîne GAG de la protéine centrale.

La sous-unité disaccharidique de CS peut être modifiée avec différentes sulfatations. La ChABC reconnait les CS A, B et C, donnant des disaccharides D4,5-insaturés (**Fig.43**). L'injection de ChABC diminue donc le marquage WFA/PNN dans l'heure qui suit (Chu et al., 2018). Les sites de liaison WFA et l'hyaluronane sont éliminés dans la zone d'injection, et la coloration des différents composants de la protéine centrale ne révèle que des fragments de PNN.

Après digestion avec la ChABC, il faut compter un minimum de 7 jours pour visualiser à nouveau des PNN autour des interneurones PV dans le cortex visuel (Brückner et al., 1998 ; Pizzorusso et al., 2002). Cependant, concernant la structure de la matrice en elle-même, on constate toujours des différences 4 semaines post-injection. Ce n'est qu'après 5 mois qu'il est totalement impossible de distinguer les tissus traités à la ChABC de tissus non-traités (Brückner et al., 1998). Ce remodelage des interneurones PV et de leur PNN, ainsi que les effets induits par l'injection de ChABC sont décrits dans diffférentes parties (cf Introduction III.C).

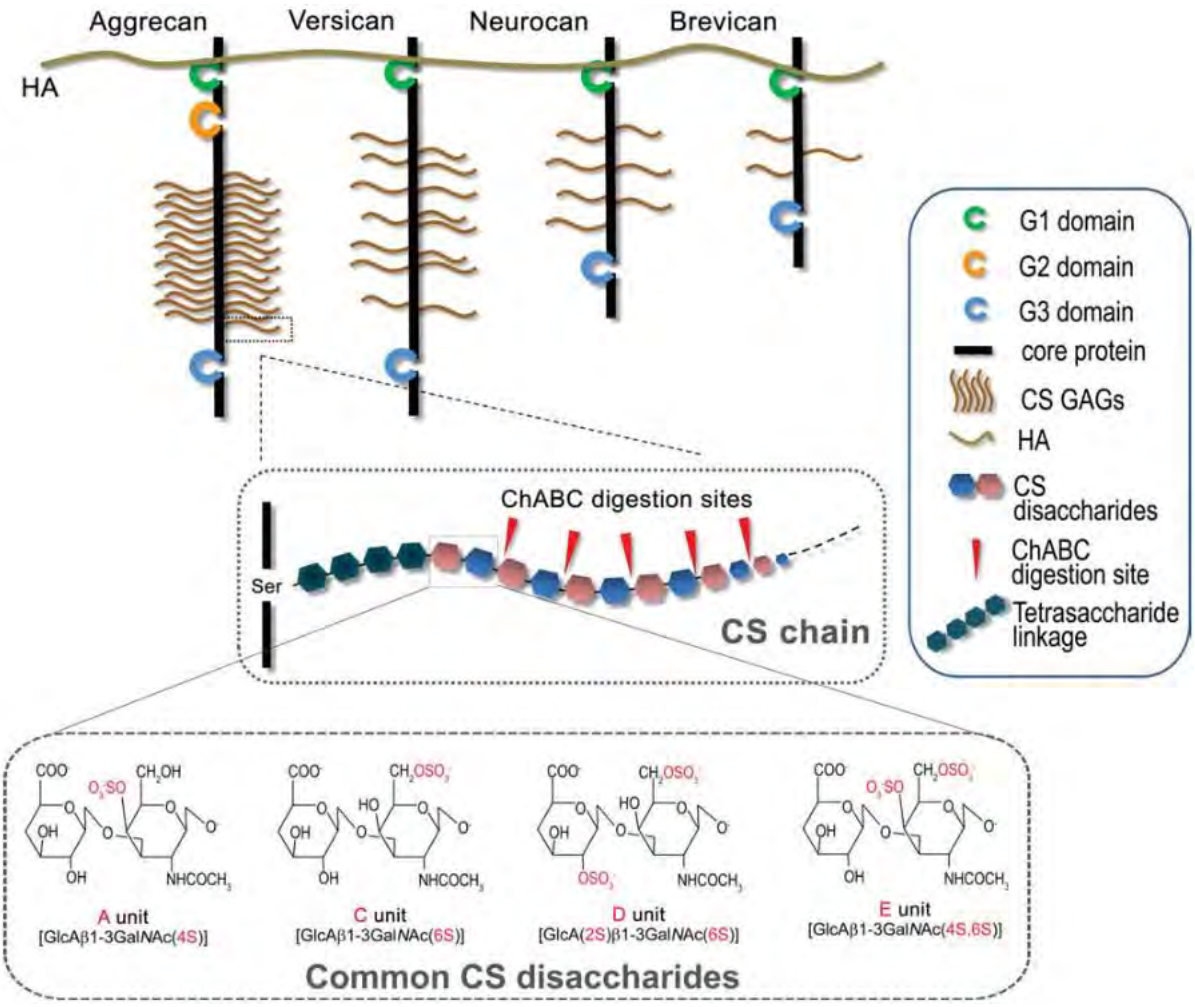



*Figure 43 En haut, on retrouve l'articulation des protéoglycans sur le brin d'acide hyaluronique, avec leur domaine N-terminal (G1, 2 ou 3), ainsi que les chaînes de polysaccharides. L'encadré du centre représente les sites sur lesquels la ChABC dégrade les PNN au niveau des chaines de disaccharides. Dans l'encadré du bas, on retrouve certains CS communs, qui sont des polymères linéaires de sous-unités GlcA et GalNAc, possédant différentes sulfatations possibles (2S, 4S ou 6S) (d'après Kwok et al., 2011).*

## E. Implications des PNN dans la plasticité des interneurones PV

Les PNN forment une barrière physique autour des neurones. Cette barrière permet notamment une protection contre le stress oxydatif (Cabungcal et al., 2013). De plus, les PNN étant composés d'une grande combinaison de charges négatives, ils agissent comme une réserve d'ions, et peuvent générer un gradient de concentration le long de la membrane qui permet de soutenir un haut potentiel de membrane au repos (Härtig et al., 1999). Ils ont également un rôle de tampon local, en absorbant les fortes variations de concentration en cations extracellulaires (Hartig et al., 1999 ; Morawski et al., 2015). Cette barrière pourrait également protéger les neurones de molécules neurotoxiques, comme le peptide Aβ (Miyata et al., 2007) ou la protéine Tau (Morawski et al., 2010) dans le cadre de la MA.

### 1. Interneurones PV/PNN et plasticité synaptique

Les synapses neuronales sont intégrées dans les matrices extracellulaires (ECM). Cela peut être dans les ECM interstitielles, présentes dans tout le système nerveux central, ou dans les PNN, une matrice spécialisée au sein de laquelle les synapses peuvent interagir avec les CSPG et les différents composants des PNN (**Fig.44**), modifiant ainsi la migration et les propriétés des récepteurs membranaires (Favuzzi et al., 2017). Les PNN influencent par exemple la diffusion latérale des récepteurs AMPA des synapses glutamatergiques (Frischknecht et al, 2009 ; Favuzzi et al., 2017).

L'utilisation de la ChABC a largement contribué à faire avancer les découvertes quant aux modifications synaptiques apportées par la plasticité des PNN. Par exemple, la dégradation de cette matrice par la ChABC permet d'ouvrir une plasticité synaptique en augmentant la motilité et le renouvellement des épines dendritiques, résultant en une augmentation du nombre de bourgeonnements synaptiques (Orlando et al., 2012 ; de Vivo et al., 2013). Les PNN jouent donc un rôle important sur le microenvironnement cellulaire et la fonction synaptique des interneurones PV.

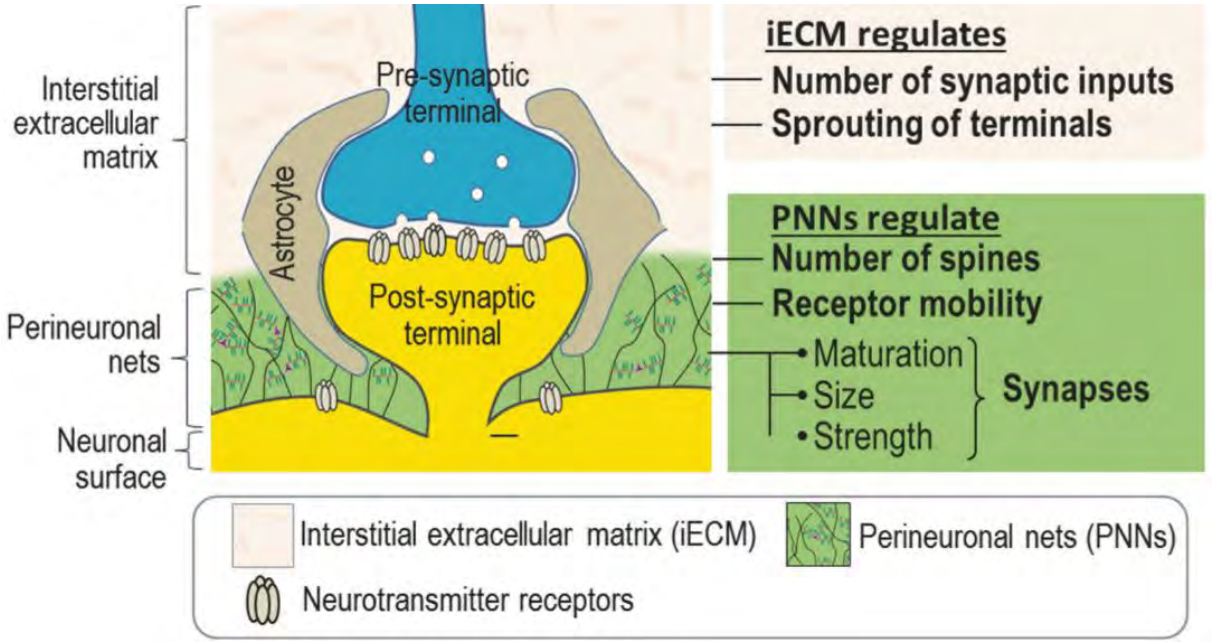



*Figure 44 Représentation d'une synapse et de l'organisation de la matrice extracellulaire interstitielle et de sa condensation en PNN. Les PNN peuvent influer sur le nombre d'épines dendritiques, mais également sur la mobilité des récepteurs qui composent les synapses (d'après Fawcett et al., 2022).*

En outre, les PNN empêchent la formation de nouvelles synapses (Kwok et al., 2011) et stabilisent les synapses excitatrices sur les interneurones PV. En effet, la

suppression d'un des principaux composants des PNN (brevican, présent sur 80% des interneurones PV) diminue le nombre de synapses excitatrices sur ces neurones (Favuzzi et al., 2017). Ceci s'accompagne d'une augmentation de leur excitabilité, et de leur résistance membranaire, qui va être associée à une durée du potentiel d'action et une période réfractaire plus longue (Favuzzi et al., 2017). Les neurones PV entourés de PNN non-mature/fonctionnel sont donc moins efficaces à haute fréquence. Cela entraine également une augmentation du taux maximum de décharge de ces neurones ainsi que de l'expression de la protéine PV (Yamada et al., 2015).

En revanche, dans l'hippocampe, la digestion des PNN par la ChABC a pour effet d'augmenter le nombre de synapses inhibitrices sur les interneurones PV (Donato et al., 2013 ; Ruzicka et al., 2021). Dans le cortex entorhinal, des travaux montrent une diminution des synapses excitatrices et inhibitrices sur les interneurones PV suite à l'injection locale de ChABC (Christensen et al., 2021). La dégradation des PNN avec la ChABC induit également une diminution de la LTP dans l'hippocampe (Bukalo et al., 2001 ; Brakebusch et al., 2002), ainsi qu'une augmentation de l'activité cérébrale globale (Wingert et al., 2021).

La maturation des interneurones PV et des PNN est dépendante des entrées sensorielles, particulièrement lors des périodes critiques, et les expériences vécues par un individu vont impacter la plasticité de ces cellules, autrement dit les remodeler. Ce remodelage des interneurones PV est donc dépendant des changements structurels des PNN autour de ces cellules, qui peuvent influencer le nombre terminaisons synaptiques excitatrices et inhibitrices sur ces neurones. Cette plasticité joue ainsi un rôle essentiel dans les processus mnésiques et les fonctions cognitives.

### 2. Interneurones PV/PNN et fonctions mnésiques

Une étude réalisée par Donato et al., 2013 montre l'implication de la plasticité des interneurones PV dans la mise en place de la mémoire épisodique contextuelle chez la souris adulte. Cette étude montre que, lorsque les individus sont placés dans un EE, les neurones PV de l'aire CA3 de l'hippocampe adoptent une configuration dite « low-PV » où l'on retrouve des concentrations faibles en parvalbumine et en GAD67, ainsi qu'une diminution des contacts synaptiques excitateurs, et une augmentation des entrées inhibitrices. En effet, les auteurs mesurent une augmentation de la densité des boutons synaptiques d'un sous-type de neurones GABAergiques exprimant le peptide

intestinal vasoactif (VIP) sur les cellules PV. Une diminution du nombre de cellules PV+ et PNN+ quantifiables suite à un séjour en EE est également observée sur l'ensemble de l'hippocampe des souris non-transgéniques (non-porteuses de la mutation FAD) de la lignée Tg2576 (Cattaud et al., 2018). Cette désinhibition des neurones excitateurs, et cette diminution des PNN sont considérées comme une réouverture d'une période de plasticité (Spatazza et al., 2013), facilitant l'établissement de nouveaux apprentissages. À l'inverse, lorsque les animaux doivent consolider rapidement une nouvelle information (comme suite au test de conditionnement de peur dans Donato et al., 2013), on mesure une augmentation de la concentration de parvalbumine et de GAD67, et donc une augmentation de la proportion de neurones « high-PV ». Le nombre de synapses excitatrices sur les interneurones PV augmente, ainsi que le tonus inhibiteur exercé sur les cellules principales, ce qui favoriserait la consolidation de la mémoire acquise, altérant par ailleurs les nouveaux apprentissages qui pourraient perturber cette consolidation (**Fig.45** ; Donato et al., 2013). Cette publication démontre un état dit « bistable » des interneurones PV, qui se traduit par une adaptation de leur configuration en fonction de l'expérience vécue. Cela soutient l'idée qu'une grande partie de nos fonctions cognitives à l'âge adulte sont façonnées au cours des premières périodes critiques où les circuits neuronaux s'adaptent pour la première fois à leur environnement.

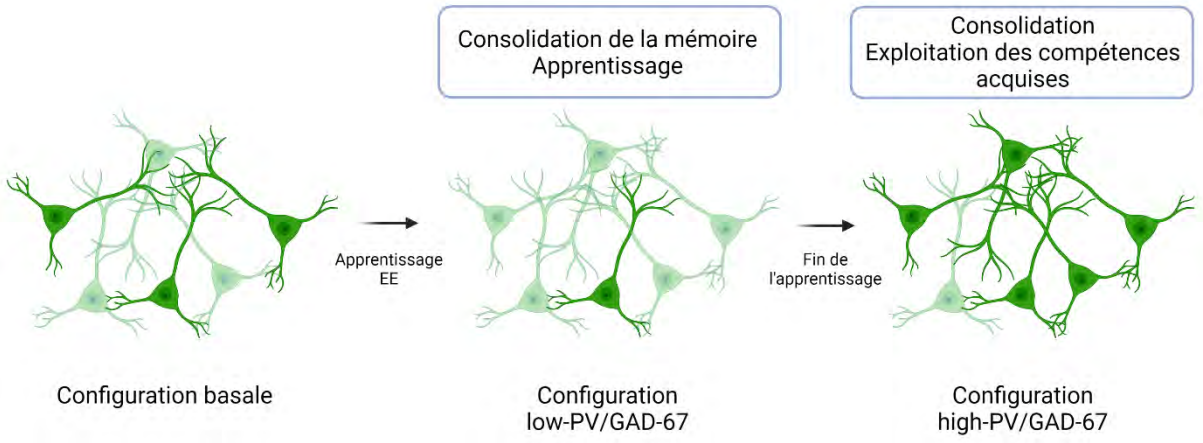



*Figure 45 Représentation de la plasticité des interneurones PV induite par l'expérience vécue par les individus. Lorsque les souris sont placées dans un environnement enrichi (EE), la configuration low-PV est favorisée, avec une faible expression de la protéine PV et de GAD67. À l'inverse lors de la consolidation d'informations ou de l'exploitation de compétences acquises, les interneurones PV favorisent la configuration high-PV (d'après Donato et al., 2013).*

Il apparait donc important de comprendre le mécanisme de remodelage des neurones PV, et de leur PNN dont la présence ou l'absence est associée aux configurations « low-PV » et « high-PV » (Hensch, 2014 ; Favuzzi et al., 2017), ainsi que l'implication

des neurones VIP, dont les modulateurs d'activités tels que l'acétylcholine et la sérotonine sont libérés lors d'une expérience (Letzkus et al., 2011) (**Fig.46A** & **B**). En effet, la régulation de l'inhibition des interneurones PV joue un rôle important dans les fonctions cognitives tout au long de la vie (**Fig.46C**).

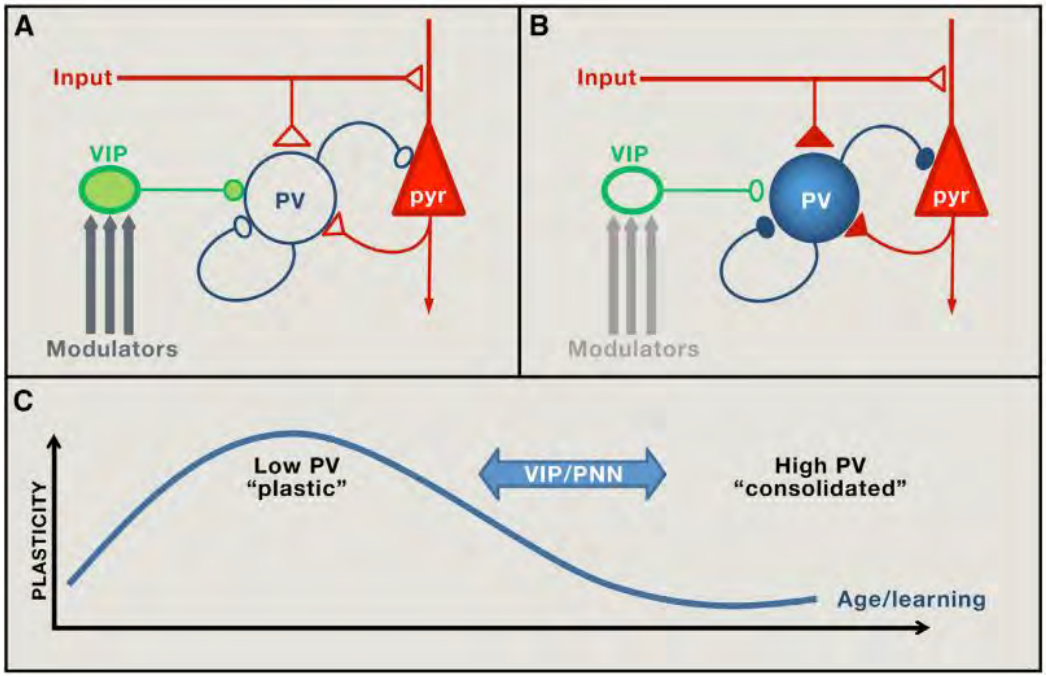



*Figure 46 (A) Configuration low-PV, favorisée par l'augmentation du nombre de contacts inhibiteurs des neurones VIP, soutenue par des neuromodulateurs libérés lors d'un EE par exemple. (B) Configuration high-PV, réfractaire à la plasticité, permettant la consolidation des souvenirs. (C) Évolution et remodelage de la configuration PV et de leur PNN au long de la vie des individus, réversibles par des manipulations des PNN ou de l'activité des neurones VIP (d'après Hensch, 2014).*

Comme vu précedemment, la présence de PNN autour des interneurones PV influence l'activité de ces derniers (cf Introduction IV.D). Ceci a des conséquences sur les capacités de mémorisation à long-terme, et cela est démontré pour différents types de mémoire. Par exemple, l'apparition des PNN dans l'amygdale baso-latérale coïncide avec la capacité à maintenir à long-terme une mémoire associative de peur conditionnée au cours du développement post-natal, démontrant l'importance du contrôle inhibiteur dans l'élaboration de cette mémoire (Gogolla et al., 2009). Dans la même étude, l'injection de ChABC dans l'amygdale de rats adultes a pour conséquence de dégrader la matrice autour des interneurones PV, et induit la suppression du comportement de peur conditionnée, suggérant que la présence de PNN permet de protéger la trace de cette mémoire associative en stabilisant les réseaux neuronaux associés aux interneurones PV qui sous-tendent ces processus mnésiques (Gogolla et al., 2009). De la même manière, une perturbation de la

mémoire de peur contextuelle est observée suite à la dégradation des PNN *via* l'injection de hyaluronidase dans l'hippocampe de souris (Kochlamazashvili et al, 2010). Pour citer un dernier exemple, l'injection de ChABC dans l'aire CA1 provoque une perturbation de l'acquisition, de la consolidation, et de la reconsolidation chez des souris soumises à un conditionnement de peur au contexte (Shi et al., 2019). Ces exemples suggèrent qu'une fois que l'apprentissage est acquis lors du conditionnement de peur au contexte, les animaux ayant subi une dégradation des PNN autour des interneurones PV sont incapables de former une mémoire à long-terme de ces évènements, l'absence de PNN induisant une incapacité pour les neurones PV à adopter une configuration « high-PV » (**Fig.45**).

Il est également démontré que lors de tests comportementaux mesurant la capacité d'un individu à discriminer un nouvel objet d'un objet familier, la dégradation des PNN dans CA1 facilite la dépression à long-terme (LTD) dans cette aire, et est associée à de meilleures performances dans cette tâche de reconnaissance (Khoo et al., 2019). Concernant la mémoire spatiale, la dégradation de la matrice dans le cortex entorhinal médian par la ChABC déstabilise les réseaux des « grid cells » conduisant à des représentations altérées de nouveaux environnements (Christensen et al., 2021), comme si la plasticité du réseau pouvait altérer les représentations spatiales stockées (Fawcett et al., 2022). De plus, lors d'un apprentissage spatial, les niveaux de marquage de brevican dans les PNN qui entourent les neurones PV de l'hippocampe sont réduits pendant l'apprentissage dans le labyrinthe aquatique de Morris, et reviennent ensuite au niveau de base pendant la consolidation (Favuzzi et al., 2017). Ce composant des PNN semble d'ailleurs jouer un rôle essentiel dans la mémoire spatiale de travail et la mémoire à court terme, mais n'est pas nécessairement impliqué dans la mémoire à long terme (Favuzzi et al., 2017). L'une des hypothèses serait que des composants des PNN pourraient réguler certaines connexions synaptiques spécifiques sur les interneurones PV, qui auraient des conséquences particulières sur le niveau d'activité de ces neurones (Klausberger & Somogyi, 2008), sous-tendant une implication dans différents aspects de la mémoire (Kitamura et al., 2015).

La maturation des PNN dans l'aire CA2 de l'hippocampe joue également un rôle important dans la capacité à former une mémoire sociale chez la souris, à la fin de l'adolescence (Domínguez et al., 2019). En effet, la présence de PNN est permissive à deux formes de LTD inhibitrice (iLTD), à travers la signalisation de la voie

NRG1/ErbB4, l'une médiée par les récepteurs delta-opioïde (DOR-iLTD), elle-même permissive à celle des récepteurs cannabinoïdes de type 1 (CB1R-iLTD) (Loisy et al., 2022). Enfin, de façon intéressante, la suppression des PNN dans le cortex auditif avec l'hyaluronidase conduit à un meilleur apprentissage d'un changement de règle, c'est-à-dire la capacité de réapprendre une tâche qui nécessite une flexibilité comportementale (Happel et al., 2014 ; Carulli & Verhaagen, 2021).

La maturation des PNN autour des interneurones PV peut donc à la fois empêcher les nouveaux apprentissages en limitant la plasticité, et permettre de consolider les apprentissages déjà acquis. Cette capacité de remodelage de la structure et de la composition des PNN, ainsi que des connexions synaptiques sur les interneurones PV et de leur activité qui en découle, présente donc un intérêt tout particulier pour des intentions thérapeutiques. Manipuler la présence des PNN et/ou l'activité des neurones PV pourrait ainsi permettre d'améliorer les processus d'apprentissage, ou potentialiser la consolidation de la mémoire. Or, il existe une pathologie affectant grandement les fonctions mnésiques, dans lesquelles l'activité des interneurones PV semblent jouer un rôle essentiel : la MA.

## F. Interneurones PV/PNN et maladie d'Alzheimer

Les interneurones PV sont essentiels pour l'intégration d'informations sensorielles lors des périodes critiques, mais également pour l'instauration des fonctions cognitives chez l'adulte, régulant l'activité des cellules principales, faisant émerger les oscillations gamma (Cardin et al., 2009 : Sohal et al., 2009) et permettant la synchronisation neuronale dans le cerveau (Hu et al., 2014). Leur dysfonction peut conduire à de l'épilepsie chez l'humain et la souris (Szabo et al., 2022), des perturbations de l'activité gamma (Verret et al, 2012), ainsi qu'à des troubles psychiatriques divers comme l'autisme, la schizophrénie, ou la MA (Marín, 2012). Chez la souris, ou lors d'études *post-mortem* chez l'humain, des travaux ont présenté des résultats contradictoires quant aux quantifications de la présence des interneurones PV et de leur PNN dans le cadre de la pathologie (**Tableau 1,** Ruden et al., 2021 **;** Reid et al., 2021 ; Scarlett et al., 2022).

| Modèle | *Références* | Structure | PV | PNN |
|---|---|---|---|---|
| **Humain** | *Baig et al., 2005* | Cortex | = | ↓ |
| | *Hof et al., 1991* | préfrontal/temporal | = | Ø |
| | *Verret et al., 2012* | Cortex pariétal | ↓ Nav1.1 | Ø |
| | *Crapser et al., 2020* | Gyrus frontal moyen | Ø | ↓ aggrecan |
| | *Brady & Mufson, 1997* | Hippocampe | ↓ 60% | Ø |
| | *Lendvai et al., 2013* | | Ø | ↑ |
| | *Zheng et al., 2020* | CA3 | = | = |
| **Souris** | | | | |
| APPsl/PS1ho KI | *Takahashi et al., 2010* | Hippocampe | ↓ | Ø |
| APPswe/PS1dE9 | *Verdaguer et al., 2015* | Hippocampe | ↑ | Ø |
| APP/PS1 | *Végh et al., 2014* | Hippocampe | Ø | ↑ |
| | *Hijazi et al., 2019* | | Hyperexcitabilité | Ø |
| Tg2576 | *Verret et al., 2012* | Hippocampe | ↓ Nav1.1 | Ø |
| | *Ramos et al., 2006* | | - | ↓ |
| | *Cattaud et al., 2018* | | ↓ | ↓ |
| | *Rey et al., 2022* | | ↓ | ↓ |
| | *Ajmo et al., 2010* | | Ø | ↓ (CS-GAG sur brevican) |
| | *Huh et al., 2016* | CA1 | ↓ | ↓ |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| TgCRND8 | *Hamm et al., 2017*<br>*Mahar et al., 2017*<br>*Albuquerque et al., 2015* | CA2 / 3 / DG<br>CA1/2/subiculum<br>CA3 / DG<br>Hippocampe | ↓<br>↓<br>=<br>↓ | ↓<br>Ø<br>Ø<br>Ø |
| 5xFAD | *Crapser et al., 2020* | Subiculum | ↓ | Ø |
| femelle apoE-KI | *Leung et al., 2012* | CA1 ipsilatéral | ↓ | Ø |

*Tableau 1 Tableau récapitulatif des différentes modifications de l'activité des interneurones PV et de la présence des PNN, chez les patients ainsi que plusieurs modèles de souris MA, en fonction des différentes régions cérébrales.*

Les différences entre ces observations chez l'humain peuvent s'expliquer par le fait que les régions cérébrales présentent une altération hétérogène lors du décours de la pathologie. De plus, les PNN sont dégradés dans les 4 à 8 heures *post-mortem* par différents facteurs externes, limitant leur détection dans le cerveau. Ces résultats contradictoires peuvent aussi être présents chez la souris. Si les conséquences de la MA sur l'activité des interneurones PV ne convergent pas vers un consensus par delà les différents modèles et expérimentations, la perturbation des oscillations gamma qui en découle (cf. Introduction III.B.1) nous indique que, dans un sens ou dans l'autre, les interneurones PV dysfonctionnent dans la pathologie.

Comme vu précédemment, c'est en 2012 qu'a été établi le premier lien entre l'activité des interneurones PV, les oscillations gamma et les fonctions cognitives chez les souris MA (Verret et al., 2012). Ces dernières années, on observe une augmentation du nombre d'études qui s'intéressent au rôle des interneurones PV et particulièrement de leur PNN dans les processus mnésiques et dans les maladies neurodégénératives (Marín, 2012 ; Wen et al., 2018 ; Testa et al., 2019, Carulli & Verhaagen, 2021 ; Reid et al., 2021 ; Fawcett et al, 2022 ; Scarlett et al., 2022).

Dans ces nombreuses études, malgré le fait que les intentions et outils de remodelage des interneurones PV et des PNN diffèrent, voire s'opposent, elles convergent vers une restauration des fonctions cognitives dans les différents modèles. Avec l'optogénétique, restaurer l'équilibre synaptique entre l'excitation et l'inhibition dans les microcircuits des cellules principales de CA1 qui inervent les interneurones PV, permet

d'améliorer la mémoire spatiale dans le test de la piscine de Morris (Yang et al., 2018), ainsi que l'activité gamma dans l'hippocampe (Dávila-Bouziguet et al., 2019). Dans un modèle de tauopathie, la digestion des PNN avec la ChABC restaure la mémoire spatiale des souris (Yang et al., 2015 ; Fawcett et al., 2015). À l'inverse, stimuler l'activité des interneurones PV de l'aire CA2 dans le modèle Tg2576 restaure la présence de PNN autour des interneurones PV, ainsi que la mémoire sociale (Rey et al., 2022). De la même façon, placer des souris Tg2576 dans un EE, augmente d'une part, le nombre d'interneurones PV et de PNN quantifiables dans l'hippocampe (Cattaud et al., 2018), et d'autre part, les capacités mnésiques de ces animaux (Verret et al., 2013).

Une fois encore, il n'existe pas de consensus sur la façon dont les interneurones PV et leur PNN permettent des améliorations cognitives notables sur les modèles MA. Cependant, le dénominateur commun qui se dégage de la littérature semble être la capacité des interneurones PV et de leur PNN à être remodelés, et donc à pouvoir changer de conformation. Ces travaux permettent ainsi de proposer une nouvelle approche thérapeutique, soit manipuler/stimuler le remodelage des interneurones PV/PNN pour pallier aux troubles de la mémoire dans la pathologie. Comme exposé par la suite, cela peut être rendu possible par les stimulations environnementales : chez l'animal, le paradigme de l'EE permet d'augmenter les stimulations sensorielles et sociales au quotidien ; chez l'humain, la recommandation d'avoir une vie riche en expériences diverses, que ce soit sur le plan intellectuel, sportif ou social par exemple, permet de former une réserve cognitive. D'autres études ont privilégié une autre approche plus directe, à savoir générer directement des oscillations gamma dans le cerveau, afin d'en étudier les potentiels effets bénéfiques chez les souris MA, mais également chez les patients.

# V. Environnement enrichi

## A. La réserve cognitive chez l'humain

Il existe à ce jour très peu de moyens permettant de lutter efficacement contre la MA. Cependant, et dans un cadre pathologique plus large que cette seule maladie, de nombreuses études s'intéressent à un mécanisme endogène de notre cerveau qui permettrait de diminuer les risques ou de ralentir la progression des maladies neurodégénératives : la « réserve cognitive ». Cette ressource repose sur le fait que le cerveau peut compenser différentes lésions ou affections cérébrales en utilisant des réseaux neuronaux préexistants, ou en activant de nouvelles connexions neuronales. Ce concept est à différencier de la « réserve cérébrale », qui quantifie en quelque sorte la matière neurale disponible pour le fonctionnement cérébral, détectable par IRM (volume intracrânien, épaisseur et surface du cortex, voire l'efficacité des connexions entre régions cérébrales). La réserve cognitive se construirait tout au long de la vie des individus, mais c'est dans les 25 premières années que le processus serait le plus déterminant. La réserve cognitive semble être instaurée selon les études par différents facteurs tels que le niveau d'éducation, la pratique de loisirs ou d'activités physiques, mais également l'implication dans son travail et ses liens sociaux (Stern, 2009 ; Bezzina & Rampon, 2013 ; Mistridis et al., 2017 ; Lee et al., 2018). Pour donner un exemple, un individu avec moins de 8 années d'éducation a 2,2 fois plus de risque de développer une forme de démence (Stern, 2009). Ces ressources cérébrales sont donc autant de facteurs permettant de diminuer le risque d'atteintes cognitives, mais également de compenser les effets de ces atteintes une fois déclarées (**Fig.47**). En effet, les individus présentant une forte réserve cognitive recrutent davantage de réseaux neuronaux, ainsi que des réseaux alternatifs, permettant ainsi de soutenir l'hypothèse que les patients pourraient utiliser ces réseaux comme un mécanisme de compensation lors du décours de la pathologie (Stern et al., 2000).

Lorsque l'on s'intéresse aux substrats neuronaux qui sous-tendent la réserve cognitive, on utilise en expérimentation animale, et notamment chez le rongeur, un paradigme permettant de reproduire en partie la mise en place d'une forte réserve cognitive : l'environnement enrichi (EE).

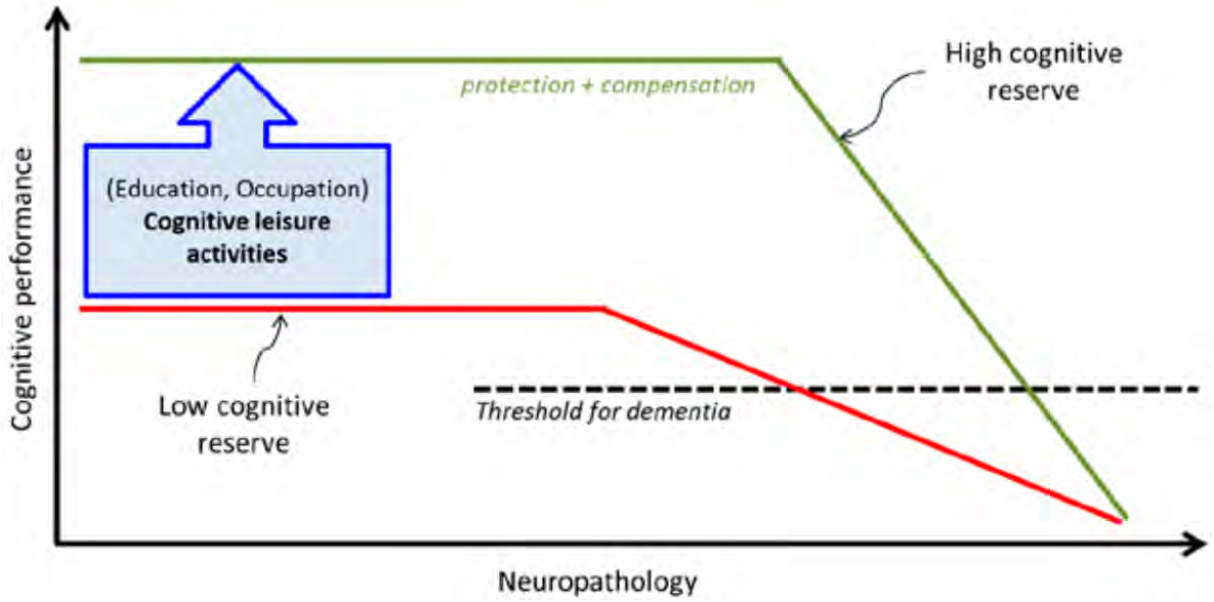



*Figure 47 Illustration schématiques des différents degrés de réserve cognitive permettant de retarder l'apparition des différentes formes de démence,* via *les processus de protection et de compensation neuronale (d'après Mistridis et al., 2017).*

### B. Stimulation de la réserve cognitive en expérimentation animale : le paradigme d'environnement enrichi

Dans l'expérimentation animale, le concept d'expérience émerge dans les années 1940, à travers le travail de Donald Hebb, un psychologue et neuropsychologue canadien. L'histoire populaire indique qu'il aurait rapporté des rats du laboratoire à ses enfants pour qu'ils jouent avec, et qu'il se serait aperçu que ces rats-là résolvaient ensuite des tests comportementaux plus facilement que les rats restés dans leur cage. Il en déduit que cette amélioration des capacités cognitives des rats ayant passé du temps avec ses enfants s'explique par le fait que ces animaux ont évolué dans un environnement plus riche de par les interactions multiples qu'ils pouvaient avoir, ainsi que la multitude de stimulations qu'ils pouvaient recevoir de par cet environnement. Cela a mené en 1964 à découvrir que l'enrichissement de l'environnement augmente le volume cérébral chez le rat (Diamond et al., 1964). Ce travail englobe une idée plus générale du rôle de l'expérience sur le développement du cerveau et les capacités cognitives (Brown & Milner, 2003).

Aujourd'hui, l'EE est devenu un paradigme expérimental permettant de générer une « expérience vécue » augmentée chez l'animal, en partilculier chez les rongeurs.

Même si ses composantes peuvent varier, l'EE se présente généralement en une grande cage d'hébergement, contenant de nombreux objets (jouets, structures) de différentes formes, tailles, couleurs, et constitués de différents matériaux (plastique, métal, verre, bois) eux-mêmes présentant différentes textures. Dans cet environnement, les animaux peuvent créer des nids, se cacher, grimper et interagir avec les objets (**Fig.48** ; Nithianantharajah & Hannan, 2006). Il est également important de considérer que cette procédure comprend souvent un enrichissement social, dans lequel on retrouve des individus provenant de cages différentes et parfois d'âges différents. Ainsi, le nombre total d'individus hébergés dans un EE est généralement plus important que lors des hébergements en condition standard.

Les études sur les effets neurobiologiques et comportementaux de l'EE sont très nombreuses. Cependant, il s'agit d'une manipulation incluant de nombreuses composantes, variables d'un laboratoire à l'autre, induisant une non-standardisation et donnant donc parfois des résultats qui s'opposent, menant ainsi des auteurs à s'interroger sur des protocoles de standardisation de l'EE (Sztainberg & Chen, 2010).

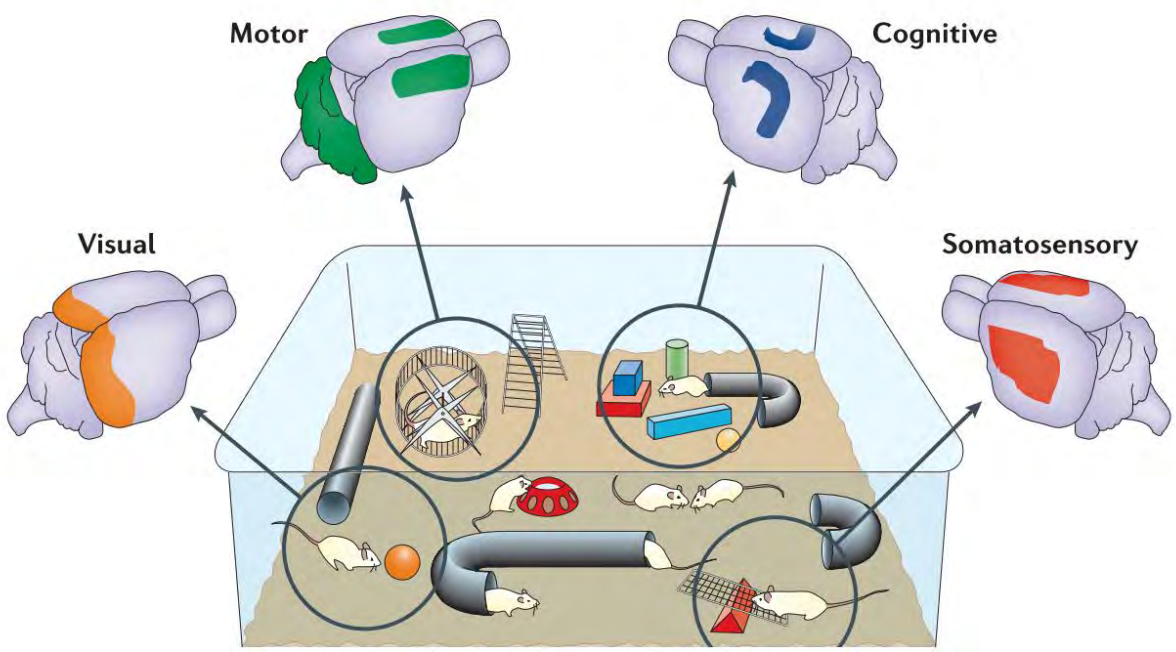



*Figure 48 Représentation de la configuration d'un EE, associant ses différents composants aux multiples stimulations sensorielles et cognitives (d'après Nitianantharajah & Hannan, 2006).*

## C. Effets principaux de l'environnement enrichi chez l'animal

Lors des expérimentations utilisant l'EE, les animaux sont le plus souvent comparés à un groupe témoin vivant dans des cages standards, ou bien l'étude compare les évolutions possibles de l'animal avant et après un séjour en EE (**Fig.49** ; Nithianantharajah & Hannan, 2006 ; Kempermann, 2019). Les principaux effets de l'EE peuvent être étudiés sur les modèles murins, où l'on peut retrouver des effets physiologiques sur l'état interne de l'animal, comme une diminution du stress et de l'anxiété (Benaroya-Milshtein et al., 2004), liée notamment à une augmentation du niveau de sérotonine extracellulaire et une surexpression des récepteurs et transporteurs sérotoninergiques dans l'amygdale (Varman et al., 2015). Plus largement, l'EE est souvent utilisé dans un objectif d'améliorer les fonctions cognitives, tel un moyen de stimuler la réserve cognitive, dans les processus de vieillissement naturel (Bennet et al., 2006 ; Mora et al., 2007), mais également dans des conditions pathologiques comme la MA (Verret et al., 2013 ; Fisher, 2016), la maladie de Parkinson (Tillerson et al., 2003), ou encore la dépression (Mahati et al., 2016).

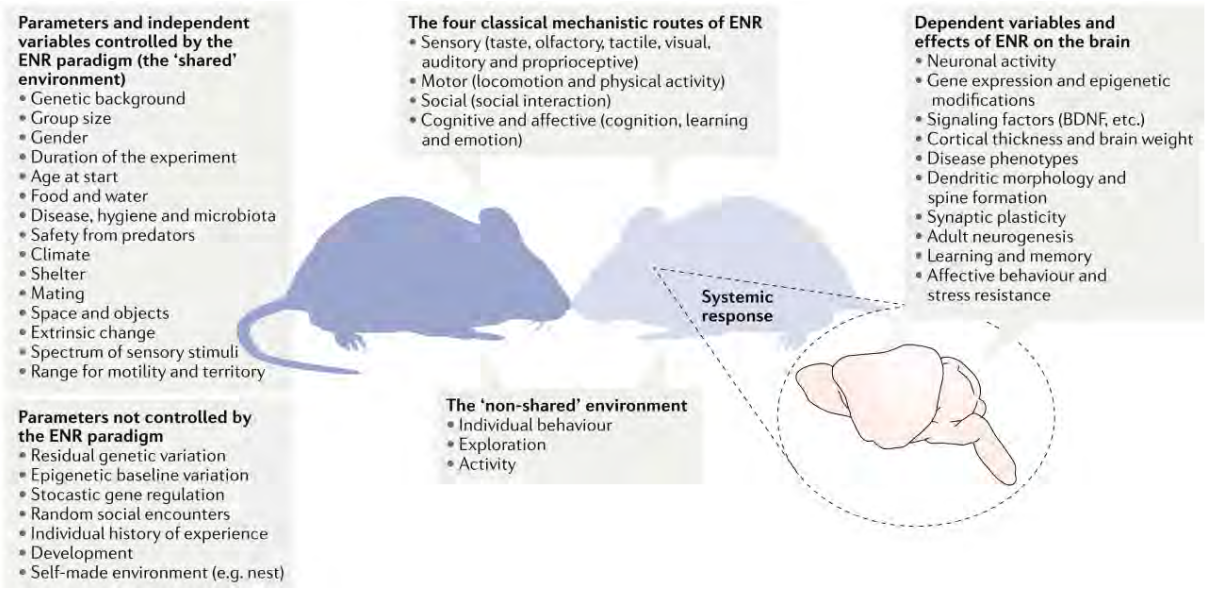



*Figure 49 Synthèse de l'ensemble des paramètres, des mécanismes et des variables dépendantes et indépendantes de l'environnement enrichi. Dans les encadrés de gauche, on retrouve les paramètres qui peuvent être définis par l'expérimentateur, et ceux que l'on ne peut pas contrôler. Les individus placés en EE vont recevoir différentes stimulations sensorielles, motrices mais également cognitives et sociales, malgré le fait qu'une partie des interactions possibles sont également non-contrôlables. L'encadré de droite liste une partie des effets de l'environnement enrichi sur le cerveau des rongeurs (d'après Kempermann, 2019).*

De nombreuses études se sont intéressées aux mécanismes cérébraux qui pouvaient sous-tendre ces améliorations cognitives. On y retrouve des modifications

anatomiques dans diverses aires cérébrales, comme une augmentation de la taille du soma des neurones dans le cortex, mais également une augmentation de la densité neuronale, de la longueur des ramifications dendritiques, de la taille des synapses et du nombre de cellules gliales (Mohammed et al., 2002). L'EE permet également une accélération de la maturation de l'acuité visuelle des souris (Sale et al., 2009), avec des niveaux de BDNF dans le cortex visuel plus élevé chez les animaux EE que chez les animaux restés en cage standard, et ce dès le septième jour post-natal (Cancedda et al., 2004). En accord avec les résultats comportementaux sur la diminution de l'anxiété et du stress, on mesure une diminution de l'expression de cFos suite à un test aversif (incluant des chocs électriques) dans l'amygdale médiane des rats placés en EE, traduisant le fait que les animaux restés en cage standard mettent plus de temps que les animaux en EE à se remettre d'une expérience stressante (Nikolaev et al., 2002). Enfin, plusieurs études supportent l'idée qu'il y aurait des effets transgénérationnels de l'EE sur la plasticité synaptique et la formation de la mémoire, ainsi qu'une diminution des comportements moteurs répétés, associés à l'autisme (Arai & Feig, 2011 ; Bechard & Lewis, 2016). Ce dernier élément renforcerait encore plus l'idée d'une vie riche et pleine d'expériences variées comme facteur de prévention contre les maladies neurodégénératives.

### D. Effets de l'environnement enrichi sur l'hippocampe.

C'est dans la structure hippocampique qu'une large partie de la littérature se concentre concernant les effets de l'EE dans les modèles murins.

Parmi les effets de l'EE sur l'hippocampe, l'un des larges champs d'étude est la neurogenèse adulte. C'est en 1997 que Kempermann et ses collaborateurs démontrent l'effet bénéfique d'un séjour en EE sur le nombre de neurones néoformés dans l'hippocampe (Kempermann et al., 1997). Suite à un séjour en EE, on observe des modifications de l'expression de gènes du DG, notamment des facteurs de transcription comme NeuroD1, régulateur de la neurogenèse adulte (Zhang et al., 2018). L'effet de l'EE peut en partie être attribué à une augmentation de l'activité locomotrice des souris, et lorsqu'il est couplé à une roue d'activité, on peut observer des augmentations des niveaux de BDNF, ainsi qu'une amélioration de la prolifération et de la survie des nouveaux neurones hippocampiques (Kobilo et al., 2015). Ces effets bénéfiques sur la neurogenèse pourraient à leur tour sous-tendre les

améliorations observables sur les capacités cognitives des animaux (Garthe et al., 2016), car ces nouveaux neurones possèdent une grande plasticité, permettant l'encodage de nouvelles informations (cf Introduction II.B.1) (Deng et al., 2010). Par ailleurs, l'EE permet d'induire une neurogenèse chez les individus âgés (souris de 20 mois, Kempermann et al., 1998), sous-tendant l'amélioration des fonctions cognitives associées (Kempermann et al., 2002 ; Bruel-Jungerman et al, 2005).

Au-delà de son impact sur la neurogenèse adulte, le séjour en EE induit divers effets sur l'activité neuronale de l'hippocampe et les processus cognitifs qui en découlent. Chez le rat, on mesure un renforcement des potentiels postsynaptiques excitateurs locaux (fEPSPs) dans le DG, 3 à 5 semaines après l'EE (Irvine et al., 2006). De façon intéressante, les synapses de CA3 à CA1 semblent résister à cette facilitation synaptique dans le cas où le renouvellement des objets de l'EE ne se fait que toutes les 2 à 3 semaines (Ohline & Abraham, 2019). En revanche, si le changement est réalisé tous les jours, on observe une amélioration de la transmission synaptique de CA3 vers CA1 (Foster et al., 2000). Dans CA1, on mesure une augmentation de l'activité des cellules pyramidales enregistrée en patch-clamp suite à un EE de 4 à 5 semaines (Malik & Chattarji, 2012). Cependant, avec des durées d'EE plus longues (8 à 12 semaines), cette augmentation de l'activité neuronale dans l'hippocampe n'est plus mesurable (Eckert et al., 2010).
Ces modifications de l'activité des neurones de l'hippocampe, en particulier de CA1, sont également associées à des effets bénéfiques sur la mémoire spatiale des animaux (Eckert et al., 2010). Ce phénomène serait dû au « remapping » des cellules de lieu qui serait plus important après un EE et pourrait contribuer aux effets bénéfiques sur la mémoire spatiale (Bilkey et al., 2017). Enfin, dans l'aire CA1, on observe un renforcement de la LTP dans une majorité d'études répertoriées dans la revue de Ohline & Abraham, 2019. Ces effets sur la LTP sont particulièrement consolidés/renforcés lorsque l'EE est couplé à une roue d'activité pour les animaux (Vivar et al., 2013). De plus, l'EE peut contrecarrer les déficits de LTP et LTD chez les individus âgés (van Praag et al., 2000 ; Kumar et al., 2012).

Ces modifications et restaurations des différents processus de plasticités hippocampiques pourraient donc sous-tendre la réserve cognitive, et pourraient

contrecarrer les effets du vieillissement sur les processus cognitifs, mais également les altérations liées aux maladies neurodégénératives comme la MA.

### E. Effets de l'environnement enrichi sur les modèles Alzheimer

De nombreuses études ont permis de comprendre que l'étiologie de la MA est associée à des facteurs génétiques, mais également à l'environnement (**Fig.50**).

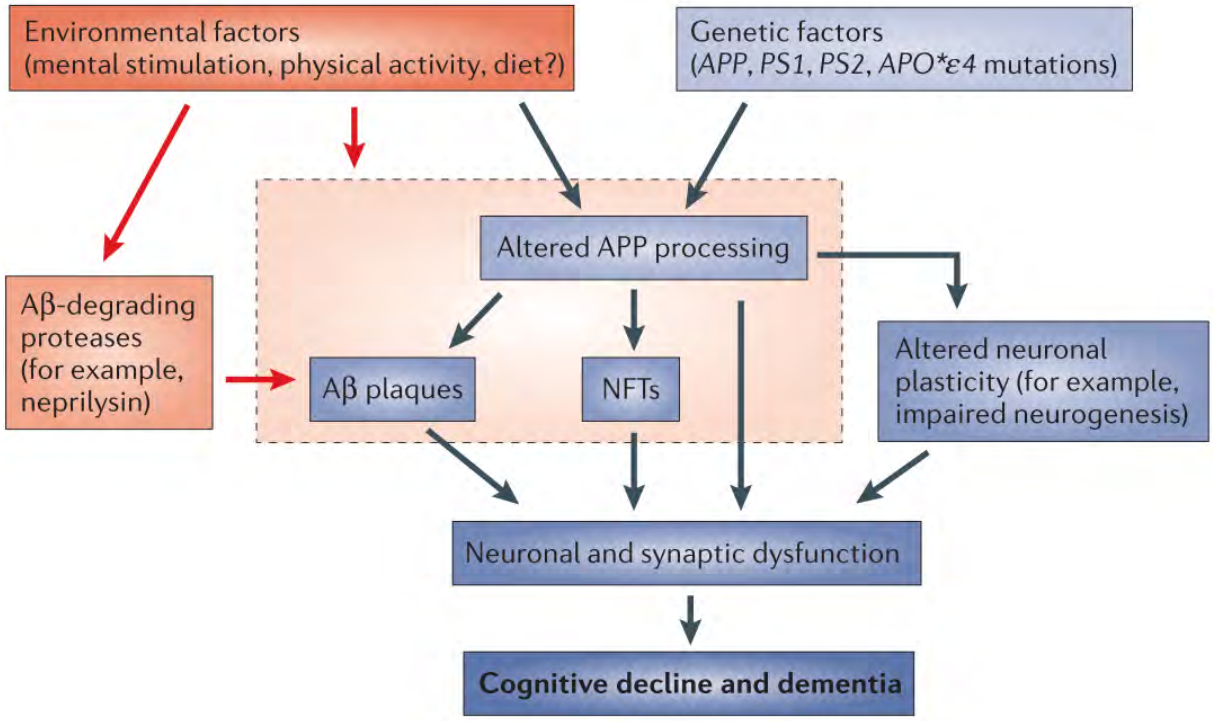



*Figure 50 Représentation schématique de l'interaction entre gènes et environnement dans l'étiologie de la maladie d'Alzheimer. Les encadrés rouges sont associés aux facteurs environnementaux, alors que ceux en bleu sont associés aux facteurs génétiques. La zone pointillée désigne les facteurs sur lesquels l'environnement peut avoir un effet bénéfique sur les différents stades de la maladie (d'après Nithianantharajah & Hannan, 2006).*

Concernant les effets d'un séjour en EE sur la présence de plaque Aβ des modèles animaux de la pathologie, il existe des résultats divergents (Nithianantharajah & Hannan, 2006). Ainsi, après un séjour dans l'EE, la surface cérébrale occupée par les plaques amyloïdes peut être stable dans l'hippocampe et le cortex pariétal des souris APPswe (Arendash et al., 2004). La surface occupée par les plaques diminue également chez APPswe X PS1ΔE9 (Lazarov et al., 2005) ; alors qu'elle augmente dans les études de Jankowsky et al., 2003 ; 2005, bien que réalisées sur le même modèle. Dans les études plus récentes, il semblerait que les niveaux d'Aβ diminuent après un EE dans les modèles 5XFAD (Nakano et al., 2020), et Tg2576 où l'on observe

une réduction de la surface occupée par les plaques séniles dans le télencéphale (Verret et al., 2013), ainsi qu'une diminution de la présence d'Aβ40 et Aβ42 solubles (Gerenu et al., 2013). On retrouve également une diminution de la dégénérescence des astrocytes dans l'hippocampe de souris 3xTg-AD (Rodríguez et al., 2013).

Cependant, même si les conclusions sur les effets de l'EE sur l'amyloïdose peuvent varier, on constate toujours une amélioration des fonctions cognitives des animaux modèles de la pathologie lorsqu'ils sont placés dans un EE (Nithianantharajah & Hannan, 2006). Dans le modèle Tg2576, ces améliorations sont d'autant plus importantes lorsque les animaux sont placés dans l'EE à leur jeune âge, et donc dans les stades précoces de la maladie, et ces effets bénéfiques peuvent perdurer jusqu'à au moins 8 mois après avoir remis les animaux dans leur condition d'hébergement standard (Verret et al., 2013). Cette approche préventive du séjour en EE est un point central de ces études : l'EE permettrait ainsi de modérer les troubles liés à la pathologie (Montarolo et al., 2013 ; Verret et al., 2013 ; Li et al., 2021) avec notamment des effets bénéfiques sur la mémorie spatiale avant même l'apparition de l'amyloïdose (Cao et al., 2017).

### F. Environnement enrichi et interneurones PV/PNN

D'après Donato et al., 2013, l'EE joue un rôle important dans le remodelage des interneurones PV et de leur PNN et donc sur les processus mnésiques qui en découlent. De plus, l'EE permettrait des remodelages neuronaux qui sous-tendent des améliorations à long-terme des fonctions cognitives dans divers modèles pathologiques.

Dans le cadre des accidents vasculaires cérébraux, un nombre réduit de PNN (aggrecan en particulier) est observé autour des interneurones PV après un EE, ainsi qu'une régulation à la hausse des MMP-9 chez le rat et l'humain (Quattromani et al., 2018). Dans les modèles d'épilepsie, l'EE permet de diminuer les convulsions et restaurer l'architecture du sommeil, en améliorant par exemple, la durée du sommeil paradoxal chez le rat (Nair et al., 2022). Enfin, dans les modèles d'obésité, l'EE permet de restaurer le nombre de neurones PV dans les bulbes olfactifs, et reduit les troubles de l'olfaction.

Dans le modèle Tg2576 de la MA, un séjour de 10 semaines en EE diminue le nombre de neurones PV et de PNN quantifiables dans l'hippocampe de souris non-transgéniques (NTg), alors que l'on observe une augmentation de ces cellules dans les souris MA (Cattaud et al., 2018). Le même phénomène est observé chez des souris déficientes pour la tenascin-C ou MMP-9. En effet, l'EE entraine une diminution du marquage PNN accompagnée d'une diminution de la taille des neurones GABAergiques, et une augmentation de la taille et du nombre des terminaisons glutamatergiques chez les souris sauvages, alors que l'EE augmente le marquage PNN chez les souris déficientes en tenascin-C (Stamenkovic et al., 2016).

L'ensemble de ces travaux démontrent que l'EE modifie les interneurones PV et leur PNN, et que l'étude de ces remodelages peut présenter un intérêt dans plusieurs pathologies. Les stimulations sensorielles et cognitives induites par l'EE permettent de restaurer la présence d'interneurones PV dans l'hippocampe dans plusieurs modèles pathologiques. Comme vu précédemment (cf Introduction III.B.1) les interneurones PV sont associés à l'émergence des oscillations gamma, dont la présence coïncide avec le bon fonctionnement des processus cognitifs (Verret et al., 2012). L'EE semble ainsi contribuer au remodelage des interneurones PV, ce qui renforcerait l'activité gamma dans le cortex et l'hippocampe (Shinohara et al., 2013).

### G. Les stimulations gamma pour soigner Alzheimer ?

Comme vu précédemment (cf Introduction III.B.1), l'émergence des oscillations gamma est associée à la perception et à l'apprentissage conscient et engagé d'un individu, et est sous-tendue par le bon fonctionnement des interneurones PV (Cardin et al., 2009 ; Sohal et al., 2009). De plus, restaurer l'activité des neurones PV, et donc les oscillations gamma qui en découlent, permet d'améliorer les performances mnésiques chez les individus MA (Verret et al., 2012).

Plusieurs études ont utilisé des stimulations optogénétiques des neurones PV à 40Hz afin de provoquer l'apparition d'oscillations gamma dans le cortex des animaux modèles de la MA, et ont observé que cela permettait de stimuler la microglie et d'atténuer la charge amyloïde des souris 5xFAD âgées de 3 mois (**Fig.51** ; Aron & Yankner, 2016 ; Iacarrino et al., 2016). Plus précisemment, l'étude du groupe de Li-Hue Tsai au MIT montre que les stimulations optogénétiques à 40Hz dans

l'hippocampe de souris 5xFAD/PV-Cre induisent des changements de morphologie des cellules microgliales, et en particulier une augmentation de taille de leur soma (Iacarrino et al., 2016).

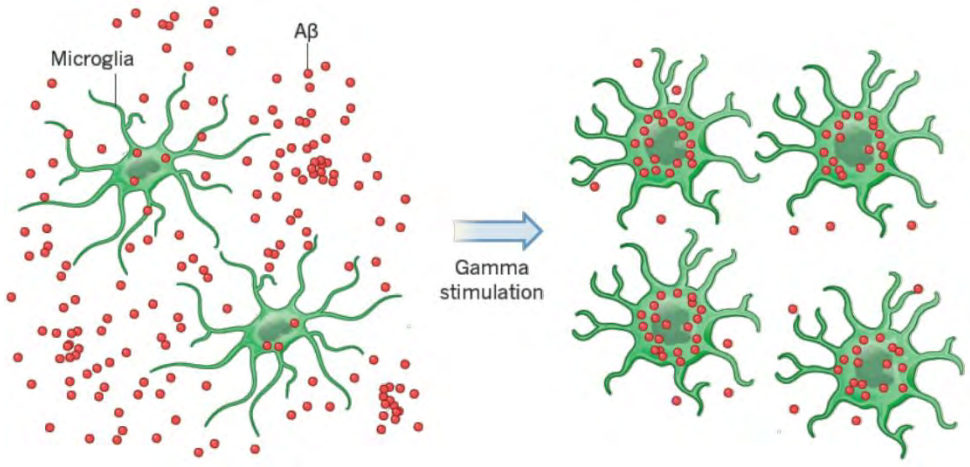



*Figure 51 La stimulation des interneurones PV à 40Hz permet de recruter la microglie afin d'engager la clairance des dépôts de protéines amyloïdes-β (d'après Aron & Yankner, 2016).*

Une autre approche expérimentale utilisée dans plusieurs études vise à provoquer l'apparition d'oscillations gamma par stimulations sensorielles, visuelles et auditives. Concernant les stimulations visuelles, les stimulations lumineuses induisent une fréquence de l'activité cérébrale équivalente à la fréquence des stimulations : c'est le phénomène de « photic driving » qui a pu être démontré il y a quelques décennies (Regan, 1989 ; Rager & Singer, 1998), et qui est confirmé lors des expériences sur le sujet chez l'humain (Herrmann, 2001 ; Pastor et al., 2002 ; Lustenberger et al., 2018) et chez la souris (Iaccarino et al., 2016 ; Singer et al., 2016 ; Martorell et al., 2019).

Ce n'est que récemment que le mécanisme d'entrainement de l'activité cérébrale vers les fréquences gamma *via* les stimulations sensorielles à 40 Hz est étudié, bien que le phénomène soit connu depuis longtemps. L'implication des interneurones dans ce mécanisme, et notamment celui des interneurones PV, reste encore à approfondir (**Fig.52**). Il est intéressant de noter que, dans l'aire CA1, les oscillations gamma générées par des stimulations multimodales, présentent des similitudes mécanistiques avec le gamma évoqué visuellement lors d'une tâche d'attention dirigée dans le cortex préfrontal (Kim et al., 2016 ; Adaikkan et al., 2019b). Les stimulations visuelles permettent par exemple, d'induire des changements vasculaires avec une augmentation du flux sanguin chez l'individu sain (observés par TEP, Pastor et al., 2003). Des dispositifs de stimulations multi-sensorielles non-invasifs ont donc été

développés dans un but thérapeutique, permettant également d'étudier les effets de la restauration des oscillations gamma chez les individus atteints de maladies neurodégénératives, comme la MA.

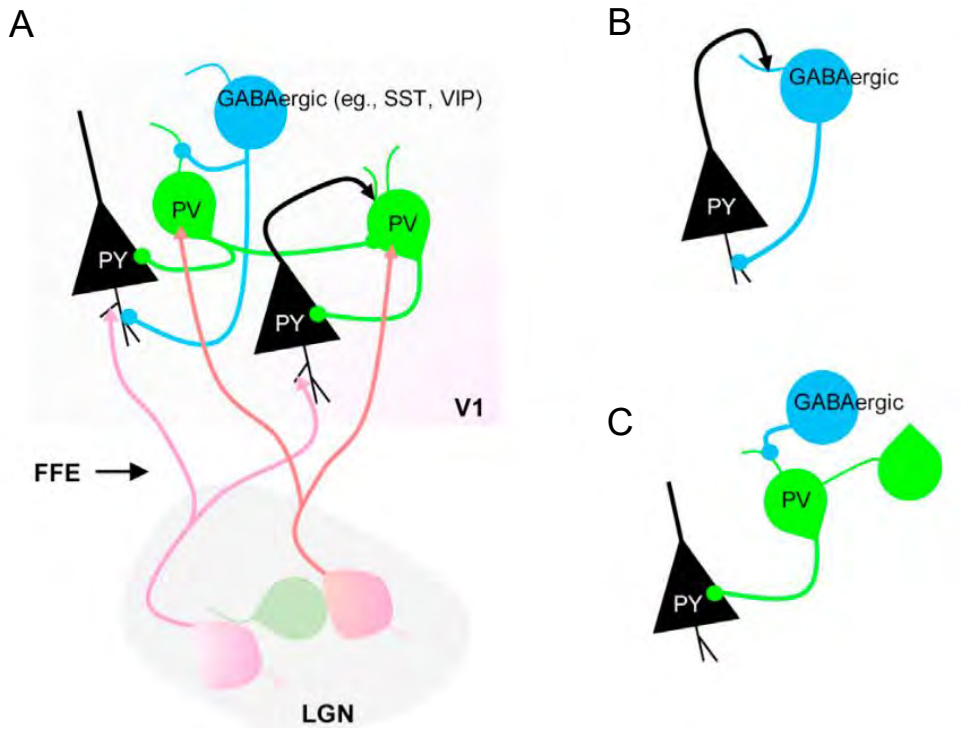



*Figure 52 Schéma explicatif hypothétique de l'implication des neurones PV dans l'apparition d'oscillations gamma lors de stimulations lumineuses à 40Hz* (A) *Les stimulations visuelles pourraient générer des activations neuronales « feed-forward » synchrones de la rétine vers le corps genouillé latéral (LGN) puis vers le cortex visuel primaire (V1). Ces excitations rythmiques à 40 Hz (FFE : feedforward excitation) pourraient activer les cellules excitatrices ou inhibitrices de V1. (B) Dans ce modèle, la FFE sur les neurones pyramidaux (PY) excitateurs génère des pics d'activité, qui déclenchent à leur tour des pics synchronisés avec les interneurones interconnectés, qui peuvent à leur tour effectuer une boucle de rétroaction et inhiber les neurones PY. Lorsque l'inhibition diminue, les neurones PY déchargent à nouveau, générant ainsi l'activité gamma. (C) Si la FFE active les interneurones PV, ils pourraient alors générer une FFI (feed foward inhibition) sur les neurones PY. La FFE pourrait également activer d'autre interneurones interconnectés. Ces décharges d'interneurones permettraient de générer des potentiels postsynaptiques inhibiteurs synchrones dans les neurones post-synaptiques, et ces interactions entre les interneurones inhibiteurs sont suffisantes pour produire des oscillations gamma (d'après Adaikkan & Tsai, 2019a).*

Ainsi, les travaux du groupe de Li-Hue Tsai indiquent qu'exposer des souris modèles de la MA à des stimulations lumineuses à 40Hz pendant 1h/jour sur une semaine (protocole détaillé dans Singer et al. 2016) induit les mêmes modifications de la microglie dans le cortex visuel que celles obtenues par les stimulations optogénétiques des neurones PV (**Fig.53** ; Iaccarino et al., 2016). De façon intéressante, une diminution du taux d'Aβ40 et Aβ42 est mesuré dans le cortex visuel suite aux stimulations lumineuses à 40 Hz, mais pas dans l'hippocampe (Iaccarino et al., 2016).

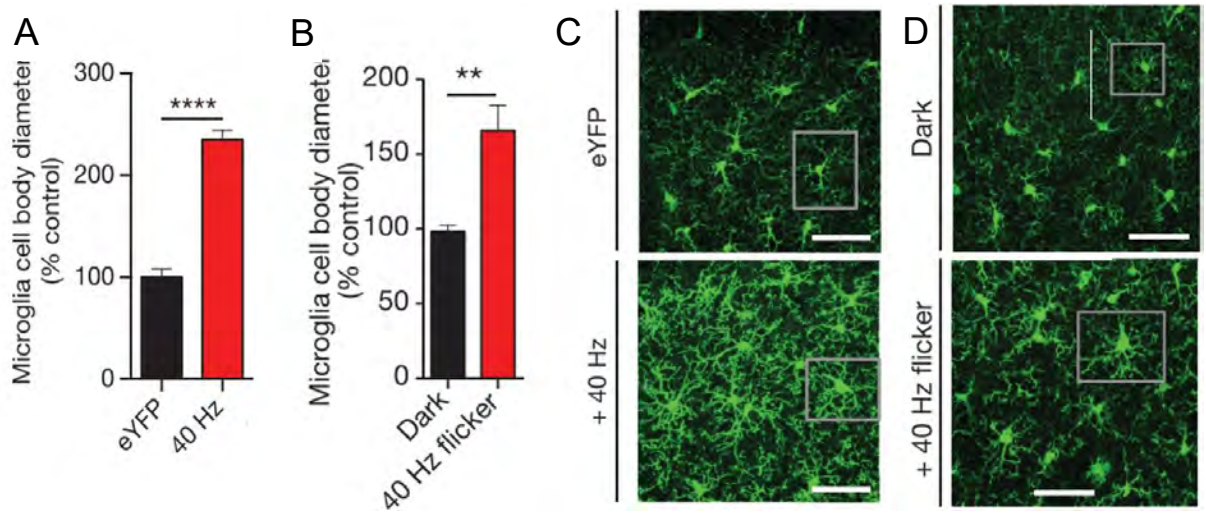



*Figure 53 Augmentation de la taille du corps cellulaire des cellules microgliales suite à des stimulations optogénétiques à 40Hz dans l'hippocampe (A) ou dans le cortex visuel suite à des stimulations lumineuses à 40Hz (B) chez les souris 5xFAD/PV-Cre. Augmentation du nombre de cellules microgliales dans l'hippocampe (C) et dans le cortex visuel (D) suite aux stimulations optogénétiques et lumineuses, respectivement (d'après Iaccarino et al., 2016).*

En poursuivant cette idée, ce même groupe a mis en place des stimulations multimodales en additionnant des stimulations auditives aux stimulations lumineuses. Dans cette configuration, les auteurs observent un recrutement de la microglie et une diminution de l'Aβ jusque dans l'hippocampe, ainsi que dans le cortex préfrontal (Martorell et al., 2019). De plus, les souris 5xFAD présentent alors une amélioration des fonctions cognitives, avec une amélioration de la mémoire spatiale dans un test de localisation d'objets et dans la piscine de Morris, mais aussi de la mémoire de reconnaissance dans le test de reconnaissance d'objets. Enfin, les auteurs rapportent également une vasodilatation dans le cortex auditif et dans l'aire CA1 après des stimulations auditives dans les fréquences gamma (Martorell et al., 2019).

La stimulation cérébrale avec cette approche non-invasive permet donc d'observer des améliorations cognitives sur des souris modèles de la MA, associées à une restauration de l'activité gamma, qui est réduite chez les patients MA (Koenig et al., 2005). De ces travaux découlent aujourd'hui des études cliniques qui cherchent à transposer l'utilisation de ce système chez l'humain. Ces études, portées par la collaboration entre les auteurs des articles sur les souris 5xFAD et une entreprise co-fondée (Cognito therapeutics), sont actuellement en phase 2, et montrent des effets bénéfiques avec une diminution de l'atrophie cérébrale et des améliorations cognitives chez les patients humains (https://cognitotx.com/ ; Chan et al., 2021). Des projets

comme Alzlife (https://www.alz.life/) ont mis en place une application mobile, permettant de mêler ces stimulations auditives et visuelles à 40Hz à des jeux de réflexion. Cette idée d'une thérapie non-invasive et disponible chez soi est une évolution intéressante quant à la lutte contre la pathologie.

Ce que l'on observe avec les effets bénéfiques d'une restauration des oscillations gamma s'apparente à la recommandation des professionnels de santé d'entrainer notre cerveau, en ayant dans notre vie quotidienne, des sources d'expériences variées qui stimulent également ces oscillations gamma (Howard et al., 2003 ; Fell et al., 2006 ; van Vugt et al., 2010). Ces expériences vécues agrémentent notre réserve cognitive, et cette conceptualisation est aujourd'hui l'un des seuls moyens connus pour retarder l'apparition de la pathologie chez l'humain. Difficile à mesurer et organiser dans la vie d'un individu, générer directement l'activité cérébrale associée avec une méthode non-invasive telle que les stimulations visuelles et auditives à 40Hz pourrait donc présenter un intérêt majeur dans les projets de recherches à venir.

# OBJECTIFS

Dans le cadre de la MA, on observe des perturbations de la balance E/I, traduisant de nombreuses altérations de l'activité des interneurones inhibiteurs (Palop et al., 2006 ; Palop et al., 2007 ; Verret et al., 2012 ; Bezzina et al., 2015b ; Reyes-Marin & Nuñez, 2017). Ces altérations conduisent à des perturbations de l'activité oscillatoire cérébrale, comme des fluctuations aberrantes des oscillations gamma, qui sont associées aux fonctions cognitives (Engel & Singer, 2001 ; Buzsáki & Draguhn, 2004 ; Fries, 2009), comme la mémoire de travail (Howard et al., 2003) ou la mémoire déclarative (Fell et al., 2006). Les oscillations gamma ont pour substrat les interneurones PV (Cardin et al., 2009 ; Sohal et al., 2009), dont le nombre de cellules détectables est diminué dans l'hippocampe de souris modèles de la MA (Cattaud et al., 2018), et également chez l'humain (Verret et al., 2012). Le lien causal entre le fonctionnement des interneurones PV et les fonctions cognitives dans le cadre de la MA est illustré par le fait que la restauration fonctionnelle des neurones PV chez les souris hAPPJ20 permet d'augmenter les courants synaptiques inhibiteurs ainsi que la puissance du gamma, résultant également en une amélioration des fonctions mnésiques (Verret et al., 2012).

Le fonctionnement des interneurones PV joue donc un rôle crucial dans les fonctions cognitives, et leur activité va dépendre de leur maturation, ainsi que de leur matrice extracellulaire, les PNN. La formation de cette matrice est nécessaire à la capacité à former une mémoire (Gogolla et al., 2009), et est dépendante de l'expérience vécue par l'individu (Hensch, 2014). Expérimentalement, il est possible de placer les animaux dans un contexte contrôlé permettant de multiplier les expériences vécues par les individus : l'environnement enrichi, ou EE (Kempermann, 2019). Ce paradigme permet dans notre cas d'étudier la plasticité dépendante de l'expérience des interneurones PV. En effet, l'EE modifie le niveau d'activité des interneurones PV de l'hippocampe, permettant ainsi une désinhibition des neurones pyramidaux, facilitant les nouveaux apprentissages (Donato et al., 2013). Les PNN présents autour des interneurones PV diminuent également chez la souris saine (2 et 6 mois) lors d'un séjour en EE (Favuzzi et al., 2017 ; Cattaud et al, 2018). Chez les souris Tg2576, on observe une augmentation du nombre de cellules PV+ et PV+/PNN+ quantifiables dans l'hippocampe à l'âge de 6 mois (Cattaud et al., 2018). En parallèle, une autre étude a placé des souris Tg2576 en EE pendant 10 semaines à l'âge de 3 (pas de déclin cognitif), 5 (légères altérations) et 10 (fortes altérations) mois et a testé les capacités

mnésiques de ces animaux à 13 mois. Les souris placées en EE à l'âge de 3 ou 5 mois montrent une restauration des fonctions cognitives avec des performances semblables aux souris contrôles, et une restauration largement diminuée pour celles placées en EE à l'âge de 10 mois (Verret et al., 2013).

Ainsi, le modèle Tg2576 a permis de montrer qu'un séjour en EE permet une augmentation du nombre de cellules PV+ et PV+/PNN+ dans l'hippocampe à la sortie de ce dernier, et qu'il permet également une amélioration des fonctions cognitives, et cela plusieurs mois après que les animaux soient retournés dans leur condition d'hébergement standard. Si le lien entre l'augmentation du nombre de neurones PV/PNN à la sortie de l'EE et l'amélioration des fonctions cognitives à long terme est fortement sous-entendu, la causalité entre ces deux évènements demeure à être démontrée.

Le but de mes travaux de thèse a été **d'établir un lien de cause à effet entre la stimulation des interneurones PV et/ou la restauration de leur présence dans l'hippocampe et les bénéfices cognitifs chez les souris Tg2576**.

1) **Les effets bénéfiques de l'EE sur les capacités cognitives des souris Tg2576 sont-ils liés à la restauration du nombre d'interneurone PV et des PNN dans l'hippocampe ?**

La réserve cognitive est l'un des seuls moyens connus qui permettent de retarder l'apparition des troubles cognitifs liés à la MA. Dans l'expérimentation animale, on utilise l'EE comme manipulation pour générer de nouvelles expériences vécues par les individus. S'enrichir de ces évènements, notamment lors de périodes sensibles aux entrées sensorielles permettrait de stimuler et remodeler le réseau PV/PNN afin de retarder les troubles cognitifs.

Afin de le démontrer, nous avons placé des souris Tg2576 de 5 mois dans un EE pour une durée de 10 jours. La veille, les souris ont reçu une injection intra hippocampique de chondroïtinase-ABC (ChABC), un enzyme qui dégrade les PNN, dans l'aire CA1 afin de limiter le remodelage des interneurones PV pendant cet EE. Après cette période, les souris regagnent leur cage standard pour une durée de 20 jours. Leurs

capacités cognitives sont ensuite évaluées dans un test de mémoire spatiale, dépendant de CA1, et un test de mémoire sociale, dépendant de CA2. Nous faisons l'hypothèse selon laquelle limiter le remodelage des PV/PNN dans CA1 empêche les effets bénéfiques de l'EE sur la mémoire spatiale, ainsi que l'augmentation du nombre de cellule PV+ et PV+/PNN+ dans cette région, mais préserve les effets bénéfiques de l'EE concernant CA2.

### 2) Les stimulations sensorielles multimodales à 40Hz miment-elles les effets de l'EE sur les neurones PV et les performances de mémoire des souris Tg2576 ?

Les bénéfices cognitifs de l'EE pourraient être sous-tendus par la stimulation et le remodelage des interneurones PV. Il est possible de stimuler directement les interneurones PV en utilisant le phénomène de « photic driving » (Herrmann, 2001), connu pour générer, dans le cortex visuel par exemple, une réponse neuronale dont la fréquence de décharge correspond à la fréquence de stimulation. Cette stimulation pourrait mimer les effets de l'EE sur les interneurones PV, permettant de générer directement des oscillations gamma dans le cerveau, et pourrait donc améliorer les capacités cognitives des individus MA.

En s'appuyant sur les travaux du groupe de la neurobiologiste Li-Huei Tsai (Singer et al, 2016), les stimulations lumineuses à la fréquence de gamma (40Hz) permettent de réduire la charge amyloïde dans le cortex visuel de souris 5xFAD (Iaccarino et al., 2016). Lorsque cette stimulation lumineuse est combinée à une stimulation auditive (toujours à 40Hz), les auteurs observent une diminution d'Aβ dans l'hippocampe, ainsi que des améliorations cognitives lors de tests de mémoire spatiale (Martorell et al., 2019). L'implication des interneurones PV dans ce processus semble donc être un point intéressant à développer (Adaikkan et al., 2019a), en s'interrogeant sur les similarités entre le remodelage des interneurones PV suite à un EE ou avec des stimulations gamma à 40 Hz. Nous avons reproduit le dispositif utilisé par les auteurs (Singer et al., 2016), afin d'observer si nous détections des modifications des interneurones PV dans le cortex visuel de souris Tg2576. Nous avons également contrôlé l'effet de notre dispositif sur la microglie, et pratiqué des EEG afin d'observer

si les stimulations 40Hz induisaient des modifications de l'activité gamma du cerveau des animaux.

3) **Quelle est la conséquence des conditions expérimentales testées (EE, ChABC, NRG1) sur les modifications synaptiques des neurones PV et la structure des PNN dans l'hippocampe des souris NTg et Tg2576 ?**

Le remodelage des interneurones PV est associé à des modifications synaptiques et des changements structuraux des PNN. Les paradigmes expérimentaux permettant la restauration de ces interneurones—comme une injection de NRG1 ou l'EE chez les Tg2576—ou de leur altération—comme avec la ChABC chez les NTg—modifient la connectivité des interneurones PV et la structure des PNN. Il est donc intéressant de chercher à déterminer quels paramètres (connexions synaptiques et structures des PNN) sont sensibles aux interventions réalisées. En d'autres termes, les interneurones PV qui sont remodelés chez les souris Tg2576 après un EE ou une injection de NRG1, sont-ils similaires dans leur composition synaptique et dans l'organisation de la structure des PNN aux neurones PV des souris NTg ?

Pour répondre à cette question, nous cherchons à observer les remodelages des composants des PNN (protéoglycans), ainsi que les connexions synaptiques inhibitrices et excitatrices formées sur les neurones PV. Nous utilisons un dispositif de microscopie appelé RIM pour « Random Illumination Microscopy » (Mangeat et al., 2020), afin de quantifier puis d'analyser ces différents facteurs sur l'ensemble de nos conditions expérimentales (EE, ChABC, NRG1) chez les souris NTg et Tg2576.

# MÉTHODES

# I. Les souris Tg2576, modèles de la maladie d'Alzheimer

Dans cette étude, nous avons utilisé le modèle transgénique murin Tg2576 (Hsiao et al., 1996), largement décrit et fréquemment étudié parmi les différents modèles de la MA. Ces souris se caractérisent par une sur-expression hémizygote du gène humain de la protéine précurseur du peptide amyloïde (*hAPP*, isoforme 695) portant une double mutation identifiée dans une famille suédoise (APPSwe, Lys670→Asn, Met671→Leu), contrôlée par le promoteur du gène codant pour la protéine du prion de hamster. Le transgène sera donc exprimé constitutivement dans la plupart des tissus (foie, rein ; Van Ess et al., 2002), dont majoritairement le cerveau (Borchelt et al., 1996).

Dans notre animalerie, la lignée de souris Tg2576 est maintenue sous un fond génétique 50% C57Bl6 / 50% SJL, obtenue par croisements des souris Tg2576 mâles avec des femelles C57Bl6/SJL F1 (Charles River, L'Arbresle, France). La génération qui suit est génotypée par PCR, *via* prélèvement d'un bout de queue, afin de révéler la présence de la séquence d'ADN *hAPP* mutée. Après le sevrage, les souris non-transgéniques (NTg) et transgéniques (Tg2576) sont hébergées entre individus de même sexe (4 à 6 souris/cage) dans des cages en polycarbonate (32 × 16 × 14 cm). Dans l'animalerie, l'environnement contrôlé permet de maintenir les souris dans des conditions de température de 23°C ± 1°C, un cycle jour-nuit de 12h :12h débutant à 8h00, et un accès illimité à la nourriture et l'eau.

Le modèle Tg2576 présente l'avantage d'une évolution progressive de la maladie, permettant ainsi de travailler sur les stades précoces de la pathologie, ce qui nous pousse à utiliser ce modèle plutôt qu'un autre, où la pathologie se développe de façon plus agressive et précoce, comme les souris APPswe/PS1dE9 ou les Tg5xFAD (Garcia-Alloza et al., 2006 ; Oakley et al., 2006). Le modèle Tg2576 permet de suivre de façon longitudinale les différents marqueurs biologiques et les troubles cognitifs, afin d'ouvrir un champ de recherche prédictif et préventif de la maladie. Les souris Tg2576 font l'objet d'une littérature conséquente, et les différentes atteintes cognitives ainsi que les modifications cellulaires et moléculaires observées en fonction de l'âge des individus sont résumées dans le **Tableau 2**.

| Âge | Fonctions cognitives | | *Références* | Modifications cellulaires et moléculaires | *Références* |
|---|---|---|---|---|---|
| 1.5 mois | **Pas d'altération** | | - | Activité épileptiforme et hyperexcitabilité neuronale | *Bezzina et al., 2015b*<br>*Karn et al., 2016* |
| | | | | Augmentation de Aβ1-42 dans le DG | *Lee et al., 2012* |
| 3-4 mois | **Légère altération** | Localisation d'objets | *Duffy et al., 2015* | Diminution de la densité des épines dendritiques (CA1/DG) | *D'Amelio et al., 2010* |
| | | Conditionnement de peur au contexte | *Jacobsen et al., 2006*<br>*D'Amelio et al., 2010* | Expression ectopique de NPY | *Jacobsen et al., 2006*<br>*Bezzina et al., 2015b* |
| | | Alternance spontanée Labyrinthe en Y | *Holcomb et al, 1998* | Altération de la neurogénèse adulte | *Krezymon et al., 2013* |
| | | Mémoire spatiale Piscine de Morris | *Hsiao et al., 1996* | Vulnérabilité des mitochondries synaptiques (CA1) | *Balietti et al., 2013* |
| 7-9 mois | **Altération des fonctions cognitives** | Évitement passif | *King et al., 1999*<br>*Nobili et al., 2017* | Diminution du nombre d'interneurones PV | *Huh et al., 2016* |
| | | Conditionnement de peur au contexte | *Zhang et al., 2005* | Diminution du nombre de neurones DA (VTA) | *Nobili et al., 2017*<br>*Cordella et al., 2018* |
| | | Alternance spontanée Labyrinthe en Y | *Hsiao et al., 1996*<br>*King & Arendash, 2002*<br>*Stewart et al., 2011* | | |
| | | Mémoire spatiale Piscine de Morris | *Hsiao et al., 1996*<br>*Westerman et al., 2002*<br>*Neelima & Sandova, 2007*<br>*Stewart et al., 2011* | Diminution du taux d'ACh et des récepteurs muscariniques | *Ikarashi et al., 2004*<br>*Kim et al., 2019* |
| 11 mois et + | **Forte altération des fonctions cognitives** | Alternance spontanée Labyrinthe en Y | *King & Arendash, 2002*<br>*Stewart et al., 2011*<br>*Caccuci et al., 2008* | Diminution du taux de Calbindine | *Krezymon et al., 2013* |
| | | | | Augmentation de l'astrogliose + taux des cytokines pro-inflammatoires autour des plaques | *Apelt & Schliebs, 2001*<br>*Patel et al., 2005* |
| | | Mémoire spatiale Piscine de Morris | *Westerman et al., 2002*<br>*Stewart et al., 2011* | Mort cellulaire (DG) et hyperphosphorylation de tau autour des plaques | *Otth et al., 2002* |
| | | | | Dégénérescence des axones cholinergiques | *Lüth et al., 2003* |

*Tableau 2 Tableau des différentes altérations cognitives et cellulaires observables avec le modèle de souris Tg2576, en fonction de l'âge des individus.*

Les premières altérations de la plasticité cérébrale et les activités épileptiformes de ces animaux ont été mesurées dès l'âge de 1-2 mois. Les premiers troubles des capacités mnésiques se manifestent à 3 mois, et la mémoire se dégrade ensuite progressivement, permettant d'observer un statut cognitif différent sur des souris âgées de 3, 6 ou 9 mois (Kosel et al., 2020).

Au-delà de 8-9 mois, les performances de mémoires spatiale, sociale et contextuelle sont fortement dégradées, et l'augmentation des taux d'Aβ42 soluble coïncide avec l'apparition des plaques séniles dans le cortex. Après 18 mois, les souris présentent une mort des cellules granulaires hippocampiques ainsi qu'une présence de Tau hyperphosphorylés autour des plaques amyloïdes, bien que cet âge soit difficile à atteindre pour les animaux, leur espérance de vie étant fortement réduite (Freude et al., 2009 ; Rae & Brown, 2015).

Dans notre étude, nous avons utilisé un total de 279 souris femelles, agées de 5 à 9 mois, à savoir 233 pour la partie I des résultats (153 pour les expériences avec EE, 80 pour les expériences avec la NRG1), et 46 pour la partie II des résultats. Les tissus cérébraux utilisés pour la partie III des résultats sont issus des mêmes animaux.

# II. Procédures chirurgicales

## A. Anesthésie gazeuse

Pour l'ensemble des expérimentations, les souris sont anesthésiées *via* vetflurane (1000mg/g/ml ; ref : Vnr137317 ; Virbac). Pour cela, les souris sont placées dans une chambre d'induction avec une concentration de vetflurane de 4% à un débit de 0,2ml/min, pour une durée d'environ 3 minutes, c'est-à-dire jusqu'à ce que l'animal soit immobile. L'animal est ensuite placé dans un appareil stéréotaxique (Kopf) ayant le museau dans un masque permettant d'apporter continuellement le gaz anesthésiant. La respiration de l'animal est contrôlée afin de vérifier qu'elle soit régulière.

La tête est placée dans l'appareil stéréotaxique à l'aide de barres d'oreilles, dont l'extrêmité est légèrement enduite de lidocaïne en pommade pour réduire la douleur subie par l'animal, mais également pour générer une fine pellicule grasse entre son oreille et la barre, permettant également de réduire les éventuelles blessures liées aux frottements. Les membres sont manipulés afin qu'ils ne demeurent pas sous le corps lors de la chirurgie, afin d'assurer une bonne circulation sanguine. L'animal est placé sur une couverture chauffante avec contrôle rectal (~36 C°) afin d'éviter l'hypothermie. Enfin, pour éviter le dessèchement des yeux, un gel oculaire (Ocrygel) est appliqué. Une fois ces étapes réalisées, le débit du gaz est alors diminué à 3%. Ensuite, les poils au-dessus du crâne sont coupés avec un ciseau pour dégager la zone d'incision. Une injection de 0,1ml de lidocaïne (7mg/Kg) est réalisée en sous-cutané, que l'on laisse agir 3 minutes en massant délicatement la zone d'injection pour assurer une bonne diffusion. Ensuite, l'état de vigilance de l'animal est contrôlé *via* la réponse aux réflexes (petite pression sur une patte arrière) pour s'assurer que l'anesthésie opère correctement, avant de faire une incision d'environ 1cm à l'aide d'un scalpel. Une fois l'incision faite, le débit gazeux est encore diminué à 1,5%, ce qui aide à obtenir un rythme respiratoire encore plus calme, tout en maintenant une anesthésie profonde. Les coordonnées stéréotaxiques sont prises par rapport au bregma (jonction entre la suture coronale et sagittale) sur le crâne de l'animal. Les trépanations sont effectuées à l'aide d'une fraise de 0,05mm. À la fin des différentes interventions décrites ci-dessous (dont les différentes coordonnées des sites d'injections ou de placement des électrodes sont répertoriées dans la **Fig.54** et le **Tableau 3**), on réalise 3 à 4 points de suture avec un fil résorbable aseptique, et la souris reçoit une dernière injection de

Métacam (2mg/ml), avant d'être placée dans une cage individuelle, sous une lampe chauffante pendant environ 1h, jusqu'à son réveil complet.

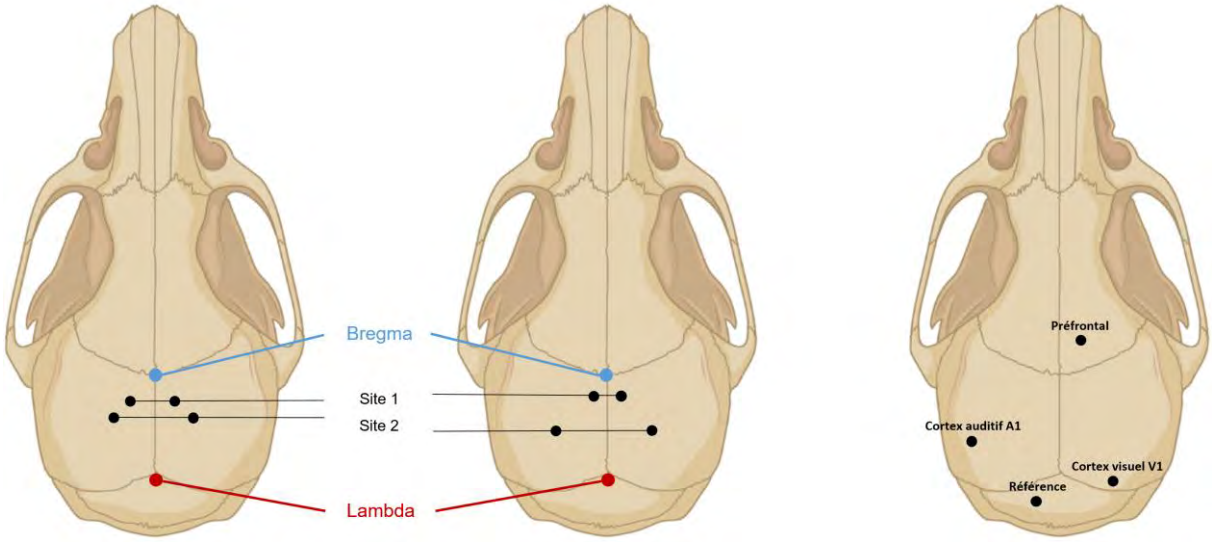



*Figure 54 Localisation des sites d'injections (en noir) dans l'aire CA1 (crâne de gauche), CA2 (crâne du milieu), ainsi que la position des électrodes lors des enregistrements EEG. Ces coordonnées sont déterminées par rapport au bregma, considéré comme le point 0, et au lambda, estimé en moyenne sur le modèle Tg2576 à -4.2mm du bregma en antéro-postérieur.*

| Sites d'injections | Aire CA1 | Aire CA2 | EEG |
|---|---|---|---|
| Site 1 rostral | -1,20 AP<br>±1,10 L<br>-1,60 DV | -0,50 AP<br>±0,70 L<br>-2,05 DV | Préfrontal<br>2,60 AP; +1,30 L<br>A1<br>-2,50 AP; -3,50 L<br>V1<br>-4,30 AP; +2,70 L<br>Ref<br>-5,50 AP; +1,60 L |
| Site 2 caudal | -1,80 AP<br>±1,80 L<br>-1,75 DV | -1,38 AP<br>±2,30 L<br>-2,00 DV | |

*Tableau 3 Coordonnées stéréotaxiques relatives au Bregma des sites d'injections pour les aires rostraux et caudaux des aires CA1 et CA2, ainsi que des électrodes placées en zone subdurale pour les enregistrements EEG.*

### B. Injections de ChABC dans l'aire CA1 de l'hippocampe

Dans la première partie des travaux de cette thèse, 39 souris NTg et 39 souris Tg2576 femelles de 5 mois ont subi des injections intrahippocampiques avec une solution de ChABC, afin de supprimer la présence de PNN dans les zones injectées. Les souris reçoivent deux injections dans chaque hémisphère d'une solution de ChABC à 50 U/ml (Sigma-Aldrich Cat# C3667) dans une solution de tampon phosphate contenant 0,9% de NaCl (PBS) et 0,1% de sérum albumine bovine (BSA), diluée dans une solution de

PBS, ou, dans le cas des individus contrôle, une simple solution de PBS. Pour CA1, 0,1µl de solution sont injectés avec un débit de 0,07 µl/min dans les sites rostraux et 0,2µl de solution à 0,07 µl/min pour les sites caudaux. Les injections sont effectuées avec des seringues Hamilton de 5 µl et une aiguille de 0,475 nm de diamètre.

### C. Injections de NRG1 dans les aires CA1 et CA2

Toujours dans la première partie des travaux de cette thèse, 18 souris NTg et 22 souris Tg2576 femelles de 5 mois ont subi des injections intrahippocampiques avec une solution de NRG1, dans le but de provoquer la maturation des neurones PV et/ou la présence de PNN dans les zones injectées. Les souris reçoivent deux injections dans chaque hémisphère d'une solution de NRG1 à 6,66nM (**Tableau 3**), diluée dans une solution de PBS, ou, dans le cas des individus contrôle, une simple solution de PBS. Pour CA1, on injecte 0,1 µl de solution à un débit de 0,07 µl/min dans les sites rostraux et 0,2µl de solution à 0,07 µl/min pour les sites caudaux. Pour CA2, toutes les injections sont de 0,1µl à un débit de 0,07 µl/min.

### D. Implantation des électrodes subdurales pour les enregistrements EEG.

Pour la deuxième partie des travaux de cette thèse, nous avons réalisé des enregistrements EEG de 5 souris NTg femelles de 6 mois. Pour cela, trois électrodes sont préparées avec du fil d'argent de 0,125 mm de diamètre protégé d'une gaine de téflon de 0,026 mm d'épaisseur. Ces éléctrodes sont d'une longueur de 0,7 à 0,9 cm, et dénudées sur 0,1 cm à chaque extrémité. Une quatrième électrode, dite de référence, plus épaisse, est constituée d'un fil d'argent 0,5 mm sans gaine (**Tableau 3**). Ces quatre électrodes sont ensuite soudées à un connecteur multicanal (8 mm de longueur et 8,1 mm de haut). L'impédance des électrodes, mesure de l'opposition d'un circuit (ici l'ensemble électrode + contact) au passage d'un courant, est vérifiée avant l'implantation. Les électrodes EEG ont une impédance comprise environ entre 4 et 10 kOhm, l'électrode de référence entre 1 et 3 kOhm (plus conductrice). Lors de la chirurgie, les électrodes sont coudées sur la partie dénudée, pour les insérer de façon subdurale dans les trépanations. Une fois les électrodes positionnées, on utilise de la colle dentaire (Superbond) sur le crâne de l'animal, ainsi que du ciment dentaire à

base de méthylméthacrylate (Duralay) pour créer une structure solide, permettant à l'animal de se mouvoir sans risquer de perdre le casque.

Pour effectuer les enregistrements, le connecteur multicanal est connecté par un câble souple à un commutateur (PlasticsOne) qui est fixé à l'intérieur d'une cage de Faraday et qui peut tourner sur lui-même, permettant de maintenir l'intégrité du circuit électrique malgré la rotation du câble *via* les déplacements de l'animal. Ensuite, un câble relie le commutateur (à l'extérieur de la cage de Faraday) à un amplificateur AM system 3600. L'amplificateur va donc amplifier le voltage du signal capté par les électrodes, et est lui-même connecté par des câbles BNC à la carte d'acquisition CED Power 1401 mk II (Spike 2). La carte d'acquisition est reliée par câble USB à l'ordinateur, transformant le signal analogique en signal numérique. Les périodes d'enregistrements étaient de 2 heures pour avoir une mesure de l'activité cérébrale de base, puis les périodes de stimulation étaient de 10 minutes, espacées de 10 minutes de repos. Les données étaient extraites à l'aide d'un script executé par le logiciel Spike 2, nous permettant de recueillir la puissance enregistrée par les électrodes, pour un spectre de fréquence allant de 0 à 120 Hz.

# III. Tests comportementaux

## A. Mémoire spatiale : test de localisation d'objets.

Le test de localisation d'objets vise à évaluer la capacité des souris à former une mémoire spatiale, sur la base de la mémorisation d'une configuration spatiale de deux objets dans une arène. Le dispositif expérimental utilisé est une arène cylindrique opaque de 40 cm de diamètre qui contient un repère visuel, une feuille plastifiée (20 × 20 cm) représentant un motif hachuré de bandes noires et blanches. La luminosité au sein de l'arène est d'environ 24 lux. L'ensemble des phases qui vont suivre sont filmées grâce une caméra, permettant de recueillir des données de locomotion grâce au système Ethovision (Noldus). Le test commence par une phase d'habituation, qui consiste à placer la souris dans l'arène vide pour une durée de 10 minutes afin qu'elle se familiarise avec le dispositif (**Fig.55**).




*Figure 55 Représentation des différentes phases du test de localisation d'objets, avec les temps d'attente entre chacune d'entre elles.*

La deuxième phase consiste en l'acquisition (1h30 après l'habituation), au cours de laquelle la souris est mise dans l'arène pour 10 minutes en présence de deux objets identiques (angle métallique de 9 cm sur un support rectangulaire en PVC), placés à 10 cm du bord de la paroi de l'arène. Le temps d'exploration de la souris pour chacun des objets est alors mesuré, c'est-à-dire, le temps qu'elle passe à interagir avec un objet (reniflement, mordillement, grattement), mais pas lorsqu'elle grimpe sur celui-ci. Enfin, lors de la dernière phase (phase de test, 3 ou 24 h après selon les expériences), l'objet qui a été le moins exploré par la souris lors de l'acquisition est déplacé près de l'indice visuel. De la même façon, le temps d'exploration est mesuré. Si le total de temps d'exploration des objets au cours des phases d'acquisition ou de test est inférieur à 15 secondes, les individus concernés sont exclus de l'expérience. Dans ce

test, on considère que les souris ont une bonne capacité de mémoire spatiale si elles montrent une préférence pour l'objet déplacé, par rapport à l'objet resté à la même position. Entre chaque phase, l'arène et les objets sont nettoyés avec de l'éthanol 70%.

### B. Mémoire sociale : test à 5 ou 7 essais.

Le test réalisé ici est inspiré d'un dispositif décrit dans la littérature (Kogan et al., 2000) et permet d'appréhender la mémoire sociale des souris, en évaluant leur capacité à mémoriser un individu qui leur est présenté de façon répétée. Une cage cylindrique à barreaux amovibles (8 × 16 cm) vide est placée au cebtre d'une grande cage (35 × 25 cm). Puis, la souris testée est déposée dans le dispositif pour une période d'habituation de 10 min. Ensuite, la cage contenant une souris dite « présentatrice 1 » est placée dans une cage cylindrique qui remplace celle présente dans le dispositif, et ce pendant 5 minutes (**Fig.56**). Cette souris présentatrice 1 n'a jamais été rencontrée par la souris testée, et n'a pas de lien de parenté avec cette dernière.

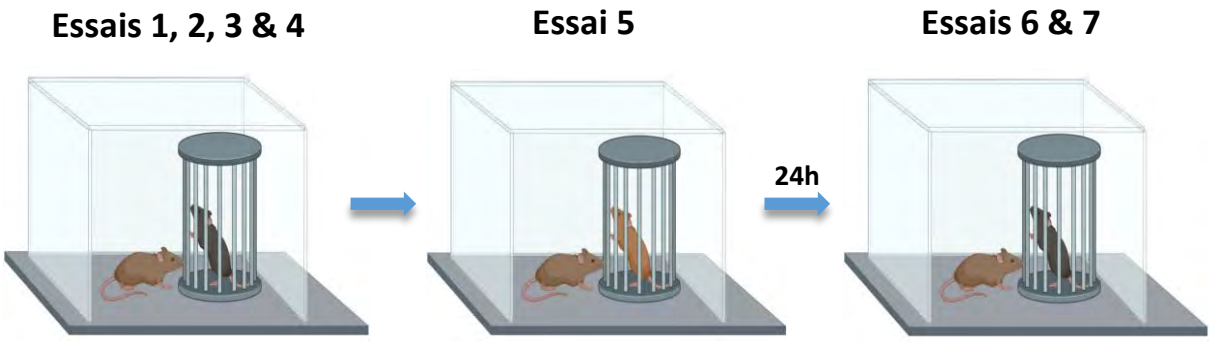



*Figure 56 Représentation des différentes phases du test à 5 et 7 essais, inspiré par Kogan et al., 2000. Les essais 6 et 7 ne sont réalisés que lors des expériences d'environnement enrichi, lorsque la mémoire sociale est testée à long terme.*

Dans cette phase de test, on mesure le nombre et la durée des d'interactions effectuées par la souris testée envers la souris présentatrice 1. On considère comme une interaction, lorsque la souris testée est proche de la souris présentatrice 1, tournée vers elle, et qu'elle renifle ou tente de l'agripper avec ses pattes. Si elle est immobile et que son museau ne bouge pas, cela n'est pas comptabilisé, de même si elle gratte la cagette ou si elle grimpe sur les barreaux. À la fin des 5 minutes de ce premier essai, on replace la cagette vide à la place de celle qui contient la présentatrice 1. Cette cage est nettoyée à l'éthanol 70%. La souris testée passe à nouveau 10 minutes dans le dispositif sans souris présentatrice, puis la cage à barreaux contenant la souris présentatrice est à nouveau introduite dans l'arène pour un deuxième essai de 5

minutes. Cette manipulation est répétée un total de 4 fois. On s'attend à observer une familiarisation de la souris testée pour la souris présentatrice, qui se caractérise par une diminution du temps d'interaction au cours des 4 essais. Lors du cinquième essai, une nouvelle souris présentatrice (2) est placée dans la cage, de la même façon que précédemment. Si la souris est en mesure de distinguer les deux souris présentatrices, alors on s'attend à observer un regain d'interaction lors de l'essai 5.

Pour certaines expériences de la partie 1 des résultats de cette thèse, deux essais supplémentaires sont effectués le lendemain (essais 6 et 7), au cours desquels la souris testée est à nouveau mise en présence avec la souris présentatrice 1. Si les souris ont une bonne capacité de mémoire sociale, et que celle-ci perdure à long terme, on s'attend à ce qu'elles interagissent peu avec la souris présentatrice aux essais 6 et 7. Si le total de temps d'exploration de la souris présentatrice 1 au cours du premier essai est inférieur à 20 secondes, les individus concernés sont exclus de l'expérience.

### C. Environnement enrichi.

Pour ce paradigme utilisé dans la première partie des travaux de cette thèse, les souris sont placées dans un EE à l'âge de 5 mois et pour une durée de 10 jours. Cet hébergement est constitué d'une grande cage de dimension 100 × 50 × 80 cm. À l'intérieur, on dépose de la sciure standard, et une multitude de jouets, de diverse tailles, formes, couleurs et textures (plastique, bois, verre, métal), permettant de créer plusieurs espaces d'exploration. Ces espaces sont reliés *via* des tubes, des plateformes en hauteur et des ponts, où les souris peuvent trouver des granules cachés (nourriture standard), et de nombreux recoins où s'abriter. De plus, les souris disposent de twist de papier, leur permettant de former des nids un peu partout et de s'y regrouper (**Fig.57**). Pour garantir un réel enrichissement, cet environnement est entièrement changé tous les 3 jours, remodelant ainsi toute la géométrie de l'espace, ainsi que les lieux auxquels les souris se sont habituées. La seule exception reste la litière, qui n'est que partiellement remplacée, permettant d'éviter un excès d'agressivité chez les Tg2576, grâce à la conservation des repères olfactifs.



*Figure 57 Photo de l'environnement enrichi utilisé pour les expérimentations*

Dans cet environnement, en plus de l'enrichissement lié à l'exploration spatiale et des objets, s'établit un enrichissement social, puisque 11 à 16 individus NTg et Tg2576 femelles sont placés dans l'EE, provenant donc de 3 à 5 cages différentes. Les souris sont marquées sur la queue avec un code couleur pour pouvoir les identifier lors des changes et du retour, au bout de 10 jours, dans leur cage standard.

### D. Stimulations visuelles et auditives

La méthode expérimentale utilisée pour la deuxième partie des travaux de cette thèse est inspirée des études de Iaccarino et al., 2016, Singer et al., 2016 et Martorell et al., 2019. Nous avons utilisé une bande de LED (NFLS X3) connectée à une puce Arduino (https://store.arduino.cc/products/arduino-uno-rev3) et son software (https://www.arduino.cc/en/software). La puce Arduino permet aux LED d'avoir 4 modes de stimulation (20, 40 et 80 Hz), ainsi qu'un mode de stimulation aléatoire (combinant aléatoirement des séquences de 20, 40 et 80 Hz), *via* un potentiomètre (**Fig.58, bas**). Par exemple, dans un cycle de stimulations à 40 Hz sur une période de 25 ms, les lumières sont allumées 50% du temps, soit 12,5 ms allumées puis éteintes pendant 12,5 ms (**Fig.58, haut**).

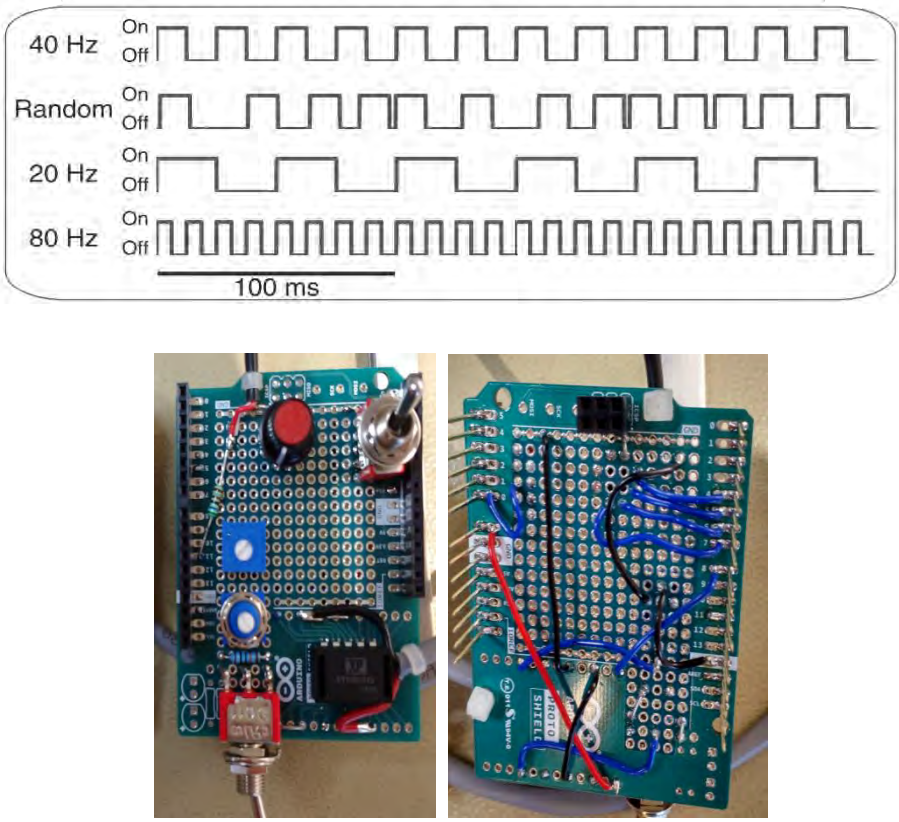



Figure 58 *En haut, sont schématisés les quatre modes de stimulations visuelles des LED* via *le code entré dans la carte Arduino, réglable* via *un potentiomètre. En bas, la configuration du hardware de la puce Arduino en vue de dessus à gauche, et vue du dessous à droite (d'après Singer et al., 2016).*

Les LEDs sont fixées sur un support en plastique permettant d'y entreposer une cage de souris de format standard. Les LEDs sont ainsi disposées tout autour de la cage (à 5 cm), l'intensité lumineuse variant de 480 lux à 260 lux sur l'ensemble de la cage.

Pour les stimulations auditives, le même système est utilisé, avec une tonalité de 10 kHz délivrée à 60 dB environ. Les systèmes peuvent être utilisés simultanément, et de façon synchrone. Puis, nous utilisons un code que nous avons élaboré pour régler les différents modes de stimulations (**Fig.59**).


Led_Sono | Arduino 1.8.16

Fichier Édition Croquis Outils Aide

Led_Sono

```
#include <FrequencyTimer2.h>

#define MODULATION A0     // avec ou sans modulation à 10KHz
#define HZ80  7
#define HZ40  6
#define HZ20  5
#define ALEAT 4
#define LED   8           // commande ruban de leds
#define SON   11          // pin output FrequencyTimer2

word aleat = 6250;
byte compteur = 0;
bool flagModulation = false;
bool flagHZ80 = false;
bool flagHZ40 = false;
bool flagHZ20 = false;
bool flagAleat = false;
bool flagSignal = false;

void setup()
{
  pinMode(LED, OUTPUT);
  pinMode(LED_BUILTIN, OUTPUT);
  pinMode(SON, OUTPUT);
  pinMode(HZ80, INPUT_PULLUP);
  pinMode(HZ40, INPUT_PULLUP);
  pinMode(HZ20, INPUT_PULLUP);
  pinMode(ALEAT, INPUT_PULLUP);
  pinMode(MODULATION, INPUT_PULLUP);
  digitalWrite(LED, LOW);
  digitalWrite(SON, LOW);
  digitalWrite(LED_BUILTIN, HIGH);
  FrequencyTimer2::setPeriod(100);    // période en µs ie 10 KHz
  delay(1000);                        // pour avoir le temps de voir la led 13
}

void loop()
{
  compteur = (compteur + 1) % 10;     // valeurs de 0 à 9
  aleat = random(3125,12500);         // fréquence aléatoire entre 20 et 80 Hz (delai µs x2)

  if      (digitalRead(HZ20) == LOW) { flagHZ20 = true;  flagHZ40 = false; flagHZ80 = false; flagAleat = false; flagSignal = true; }
  else if (digitalRead(HZ40) == LOW) { flagHZ20 = false; flagHZ40 = true;  flagHZ80 = false; flagAleat = false; flagSignal = true; }
  else if (digitalRead(HZ80) == LOW) { flagHZ20 = false; flagHZ40 = false; flagHZ80 = true;  flagAleat = false; flagSignal = true; }
  else if (digitalRead(ALEAT) == LOW){ flagHZ20 = false; flagHZ40 = false; flagHZ80 = false; flagAleat = true;  flagSignal = true; }
  else { flagSignal = false; }
  if (digitalRead(MODULATION) == LOW) { flagModulation = true; } else { FrequencyTimer2::disable(); flagModulation = false; }

  if (flagSignal == true)
  {
    digitalWrite(LED, HIGH);
    if (compteur == 0) digitalWrite(LED_BUILTIN, HIGH);
    if (flagModulation == true) { FrequencyTimer2::enable(); } else { digitalWrite(SON, HIGH); }                  // son
    if (flagHZ20 == true) { delayMicroseconds(12500); delayMicroseconds(12500); /*digitalWrite(SON, LOW);*/}                                  // 20 Hz
    if (flagHZ40 == true) { delayMicroseconds(12500); /*digitalWrite(SON, LOW);*/}                                                             // 40 Hz
    if (flagHZ80 == true) { delayMicroseconds(6250); /*digitalWrite(SON, LOW);*/}                                                              // 80 Hz
//    if (flagHZ80 == true) { delay(1000); /*digitalWrite(SON, LOW);*/}                                                                        // 80 Hz
    if (flagAleat == true){ delayMicroseconds(aleat); delayMicroseconds(aleat); /*digitalWrite(SON, LOW);*/}                                   // fréquence aléatoire

    digitalWrite(LED, LOW);
    if (compteur == 5) digitalWrite(LED_BUILTIN, LOW);
    if (flagModulation == true) { FrequencyTimer2::disable(); } else { digitalWrite(SON, LOW); }
    if (flagHZ20 == true) { delayMicroseconds(12500); delayMicroseconds(12500); /*digitalWrite(SON, LOW);*/}                                  // 20 Hz
    if (flagHZ40 == true) { delayMicroseconds(12500); /*digitalWrite(SON, LOW);*/}                                                             // 40 Hz
//    if (flagHZ80 == true) { delay(1000); /*digitalWrite(SON, LOW);*/}                                                                        // 80 Hz
    if (flagHZ80 == true) { delayMicroseconds(6250); /*digitalWrite(SON, LOW);*/}                                                              // 80 Hz
    if (flagAleat == true){ delayMicroseconds(aleat); delayMicroseconds(aleat); /*digitalWrite(SON, LOW);*/}                                   // fréquence aléatoire
  }
  else
  {
    FrequencyTimer2::disable();
    digitalWrite(SON, LOW);
    digitalWrite(LED, LOW);
    digitalWrite(LED_BUILTIN, LOW);
  }
}
```

*Figure 59 Code de programmation utilisé pour faire fonctionner la puce Arduino et générer les stimulations auditives et visuelles sur les modes aléatoires, 20, 40 et 80 Hz.*

# IV. Histologie et immunohistochimie

## A. Perfusion intracardiaque et préparation des tissus

Pour l'ensemble des études de cette thèse, des marquages immunohistochimiques sur coupes flottantes de tissus cérébraux fixés sont réalisés. Afin de prélever le cerveau des animaux, une perfusion intracardiaque avec une solution de PBS 0,1M est réalisée. Pour cela, les souris sont profondément anesthésiées par une injection de Doléthal (2 g/kg) en intrapéritonéal. Après 2 à 3 minutes, les souris ne présentent plus de réflexe moteur (contrôle *via* pression exercée sur une des pattes arrière), et sont placées sur la table de dissection. Une thoracotomie est alors effectuée pour dégager le cœur, et permettre l'insertion, dans le ventricule gauche, d'une aiguille émoussée reliée à une pompe péristaltique. Après avoir sectionné l'oreillette droite, une solution isosmotique de chlorure de sodium (NaCl 0,9%) est délivrée à température ambiante avec un débit de 16ml/min pour une durée de 30 à 40 secondes, permettant l'exsanguination. Ensuite, une seconde dissection est réalisée sur un bloc métallique froid pour extraire le cerveau, et le placer dans une solution de paraformaldéhyde (PFA) 4% avec du tampon phosphate 0,1M (PB 0,1M) maintenue à 4°C, pour la fixation des tissus. Après 48h, les cerveaux sont rincés environ 8h dans une solution PBS, puis transvasés dans une solution de sucrose 30% avec 0,1% d'azide de sodium (afin d'éviter la contamination organique des tissus) pour une durée minimale d'une semaine. Ensuite, les deux hémisphères sont séparés et des coupes coronales de 30 µm sont réalisées grâce à un microtome (Leica SM2010R) équipé d'une platine de congélation (Physitemp BFS-3MP). Pour finir, les coupes sont placées en série dans 10 tubes contenant une solution de cryoprotectant (PB 0,1M, 30% éthylène glycol et 30% glycérol) permettant leur conservation à -20 °C.

## B. Immunohistochimie

Les marquages des parties 1 à 3 qui vont suivre, ont été utilisés lors de la première et deuxième partie de cette thèse. Seul le premier protocole décrit de manière exhaustive les différentes étapes de préparation des solutions et de rinçage : ces étapes sont similaires pour l'ensemble des marquages, sauf exceptions qui sont alors mentionnées.

### 1. Marquage PV / PNN / PCP4

Ce protocole permet de marquer les interneurones PV, les PNN, et les neurones pyramidaux de CA2 (PCP4+), servant ici à marquer la limite entre l'aire CA1 et CA2. Ce marquage est réalisé sur un échantillonnage d'une coupe tous les 150µm. Toute la procédure se déroule à température ambiante. L'ensemble des références des anticorps utilisés sont présentes dans le **Tableau 5**.

Les coupes sont d'abord rincées dans une solution de PBS. Après plusieurs heures de rinçage sur un agitateur, les coupes sont transférées dans une solution de 10% de sérum d'âne (normal donkey serum ; NDS 10%) dans du PBST-azide (PBS contenant 0,25% de triton-X et 0,1% de sodium azide) pendant une heure, pour saturer les sites de liaison antigénique non-spécifiques. Ensuite, on utilise cette même solution de NDS dans PBST-Az pour incuber les coupes toute la nuit sur agitateur à température ambiante avec les anticorps primaires suivants :

- Chèvre anti-PV (1:2500 ; Swant, PVG-213) ;
- Lectine *Wisteria floribunda agglutinin* (WFA) conjuguée à de la biotine (1:1000 ; Sigma, L1516), qui reconnait les résidus N-acetylgalactosamine des chaines de sucre des PNN ;
- Lapin anti-Purkinje Cell Protein 4 (PCP4) (1:500 ; Santa Cruz, sc-74816).

Le lendemain, trois rinçages de 10 minutes sont réalisés dans du PBS 0.1M. Les coupes sont alors placées dans une solution PBST-Az contenant les anticorps secondaires suivants pendant 1h30 :

- Streptavidine couplée avec de la TRITC (1:1000 ; Vector, SA-5549) afin de reconnaître et de marquer la biotine associée à la WFA ;
- Âne anti-chèvre A488 pour les interneurones PV (1:500 ; Invitrogen, A-11055) ;
- Âne anti-lapin A647 pour le PCP4 (1:500 ; Invitrogen, A-31573).

Trois derniers rinçages sont alors réalisés dans du PBS, puis les coupes sont montées sur lame d'observation microscopique (Superfrost) dans une solution de PBST, et mises entre lame et lamelle avec du Mowiol comme milieu de montage.

### 2. Marquage Iba1

Le marquage Iba1 est réalisé pour identifier les cellules microgliales activées. Pour se faire, les coupes subissent le traitement suivant (à température ambiante) :

• Incubation dans une solution d'anticorps primaire de Lapin anti Iba1 (1:600 ; CAG5175) dans du PBST-Az NDS 10% toute la nuit

• Incubation avec les anticorps secondaires Âne anti-lapin A488 (1:500 ; Invitrogen, A-11008) pendant 1h30 dans du PBST-azide

### 3. Marquage cFos

Le marquage cFos permet de marquer l'activité neuronale. Cette immunohistochimie est réalisée en visible, et toutes les étapes sont à température ambiante.

Après les premiers rinçaces, un traitement anti-peroxydase de 15 minutes est effectué dans une solution de PBS 0,1M contenant 10% de méthanol et 3% $H_2O_2$ (inhibition des peroxydases endogènes des hématies afin de limiter le marquage non-spécifique). Puis le traitement est stoppé par deux rinçages dans du PBST 0,1M. Ensuite, un blocage d'une heure est effectué dans du PBST-Az contenant 5% de sérum de chèvre (normal goat serum ; NGS).

• Incubation avec l'anticorps primaire lapin anti cFos (1:2000 ; Santa Cruz, sc-52) dans une solution PBST-Az NGS 5% toute la nuit ;

• Incubation avec les anticorps secondaires Chèvre anti lapin biotinylé (1:500 ; Vector laboratories ; ZB1007) pendant 1h30 dilué dans du PBST-azide.

Après trois rinçages dans du PBST, au cours desquels est préparée la solution d'avidine-biotine permettant l'amplification et la visualisation de l'anticorps biotinylé (1 :500 ; kit ABC Vectastain ; ZF-0403), les coupes sont placées 1h30 dans cette solution ABC. En effet, cette solution doit être préparée 30 minutes avant l'incubation. Après deux rinçages dans du PBST, la révélation, catalysée par la présence d'$H_2O_2$, est réalisée avec la 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) et du nickel d'ammonium (SK-4100, pour une visualisation bleue-noire des marquages) pendant environ 20 minutes. Lorsque considérée optimale par contrôle visuel sous microscope, la réaction est

arrêtée en plaçant les coupes dans une solution de PBS-Az, puis les coupes sont montées sur lames gélatinées. Après 72h de séchage à température ambiante, les lames sont déshydratées dans des bains d'éthanol successifs pendant 7 minutes ($H_2O$ distillée, éthanol à 50%, 70%, 90%, 100%, 100%, toluène) avant d'être placées sous lamelles avec de l'Eukitt (Sigma-Aldrich).

### 4. Marquage aggrecan

Les marquages des parties 4 à 6 sont utilisés pour la dernière partie de cette thèse, lors des analyses d'image effectuées grâce à la « Random Illumination Microscopy » ou RIM. Les étapes de préparation des solutions et des rinçages sont identiques à ceux présentés pour le marquage PV/PNN/PCP4 (cf Méthodes IV.B.1). Tous les tissus sont triplement marqués, à savoir : **1)** les cellules PV+, qui sont toutes marquées en rouge lointain, car c'est l'anticorps secondaire dont le signal est le moins visible, et dans nos expériences, ce marquage nous sert seulement à détecter les cellules PV+ ; **2)** un marquage PNN avec la WFA ; et **3)** un dernier marquage qui varie selon les expériences entre aggrecan, Syt2 ou Vglut1, dont la spécificité de marquage sera décrite dans les parties suivantes. Ce dernier marquage sera toujours lié à un anticorps secondaire émettant en vert, couleur ayant le plus fort signal en utilisant le RIM.

Incubation dans les anticorps primaires dans une solution de NDS 10% toute la nuit :

- Chèvre anti-PV (1:2500 ; Swant, PVG-213) ;
- Lectine *Wisteria floribunda agglutinin* (WFA) conjuguée à de la biotine (1:1000 ; Sigma, L1516) ;
- Lapin anti-Aggrecan (1:1000 ; Sigma-Aldrich (AB1031)).

Incubation avec les anticorps secondaires dans une solution de PBST-azide pendant 1h30 :

- Âne anti-rabbit A647 pour les interneurones PV (1:500 ; Invitrogen (A-31573)) ;
- Streptavidine couplée avec de la TRITC (1:1000 ; Vector, SA-5549) afin de reconnaître la biotine associée à la WFA ;
- Âne anti-chèvre A488 pour Aggrecan (1:500 ; Invitrogen (A-11055)).

Le montage des coupes sur lames est effectué avec du VECTASHIELD (H-1000-10) plutôt que du Mowiol, car c'est un milieu de montage qui présentent moins d'autofluorescence.

### 5. Marquage Vglut1

Incubation dans les anticorps primaires dans une solution de NDS 10% toute la nuit :

- Chèvre anti-PV (1:2500 ; Swant, PVG-213) ;
- Lectine *Wisteria floribunda agglutinin* (WFA) conjuguée à de la biotine (1:1000 ; Sigma, L1516) ;
- Lapin anti-Vglut1 (1:4000).

Incubation avec les anticorps secondaires dans une solution de PBST-azide pendant 1h30 :

- Âne anti-rabbit A647 pour les interneurones PV (1:500 ; Invitrogen (A-31573)) ;
- Streptavidine couplée avec de la TRITC (1:1000 ; Vector, SA-5549) afin de reconnaître la biotine associée à la WFA ;
- Âne anti-chèvre A488 pour Vglut1 (1:1000 ; Sigma-Aldrich (ABN1647)).

### 6. Marquage Syt2

Incubation dans les anticorps primaires dans une solution de NDS 10% toute la nuit :

- Chèvre anti-PV (1:2500 ; Swant, PVG-213) ;
- Lectine *Wisteria floribunda agglutinin* (WFA) conjuguée à de la biotine (1:1000 ; Sigma, L1516) ;
- Lapin anti-Syt2 (1:1000 ; Abcam (ab113545)).

Incubation avec les anticorps secondaires dans une solution de PBST-azide pendant 1h30 :

- Âne anti-rabbit A647 pour les interneurones PV (1:500 ; Invitrogen (A-31573)) ;

• Streptavidine couplée avec de la TRITC (1:1000 ; Vector, SA-5549) afin de reconnaître la biotine associée à la WFA ;

• Âne anti-chèvre A488 pour Syt2 (1:500 ; Invitrogen (A-11055)).

| Antigènes | Concentration | Référence |
|---|---|---|
| Parvalbumine (PV) | 1:2500 | Swant (PVG-213) |
| Purkinje Cell Protein 4 (PCP4) | 1:500 | Santa Cruz (sc-74816) |
| *Wisteria floribunda agglutinin* (WFA) | 1:1000 | Sigma (L1516) |
| cFos | 1:2000 | Santa Cruz (sc-52) |
| Iba1 | 1:600 | Fujifilm (CAG5175) |
| Aggreccan | 1:1000 | Sigma-Aldrich (AB1031) |
| Vglut1 | 1:4000 | Sigma-Aldrich (ABN1647) |
| Syt2 | 1:1000 | Abcam (ab113545) |
| Streptavidine Dyelight 549 | 1:1000 | Vector (SA-5549) |
| Alexa 488 donkey anti goat | 1:500 | Invitrogen (A-11055) |
| Alexa 488 donkey anti rabbit | 1:500 | Invitrogen (A-11008) |
| Alexa 647 donkey anti rabbit | 1:500 | Invitrogen (A-31573) |
| Chèvre anti lapin biotinylé | 1:500 | Vector (ZB-1007) |

*Tableau 5 Récapitulatif des différents anticorps utilisés lors des immunohistochimies.*

## C. Analyses microscopiques des marquages immunohistochimiques

### 1. Quantification par microscopie classique

Les quantifications sont effectuées avec un microscope Leica DM6000 B équipé d'une lampe à fluorescence et d'une caméra. Les comptages des cellules PV+, PNN+ et PV/PNN+, Iba1+ et cFos sont effectués grâce au logiciel Mercator (Explora Nova) sur les régions CA1 et CA2 de l'hippocampe (oriens + pyramidale + radiatum) ainsi que dans le cortex somatosensoriel et le cortex V1 pour les expériences de stimulations lumineuses. Dans un premier temps, le contour d'une région est tracé avec l'objectif x5, afin d'en obtenir la surface. Ensuite, des images de la région tracée sont effectuées avec l'objectif x20 (20% de recouvrement entre les images). Cela nous permet par la suite de reconstruire une image de bonne résolution de la région entière avec le logiciel ImageJ (https://imagej.net/). Dans un second temps, le comptage des cellules est effectué avec l'objectif x20. Chacun des marquages est compté indépendamment, en fonction de leur longueur d'onde d'émission, en cliquant manuellement sur chacune des cellules positives au marquage, sur un écran qui permet d'obtenir un retour caméra de la préparation histologique. Enfin, le nombre absolu de cellules marquées dans la région concernée est évalué par stéréologie avec la méthode de West, 1993.

### 2. Random Illumination microscopy

Dans le dernier axe de cette thèse, nous nous sommes intéressés à la nature et au nombre de synapses sur les interneurones PV et à l'organisation de leur PNN en fonction des différentes conditions expérimentales dans lesquelles nous avons placé les souris Tg2576. Pour cela, nous avons cherché à quantifier le nombre de synapses excitatrices et inhibitrices présentes autour des interneurones PV, ainsi que la présence d'un composant des PNN, aggrecan. Pour cela, 4 souris sont séléctionnées aléatoirement pour chacun des 5 groupes suivants : NTg ; Tg2576 ; NTg-ChABC (CA1) ; Tg2576-NRG1 (CA1) et Tg2576-EE.

Les images des différents marquages sont acquises grâce un dispositif de microscopie appelé « Random Illumination Microscopy » (RIM ; Mangeat et al., 2020). Le RIM reconstruit une image super-résolue de l'échantillon à partir de plusieurs images à basse résolution obtenues sous différents éclairages de speckles (pattern lumineux aléatoire). Pour les tissus de chacun des individus, les interneurones PV sont marqués

au préalable avec un anticorps secondaire fluorescent d'une longueur d'onde de 647 nm, et les PNN avec de la WFA couplé à la Streptadivine 549 nm. Ensuite, la protéine d'intérêt est toujours marquée avec une longueur d'onde de 488 nm, que ce soit pour aggrecan, Vglut1 ou Syt2 (cf Méthodes IV.B.4-6). Pour chaque individu, l'échantillonage se compose d'environ 5 neurones par coupe sur 3 niveaux de coupes différents, proches des sites d'injection. Cela nous donne environ 15 neurones par individu, et donc 60 par groupe (ce nombre est réduit par le traitement d'image à environ 40 neurones utilisables par groupe). Pour l'acquisition d'un neurone, celui-ci est repéré grâce à son marquage PV+. Ensuite, l'acquisition permet d'obtenir des images sur une longueur de 6 µm autour du centre du neurone, et échantillonné tous les 0,2 µm. Les images brutes sont alors reconstruites *via* le logiciel AlgoRIM, basé sur une méthode d'analyse mathématique (Idier et al., 2018), qui tire parti de la corrélation spatiale de l'excitation du fluorophore induite par le speckle pour obtenir une résolution multipliée par deux. Les images sont réalignées sur le logiciel Icy (https://icy.bioimageanalysis.org/) puis traitées sur ImageJ (https://imagej.net/) pour détourer un masque correspondant au contour des PNN, permettant de localiser précisement la zone à analyser. Pour chaque neurone, on utilise deux images qui sont prises aléatoirement sur l'ensemble des couches comprises dans les 6 µm d'acquisition. Chacune des images est alors analysée grâce au pluggin Soda sur le logiciel Icy (https://icy.bioimageanalysis.org/plugin/soda-suite/). Cela permet d'identifier, d'après le signal, des points dont la détection est paramétrée sur le protocole Soda. Le logiciel réalise ensuite des analyses statistiques sur ces points, comme par exemple, le nombre de points détectés, ou la probilité de couplage (d'une interaction entre deux points de marquage différent).

# RÉSULTATS

# I. Les effets bénéfiques de l'EE sur les capacités cognitives des Tg2576 sont-ils liés à la restauration du nombre d'interneurones PV et des PNN dans l'hippocampe ?

Dans notre modèle de souris MA, il a été montré que les animaux âgés de 6 mois présentent des troubles cognitifs, associés à une diminution du nombre d'interneurones PV et PNN dans l'hippoccampe par rapport aux animaux contrôles (Cattaud et al., 2018). Les interneurones PV sont impliqués dans les fonctions cognitives, et la restauration de leur activité permet de renforcer les oscillations gamma ainsi qu'une amélioration des processus mnésiques (Verret et al., 2012). Par ailleurs, lorsqu'on place les souris Tg2576 dans un EE avant l'apparition des troubles cognitifs, on observe une augmentation du nombre de cellules PV et PNN quantifiables dans l'hippocampe à la sortie de l'enrichissement (Cattaud et al., 2018), et également une amélioration des fonctions cognitives, même plusieurs mois après (Verret et al., 2013).

Dans ce modèle, l'EE permet donc de restaurer le nombre d'interneurones PV dans l'hippocampe ainsi que les fonctions cognitives. Les interneurones PV étant impliqués dans ces mêmes fonctions, il est fortement sous-entendu que la restauration des interneurones PV par l'EE permet de soutenir l'amélioration des processus cognitifs à long terme. Cependant, il n'existait pas de lien direct permettant d'affirmer cette hypothèse.

Afin de mettre en évidence un éventuel lien de cause à effet entre le remodelage des neurones PV au cours de l'EE et l'amélioration des fonctions cognitives, nous avons établi un protocole visant à limiter le remodelage des interneurones PV pendant l'EE, et à en évaluer les conséquences sur le comportement.

Plus spécifiquement, les souris ont reçu une injection de ChABC dans l'aire CA1 de l'hippocampe avant d'être placées dans l'EE. Nous avons ensuite testé la mémoire spatiale (dépendant de CA1), et la mémoire sociale (dépendant de CA2) des souris NTg et Tg2576. Puis, une analyse histologique a été réalisée afin de déterminer le nombre de cellules PV et PNN dans les régions CA1 et CA2 de l'hippocampe, en fonction des conditions expérimentales (ChABC ou PBS, EE ou standard housing, SH).

Notre hypothèse ici est que l'injection de ChABC dans CA1, de par son action sur les neurones PV et leur PNN, empêche les effets bénéfiques d'un séjour en EE sur la mémoire spatiale des souris Tg2576.

### A. Une injection de ChABC dans l'aire CA1 de l'hippocampe empêche le remodelage EE-dépendant des interneurones PV et de leur PNN

Dans une première expérience, nous avons cherché à évaluer les conséquences d'une injection de ChABC sur le remodelage des neurones PV et de leur PNN dans l'hippocampe de souris NTg et Tg2576, au cours d'un séjour dans l'EE.

Pour cela, nous avons injecté une solution de ChABC ou une solution contrôle (PBS) dans l'aire CA1 de l'hippocampe de souris femelles âgées de 5 mois (cf Méthodes II.B). Dans les 24 heures qui suivent l'injection, les souris sont séparées en deux lots expérimentaux qui comportent des conditions d'hébergement différentes. Dans un premier lot, les souris sont restées 10 jours en condition d'hébergement standard (SH) (**Fig.60**).

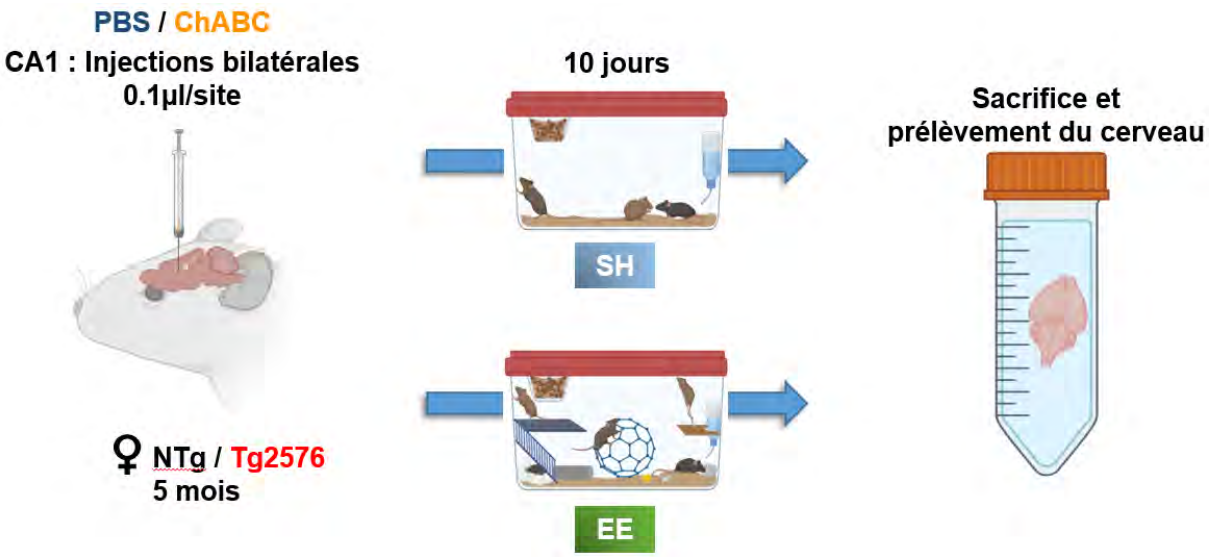



*Figure 60 À l'âge de 5 mois, les souris NTg et Tg2576 reçoivent une injection d'une solution de PBS ou de ChABC dans l'aire CA1. Ensuite, elles restent dans leur condition standard d'hébergement (SH) ou elles sont placées dans un EE pour une durée de 10 jours. Enfin, les animaux sont sacrifiés et les tissus sont prélevés pour réaliser des quantifications du nombre de neurones PV et de la présence de PNN en fonction des conditions expérimentales.*

Cela concerne les animaux NTg-PBS-SH (n=6), NTg-ChABC-SH (n=6), Tg2576-PBS-SH (n=8), et Tg2576-ChABC-SH (n=7). Dans un second lot, les souris sont placées 10 jours en EE, constituant les groupes expérimentaux NTg-PBS-EE (n=4), NTg-ChABC-EE (n=7), Tg2576-PBS-EE (n=4) et Tg2576-ChABC-EE (n=4). Passés ces 10 jours, les animaux sont sacrifiés et leur cerveau prélevé (cf Méthodes IV.A).

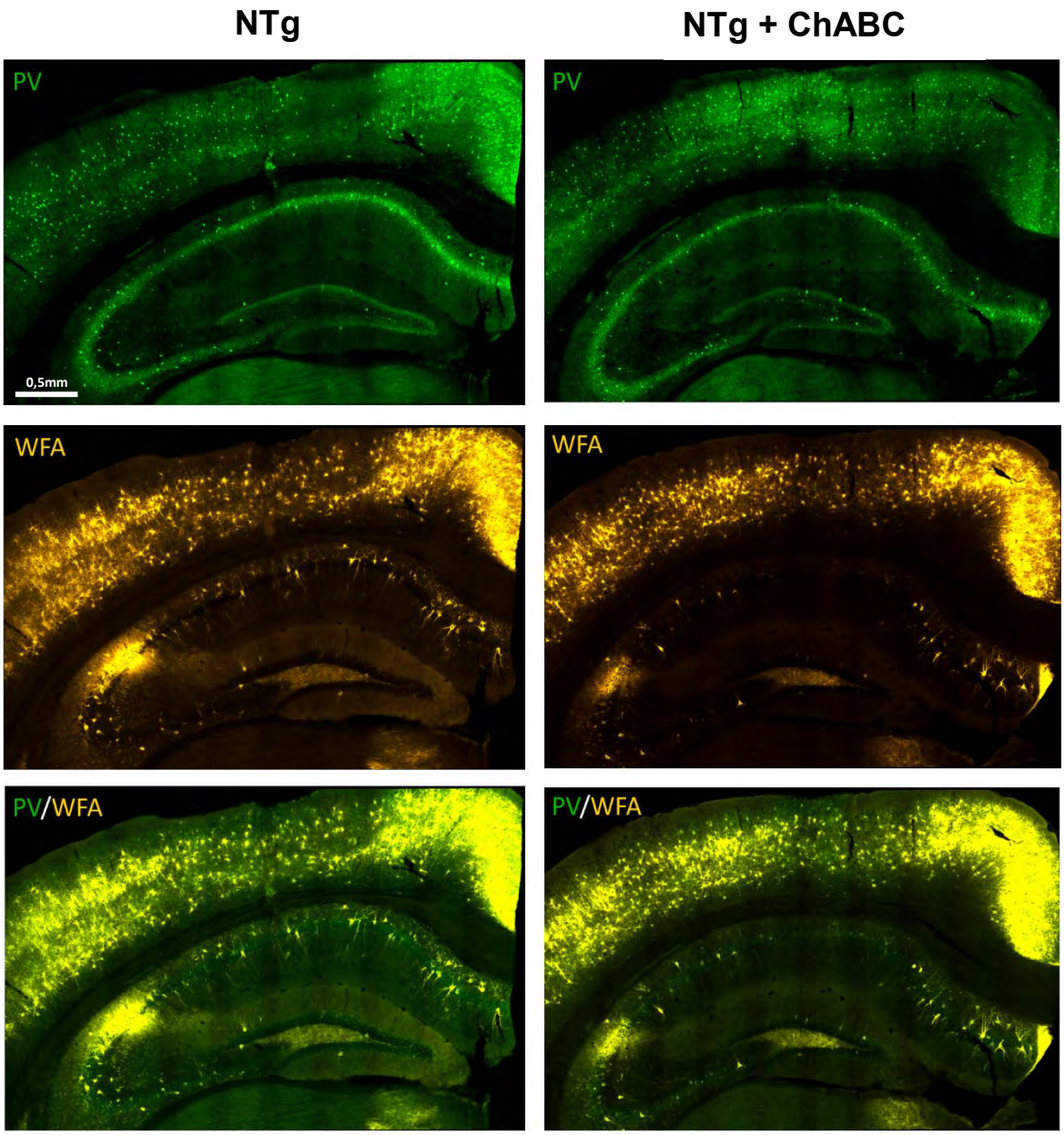



*Figure 61 Distribution du marquage PV+, PNN+ (WFA) et PV+/PNN+ dans l'hippocampe de souris NTg injectée avec du PBS (gauche) ou de la ChABC (droite). On observe une nette extinction du marquage WFA au niveau de l'aire CA1, lorsque les souris ont reçu une injection de ChABC.*

Les tissus cérébraux sont alors soumis à un triple marquage PV/PNN/PCP4 (cf Méthodes IV.B.1). La spécificité des sites d'injection a pu être évaluée par la présence de la trace de descente de l'injecteur, ainsi que par la diminution de l'intensité/nombre de marquage PNN dans l'aire CA1 des individus injectés avec la ChABC (**Fig.61**). D'après la littérature et nos observations personnelles, la « repousse » des PNN dans l'hippocampe est observable environ 14 jours après une injection de ChABC. D'après ces observations, l'injection de ChABC intrahippocampique devrait donc annihiler la présence de PNN dans l'aire ciblée pendant au moins la durée de l'EE choisie, c'est-à-dire 10 jours.

En ce qui concerne les animaux restés en condition stardard, on observe la diminution attendue du nombre de PNN autour des interneurones PV de l'aire CA1 des souris MA, c'est-à-dire entre les groupes NTg-PBS-SH et Tg2576-PBS-SH (-500,00 [-137,6 à -862,4] cellules PV+/PNN+) (**Fig.62A** ; ANOVA à deux facteurs, génotype : $F_{1,23}$ = 11,90 ; d = 1 ; p = 0,0022 ; $R^2$ = 27,92 ; injection : $F_{1,23}$ = 4,198 ; d = 1 ; p = 0,0521 ; $R^2$ = 9,85 ; interaction : $F_{1,23}$ = 4,328 ; d = 1 ; p = 0,0488 ; $R^2$ = 10,16 ; test post-hoc de Tukey : NTg-PBS-SH *vs* Tg2576-PBS-SH, p = 0,0036) (Cattaud et al., 2018). Toujours de façon attendue, l'injection de ChABC dans l'aire CA1 des souris NTg est associée à une tendance à la diminution (-373,3 [14,05 à -760,7] cellules PV+/PNN+) du nombre de PNN autour des cellules PV (test post-hoc de Tukey : NTg-PBS-SH *vs* NTg-ChABC-SH, p = 0,0632) (Yamada et al., 2015). En revanche, l'injection de ChABC dans l'aire CA1 des souris Tg2576 ne diminue pas plus encore la présence de PNN autour des neurones PV par rapport aux souris NTg (-497,1 [-123,9 à -870,4] cellules PV+/PNN+) (test post-hoc de Tukey : NTg-PBS-SH *vs* Tg2576-PBS-SH, p = 0,0036 et NTg-PBS-SH *vs* Tg2576-ChABC-SH, p = 0,0051). Fait intéressant, les souris NTg injectées avec la ChABC (NTg-ChABC-SH) présentent des niveaux de PNN autour des interneurones PV similaires à ceux observés chez les souris Tg2576-PBS-SH (396,66 et 270,00 cellules PV+/PNN+).

À noter que ces observations sont identiques si on considère la totalité des cellules PNN+, qu'elles soient PV+ ou non (**Fig.62B**). Ceci est en accord avec le fait que, dans l'hippocampe, la grande majorité des PNN sont retrouvés autour des interneurones PV plutôt que d'autres types de neurones (cf. Introduction IV.B).

Comme décrit dans la littérature, la diminution de PNN dans l'aire CA1 des souris Tg2576 est associée à une diminution du nombre de cellules PV+ détectables

(Tg2576-PBS-SH : -742,10 [-289,40 à -1195,00] cellules PV+ par rapport aux souris NTg-PBS-SH) (**Fig.62C** ; ANOVA à deux facteurs, génotype, $F_{1,23}$ = 15,54 ; d = 1 ; p = 0,0006 ; $R^2$ = 32,34 ; injection, $F_{1,23}$ = 4,810 ; d = 1 ; p = 0,0387 ; $R^2$ = 10,01 ; interaction, $F_{1,23}$ = 5,651 ; d = 1 ; p = 0,0261 ; $R^2$ = 11,76 ; test post-hoc de Tukey : NTg-PBS-SH *vs* Tg2576-PBS-SH, p = 0,0008) (Cattaud et al., 2018).

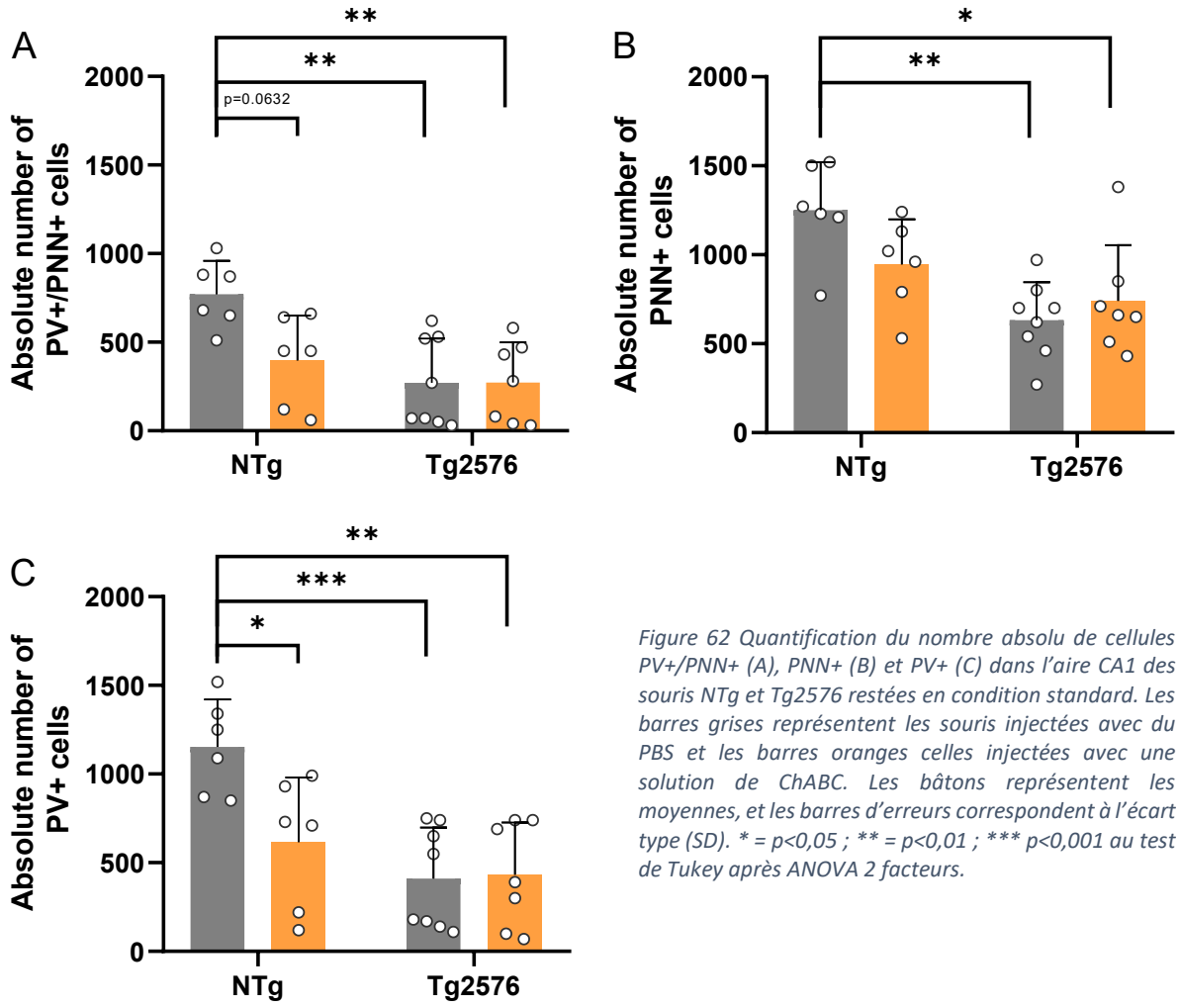



*Figure 62 Quantification du nombre absolu de cellules PV+/PNN+ (A), PNN+ (B) et PV+ (C) dans l'aire CA1 des souris NTg et Tg2576 restées en condition standard. Les barres grises représentent les souris injectées avec du PBS et les barres oranges celles injectées avec une solution de ChABC. Les bâtons représentent les moyennes, et les barres d'erreurs correspondent à l'écart type (SD). * = p<0,05 ; ** = p<0,01 ; *** p<0,001 au test de Tukey après ANOVA 2 facteurs.*

De la même manière, chez les souris NTg, la diminution du nombre de PNN autour des neurones PV induite par l'injection de ChABC est également accompagnée d'une diminution du nombre de cellules PV+ détectables (-536,70 [52,76 à 1021,00] cellules PV+) par rapport aux souris NTg-PBS-SH (test post-hoc de Tukey : NTg-PBS-SH *vs* NTg-ChABC-SH, p = 0,0260). Enfin, en accord avec les observations précédentes, l'injection de ChABC dans l'aire CA1 des souris Tg2576 ne cause pas de diminution plus importante du nombre de cellules PV+ (-720,50 [-254,20 à -1187] cellules PV+ ; test post-hoc de Tukey ; NTg-PBS-SH vs Tg2576-ChABC-SH, p = 0,0015 ; **Fig.62C**).

Ces résultats confirment qu'une injection aigue de ChABC dans CA1 réduit le nombre de neurones PV+ détectables, et donc potentiellement l'activité de ces neurones, même après 10 jours. Cela indique que, dans notre expérience, la limitation du remodelage de PV/PNN est *a priori* effective pendant toute la durée du séjour dans l'EE.

Dans un second temps, nous avons donc cherché à déterminer les conséquences d'un EE de 10 jours sur la présence de neurones PV+ et de leur PNN, en fonction du génotype des souris et de l'injection réalisée (ChABC ou PBS). En ce qui concerne les souris NTg injectées avec la ChABC dans l'aire CA1 et placées dans l'EE (NTg-ChABC-EE), l'injection de ChABC n'est plus associée à une diminution du nombre de PNN autour des interneurones PV (**Fig.63A** ; ANOVA à deux facteurs, génotype, $F_{1,15}$ = 52,77 ; d = 1 ; p < 0,0001 ; $R^2$ = 58,93 ; injection, $F_{1,15}$ = 14,57 ; d = 1 ; p = 0,0017 ; $R^2$ = 16,27 ; interaction, $F_{1,15}$ = 9,448 ; d = 1 ; p = 0,0077 ; $R^2$ = 10,55 ; test post-hoc de Tukey : NTg-PBS-EE *vs* NTg-ChABC-EE, p = 0,9948). Ces résultats suggèrent que les stimulations sensorielles et sociales de l'EE ont contrebalancé la diminution des PNN autour des interneurones PV causée par l'injection de ChABC et permis une restauration plus rapide des PNN que dans des conditions basales. En outre, cette absence de diminution du nombre de PNN dans l'aire CA1 concerne l'ensemble des cellules PNN+, qu'elles soient PV+ ou non (**Fig.63B**). De plus, l'absence de diminution des PNN autour des interneurones PV chez les souris NTg-ChABC-EE est également associée à un nombre d'interneurones PV+, similaire à celui mesuré chez les souris NTg-PBS-EE (**Fig.63C** ; ANOVA à deux facteurs, génotype, $F_{1,15}$ = 39,99 ; d = 1 ; p < 0,0001 ; $R^2$ = 50,38 ; injection, $F_{1,15}$ = 8,18 ; d = 1 ; p = 0,0119 ; $R^2$ = 10,31 ; interaction, $F_{1,15}$ = 15,33 ; d = 1 ; p = 0,0014 ; $R^2$ = 19,32 ; test post-hoc de Tukey : NTg-PBS-EE *vs* NTg-ChABC-EE, p = 0,8554).

En ce qui concerne les souris Tg2576, les 10 jours d'EE sont associés à une augmentation du nombre de PNN autour des interneurones PV de CA1 lorsque les souris ont été injectées avec du PBS (Tg2576-PBS-EE) par rapport aux souris Tg2576 injectées avec de la ChABC (Tg2576-ChABC-EE) (612,50 [210,00 à 1015,00] cellules PV+/PNN+) (**Fig.63A** ; test post-hoc de Tukey : Tg2576-PBS-EE *vs* Tg2576-ChABC-EE, p = 0,0021). De façon intéressante, ce nombre de cellules PV+/PNN+ est proche de celui observé chez les souris NTg-PBS-EE (test post-hoc de Tukey : NTg-PBS-EE *vs* Tg2576-PBS-EE, p = 0,0781). Ces observations sur la présence de PNN sont

identiques que cela concerne des cellules PV+ ou non (**Fig.63B**). Ces résultats indiquent donc que **1)** 10 jours d'EE sont suffisants pour permettre le remodelage du réseau PV/PNN chez les souris Tg2576, et **2)** l'injection de ChABC dans CA1 empêche le remodelage des interneurones PV par le séjour en EE.

En accord avec l'idée que la présence de PNN autour des neurones PV est associée à une augmentation de l'activité unitaire de ces neurones (Devienne et al., 2021), et donc de la présence de protéine PV (Yamada et al., 2015), l'augmentation du nombre de PNN autour des cellules PV observée chez les souris Tg2576-PBS-EE par rapport aux souris Tg2576-ChABC-EE, s'accompagne d'une augmentation du nombre de cellules PV+ dans l'aire CA1 (830,00 [301,60 à 1358,00] cellules PV+) (**Fig.63C** ; test post-hoc de Tukey : Tg2576-PBS-EE *vs* Tg2576-ChABC-EE, p = 0,0020).

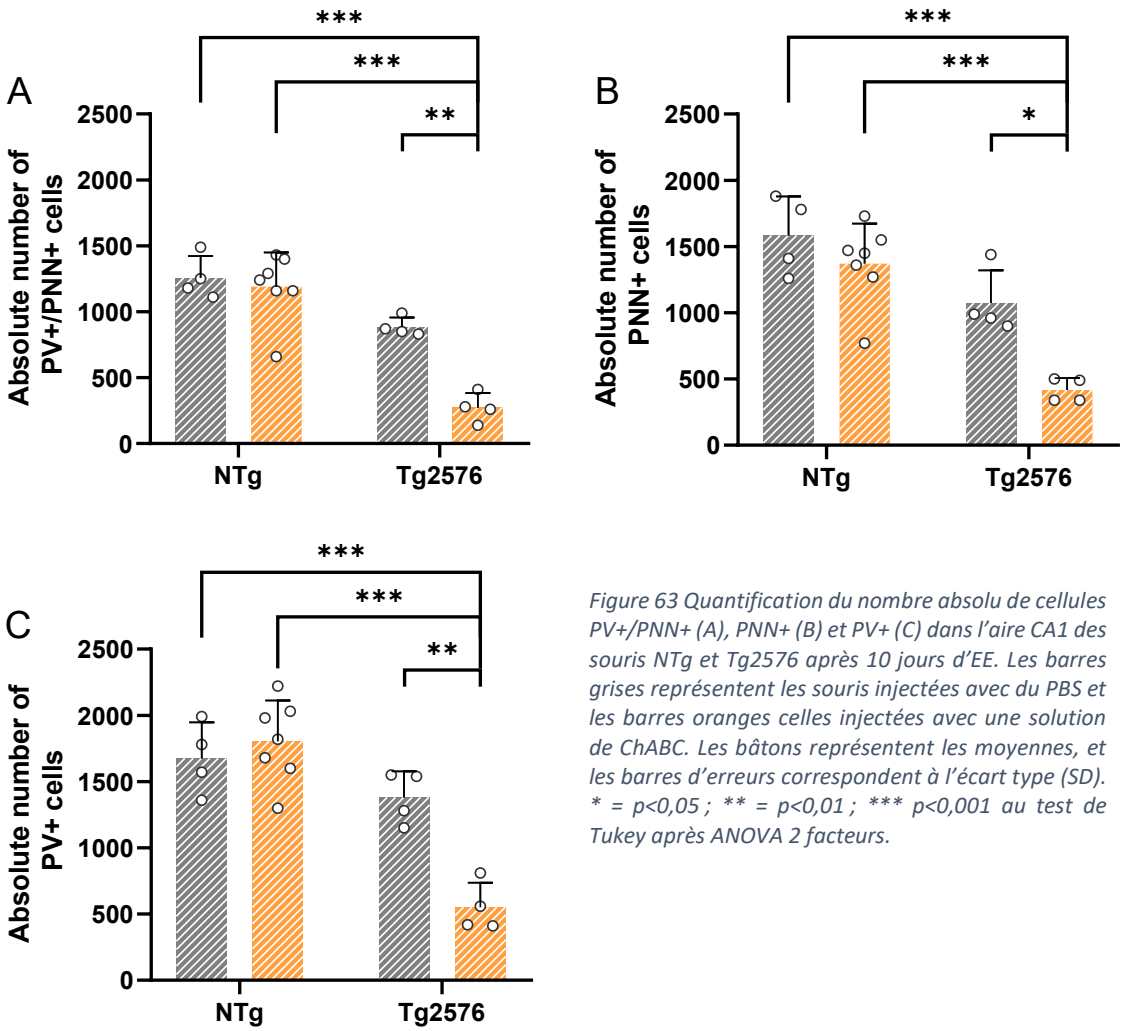



*Figure 63 Quantification du nombre absolu de cellules PV+/PNN+ (A), PNN+ (B) et PV+ (C) dans l'aire CA1 des souris NTg et Tg2576 après 10 jours d'EE. Les barres grises représentent les souris injectées avec du PBS et les barres oranges celles injectées avec une solution de ChABC. Les bâtons représentent les moyennes, et les barres d'erreurs correspondent à l'écart type (SD). * = p<0,05 ; ** = p<0,01 ; *** p<0,001 au test de Tukey après ANOVA 2 facteurs.*

L'ensemble de ces données nous permet également de comparer les nombres de cellules PV+ et PV+/PNN+ dans l'aire CA1 en fonction des conditions d'hébergement. Chez les souris NTg-PBS, on observe que 10 jours d'EE induisent une augmentation du nombre de PNN autour des interneurones PV dans l'aire CA1 (487,50 [210,80 à 764,20] cellules PV+/PNN+) (**Fig.64A** ; ANOVA à un facteur, $F_{2,11} = 11,68$ ; d = 2 ; p = 0,0019 ; $R^2 = 67,99$ ; test post-hoc de Tukey : NTg-PBS-SH vs NTg-PBS-EE, p = 0,0016). Cette augmentation du nombre de PNN autour des neurones PV s'accompagne également d'une augmentation du nombre de neurones PV+ détectables (521,70 [84,13 à 959,20] cellules PV+) (**Fig.64B** ; ANOVA à un facteur, $F_{2,11} = 5,192$ ; d = 2 ; p = 0,0258 ; $R^2 = 48,56$ ; test post-hoc de Tukey : NTg-PBS-SH *vs* NTg-PBS-EE, p = 0,0205), suggérant une augmentation de l'activité des neurones PV dans l'aire CA1 des souris NTg après 10 jours d'EE. Ces résultats sont différents de ce qui est observé par Cattaud et al., 2018, montrant qu'un séjour en EE de 10 semaines diminue le nombre de cellules PV+ et PV+/PNN+ dans l'aire CA1 de l'hippocampe de souris NTg. Cette contradiction peut potentiellement s'expliquer par le fait que, dans notre étude, l'EE ne dure que 10 jours. Il est possible que l'EE ait un effet différent sur le remodelage des cellules PV et de leur PNN en fonction de la durée de celui-ci, ce qui pourrait expliquer une augmentation du nombre de neurones PV/PNN après 10 jours d'EE (période d'enrichissement courte), et une diminution à 10 semaines (enrichissement durable dans le temps).

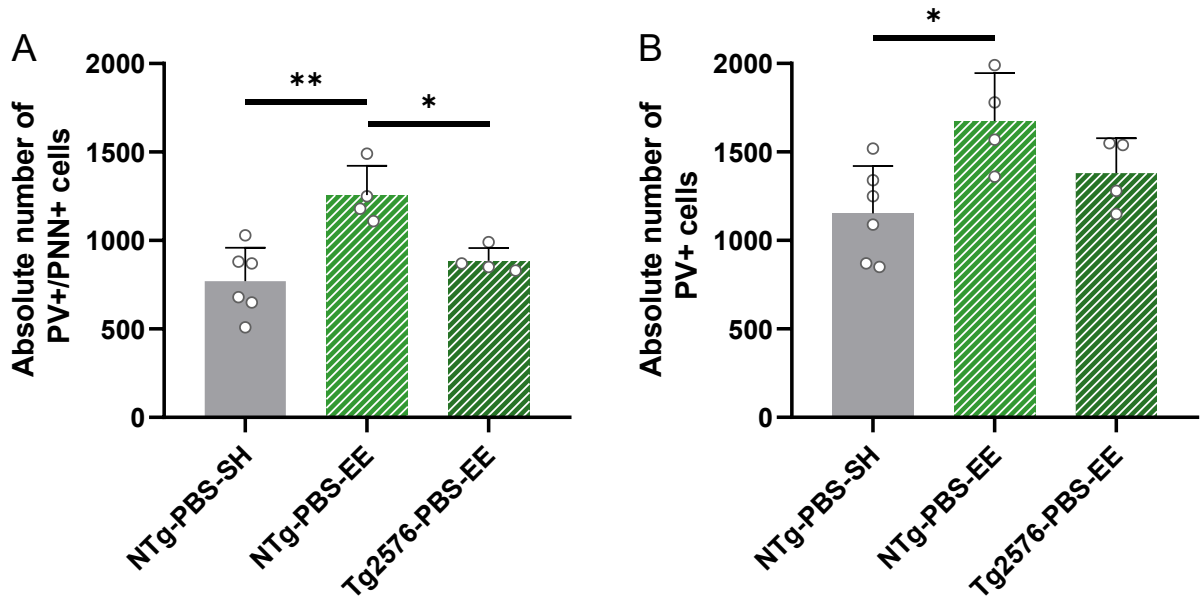



*Figure 64 (A) Nombre absolu de cellules PV+/PNN+ dans l'aire CA1 en fonction des conditions d'hébergement. (B) Nombre de cellules PV+ en fonction des conditions d'hébergement. Les bâtons représentent les moyennes, et les barres d'erreurs correspondent à l'écart type (SD). * = p<0,05 ; ** = p<0,01 ; *** p<0,001 au test de Tukey après ANOVA 1 facteur.*

En ce qui concerne les souris Tg2576 injectées avec du PBS (Tg2576-PBS-EE), le nombre de cellules PV+/PNN+ et PV+ dans l'aire CA1 à l'issue des 10 jours d'EE est augmenté, résultant en une absence de différence avec le nombre de neurones PV+/PNN+ et PV+ observés chez les souris NTg-PBS-SH (**Fig.65A** ; PV+/PNN+ : test post-hoc de Tukey : NTg-PBS-SH *vs* Tg2576-PBS-EE, p = 0,5208 ; **Fig.65B** ; PV+ : test post-hoc de Tukey : NTg-PBS-SH *vs* Tg2576-PBS-EE, p = 0,3746). Ces résultats indiquent donc qu'un EE de 10 jours induit une restauration du nombre de neurones PV/PNN ; cet effet de l'enrichissement de 10 jours est en outre similaire à ce qui est observé après un EE de 10 semaines (Cattaud et al., 2018).

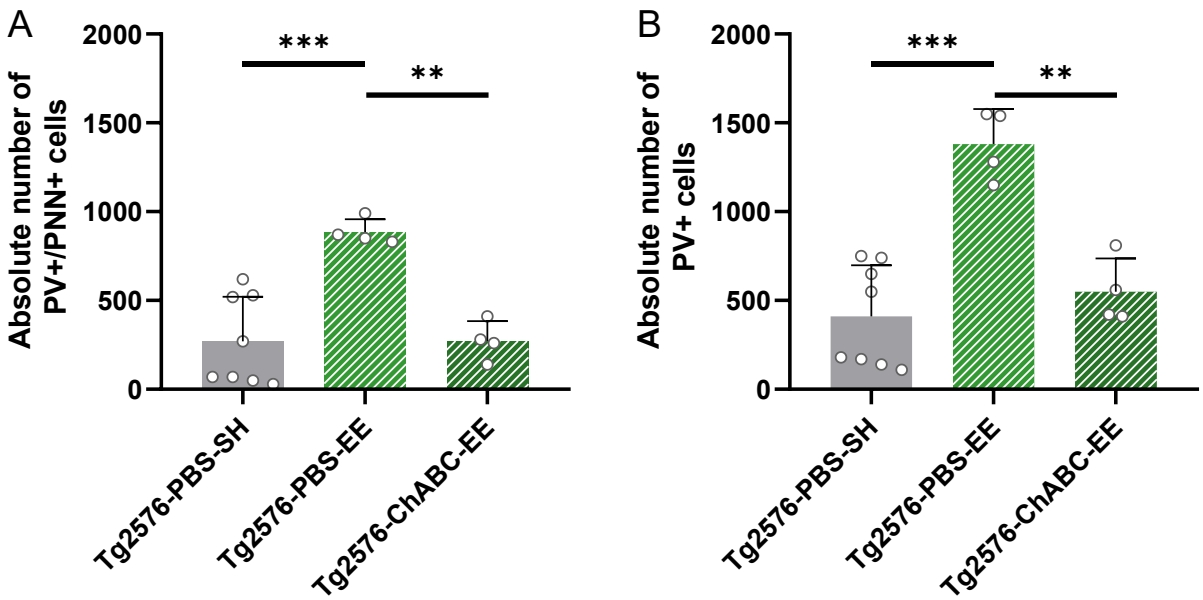



*Figure 65 (A) Comparaison du nombre absolu de cellules PV+/PNN+ dans l'aire CA1 en fonction des conditions d'hébergement. L'augmentation des interneurones PV/PNN des souris Tg2576-PBS-EE correspond à une augmentation de 228 [111 à 344] % de cellules PV+/PNN+ par rapport aux souris Tg2576-PBS-SH. (B) Comparaison du nombre de cellules PV+, avec une augmentation d'environ 235 [138 à 333] % de cellules PV+. Les bâtons représentent les moyennes, et les barres d'erreurs correspondent à l'écart type (SD). * = p<0,05 ; ** = p<0,01 ; *** p<0,001 au test de Tukey après ANOVA 1 facteur.*

De fait, le séjour dans l'EE induit également une augmentation du nombre d'interneurones PV/PNN dans l'aire CA1 des souris Tg2576-PBS-EE par rapport aux souris restées en cage standard (Tg2576-PBS-SH). Cette augmentation est de l'ordre de 615,00 [300,80 à 929,20] cellules PV+/PNN+ (ANOVA à un facteur, $F_{2,13} = 14,99$ ; d = 2 ; p = 0,0004 ; $R^2 = 69,75$ ; test post-hoc de Tukey : Tg2576-PBS-SH *vs* Tg2576-PBS-EE, p = 0,0005) et de 968,80 [568,50 à 1369,00] cellules PV+ (ANOVA à un facteur, $F_{2,13} = 21,25$ ; d = 2 ; p < 0,0001 ; $R^2 = 76,58$ ; test post-hoc de Tukey : Tg2576-PBS-SH *vs* Tg2576-PBS-EE, p < 0,0001) comparé aux souris Tg2576 restées en environnement standard. Dix jours d'EE permettent donc en moyenne de tripler voire

quadrupler le nombre d'interneurones PV détectables et de PNN dans l'aire CA1 des souris Tg2576 (**Fig.65A & B**).

En revanche, les souris Tg2576 injectées avec la ChABC avant le séjour en EE (Tg2576-ChABC-EE) présentent à leur sortie le même nombre de neurones PV+/PNN+ et PV+ que ce qui est observé chez les souris Tg2576 restées dans un hébergement standard (Tg2576-SH-PBS) (**Fig.65A** ; PV+/PNN+ : test post-hoc de Tukey : Tg2576-PBS-SH *vs* Tg2576-ChABC-EE, p = 0,9998 ; **Fig.65B** ; PV+ : test post-hoc de Tukey : Tg2576-PBS-SH *vs* Tg2576-ChABC-EE, p = 0,6406). Ces résultats indiquent donc que **1)** 10 jours d'EE permettent d'annihiler les différences dans le nombre de neurones PV+ et PV+/PNN+ entre souris Tg2576 et NTg ; et **2)** l'injection de ChABC dans CA1 empêche de remodelage des interneurones PV dû à l'EE chez les souris Tg2576.

Ainsi, l'ensemble de ces résultats suggèrent qu'un séjour transitoire dans l'EE est en mesure de restaurer le réseau PV+/PNN+ des souris Tg2576, mais que l'injection de ChABC dans CA1 empêche l'effet bénéfique de l'EE sur les cellules PV dans cette aire hippocampique.

## B. L'injection de ChABC dans l'aire CA1 empêche l'amélioration EE-dépendante de la mémoire spatiale et le remodelage des interneurones PV/PNN chez les souris Tg2576

### 1. Tests comportementaux

Nous avons donc montré que l'injection de ChABC dans l'aire CA1 prévient le remodelage de PV/PNN au cours de l'EE chez les souris Tg2576. Ainsi, si ce remodelage PV/PNN est le substrat de l'amélioration comportementale observée chez les souris Tg2576 après un séjour dans l'EE, alors les souris modèles de la MA injectées avec la ChABC dans l'aire CA1 ne devraient pas montrer d'amélioration de mémoire sous-tendue par l'aire CA1, c'est-à-dire la mémoire spatiale.
Afin d'observer cela, un autre lot de souris femelles a reçu une injection de PBS ou d'une solution de ChABC dans l'aire CA1 à l'âge de 5 mois, et est placé le lendemain dans un EE pour une durée de 10 jours, à l'identique du protocole précédent (NTg-PBS-EE (n=13) ; NTg-ChABC-EE (n=13) ; Tg2576-PBS-EE (n=14) et Tg2576-

ChABC-EE (n=15)). Cependant, à la fin de l'EE, ces souris retournent dans leur cage standard pour une durée de 20 jours, avant de passer un test de mémoire spatiale (dépendant de CA1) et de mémoire sociale (dépendant de CA2 ; les résultats obtenus à ce test sont traités dans une partie ultérieure) dans un ordre aléatoire (**Fig.66**). La durée de 20 jours entre la fin de l'EE et les tests permet de mesurer un possible effet à moyen terme de l'EE sur le comportement des souris. Le groupe contrôle est constitué de souris ayant passé 30 jours dans des conditions d'hébergements standard après injection de PBS ou de ChABC (NTg-PBS-SH (n=13) ; NTg-ChABC-SH (n=13) ; Tg2576-PBS-SH (n=13) et Tg2576-ChABC-SH (n=13)). Une fois les deux tests effectués, les animaux sont sacrifiés pour réaliser des analyses histologiques.

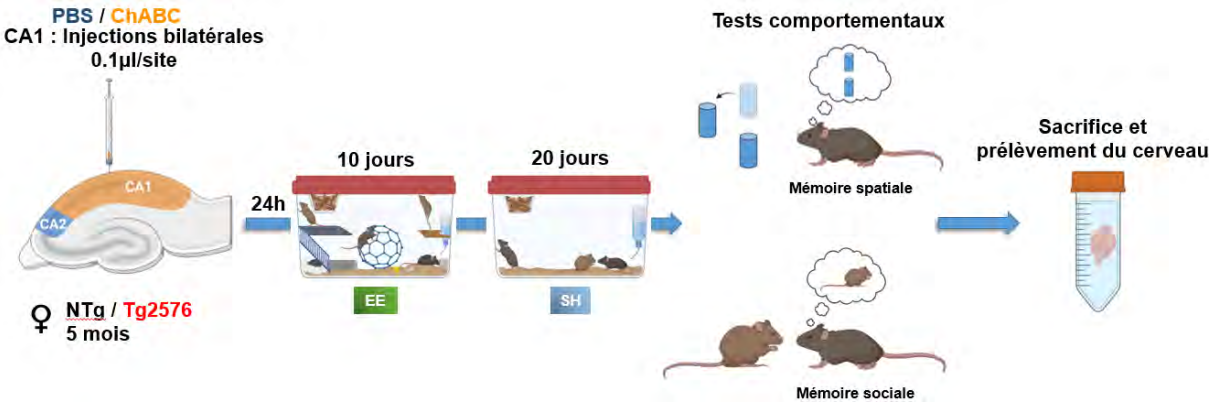



*Figure 66 À l'âge de 5 mois, les souris NTg et Tg2576 reçoivent une injection d'une solution de PBS ou de ChABC dans l'aire CA1. Ensuite, soit elles restent dans leur condition standard d'hébergement (SH) pendant 30 jours, soit elles sont placées dans un EE pour une durée de 10 jours et retournent dans leur cage standard pendant 30 jours. Les animaux sont ensuite soumis à des tests de mémoire spatiale et de mémoire sociale avant d'être sacrifiés, afin que les tissus soient prélevés pour réaliser des quantifications du nombre de neurones PV et de la présence de PNN en fonction des conditions expérimentales.*

Dans un premier temps, nous allons donc nous intéresser aux performances de mémoire spatiale des souris. En effet, cette mémoire a été rapportée comme étant perturbée dès l'âge de 3-4 mois chez les souris Tg2576 (Ashe, 2001 ; Verret et al., 2013), perturbation facilement mise en évidence dans le test de localisation d'objets (Good et al., 2007 ; Rey 2022), en utilisant l'attraction spontanée des rongeurs pour la nouveauté (Ennaceur & Delacour, 1998) (cf Méthodes III.A).

Dans notre étude, toutes les souris sont soumises au test de localisation d'objet afin d'évaluer leur mémoire spatiale. Dans une première cohorte, la tâche de rappel est effectuée à 3h, constituant le groupe « short-term memory » (STM) et dans la seconde, le rappel est effectué à 24h, formant le groupe « long-term memory » (LTM).

Sur l'ensemble des groupes expérimentaux, le temps passé à explorer les objets au cours de l'acquisition indique que les souris n'ont pas de préférence innée pour une localisation, quel que soit leur génotype et traitement (**Fig. 67A-D**).

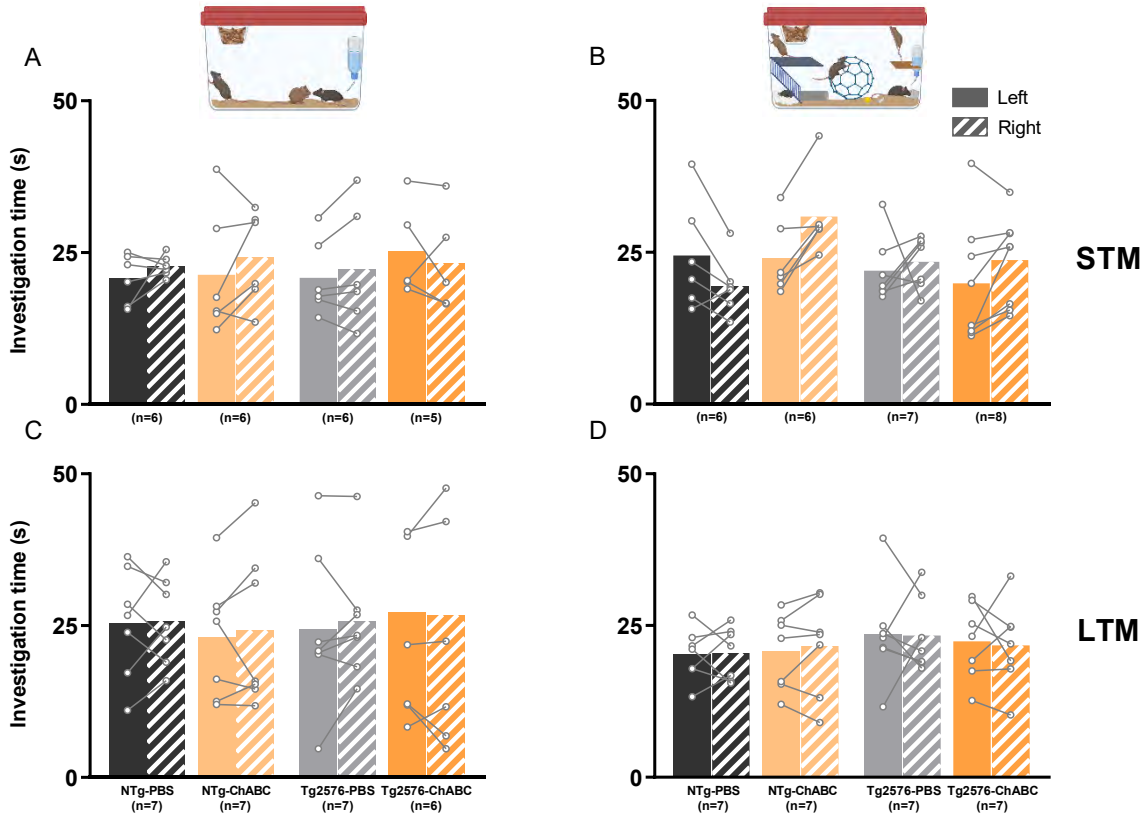



*Figure 67 Temps d'exploration des objets placés à gauche et à droite de l'arène lors de la phase d'acquisition de localisation d'objets. Sur les panneaux de gauche (A & C), on retrouve les animaux restés en hébergement standard ; sur les panneaux de droite (B & D), ceux placés dans un EE. En haut, on retrouve la cohorte dont la mémoire est testée à 3h (STM, A & B). En bas, la cohorte LTM (C&D), dont la mémoire est testée à 24h. Les barres pleines représentent l'objet gauche, alors que les barres hachurées représentent l'objet droit.*

Nous avons donc évalué la mémoire à court terme (STM ; délai de 3h entre l'acquisition et le test) dans une première cohorte de souris. Au cours de ce test, on observe que les souris NTg restées en hébergement standard (NTg-SH) et injectées avec du PBS ou de la ChABC étaient plus susceptibles d'explorer l'objet déplacé (**Fig. 68A**) (NTg-PBS-SH 13,79 s ± 6,17 objet fixe vs 22,85 s ± 7,27 objet déplacé ; $t = 6,4145$ ; $d = 5$ ; $p = 0,0014$ ; $R^2 = 89,16$ et NTg-ChABC-SH 15,45 s ± 5,69 objet fixe vs 21,52 ± 5,91 objet déplacé ; $t = 16,9023$ ; $d = 5$ ; $p < 0,0001$ ; $R^2 = 98,27$). Cela indique que la dégradation des PNN dans l'aire CA1 30 jours avant le test de localisation d'objets n'entrave pas la mémoire spatiale à court terme des souris NTg.

En revanche, les souris Tg2576 restées en hébergement standard tout le long de l'expérience (Tg2576-SH) montrent un temps d'exploration similaire entre les deux objets dans le même test de mémoire à court terme, indépendamment de l'injection de PBS (Tg2576-PBS-SH 18,35 s ± 7,53 objet fixe vs 16,31 s ± 7,25 objet déplacé ; t = 3,7026 ; d=5 ; p = 0,0140 ; $R^2$ = 73,27) ou de ChABC (Tg2576-ChABC-SH 22,46s ± 6,97 objet fixe vs 20,40s ± 7,51 objet déplacé ; t = 1,7043 ; d=5 ; p = 0,1635 ; $R^2$ = 42,06), confirmant que les souris Tg2576 âgées de 6 mois présentent une altération de la mémoire spatiale, même à ce court délai de rétention (**Fig.68A**).

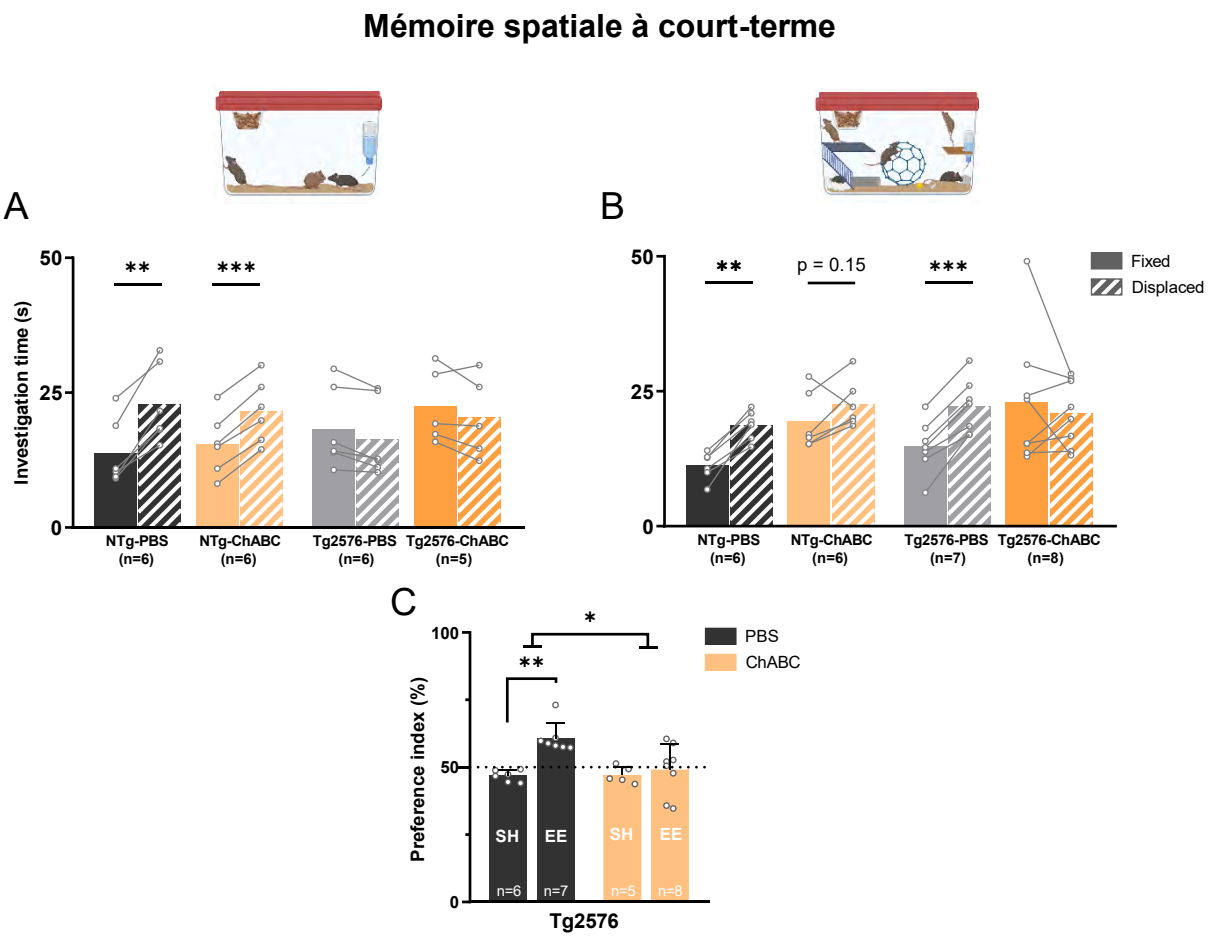



*Figure 68 Test de localisation d'objets avec un rappel effectué à 3h (STM). (A) Les souris sont testées 30 jours après l'injection de PBS ou de ChABC, en étant restées dans leur environnement standard (SH) L'ordonnée représente le temps d'interaction avec les objets fixe et déplacé en secondes. (B) Temps d'intéraction avec chacun des objets (en secondes) lors du test de rappel à 3h pour des souris placées dans un EE pendant 10 jours le lendemain de l'injection, puis remises dans leur cage standard pour une durée de 20 jours. (C) Pourcentage de préférence pour l'objet déplacé des souris Tg2576. SH : hébergement standard ; EE : environnement enrichi. Les bâtons correspondent à la moyenne, et les barres d'erreurs correspondent à l'écart type (SD). * = p<0,05 ; ** = p<0,01 ; *** p<0,001 au test de student (A & B) ainsi qu'au au test de Tukey après ANOVA 2 facteurs (C).*

Cependant, les souris Tg2576 injectées avec le PBS puis placées en EE montrent une préférence pour l'objet déplacé (**Fig.68B** ; Tg2576-PBS-EE 14,75s ± 4,94 objet fixe *vs* 22,19s ± 5,13 objet déplacé ; t=8,9154 ; d=6 ; p < 0,0001 ; $R^2$ = 92,98). Précisément,

il y a une augmentation de 13,98 % [5,07 à 22,88 %] de préférence pour le nouvel objet par rapport aux souris Tg2576-PBS-SH (**Fig.68C** ; ANOVA à deux facteurs, interaction, $F_{1,22} = 5,585$ ; d = 1 ; p = 0,0274 ; $R^2 = 11,43$ Test post-hoc de Dunnett : Tg2576-PBS-SH *vs* Tg2576-PBS-EE, p = 0,0019). Ainsi, nos résultats indiquent que 10 jours d'EE sont suffisants pour induire des modifications qui durent au moins 20 jours et qui sont capables de soutenir une amélioration de la mémoire spatiale à court terme chez les souris Tg2576. Cependant, les souris Tg2576 ayant reçu une injection de ChABC dans CA1 avant l'EE ne montrent pas d'amélioration de la mémoire spatiale à court terme (**Fig.68B** ; Tg2576-ChABC-EE 23,00s ± 12,18 objet fixe *vs* 21,04s ± 6,11 objet déplacé ; t=0,5279 ; d= 7 ; p = 0,5751 ; $R^2 = 4,70$), suggérant que l'altération du remodelage des interneurones PV et des PNN pendant l'EE empêche les bénéfices cognitifs générés par ce dernier. Chez les souris NTg, l'EE n'induit pas d'effet particulier sur les performances des souris dans ce test de mémoire spatiale, même si l'on observe qu'une souris du groupe (NTg-ChABC-EE) ne montre pas de préférence pour l'objet déplacé (**Fig.68B**).

Pour déterminer si le séjour en EE induit également des bénéfices sur la consolidation d'une mémoire spatiale chez les souris Tg2576, une autre cohorte de souris a été testée avec un délai de 24 heures entre l'acquisition et le test (cohorte LTM).

De façon attendue, en condition SH, les souris NTg injectées avec du PBS passent plus de temps à explorer l'objet déplacé que l'objet fixe (**Fig.69A** ; NTg-PBS-SH 17,40s ± 6,40 objet fixe *vs* 27,50s ± 7,78 objet déplacé ; t = 3,7542 ; d =6 ; p < 0,0095 ; $R^2$ = 70,14), montrant une capacité de mémoire spatiale à long terme intacte. En ce qui concerne les souris NTg injectées dans CA1 avec la ChABC, les performances semblent légèrement perturbées, mais cela est principalement dû à un individu qui passe plus de temps à interagir avec l'objet à la position familière (NTg-ChABC-SH 16,12s ± 10,74 objet fixe *vs* 21,78s ± 6,64 objet déplacé ; t = 2,0021 ; d = 6 ; p = 0,0922 ; $R^2 = 40,05$). En accord avec les résultats observés en STM, les souris Tg2576 injectées avec du PBS et placées en EE passent plus de temps à explorer l'objet déplacé (**Fig.69B** ; Tg2576-PBS-EE 17,23 s ± 3,75 objet fixe *vs* 25,70 s ± 6,03 objet déplacé ; t = 5,7916 ; d = 6 ; p = 0,0012 ; $R^2 = 84,82$), avec une augmentation de 7,42 % [0,18 à 14,66 %] de préférence par rapport aux souris Tg2576-SH-PBS (**Fig.69C** ; ANOVA à deux facteurs, interaction, $F_{1,24} = 4,515$ ; d=1 ; p = 0,0044 ; $R^2 = 92,98$ ; test post-hoc de Dunnett : Tg2576-PBS-SH *vs* Tg2576-PBS-EE, p = 0,0437).

**Mémoire spatiale à long-terme**

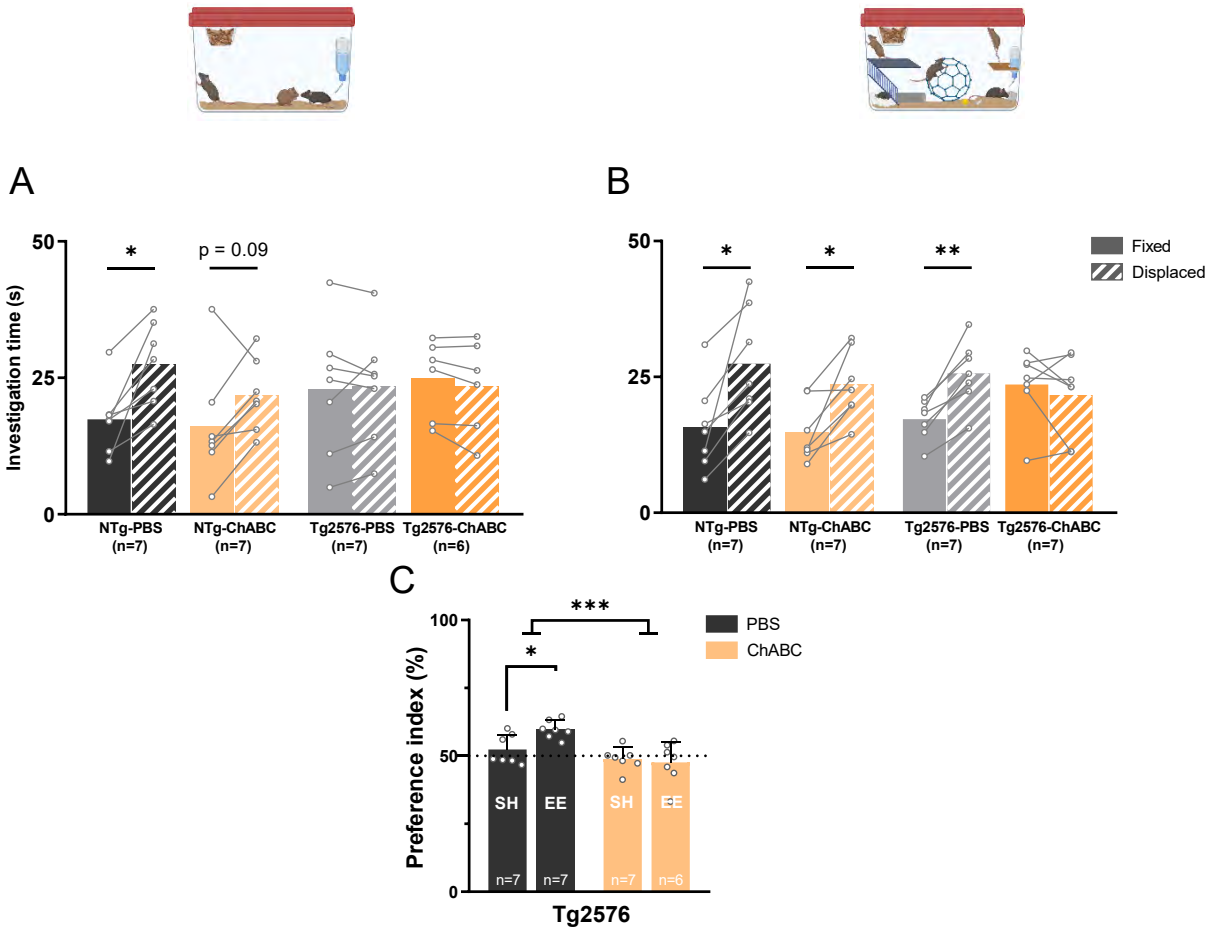



*Figure 69 Test de localisation d'objets avec un rappel effectué à 24h (LTM). (A) Les souris sont testées 30 jours après l'injection de PBS ou de ChABC, en étant restées dans leur environnement standard (SH) L'ordonnée représente le temps d'interaction avec les objets fixe et déplacé en secondes. (B) Temps d'intéraction avec chacun des objets (en secondes) lors du test de rappel à 24h pour des souris placées dans un EE pendant 10 jours le lendemain de l'injection, puis remises dans leur cage standard pour une durée de 20 jours. (C) Pourcentage de préférence pour l'objet déplacé des souris Tg2576. SH : hébergement standard ; EE : environnement enrichi. Les bâtons correspondent à la moyenne, et les barres d'erreurs correspondent à l'écart type (SD). * = p<0,05 ; ** = p<0,01 ; *** p<0,001 au test de student (A & B) ainsi qu'au au test de Tukey après ANOVA 2 facteurs (C).*

Ce résultat confirme qu'un séjour transitoire en EE améliore la mémoire spatiale des souris Tg2576, et ce même avec un rappel de 24h. Cependant, comme observé pour la mémoire à court terme, le séjour de 10 jours en EE n'a pas permis de restaurer la mémoire spatiale à long terme des souris Tg2576 si celles-ci ont reçu une injection de ChABC dans CA1 avant l'EE (Tg2576-ChABC-EE 23.60s ± 6.66 objet fixe vs 21.69s ± 7.60 objet déplacé ; t =0,8677 ; d=6 ; p = 0,4189 ; $R^2$ = 11,15). Cette expérience démontre que l'effet bénéfique de l'EE sur la mémoire spatiale chez les souris Tg2576 est maintenu lorsque la mémoire liée à CA1 nécessite une consolidation.

L'ensemble de ces résultats suggèrent que le blocage du remodelage des interneurones PV de l'aire CA1 pendant l'EE empêche l'apparition des bénéfices cognitifs dépendants de l'EE sur la mémoire spatiale des souris Tg2576.

### 2. Analyse histologique

Une fois les tests comportementaux effectués, les animaux ont été sacrifiés (entre 8h et 2h après la fin du dernier test) et une quantificaction de cellules PV+, PNN+ et PV+/PNN+ dans l'aire CA1 des souris a été effectuée afin de pouvoir associer les résultats comportementaux à un remodelage PV/PNN potentiel (**Fig.66**). Ces quantifications sont donc réalisées 30 jours après l'injection de PBS ou de ChABC, et 20 jours après la fin de l'EE.

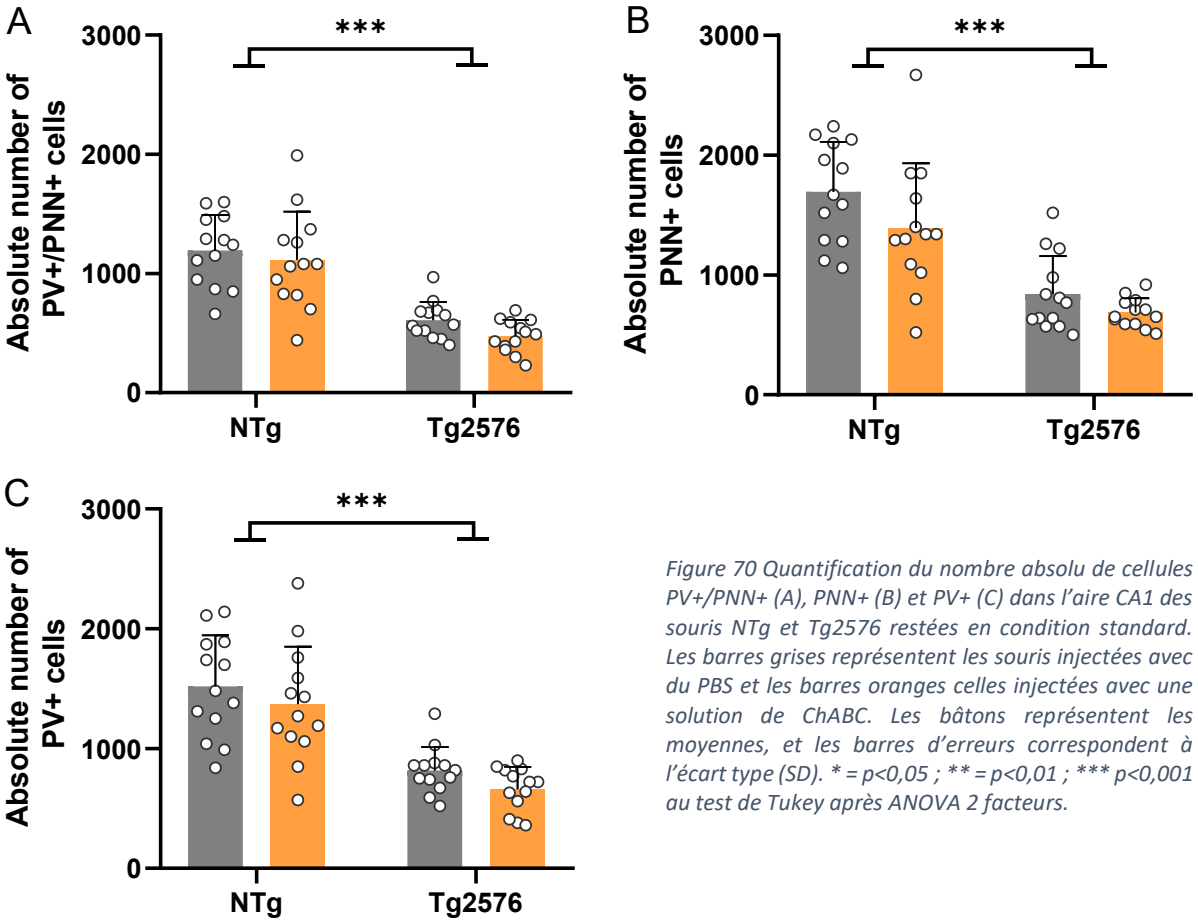



*Figure 70 Quantification du nombre absolu de cellules PV+/PNN+ (A), PNN+ (B) et PV+ (C) dans l'aire CA1 des souris NTg et Tg2576 restées en condition standard. Les barres grises représentent les souris injectées avec du PBS et les barres oranges celles injectées avec une solution de ChABC. Les bâtons représentent les moyennes, et les barres d'erreurs correspondent à l'écart type (SD). * = p<0,05 ; ** = p<0,01 ; *** p<0,001 au test de Tukey après ANOVA 2 facteurs.*

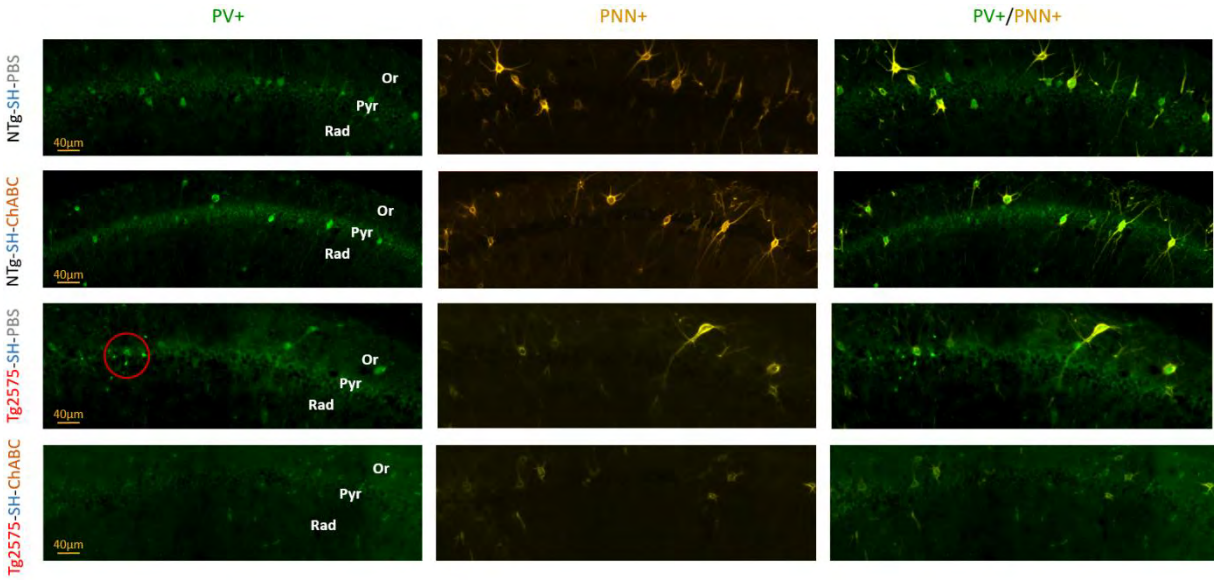



*Figure 71 Microphotographies illustrant les cellules PV+ (vert) et PNN+ (coloration WFA, jaune) dans la zone CA1 de souris NTg et Tg2576 âgées de 6 mois et élevées en condition d'hébergement standard (SH). Elles ont reçu 30 jours plus tôt, une injection de PBS ou de ChABC dans l'aire CA1. Toutes les images traitées sur ImageJ en utilisant des paramètres de contraste identiques. On observe une nette diminution du nombre de cellules PV+, PNN+ et PV+/PNN+ chez les groupes de souris Tg2576, comparés aux groupes de souris NTg. Le cercle rouge indique la trace de l'injection réalisée dans CA1, visible sur certains clichés. Or : Oriens ; Pyr : Pyramidale ; Rad : Radiatum.*

Premièrement, en ce qui concerne les individus restés en condition standard pendant 30 jours (NTg-PBS-SH (n=13) ; NTg-ChABC-SH (n=13) ; Tg2576-PBS-SH (n=13) et Tg2576-ChABC-SH (n=13)), on observe toujours la diminution attendue du nombre de PNN autour des interneurones PV (-611,50 [-460,30 à -762,80] cellules PV+/PNN+) entre les souris NTg et les souris Tg2576, indépendemment de l'injection de ChABC dans CA1 (**Fig.70A & 71** ; ANOVA à deux facteurs, génotype, $F_{1,48} = 66,09$ ; d = 1 ; p < 0,0001 ; $R^2 = 56,87$). Cette observation est cohérente avec la diminution du nombre de PNN dans l'aire CA1 des souris Tg2576 (-779,60 [567,50 à 991,80] cellules PNN+) (**Fig.70B & 71** ; ANOVA à deux facteurs, génotype, $F_{1,48} = 54,60$ ; d = 1 ; p < 0,0001 ; $R^2 = 50,66$), qui s'accompagne également d'une diminution du nombre de cellules PV+ quantifiables (-705,00 [510,90 à 899,10] cellules PV+) (**Fig.70C & 71** ; ANOVA à deux facteurs, génotype, $F_{1,48} = 53,34$ ; d = 1 ; p < 0,0001 ; $R^2 = 51,37$). Ces résultats sont en accord avec les observations réalisées sur le modèle Tg2576 (Cattaud et al., 2018), ainsi qu'avec les mesures que nous avons obtenues lorsque nous avons effectué l'analyse histologique 10 jours après l'injection (correspondant à la fin de la durée de l'EE ; cf Résultats I.A).

De plus, si après 10 jours l'injection de ChABC dans l'aire CA1 de souris NTg cause une diminution du nombre de cellules PV+, PNN+ et PV+PNN+, cet effet est aboli à 30 jours (**Fig.70 & 71**). En accord avec la littérature et nos observations, ces résultats

suggèrent que 30 jours après l'injection de ChABC, les PNN autour des interneurones PV des souris NTg ont commencé à « repousser » et l'activité des interneurones PV n'est pas réduite.

Concernant les individus placés en EE pour une durée de 10 jours, on observe toujours 20 jours plus tard la diminution du nombre de PNN autour des interneurones PV entre les souris NTg-PBS-EE et les souris Tg2576, qu'elles soient injectées avec du PBS (-436,20 [196,90 à 675,50] cellules PV+/PNN+) ou de la ChABC (-715,60 [480,10 à 951,00] cellules PV+/PNN+) (**Fig.72A & 73** ; ANOVA à deux facteurs, génotype, $F_{1,51} = 68,92$ ; d = 1 ; $p < 0,0001$ ; $R^2 = 51,90$ ; injection, $F_{1,51} = 9,18$ ; d = 1 ; $p = 0,0039$ ; $R^2 = 6,865$ ; interaction, $F_{1,51} = 1,962$ ; d = 1 ; $p = 0,1673$ ; $R^2 = 1,477$ ; test post-hoc de Tukey : NTg-PBS-EE *vs* Tg2576-PBS-EE, $p < 0,0001$ et NTg-PBS-EE *vs* Tg2576-ChABC-EE, $p < 0,0001$).

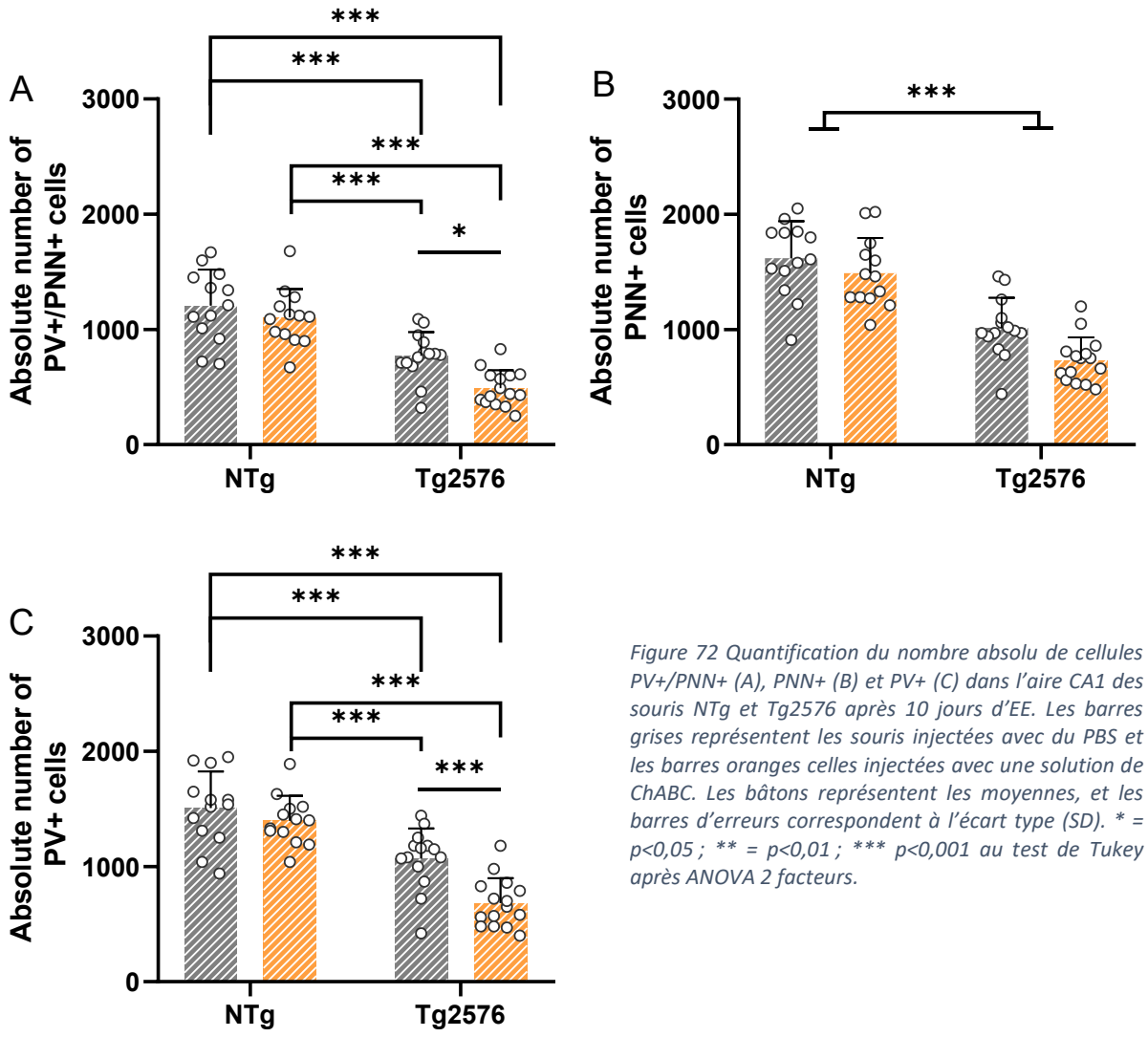



*Figure 72 Quantification du nombre absolu de cellules PV+/PNN+ (A), PNN+ (B) et PV+ (C) dans l'aire CA1 des souris NTg et Tg2576 après 10 jours d'EE. Les barres grises représentent les souris injectées avec du PBS et les barres oranges celles injectées avec une solution de ChABC. Les bâtons représentent les moyennes, et les barres d'erreurs correspondent à l'écart type (SD). * = p<0,05 ; ** = p<0,01 ; *** p<0,001 au test de Tukey après ANOVA 2 facteurs.*

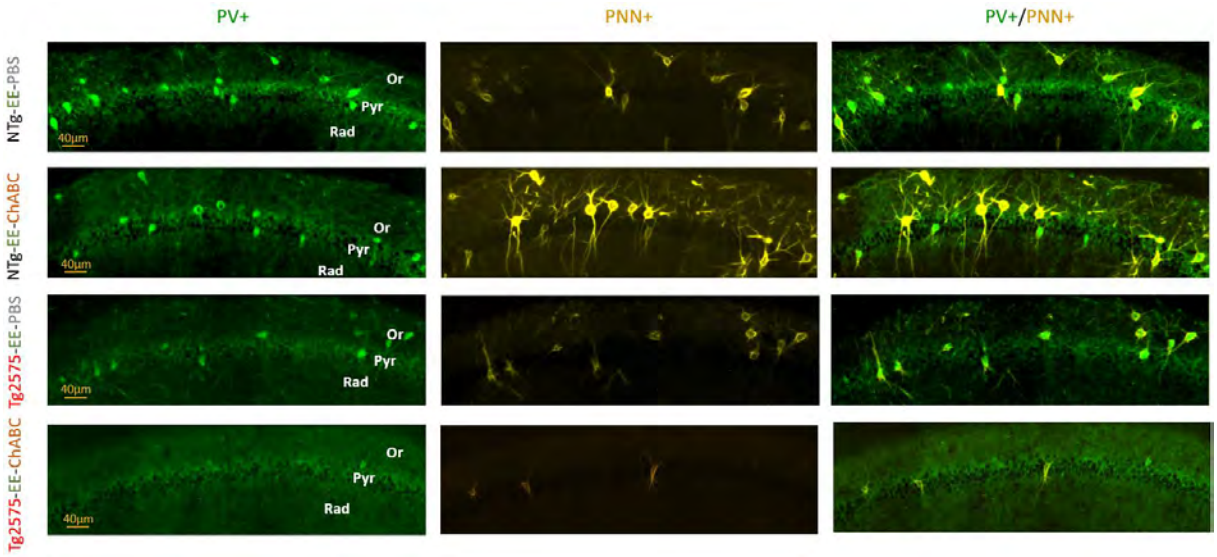



*Figure 73 Microphotographies illustrant les cellules PV+ (vert) et PNN+ (coloration WFA, jaune) dans la zone CA1 de souris NTg et Tg2576 âgées de 6 mois et élevées en EE. Elles ont reçu 30 jours plus tôt, une injection de PBS ou de ChABC dans l'aire CA1. Toutes les images traitées sur ImageJ en utilisant des paramètres de contraste identiques. On observe une nette diminution du nombre de cellules PV+, PNN+ et PV+/PNN+ chez les groupes de souris Tg2576, comparés aux groupes de souris NTg. Or : Oriens ; Pyr : Pyramidale ; Rad : Radiatum.*

Cette diminution est confirmée par la quantification du nombre de PNN dans l'aire CA1 de l'hippocampe indépendemment du fait que les neurones qu'ils entourent soient PV+ ou non (**Fig.72B & 73**). Enfin, toujours en comparaison aux souris NTg-PBS-EE, la diminution du nombre de PNN autour des interneurones PV est accompagnée d'une diminution de l'activité des interneurones PV pour les souris Tg2576-PBS-EE (-438,40 [-178,40 à -698,40] cellules PV+) et Tg2576-ChABC-EE (-824,40 [-568,50 à -1080,00] cellules PV+) (**Fig.72C & 73** ; ANOVA à deux facteurs, génotype, $F_{1,51} = 70,54$ ; d = 1 ; $p < 0,0001$ ; $R^2 = 49,99$ ; injection, $F_{1,51} = 13,00$ ; d = 1 ; p = 0,0007 ; $R^2 = 9,212$ ; interaction, $F_{1,51} = 4,060$ ; d = 1 ; p = 0,0492 ; $R^2 = 2,877$ ; test post-hoc de Tukey : NTg-PBS-EE vs Tg2576-PBS-EE, p = 0,0002 et NTg-PBS-EE vs Tg2576-ChABC-EE, $p < 0,0001$). Il est intéressant de noter que la diminution du nombre de cellules PV+ et PV+/PNN+ du groupe de souris Tg2576 injectées avec une solution de ChABC est doublée par rapport au groupe de souris Tg2576 injectées avec du PBS, et cela se confirme lorsque l'on compare les deux groupes (PV+ : test post-hoc de Tukey : Tg2576-PBS-EE vs Tg2576-ChABC-EE, $p < 0,0009$ ; PV+/PNN+ : Tg2576-PBS-EE vs Tg2576-ChABC-EE, $p < 0,0118$). Ces résultats confirment les observations faites lorsque les animaux sont sacrifiés 10 jours après l'injection, à savoir une augmentation du nombre de cellules PV+, PNN+ et PV+/PNN+ chez les souris Tg2576-PBS-EE par rapport aux souris Tg2576-ChABC-EE.

Enfin, nous avons également comparé le nombre de cellules PV+ et PV+/PNN+ des souris restées en SH ou placées en EE.

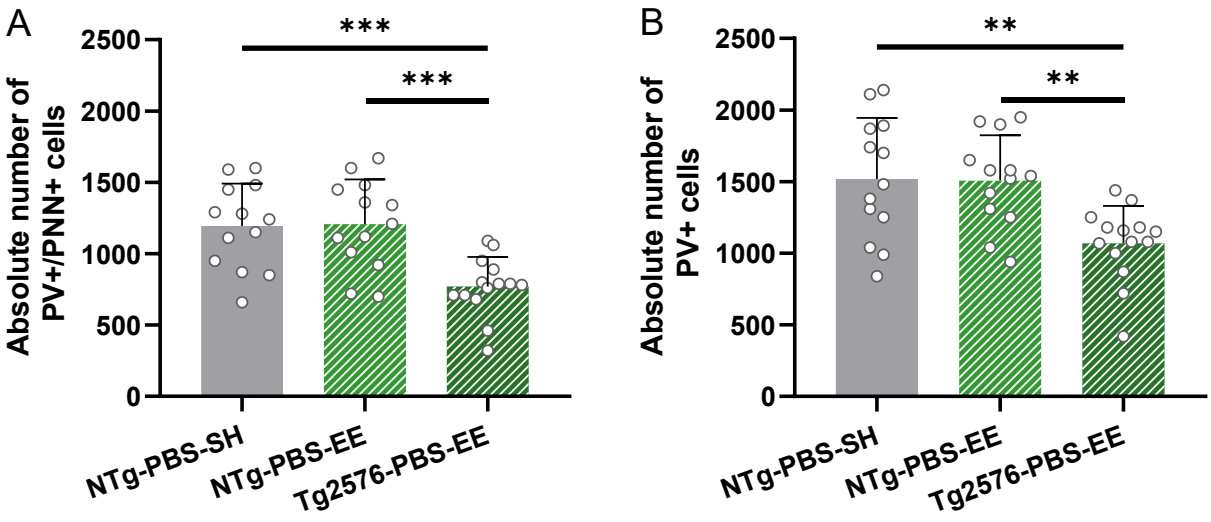



*Figure 74 (A) Comparaison du nombre absolu de cellules PV+/PNN+ dans l'aire CA1 en fonction des conditions d'hébergement. (B) Comparaison du nombre de cellules PV+. Les bâtons représentent les moyennes, et les barres d'erreurs correspondent à l'écart type (SD). * = p<0,05 ; ** = p<0,01 ; *** p<0,001 au test de Tukey après ANOVA 1 facteur.*

Premièrement, nous n'observons pas de différence au niveau de ces quantifications entre les souris NTg-PBS-SH et les souris NTg-PBS-EE, 30 jours après l'injection (**Fig.74A & B**). Or, 10 jours après l'injection, nous avions mesuré une augmentation du nombre de cellules PV+ et PV+/PNN+ avec le groupe NTg-PBS-EE (**Fig.64A**). Dans l'étude de Cattaud et al., 2018, les souris NTg présentent un nombre de neurones PV et de PNN dans CA1 plus bas que les souris restées en SH. Il est donc possible que les stimulations induites par l'EE augmentent dans un premier temps le nombre d'interneurones PV quantifiables, puis ce nombre se stabilise et enfin diminue avec le temps.

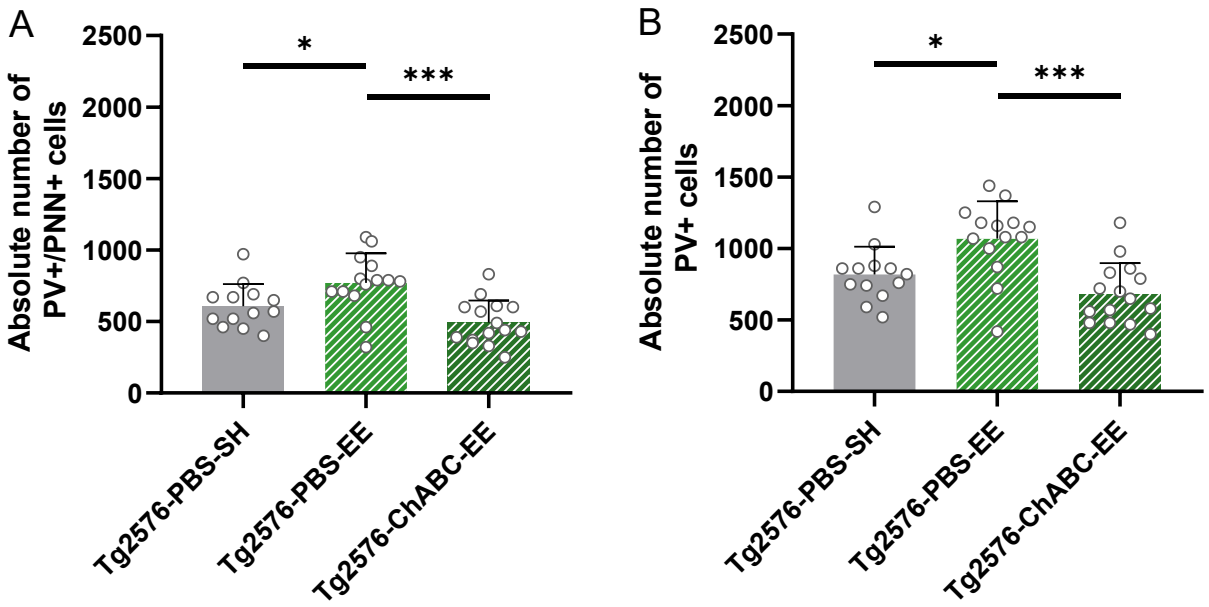



*Figure 75 (A) Comparaison du nombre de cellules PV+/PNN+dans l'aire CA1 en fonction des conditions d'hébergement, avec une augmentation chez les souris Tg2576-PBS-EE d'environ 27 [0 à 54] % de cellules PV+/PNN+ par rapport aux souris Tg2576-PBS-SH et 56 [27 à 86] % par rapport aux souris Tg2576-ChABC-EE (B) Comparaison du nombre absolu de cellules PV+. L'augmentation des interneurones PV des souris Tg2576-PBS-EE correspond à une augmentation de 31 [4 à 56] % de cellules PV+ par rapport aux souris Tg2576-PBS-SH et 56 [26 à 88] % par rapport aux souris Tg2576-ChABC-EE. Les bâtons représentent les moyennes, et les barres d'erreurs correspondent à l'écart type (SD). * = p<0,05 ; ** = p<0,01 ; *** p<0,001 au test de Tukey après ANOVA 1 facteur.*

En outre, on observe une nette augmentation du nombre de PNN qui entourent les interneurones PV chez les souris Tg2576-PBS-EE, comparées aux souris Tg2576-PBS-SH (163,00 [0,44 à 325,60] cellules PV+/PNN+), ou aux souris Tg2576-ChABC-EE (279,4 [122,50 à 436,70] cellules PV+/PNN+) (**Fig.75A** ; ANOVA à un facteur, $F_{2,39}$ = 9,451 ; d = 2 ; p = 0,0005 ; $R^2$ = 32,64 ; test post-hoc de Tukey : Tg2576-PBS-EE *vs* Tg2576-PBS-SH, p = 0,0493 et Tg2576-PBS-EE *vs* Tg2576-PBS-SH, p = 0,0003). Cette observation est accompagnée d'une augmentation du nombre de cellules PV+ chez les souris Tg2576-PBS-EE en comparaison aux groupes Tg2576-PBS-SH (251,60 [39,60 à 463,60] cellules PV+) et Tg2576-ChABC-EE (386,00 [181,40 à 590,50] cellules PV+) (**Fig.75B** ; ANOVA à un facteur, $F_{2,39}$ = 10,80 ; d = 2 ; p = 0,0002 ; $R^2$ = 35,65 ; test post-hoc de Tukey : Tg2576-PBS-EE *vs* Tg2576-PBS-SH, p = 0,0168 et Tg2576-ChABC-EE *vs* Tg2576-PBS-SH, p < 0,0001).

Pour conclure, l'EE permet donc d'induire une restauration du nombre d'interneurones PV et de leur PNN dans la région CA1 ainsi qu'une amélioration de la mémoire spatiale chez les souris Tg2576. En revanche, l'injection de ChABC altère cette restauration et ne permet pas les bénéfices cognitifs de l'EE sur la mémoire spatiale.

### C. L'injection de ChABC dans CA1 n'affecte pas la restauration de PV+/PNN+ dans l'aire CA2 après l'EE

Afin de s'assurer de la spécificité de l'injection de ChABC dans CA1 sur les altérations du remodelage des interneurones PV et de leur PNN dû à l'EE, nous avons effectué une analyse quantitative du nombre de cellules PV+, PNN+ et PV+/PNN+ dans l'aire CA2, structure adjacente à l'aire CA1. De plus, nous avons également évalué la mémoire sociale des souris dans un test adapté, le test à 5/7 essais, qui dépend du fonctionnement de l'aire CA2 (Rey et al., 2022). L'injection de ChABC ayant lieu dans l'aire CA1, nous faisons l'hypothèse que le nombre d'interneurones PV et de leur PNN dans l'aire CA2 n'est pas impacté par cette injection.

Dans un premier temps, nous avons réalisé des quantifications histologiques dans l'aire CA2 de la même manière que celles réalisées dans l'aire CA1. Les mesures réalisées 10 jours après l'injection indiquent que, comme démontré dans l'aire CA1 et d'après nos attentes, les souris Tg2576-SH présentent une diminution du nombre de PNN entourant les interneurones PV dans l'aire CA2 par rapport aux souris NTg-SH (-276,80 [195,70 à 425,60] cellules PV+/PNN+). (**Fig.76**).

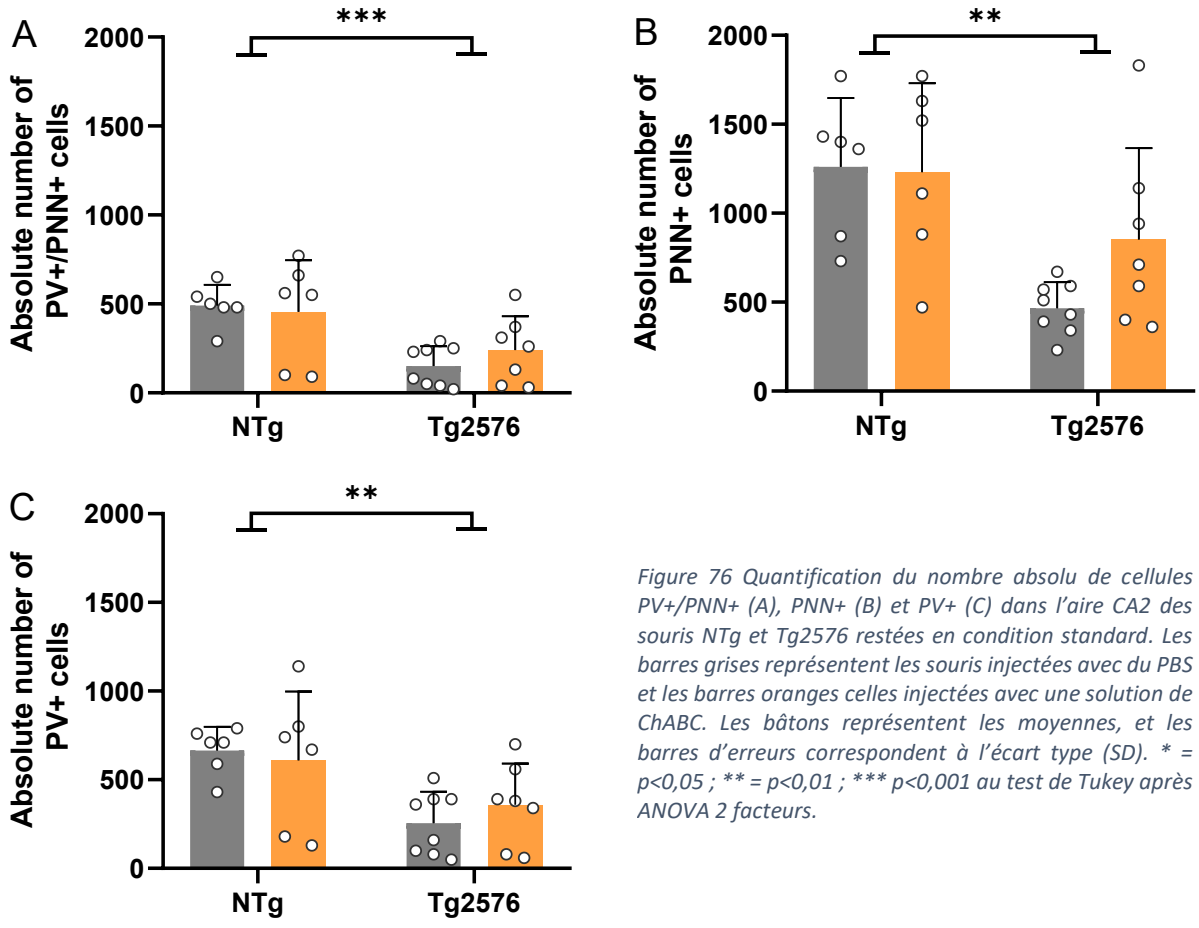



*Figure 76 Quantification du nombre absolu de cellules PV+/PNN+ (A), PNN+ (B) et PV+ (C) dans l'aire CA2 des souris NTg et Tg2576 restées en condition standard. Les barres grises représentent les souris injectées avec du PBS et les barres oranges celles injectées avec une solution de ChABC. Les bâtons représentent les moyennes, et les barres d'erreurs correspondent à l'écart type (SD). * = p<0,05 ; ** = p<0,01 ; *** p<0,001 au test de Tukey après ANOVA 2 facteurs.*

De façon importante, cette observation dans l'aire CA2 est indépendante de l'injection de ChABC dans l'aire CA1 des animaux (**Fig.76A** ; ANOVA à deux facteurs, injection, $F_{1,23}$ = 0,1539 ; d=1 ; p = 0,6984 ; $R^2$ = 0,3928 ; génotype, $F_{1,23}$ = 14,81 ; d=1 ; p = 0,0008 ; $R^2$ = 37,80). En accord avec ce résultat, on mesure également une diminution du nombre de PNN dans l'aire CA2 des souris Tg2576-SH qu'ils entourent ou non des interneurones PV (**Fig.76B** ; ANOVA à deux facteurs, injection, $F_{1,23}$ = 1,303 ; d=1 ; p = 0,2653 ; $R^2$ = 3,167 ; génotype, $F_{1,23}$ = 14,05 ; d=1 ; p = 0,0010 ; $R^2$ = 34,14). Il en est de même pour le nombre de cellules PV+ (**Fig.76C** ; ANOVA à deux facteurs, injection, $F_{1,23}$ = 0,065 ; d=1 ; p = 0,8009 ; $R^2$ = 0,180 ; génotype, $F_{1,23}$ = 12,07 ; d=1 ; p = 0,0021 ; $R^2$ = 33,38). En condition SH, les souris Tg2576 présentent donc dans l'aire CA2 un nombre réduit de cellules PV+, PNN+ et PV+/PNN+ par rapport aux souris NTg du même âge (Cattaud et al., 2018 ; Rey et al., 2022).

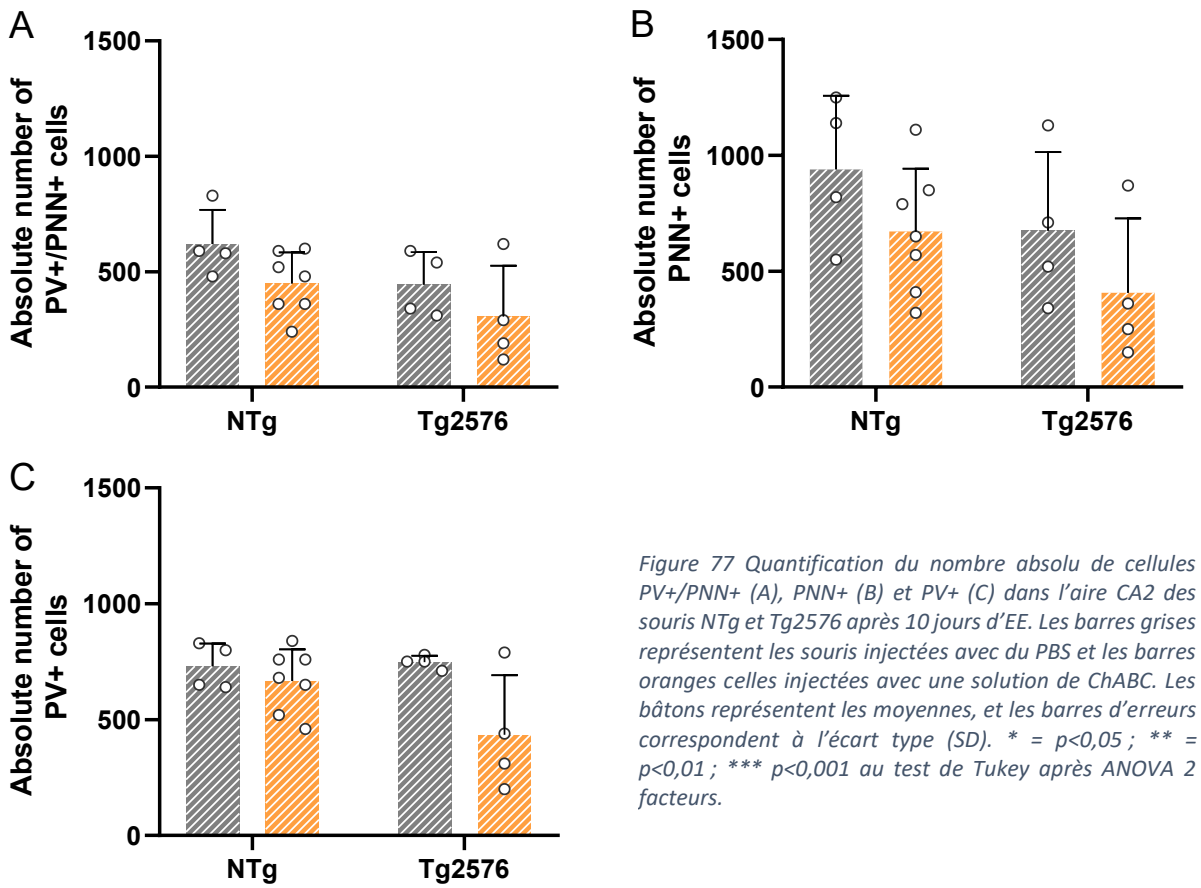



*Figure 77 Quantification du nombre absolu de cellules PV+/PNN+ (A), PNN+ (B) et PV+ (C) dans l'aire CA2 des souris NTg et Tg2576 après 10 jours d'EE. Les barres grises représentent les souris injectées avec du PBS et les barres oranges celles injectées avec une solution de ChABC. Les bâtons représentent les moyennes, et les barres d'erreurs correspondent à l'écart type (SD). * = p<0,05 ; ** = p<0,01 ; *** p<0,001 au test de Tukey après ANOVA 2 facteurs.*

En revanche, lorsque les souris ont passé 10 jours dans un EE, nous n'observons plus aucune différence du nombre de cellules PV+, PNN+ et PV+/PNN+ entre les deux

génotypes (**Fig.77**). Cela nous indique que l'EE permet de restaurer le nombre d'interneurones PV et de PNN dans l'aire CA2 des souris Tg2576, et que l'injection de ChABC dans CA1 n'empêche pas le remodelage des interneurones PV dans CA2. Cependant, on peut visuellement observer sur la **Fig.77** une tendance à la diminution de l'ensemble des quantifications chez les souris Tg2576 injectées avec la ChABC. On peut alors penser que la ChABC injectée dans l'aire CA1 ait un peu diffusé dans l'aire CA2, ou bien que les perturbations des interneurones causées dans CA1 par la ChABC ont une répercussion sur les interneurones présents dans CA2.

Pour conclure, lorsque l'on compare les animaux placés en SH et en EE, on observe qu'il n'y a pas de modification du nombre de cellules PV+/PNN+ (**Fig.78A**) et PV+ (**Fig.78B**) chez les souris NTg. De plus, le nombre d'interneurones PV et de leur PNN dans l'aire CA2 des souris Tg2576 placées en EE atteint des niveaux similaires à ceux des souris NTg.

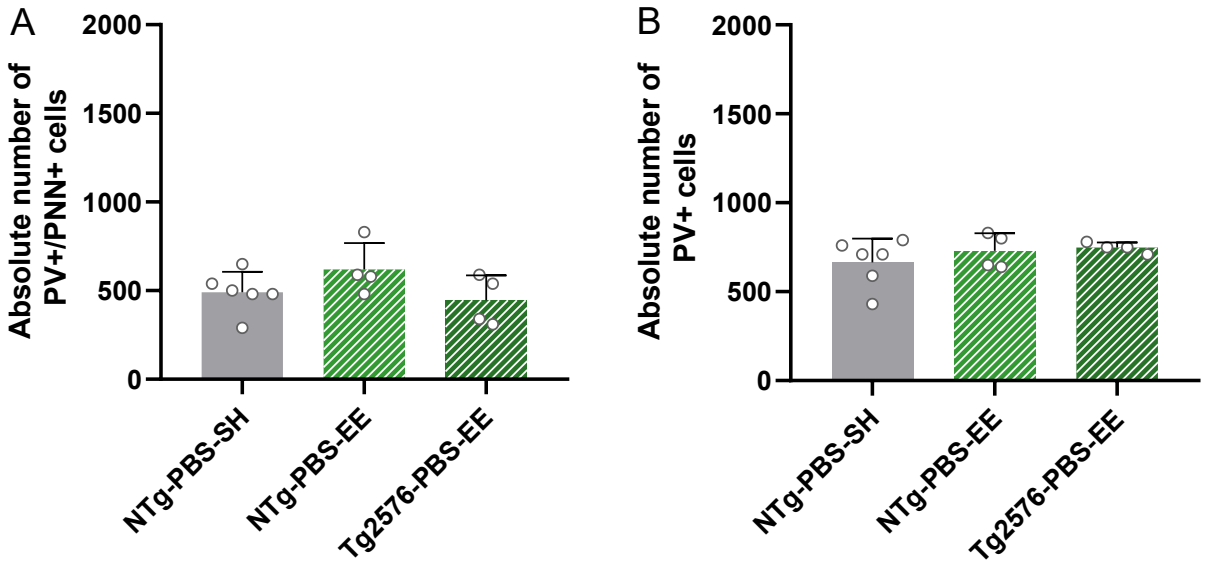



*Figure 78 (A) Comparaison du nombre absolu de cellules PV+/PNN+ dans l'aire CA2 en fonction des conditions d'hébergement. (B) Comparaison du nombre de cellules PV+. Les bâtons représentent les moyennes, et les barres d'erreurs correspondent à l'écart type (SD). * = p<0,05 ; ** = p<0,01 ; *** p<0,001 au test de Tukey après ANOVA 1 facteur.*

D'autre part, lorsque l'on compare les souris Tg2576 placées en SH ou en EE, observe une restauration du nombre de cellules PV+/PNN+ de 295,00 [51,76 à 538,20] chez les souris Tg2576-PBS-EE par rapport aux souris Tg2576-PBS-SH (**Fig.79A** ; ANOVA à un facteur, $F_{2,13} = 5,340$ ; d = 2 ; p = 0,0203 ; $R^2 = 45,10$ ; test post-hoc de Tukey : Tg2576-PBS-SH *vs* Tg2576-PBS-EE, p = 0,0178) et de 492,50 [202,70 à 782,30]

cellules PV+ (**Fig.79B** ; ANOVA à un facteur, $F_{2,13} = 10,08$ ; d = 2 ; p = 0,0023 ; $R^2$ = 60,80 ; test post-hoc de Tukey : Tg2576-PBS-SH *vs* Tg2576-PBS-EE, p = 0,0016).

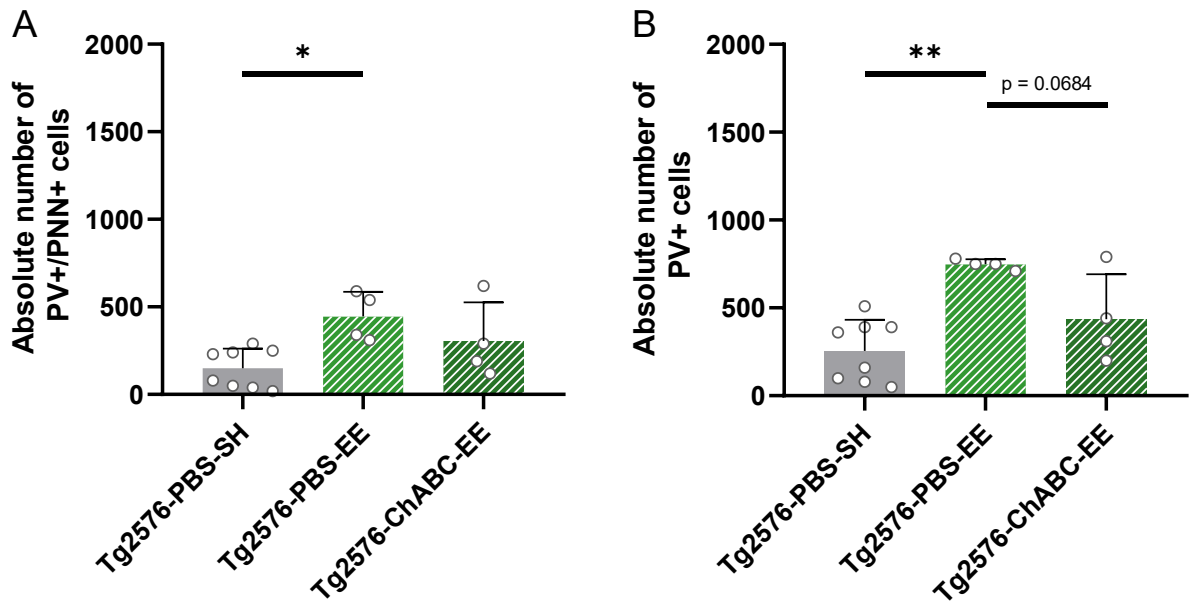



*Figure 79 (A) Comparaison du nombre de cellules PV+/PNN+ dans l'aire CA2 en fonction des conditions d'hébergement, avec une augmentation d'environ 196 [34 à 358] % de cellules PV+/PNN+ par rapport aux souris Tg2576-PBS-SH. (B) Comparaison du nombre absolu de cellules PV+. L'augmentation des interneurones PV des souris Tg2576-PBS-EE correspond à une augmentation de 192 [79 à 306] % de cellules PV+ par rapport aux souris Tg2576-PBS-SH. Les bâtons représentent les moyennes, et les barres d'erreurs correspondent à l'écart type (SD). * = p<0,05 ; ** = p<0,01 ; *** p<0,001 au test de Tukey après ANOVA 1 facteur.*

En revanche, lorsque les souris Tg2576-EE ont reçu une injection de ChABC dans CA1, nous n'observons plus de différence statistique du nombre de neurones quantifiés dans l'aire CA2 par rapport aux souris Tg2576-PBS-EE. Cependant on observe une tendance à l'augmentation du nombre de cellules PV+ quantifiables (test post-hoc de Tukey : Tg2576-PBS-EE *vs* Tg2576-ChABC-EE, p = 0,0684). Ces observations soutiennent l'hypothèse que l'injection de ChABC dans CA1 peut légèrement perturber la restauration des interneurones PV et de leur PNN dans CA2 due à l'EE, même si cette restauration est tout de même largement présente.

## D. L'injection de ChABC dans l'aire CA1 n'empêche pas les bénéfices cognitifs de l'EE sur la mémoire sociale des souris Tg2576

### 1. Tests de mémoire sociale

Le fait que l'injection de ChABC dans l'aire CA1 des souris Tg2576 empêche l'effet bénéfique induit par l'EE sur la mémoire spatiale suggère que cette amélioration de la mémoire dépendante de CA1 est soutenue par l'augmentation du nombre de cellules PV + quantifiables après l'EE. Par conséquent, chez ces mêmes souris, la perturbation induite par la ChABC de PV/PNN dans CA1 ne devrait pas altérer la capacité de mémoire sociale, qui dépend de l'intégrité de la fonction des interneurones PV dans l'aire CA2 (Piskorowski et al., 2016 ; Dominguez et al., 2019 ; Rey et al., 2022). Ainsi, nous avons examiné si l'injection de ChABC dans CA1 avait un impact sur les performances de mémoire sociale chez les souris NTg et Tg2576, hébergées dans des conditions standard. Pour cela, nous avons utilisé le test de mémoire sociale à 5 essais (Kogan et al., 2000 ; Dominguez et al., 2019 ; Rey et al., 2022), dont l'ensemble des essais se déroulent le même jour et permettent de tester la mémoire à court terme des individus (cohorte « short-term memory » STM). Dans le même ordre d'idée que pour les résultats présentés sur la mémoire spatiale, nous nous attendions à ce que l'EE ait un effet bénéfique sur la mémoire sociale des souris Tg2576. De plus, afin de déterminer si les effets bénéfiques de l'EE impliquent une consolidation à long terme, un sous-ensemble de souris NTg et Tg2576 a été soumis à un 6$^{ème}$ et 7$^{ème}$ essais le jour suivant, où la souris rencontrée lors des essais 1 à 4 est re-présentée deux fois (Loisy et al., 2022).

Lors de ces expériences, nous avons observé que les souris NTg et Tg2576 âgées de 6 mois et injectées de PBS dans l'aire CA1 se comportaient différemment au cours de quatre expositions consécutives à la même souris (**Fig.80**).

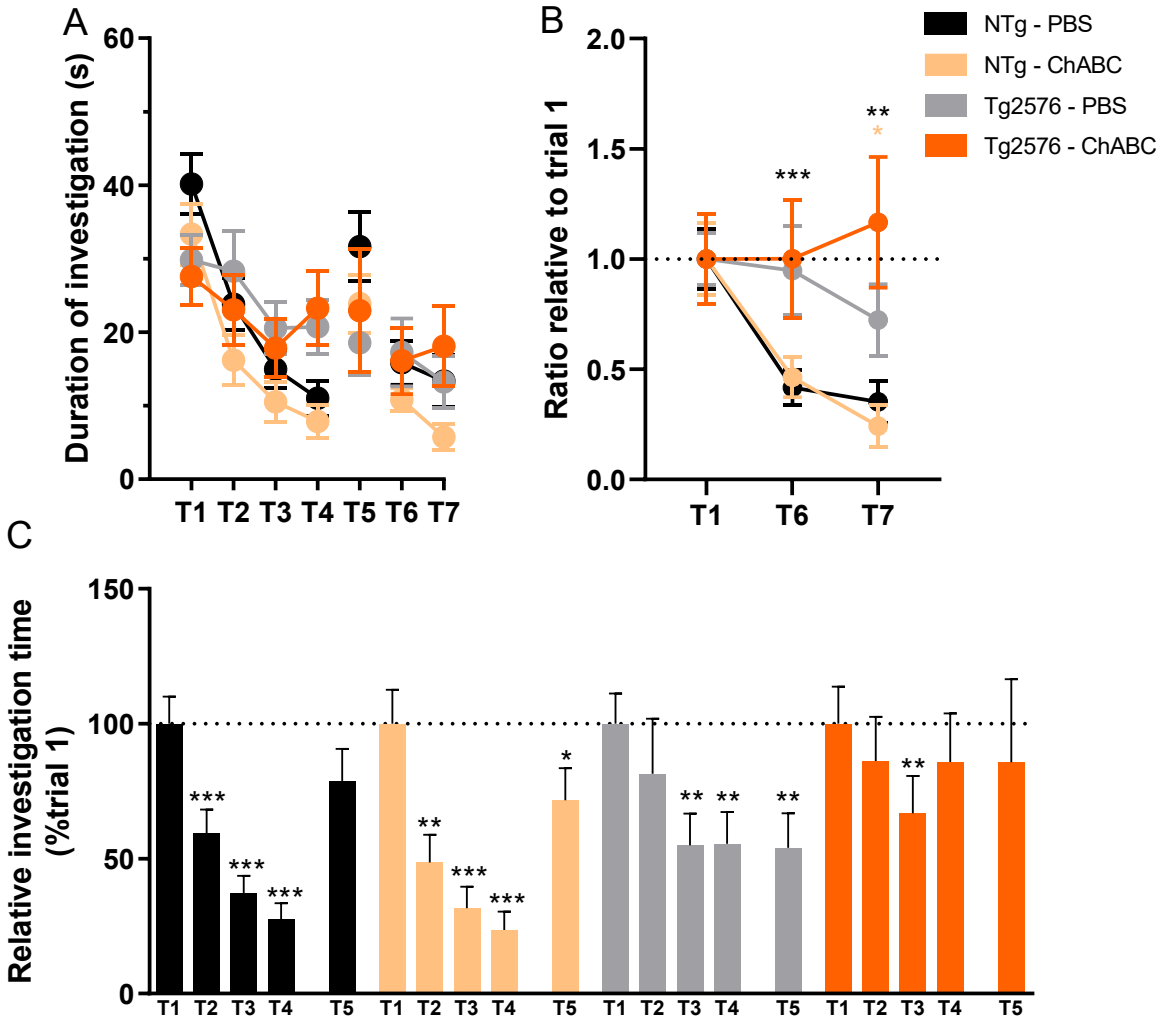



*Figure 80 T*est à 7 essais permettant d'évaluer la mémoire sociale des souris élevées en condition SH. (A) Temps d'interaction (s) de la souris testée envers la souris présentatrice (comprenant les individus des cohortes STM : essais 1 à 4 ; LTM : essais 6 et 7). (B) Ratio du temps d'interaction lors des essais 6 et 7, relatif au temps d'interaction lors de l'essai 1. La ligne pointillée indique un ratio de 1, pour lequel le temps d'interaction lors des 6 ou 7 serait similaire à celui de l'essai 1. Ce graphe ne représente que les individus de la cohorte LTM qui a réalisé ces essais. (C) Temps d'interaction en % relatif à l'essai 1 pour la cohorte STM. La ligne pointillée indique 100%, correspondant au temps d'interaction relatif de l'essai 1. Les bâtons et les points correspondent à la moyenne, et les barres d'erreurs correspondent à la SEM. ** = p<0,05 ; ** = p<0,01 ; *** p<0,001.*

Les souris NTg-PBS-SH montrent une diminution significative de 40,69 % [18,86 à 62,51%] du temps d'interaction avec la souris présentatrice dès le deuxième essai (**Fig.80C** ; ANOVA à un facteur, essai, $F_{3,32} = 19,93$ ; d=4 ; $p < 0,0001$ ; $R^2 = 62,42$ ; test post-hoc de Dunnett : essai 1 *vs* essai 2, $p = 0,0007$). L'apprentissage social apparait plus lent chez les souris Tg2576-PBS-SH chez lesquelles une diminution significative de 45,01 % [19,34 à 70,68 %] du temps d'interaction n'est observée qu'au troisième essai (ANOVA à un facteur, essai, $F_{2,21} = 5,447$ ; d = 4 ; $p = 0,0133$ ; $R^2 = 33,12$ ; test post-hoc de Dunnett : essai 1 contre essai 2, $p = 0,5928$ ; essai 1 contre essai 3, $p = 0,0014$). Par conséquent, la capacité de mémoire sociale des souris

Tg2576 apparait déjà altérée à l'âge de 6 mois, bien que ce déficit ne soit pas aussi profond que ce qui a été observé chez les individus âgés de 9 mois (Rey et al., 2022).

Fait intéressant, l'injection de ChABC dans la zone CA1 n'a pas modifié les différences de capacité de mémoire sociale observées chez les souris NTg et Tg2576 restées en SH (NTg-ChABC-SH, ANOVA à un facteur, essai, $F_{2,21} = 22,22$ ; d=4 ; $p < 0,0001$ ; $R^2 = 64,93$ ; test post-hoc de Dunnett : essai 1 *vs* essai 2, p = 0,0030, -51,38 % [-18,62 à -84,13 %] ; Tg2576-ChABC-SH, ANOVA à un facteur, essai, $F_{2,20} = 0,737$ ; d=4 ; p = 0,4791 ; $R^2 = 6,28$ ; test post-hoc de Dunnett : essai 1 *vs* essai 2, p = 0,7399).

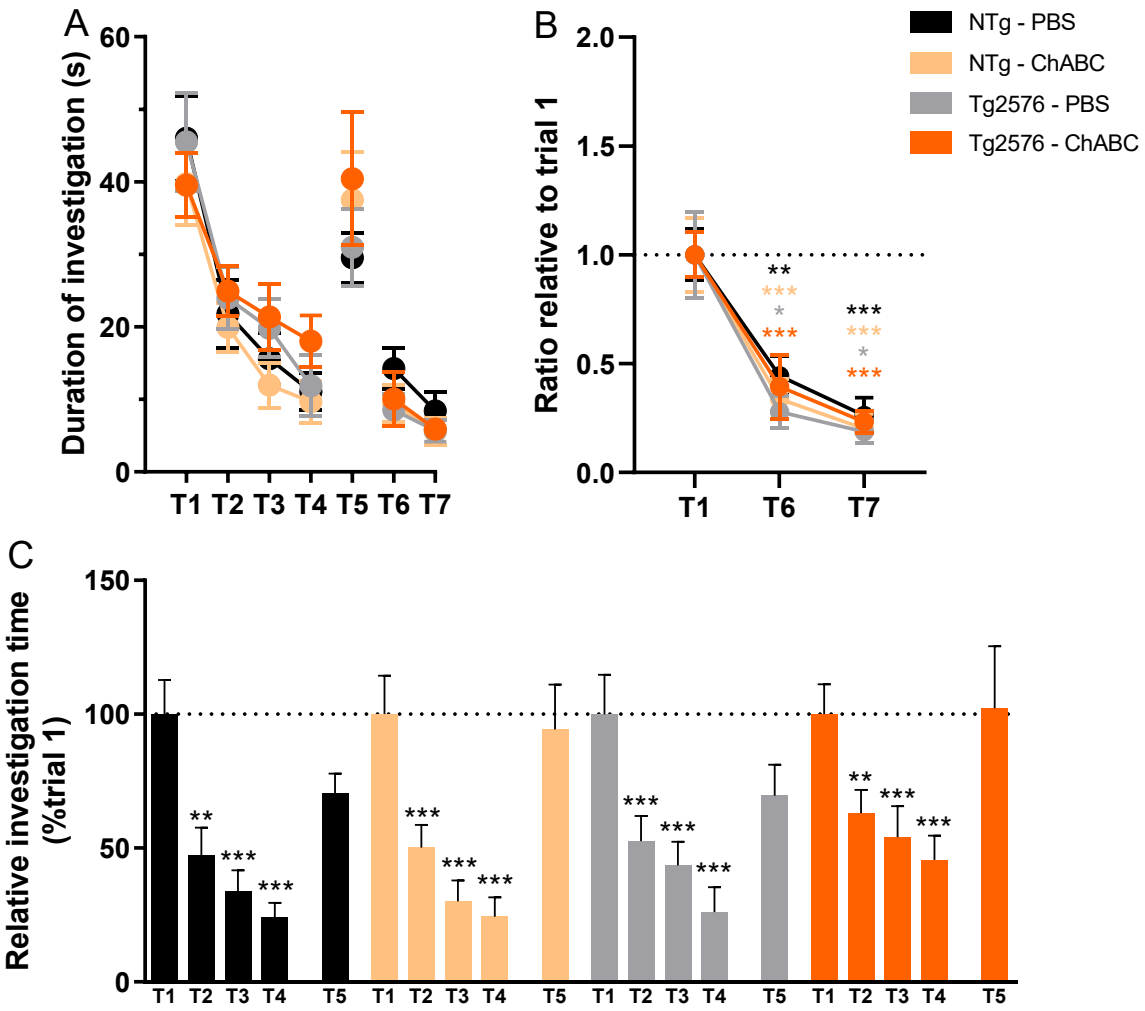



*Figure 81 T*est à 7 essais permettant d'évaluer la mémoire sociale des souris élevées en condition EE. (A) Temps d'interaction (s) de la souris testée envers la souris présentatrice (comprenant les individus des cohortes STM : essais 1 à 4 ; LTM : essais 6 et 7). (B) Ratio du temps d'interaction lors des essais 6 et 7, relatif au temps d'interaction lors de l'essai 1. La ligne pointillée indique un ratio de 1, pour lequel le temps d'interaction lors des 6 ou 7 serait similaire à celui de l'essai 1. Ce graphe ne représente que les individus de la cohorte LTM qui a réalisé ces essais. (C) Temps d'interaction en % relatif à l'essai 1 pour la cohorte STM. La ligne pointillée indique 100%, correspondant au temps d'interaction relatif de l'essai 1. Les bâtons et les points correspondent à la moyenne, et les barres d'erreurs correspondent à la SEM. ** = p<0,05 ; ** = p<0,01 ; *** p<0,001.*

En ce qui concerne les souris de la cohorte LTM, c'est-à-dire ré-exposées le lendemain à la souris présentée lors des 4 premiers essais, les souris NTg affichent lors des essais 6 et 7 un temps d'interaction réduit avec la souris désormais familière, indépendamment de l'injection de ChABC et des conditions d'hébergement (**Fig.80A & B** ; NTg-PBS-SH, ANOVA à un facteur, essai, $F_{2,9} = 23,24$ ; d = 2 ; p = 0,0005 ; $R^2 = 79,48$ ; test post-hoc de Dunnett : essai 1 contre essai 6, p = 0,0007 ; NTg-ChABC-SH, ANOVA à un facteur, essai, $F_{1,5} = 10,89$ ; d = 2 ; p = 0,0162 ; $R^2 = 73,14$ ; test post-hoc de Dunnett : essai 1 contre essai 6, p = 0,0046 ; **Fig.81A & B** NTg-PBS-EE, ANOVA à un facteur, essai, $F_{2,9} = 31,33$ ; d = 2 ; p = 0,0001 ; $R^2 = 83,93$ ; test post-hoc de Dunnett : essai 1 contre essai 6, p = 0,0052 ; NTg-ChABC-EE, ANOVA à un facteur, essai, $F_{1,7} = 45,93$ ; d = 2 ; p = 0,0002 ; $R^2 = 88,45$ ; test post-hoc de Dunnett : essai 1 contre essai 6, p = 0.0007). Comme prévu, les souris Tg2576-PBS-SH et -ChABC-SH montrent un temps d'interaction au cours du 6ème essai similaire au 1er (Tg2576-PBS-SH, ANOVA à un facteur, essai, $F_{2,9} = 1,888$ ; d = 2 ; p = 0,3420 ; $R^2 = 19,20$ ; Tg2576-ChABC-SH, ANOVA à un facteur, essai, $F_{2,9} = 0,1439$ ; d = 2 ; p = 0,8459 ; $R^2 = 2,79$), témoignant de leur incapacité à mémoriser sur le long terme une souris qui leur a été présentée de façon répétée la veille.

De façon remarquable, l'altération au test de mémoire sociale des souris Tg2576 âgées de 6 mois a été totalement supprimée par un séjour de 10 jours en EE, qu'elles aient ou non reçu une injection de ChABC dans l'aire CA1 (**Fig.81A-C** ; Tg2576-PBS-EE, ANOVA à un facteur, essai, $F_{1,7} = 12,96$ ; d = 2 ; p = 0,0063 ; $R^2 = 68,35$ ; test post-hoc de Dunnett : essai 1 *vs* essai 6, p = 0,0264 ; Tg2576-ChABC-EE, ANOVA à un facteur, essai, $F_{2,11} = 34,82$ ; d=2 ; $p < 0,0001$ ; $R^2 = 85,30$ ; test post-hoc de Dunnett : essai 1 *vs* essai 6, p = 0,0008). Cela indique que les stimulations environnementales induites par l'EE ont eu un effet bénéfique sur la capacité de mémoire sociale liée à CA2 des souris Tg2576, et que limiter le remodelage PV/PNN dans CA1 pendant l'EE n'empêche pas cet effet bénéfique. Par conséquent, l'EE a un impact bénéfique sur la mémoire sociale à court et long terme des souris Tg2576 âgées de 6 mois, indépendamment de l'injection de PBS ou de ChABC dans CA1.

En conclusion, ces résultats suggèrent que l'altération du remodelage PV / PNN dans l'aire CA1 pendant l'EE avec injection de ChABC a empêché l'amélioration de la mémoire spatiale due à l'EE chez les souris Tg2576, mais pas l'amélioration de la mémoire sociale liée à CA2.

### 2. Analyse histologique

Comme précédemment (cf Résultats I.B.2), nous avons cherché à déterminer si les améliorations de performance de mémoire sociale chez les souris Tg2576 placées en EE sont associées à une modification du nombre de cellules PV+, PNN+ et PV+PNN+ dans l'aire CA2 ; pour cela, nous avons procédé à une analyse histologique 30 jours après l'injection de ChABC ou de PBS dans CA1.

De façon similaire à ce qui a été observé 10 jours chez les souris SH après l'injection d'une solution de PBS ou de ChABC dans CA1, une diminution du nombre de PNN autour des interneurones PV (-222,70 [156,10 à 289,30] cellules PV+/PNN+) est observée en fonction du génotype, mais pas de l'injection (**Fig.82A & 83** ; ANOVA à deux facteurs, injection, $F_{1,48} = 3,071$ ; d=1 ; p = 0,0861 ; $R^2 = 3,192$ ; génotype, $F_{1,48} = 45,16$ ; d=1 ; p < 0,0001 ; $R^2 = 46,92$). Cette observation est également associée à une diminution de -675,40 [-519,70 à -831,10] cellules PNN+ (**Fig.82B & 83** ; ANOVA à deux facteurs, injection, $F_{1,48} = 10,61$ ; d=1 ; p = 0,0021 ; $R^2 = 7,745$ ; génotype, $F_{1,48} = 76,04$ ; d=1 ; p < 0,0001 ; $R^2 = 55,50$) et de -234,60 [-152,40 à -316,80] cellules PV+ (**Fig.82C & 83** ; ANOVA à deux facteurs, injection, $F_{1,48} = 1,495$ ; d=1 ; p = 0,2275, $R^2 = 1,811$ ; génotype, $F_{1,48} = 32,91$ ; d=1 ; p < 0,0001 ; $R^2 = 39,87$). Cependant, la quantification du nombre de neurones PNN+ dans l'aire CA2 montre un effet significatif de l'injection de ChABC chez les souris NTg (p = 0,0021) que l'on peut expliquer par deux individus avec un nombre de neurones PNN+ particulièrement bas. Là encore, il est possible que ces deux individus aient eu des conséquences de l'injection de ChABC dans CA1 qui soient visibles dans CA2 (**Fig.82B**).

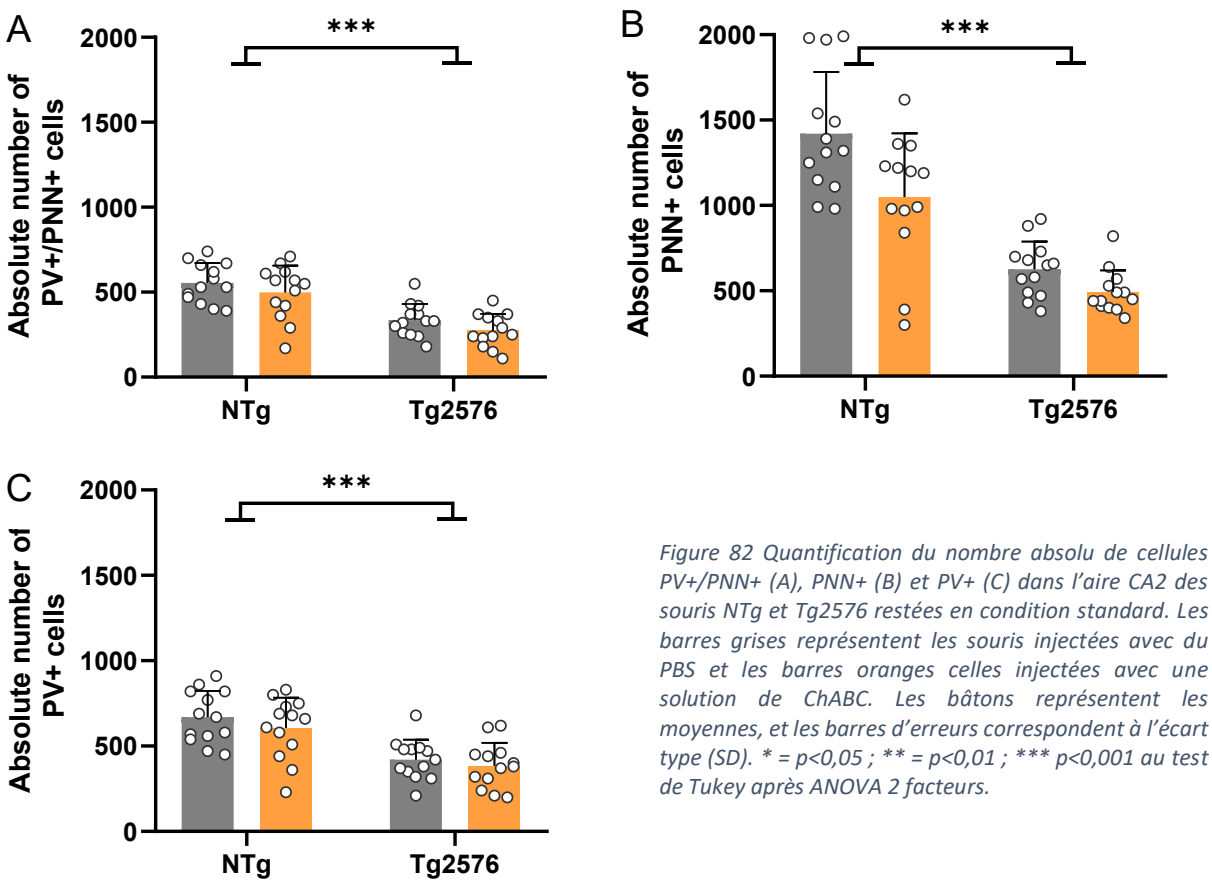



*Figure 82 Quantification du nombre absolu de cellules PV+/PNN+ (A), PNN+ (B) et PV+ (C) dans l'aire CA2 des souris NTg et Tg2576 restées en condition standard. Les barres grises représentent les souris injectées avec du PBS et les barres oranges celles injectées avec une solution de ChABC. Les bâtons représentent les moyennes, et les barres d'erreurs correspondent à l'écart type (SD). * = p<0,05 ; ** = p<0,01 ; *** p<0,001 au test de Tukey après ANOVA 2 facteurs.*

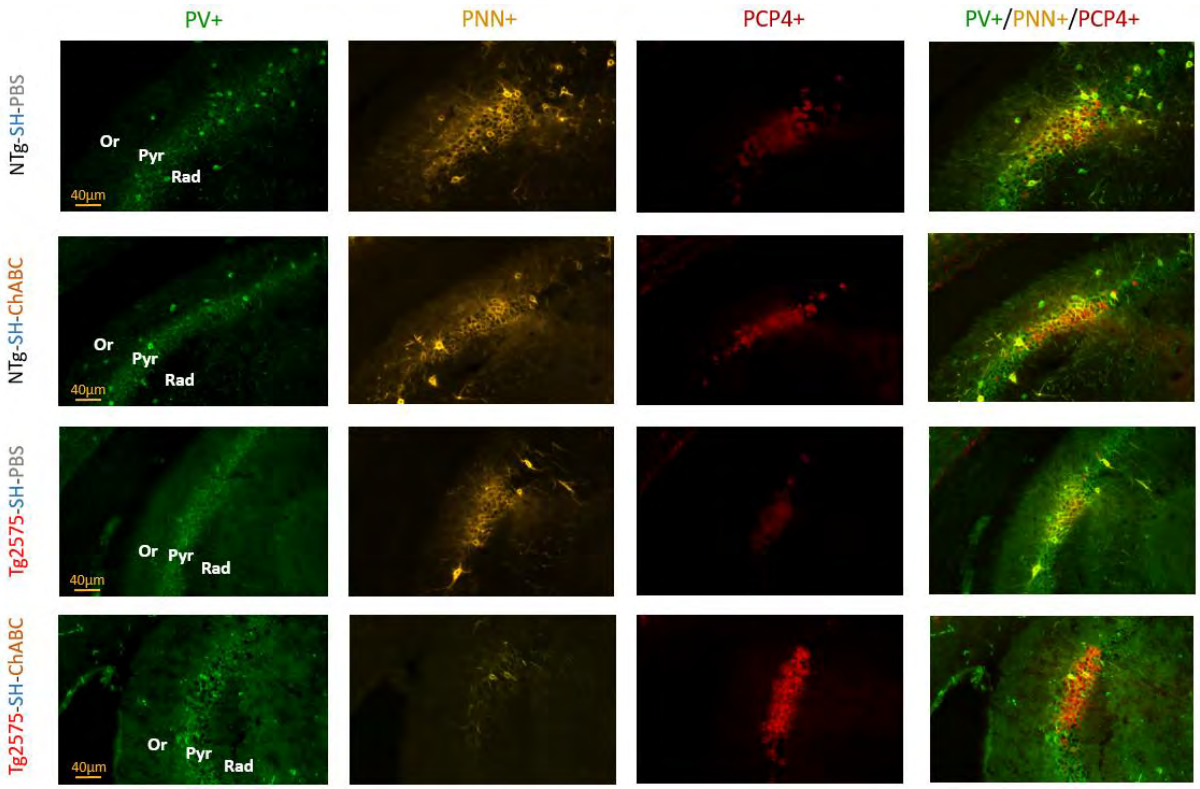



*Figure 83 Microphotographies illustrant les cellules PV+ (vert) et PNN+ (coloration WFA, jaune) dans la zone CA2 de souris NTg et Tg2576 âgées de 6 mois et élevées en EE. Elles ont reçu 30 jours plus tôt, une injection de PBS ou de ChABC dans l'aire CA1. Toutes les images traitées sur ImageJ en utilisant des paramètres de contraste identiques. On observe une nette diminution du nombre de cellules PV+, PNN+ et PV+/PNN+ chez les groupes de souris Tg2576, comparés aux groupes de souris NTg. Or : Oriens ; Pyr : Pyramidale ; Rad : Radiatum.*

Lorsque les individus sont placés en EE et que l'on compare les souris NTg et Tg2576, on observe que la restauration des PNN autour des interneurones PV est légèrement inférieure à ce qui a pu être observé 10 jours après les injections (82,47 [15,61 à 149,30] cellules PV+/PNN+) (**Fig.84A & 85** ; ANOVA à deux facteurs, injection, $F_{1,51}$ = 0,5836 ; d=1 ; p = 0,4484 ; $R^2$ = 1,011 ; génotype, $F_{1,51}$ = 6,131 ; d=1 ; p = 0,0166 ; $R^2$ = 10,62). La même observation peut être faite sur le nombre de PNN, indépendemment du fait qu'ils soient PV+ ou non (**Fig.84B & 85**). Enfin, il est à noter que l'on observe une nette diminution du nombre de cellules PV+ dans le groupe NTg-ChABC-EE par rapport à l'ensemble des autres groupes (**Fig.84C & 85**). Cependant, nous n'expliquons pas du tout ce résultat dans la mesure où cet effet n'est pas présent sur la quantification du nombre de cellules PV+/PNN+, ni sur la quantifiation du nombre de cellules PV+ à 10 jours.

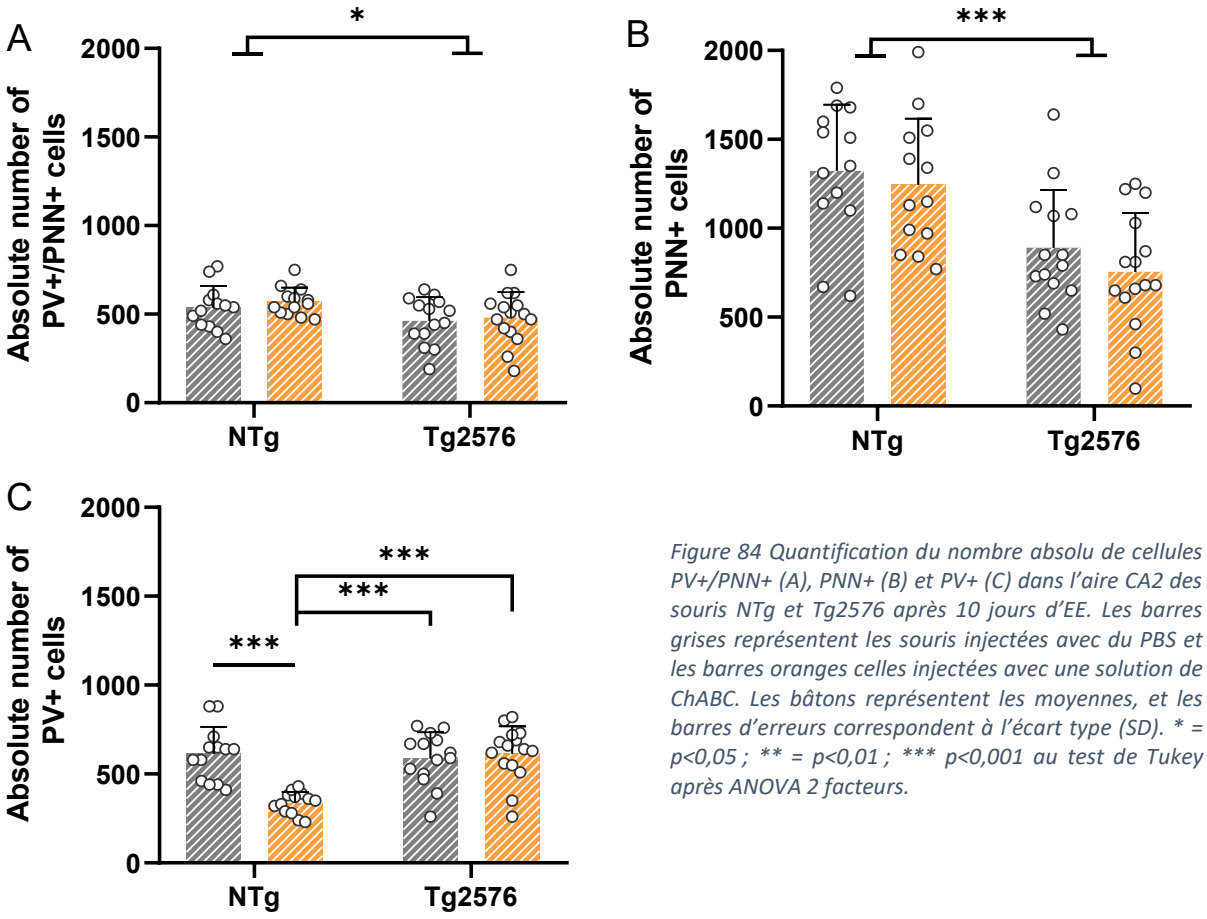



*Figure 84 Quantification du nombre absolu de cellules PV+/PNN+ (A), PNN+ (B) et PV+ (C) dans l'aire CA2 des souris NTg et Tg2576 après 10 jours d'EE. Les barres grises représentent les souris injectées avec du PBS et les barres oranges celles injectées avec une solution de ChABC. Les bâtons représentent les moyennes, et les barres d'erreurs correspondent à l'écart type (SD). * = p<0,05 ; ** = p<0,01 ; *** p<0,001 au test de Tukey après ANOVA 2 facteurs.*

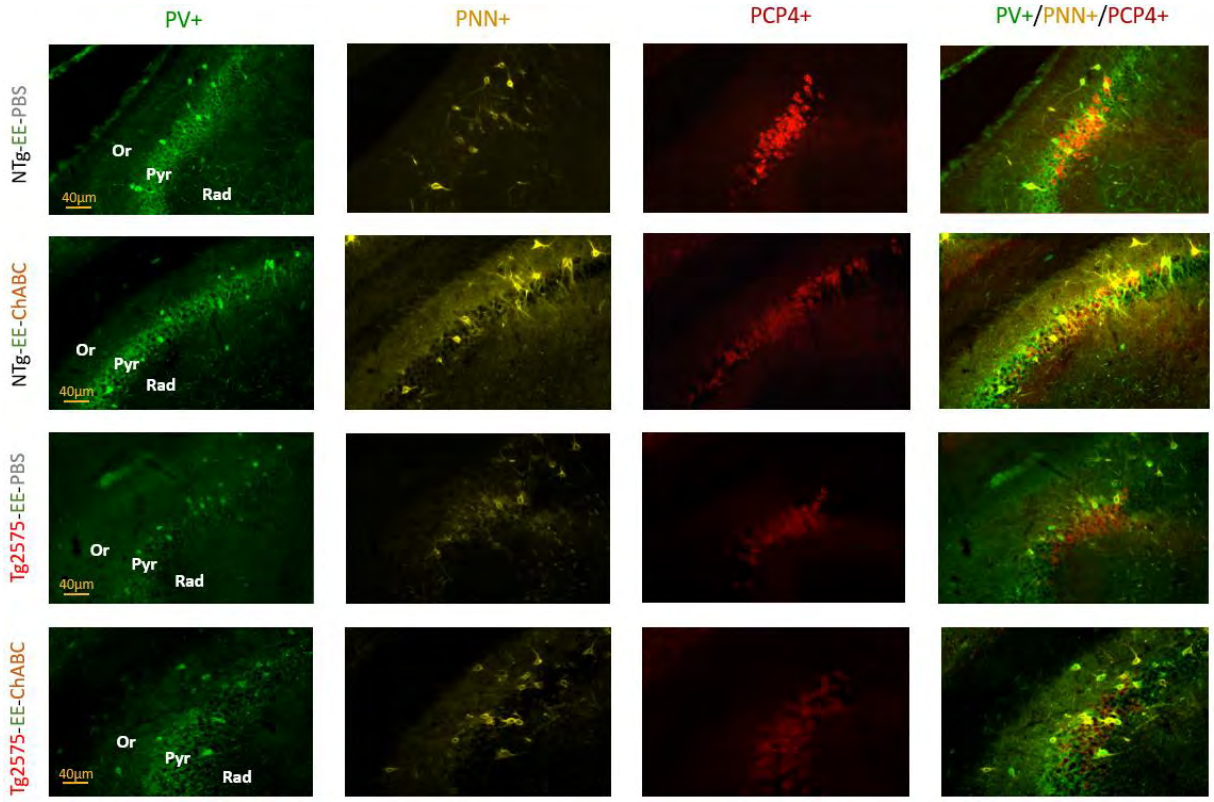



*Figure 85 Microphotographies illustrant les cellules PV+ (vert) et PNN+ (coloration WFA, jaune) dans la zone CA2 de souris NTg et Tg2576 âgées de 6 mois et élevées en EE. Elles ont reçu 30 jours plus tôt, une injection de PBS ou de ChABC dans l'aire CA1. Toutes les images traitées sur ImageJ en utilisant des paramètres de contraste identiques. On observe une nette diminution du nombre de cellules PV+, PNN+ et PV+/PNN+ chez les groupes de souris Tg2576, comparés aux groupes de souris NTg. Or : Oriens ; Pyr : Pyramidale ; Rad : Radiatum.*

Enfin, nous avons comparé les animaux placés en SH et en EE. Nous n'observons pas de différence sur les quantifications du nombre de neurones entre les souris NTg placées en SH ou en EE, ce qui est cohérent avec ce qui a été mesuré dans CA1, 30 jours après l'injection (**Fig.86A & B**). De plus, cette comparaison démontre que le nombre de cellules PV+/PNN+ et PV+ dans l'aire CA2 des souris Tg2576 placées dans un EE est restauré au même niveau que celui des souris NTg-PBS-SH.

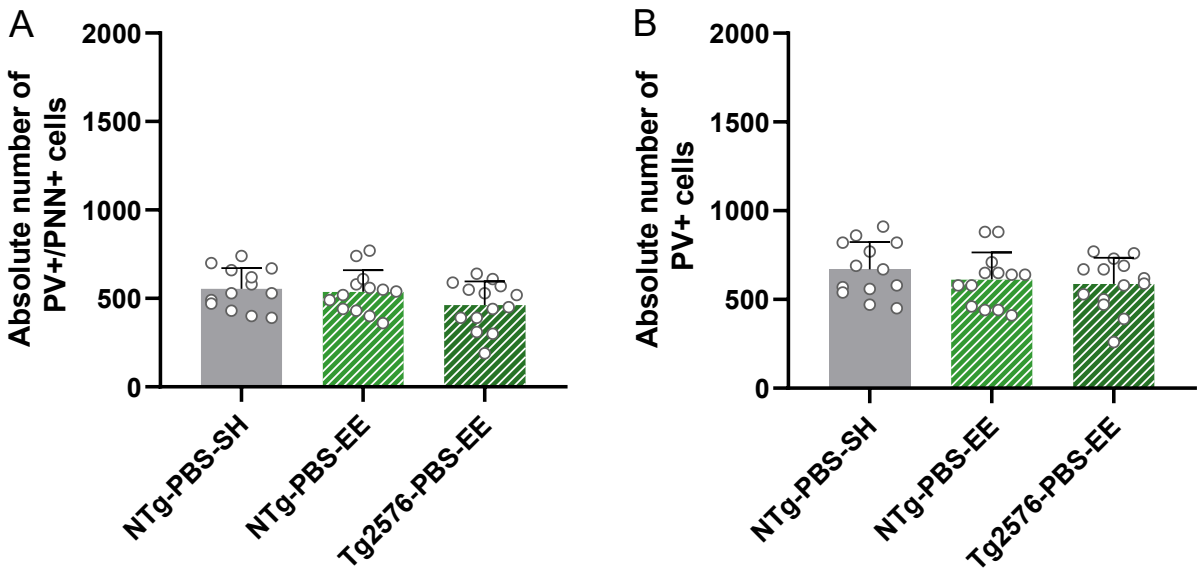



*Figure 86 (A) Comparaison du nombre absolu de cellules PV+/PNN+ dans l'aire CA2 en fonction des conditions d'hébergement. (B) Comparaison du nombre de cellules PV+. Les bâtons représentent les moyennes, et les barres d'erreurs correspondent à l'écart type (SD). * = p<0,05 ; ** = p<0,01 ; *** p<0,001 au test de Tukey après ANOVA 1 facteur.*

Pour conclure, les souris Tg2576 placées en EE montrent une restauration du nombre de cellules PV+/PNN+ et PV+ par rapport aux souris Tg2576 restées en condition standard, et ce, qu'elles aient été injectées avec du PBS (**Fig.87A** ; PV+/PNN+ : 128,20 [8,475 à 248,00] ; ANOVA à un facteur, $F_{2,39} = 5,276$ ; d = 1 ; p = 0,0094 ; $R^2$ = 21,29 ; test post-hoc de Tukey : Tg2576-PBS-SH *vs* Tg2576-PBS-EE, p = 0,0335 ; **Fig.87B** ; PV+ : 167,10 [34,99 à 299,20] ; ANOVA à un facteur, $F_{2,39} = 7,547$ ; d = 1 ; p = 0,0017 ; $R^2$ = 27,90 ; test post-hoc de Tukey : Tg2576-PBS-SH *vs* Tg2576-PBS-EE, p = 0,0103) ou de la ChABC (PV+/PNN+ : 146,10 [28,22 à 263,90], Tg2576-PBS-SH *vs* Tg2576-ChABC-EE, p = 0,0121) ; PV+ : 193,9 [63,93 à 323,90], test post-hoc de Tukey : Tg2576-PBS-SH *vs* Tg2576-ChABC-EE, p = 0,0023). L'EE a donc permis de restaurer les interneurones PV et leur PNN dans l'aire CA2 des souris Tg2576, ce qui peut être mis en lien avec les bénéfices cognitifs sur la mémoire sociale décrits précédemment.

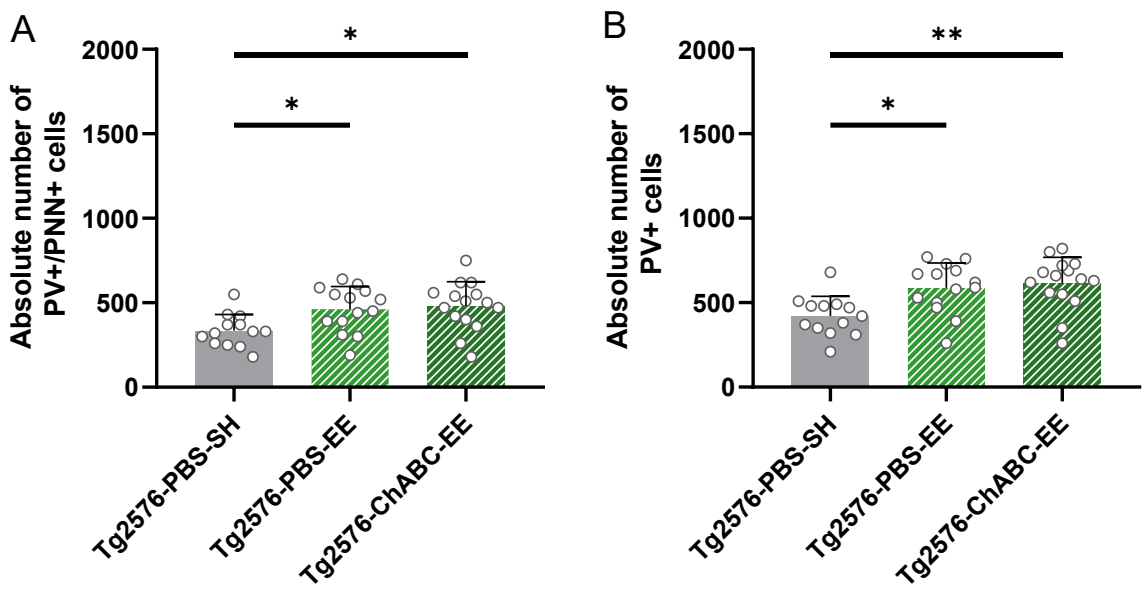



*Figure 87 (A) Comparaison du nombre absolu de cellules PV+/PNN+ dans l'aire CA2 en fonction des conditions d'hébergement, avec une augmentation chez les souris Tg2576-PBS-EE d'environ 37 [3 à 74] % de cellules PV+/PNN+ et de 42 [8 à 79] % pour les souris Tg2576-ChABC-EE, par rapport aux souris Tg2576-PBS-SH. (B) Comparaison du nombre de cellules PV+. L'augmentation des interneurones PV des souris Tg2576-PBS-EE correspond à une augmentation de 40 [8 à 71] % de cellules PV+ par rapport aux souris Tg2576-PBS-SH et 56 [26 à 88] % par rapport aux souris Tg2576-ChABC-EE. Les bâtons représentent les moyennes, et les barres d'erreurs correspondent à l'écart type (SD). * = p<0,05 ; ** = p<0,01 ; *** p<0,001 au test de Tukey après ANOVA 1 facteur.*

## E. Effets de l'injection de NRG1 dans l'aire CA1 sur la présence de PV/PNN et la mémoire des souris Tg2576

### 1. Effet de l'Injection de NRG1 5 jours avant les tests comportementaux

Les résultats décrits précédemment suggèrent fortement que le remodelage du réseau PV/PNN dû à l'EE est nécessaire à l'amélioration de la mémoire dépendante de l'hippocampe des souris Tg2576. Comme récemment démontré, une autre façon de stimuler directement la formation de PNN autour des cellules PV est d'injecter localement le facteur neurotrophique neuregulin-1 (NRG1) (Rey et al., 2022). En effet, 5 jours après l'injection de NRG1 dans l'aire CA2 de souris Tg2576 âgées de 9 mois, on observe une augmentation du nombre de cellules PV+ dans l'aire CA2, abolissant les différences de nombre de cellules PV+ et PV+/PNN+ avec les souris NTg, ainsi que dans la capacité de mémoire sociale, associée à CA2 (Rey et al., 2022). Par conséquent, nous avons souhaité déterminer si les résultats obtenus par Christophe Rey (Rey et al., 2022) dans l'aire CA2 peuvent se retrouver après une injection de NRG1 dans l'aire CA1, en faisant l'hypothèse que cela aurait pour effet d'améliorer spécifiquement la mémoire spatiale. Concernant le protocole (**Fig.59**), des souris

femelles de la lignée Tg2576 ont reçu, à l'âge de 9 mois, une injection de NRG1 (cf Méthodes II.C) dans l'aire CA1, formant ainsi quatre groupe expérimentaux : NTg-PBS (n=9), NTg-NRG1 (n=8), Tg2576-PBS (n=7) et Tg2576-NRG1 (n=9). Après 5 jours, les souris sont soumises aux tests de mémoire spatiale (cf Méthodes III.A) et sociale (cf Méthodes III.B) de façon successive mais dans un ordre aléatoire. Après le dernier test, les individus sont sacrifiés *via* perfusion intracardiaque et leur cerveau est prélevé puis conservé dans une solution de sucrose 30% + Azide 0.1%, tel que décrit précédemment (**Fig.88**).

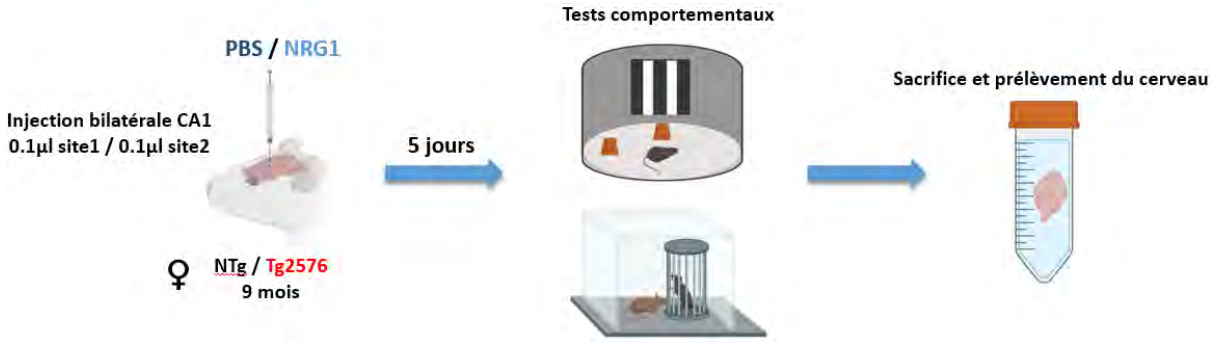



*Figure 88 Chronologie du paradigme expérimental. L'injection bilatérale de NRG1 est effectuée dans l'aire CA1 à l'âge de 9 mois. Cinq 5 jours plus tard, les souris sont soumises successivement au test de localisation d'objets (mémoire spatiale) et au test à 5 essais (mémoire sociale), dans un ordre aléatoire. Après le dernier test, les individus sont sacrifiés et leur cerveau est prélevé.*

Nous réalisons ensuite une découpe des cerveaux au microtome (30µm d'épaisseur) avant d'effectuer une immunohistochimie PV/PNN/PCP4, afin de quantifier ces cellules, ainsi que leur intensité, de façon à relier les résultats comportementaux obtenus à l'analyse histologique.

Cinq jours après l'injection bilatérale de NRG1 dans l'aire CA1 de souris âgées de 9 mois, nous avons réalisé une quantification des cellules PV+/PNN+ dans les aires CA1 et CA2. Chez les souris Tg2576-NRG1, nous avons observé une augmentation de 140 [3,56 à 277,50] cellules PV+/PNN+ par rapport aux souris Tg2576-PBS (**Fig.89A** ; ANOVA à deux facteurs, interaction, $F_{1,29} = 4,624$ ; d=1 ; p = 0,0400 ; $R^2 = 4,28$ ; test post-hoc de Tukey : Tg2576-PBS *vs* Tg2576-NRG1, p = 0,0419). En revanche, nous n'observons qu'une tendance à la restauration du nombre de cellules PNN+, qu'elles soient PV ou non (**Fig.89B**). Cette augmentation des cellules PV+/PNN+ chez les souris Tg2576-NRG1 s'accompagne d'une augmentation de 187,32 [10,39 à 364,21] cellules PV+ détectables dans CA1 par rapport aux souris Tg2576 injectées avec du

PBS (**Fig.89C** ; ANOVA à deux facteurs, interaction, $F_{1,29} = 6,751$ ; d=1 ; p = 0,0146 ; $R^2 = 8,28$ ; test post-hoc de Tukey : Tg2576-PBS *vs* Tg2576-NRG1, p = 0,0349). Cependant, cette restauration n'est pas suffisante pour abolir les différences avec le groupe NTg-PBS (test post-hoc de Tukey : Tg2576-PBS *vs* Tg2576-NRG1, p = 0,0028). Ainsi, l'analyse histologique démontre qu'une injection unique de NRG1 est suffisante pour augmenter le nombre de neurones PV+ et PV+/PNN+ détectables dans l'aire CA1 de souris Tg2576.

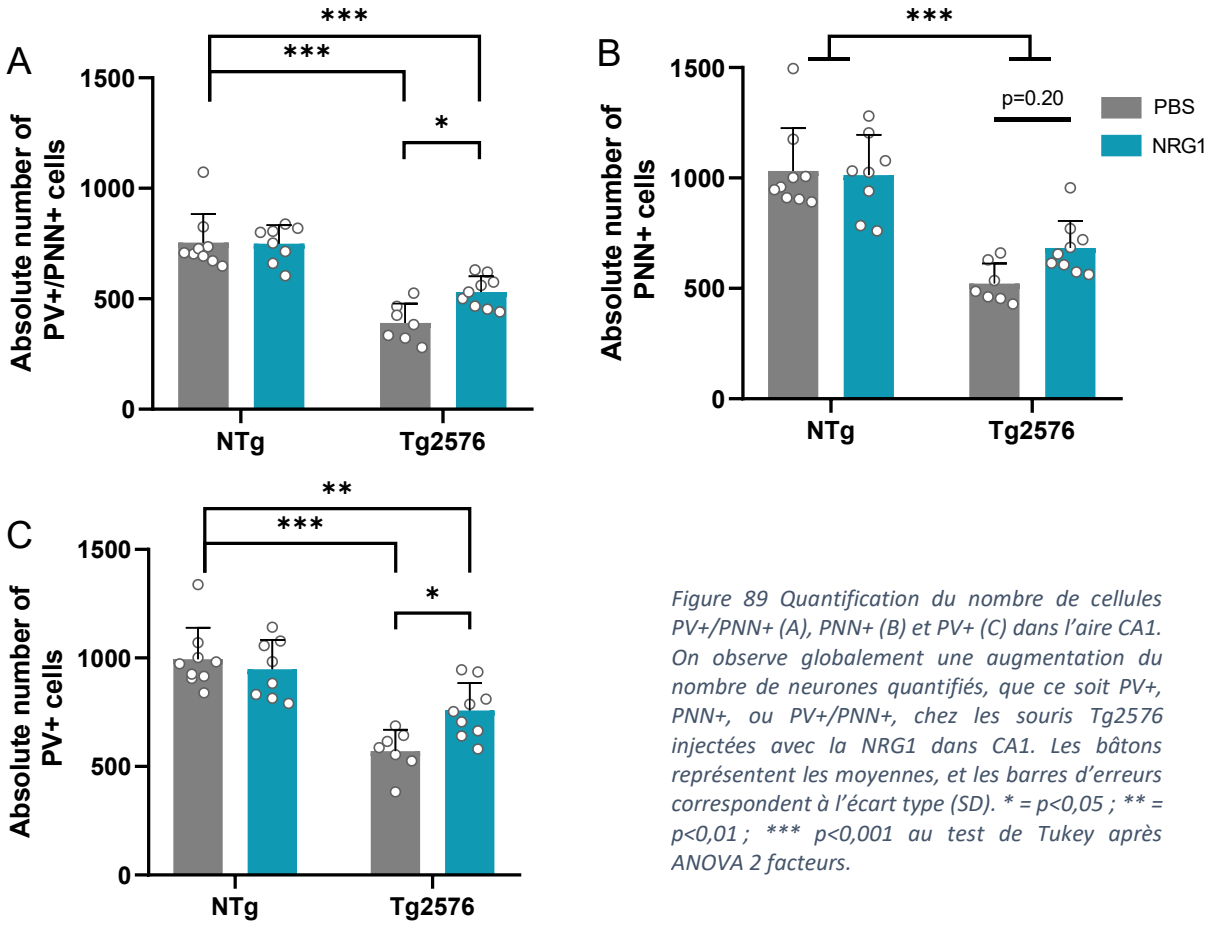



*Figure 89 Quantification du nombre de cellules PV+/PNN+ (A), PNN+ (B) et PV+ (C) dans l'aire CA1. On observe globalement une augmentation du nombre de neurones quantifiés, que ce soit PV+, PNN+, ou PV+/PNN+, chez les souris Tg2576 injectées avec la NRG1 dans CA1. Les bâtons représentent les moyennes, et les barres d'erreurs correspondent à l'écart type (SD). * = p<0,05 ; ** = p<0,01 ; *** p<0,001 au test de Tukey après ANOVA 2 facteurs.*

Dans l'aire CA2, nous n'observons que la différence attendue entre les souris NTg et Tg2576 pour les cellules PV+/PNN+. En revanche, l'injection de NRG1 dans CA1 n'a aucun effet sur le nombre de cellules PV+/PNN+ quantifiables dans CA2, et ce quel que soit le génotype des souris (**Fig.90A-C**).

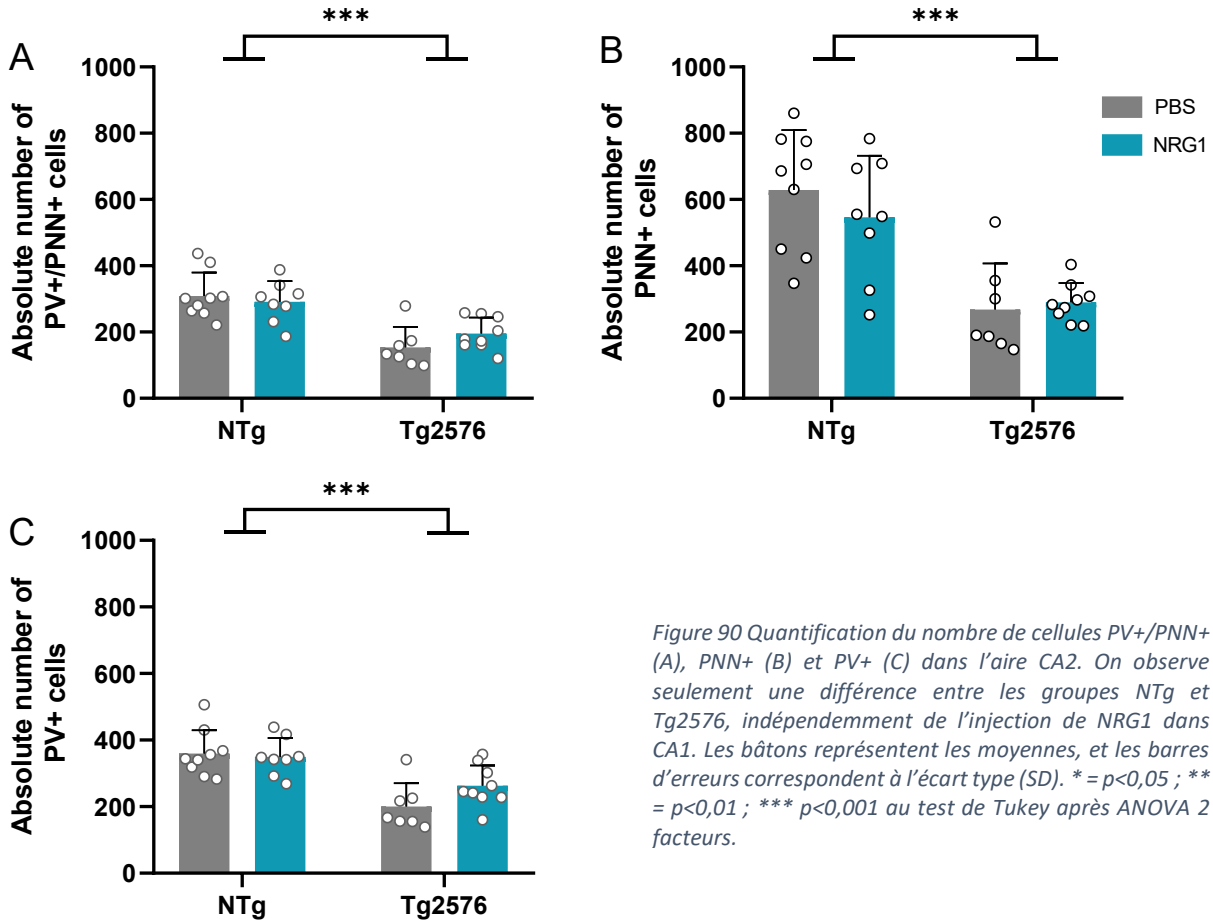



*Figure 90 Quantification du nombre de cellules PV+/PNN+ (A), PNN+ (B) et PV+ (C) dans l'aire CA2. On observe seulement une différence entre les groupes NTg et Tg2576, indépendemment de l'injection de NRG1 dans CA1. Les bâtons représentent les moyennes, et les barres d'erreurs correspondent à l'écart type (SD). * = p<0,05 ; ** = p<0,01 ; *** p<0,001 au test de Tukey après ANOVA 2 facteurs.*

En ce qui concerne les performances comportementales des animaux, on observe bien que les souris NTg sont plus susceptibles d'explorer l'objet déplacé (**Fig.91A & B**), indépendamment de l'injection de PBS (NTg-PBS 16,99s ± 2,93 objet fixe *vs* 24,77s ± 8,10 objet déplacé ; t = 2,698 ; d = 6 ; p = 0,0357 ; $R^2$ = 54,82) ou de NRG1 (NTg-NRG1 10,86s ± 5,81 objet fixe *vs* 20,82s ± 9,23 objet déplacé ; t = 4,551 ; d = 6 ; p = 0,0039 ; $R^2$ = 77,54). Cela suggère que l'injection de NRG1 dans CA1 n'influence pas la mémoire spatiale des souris NTg. En revanche, les souris Tg2576 injectées avec du PBS ont un temps d'exploration similaire entre les deux objets (Tg2576-PBS 22,17s ± 8,85 objet fixe *vs* 20,60s ± 10,27 objet déplacé ; t = 1,571 ; d = 6 ; p = 0,1672 ; $R^2$ = 29,15), témoignant de leur déficit en mémoire spatiale. En accord avec ce qui a été observé après un EE de 10 jours, les souris Tg2576 injectées avec NRG1 sont désormais capables de discriminer l'objet déplacé par rapport à l'objet fixe (Tg2576-NRG1 20,53s ± 9,92 objets fixes *vs* 29,20s ± 13,05 objets déplacés objet ; t = 3,371 ; d = 5 ; p = 0,0199 ; $R^2$ = 69,44 ; augmentation de 11,57 % [2,912 à 20,22 %] par rapport

au groupe Tg2576-PBS, ANOVA à un facteur, $F_{3,23} = 11,56$ ; d = 3 ; p < 0,0001 ; $R^2$ = 60,13 ; test post-hoc de Tukey : Tg2576-PBS *vs* Tg2576-NRG1, p = 0,0061). Par conséquent, l'induction du remodelage PV/PNN dans CA1 par injection de NRG1 est associée à une restoration de la mémoire spatiale des souris Tg2576.

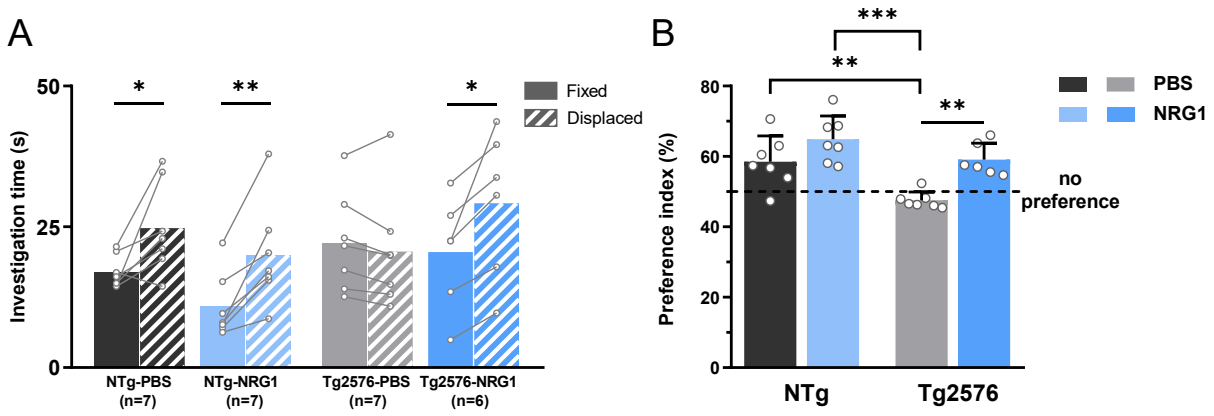



*Figure 91 Test de localisation d'objets avec un rappel effectué à 3h. (A) Les souris sont testées 5 jours après l'injection de PBS ou de NRG1. L'ordonnée représente le temps d'interaction avec les objets fixes et déplacés en secondes. (B) Pourcentage de préférence pour l'objet déplacé des souris NTg et Tg2576. Les bâtons correspondent à la moyenne, et les barres d'erreurs correspondent à l'écart type (SD). * = p<0,05 ; ** = p<0,01 ; *** p<0,001 au test de student (A) ainsi qu'au au test de Tukey après ANOVA 2 facteurs (B).*

Enfin, lorsqu'elles sont soumises au test de mémoire sociale à 5 essais, les souris NTg injectées dans l'aire CA1 avec une solution de PBS ou de NRG1 montrent une diminution significative du temps d'interaction de 69,82 % [23,48 à 116,2 %] et 54,78 % [20,65 à 88,92 %] respectivement, dès le deuxième essai (**Fig.92A & B** ; NTg-PBS, ANOVA à un facteur, essai, $F_{2,9} = 15,38$ ; d = 4 ; p = 0,0017 ; $R^2$ = 71,94 ; test post-hoc de Dunnett : essai 1 contre essai 2, p = 0,0066 ; NTg-NRG1, ANOVA à un facteur, essai, $F_{2,10} = 8,31$ ; d = 3 ; p = 0,0092 ; $R^2$ = 54,26 ; test post-hoc de Dunnett : essai 1 *vs* essai 2, p = 0,0039). En revanche, les souris Tg2576-PBS ne présentent pas de différence au niveau du temps d'interaction entre les essais par rapport à l'essai 1 (ANOVA à un facteur, essai, $F_{2,8} = 0,85$ ; d=3 ; p = 0,4564 ; $R^2$ = 18,57), et l'injection de NRG1 dans CA1 n'affecte pas cette capacité de mémoire sociale liée à CA2 chez les souris Tg2576 âgées de 6 mois (ANOVA à un facteur, essai, $F_{2,11} = 1,18$ ; d = 3 ; p = 0,3316 ; $R^2$ = 14,39).

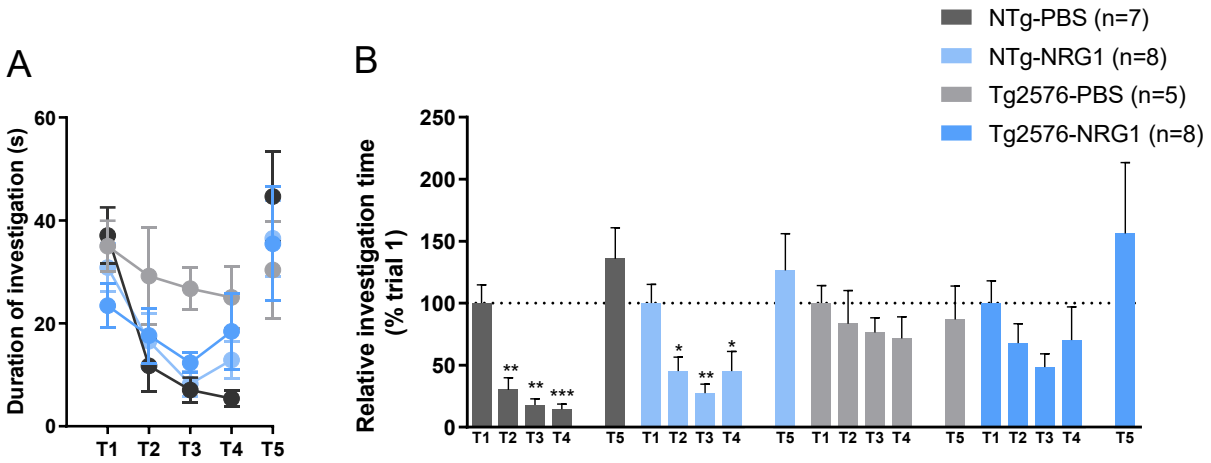



*Figure 92 Test de mémoire sociale à 5 essais. (A) Temps d'interaction (s) de la souris testée envers la souris présentatrice. (B) Temps d'interaction en % relatif à l'essai 1. La ligne pointillée indique 100%, correspondant au temps d'interaction relatif de l'essai 1. Les bâtons représentent les moyennes, et les barres d'erreurs correspondent à la SEM. * = p<0,05 ; ** = p<0,01 ; *** p<0,001 au test de Tukey après ANOVA 1 facteur.*

Dans l'ensemble, ces résultats indiquent que le remodelage du réseau PV/PNN suite à l'injection de NRG1 dans l'aire CA1 améliore la mémoire liée à cette zone spécifique, mais pas les autres mémoires dépendantes d'autres aires de l'hippocampe.

### 2. Effets de l'Injection de NRG1 40 jours avant les tests comportementaux

Pour cette étude, nous avons souhaité étendre la durée entre une injection aigüe de NRG1 dans CA2 et les tests comportementaux effectués par les souris pour définir si l'effet bénéfique qu'apporte cette injection perdure sur le plus long terme. Le protocole consiste ici à injecter de la NRG1 dans l'aire CA2 (cf Méthodes II.C) et de laisser une durée de 40 jours entre l'injection et les tests comportementaux (**Fig.93**). Seul le test de mémoire sociale a été réalisé lors de cette expérience, ne doutant plus de la spécificité de la NRG1 à restaurer spécifiquement ce type de mémoire si elle est injectée dans la région cérébrale associée. Cette expérience a été réalisée sur deux cohortes d'animaux. La première cohorte a effectué le test de mémoire sociale à 5 essais : NTg-PBS (n=6), NTg-NRG1 (n=5), Tg2576-PBS (n=7-1 souris exclue car n'atteignant pas le critère d'exclusion, soit n=6) et Tg2576-NRG1 (n=6-1 souris exclue car n'atteignant pas le critère d'exclusion, soit n=5), alors que la seconde cohorte est soumise à un test de mémoire sociale à 7 essais : NTg-PBS (n=6), NTg-NRG1 (n=5), Tg2576-PBS (n=5-2 souris exclues car n'atteignant pas le critère d'exclusion, soit n=3)

et Tg2576-NRG1 (n=7-1 souris exclue car n'atteignant pas le critère d'exclusion, soit n=6). Le total des deux expériences nous donne les effectifs suivants : NTg-PBS (n=12), NTg-NRG1 (n=10), Tg2576-PBS (n=9 (12 souris - 3 retirées suivant le critère d'exclusion) et Tg2576-NRG1 (n=11 (13 souris - 2 retirées suivant le critère d'exclusion).

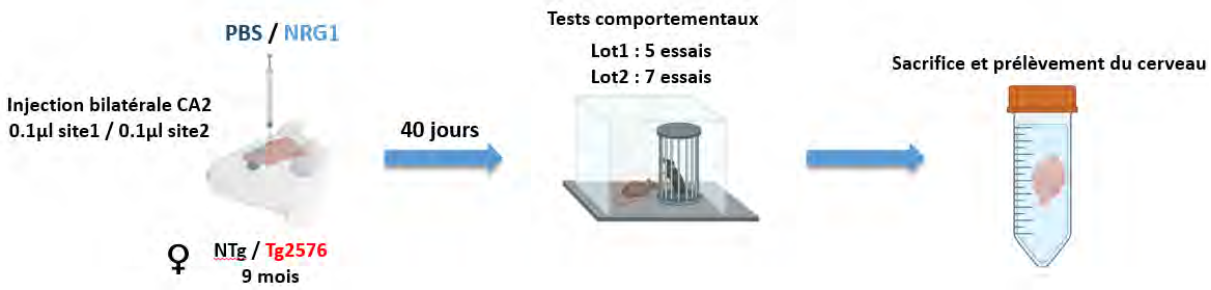



*Figure 93 Chronologie du protocole expérimental. L'injection bilatérale de NRG1 est effectuée à l'âge de 9 mois. Après 40 jours, les souris sont soumises au test à 5 essais pour le lot 1 et 7 essais pour le lot 2. Après le test, les individus sont sacrifiés et leur cerveau est prélevé puis conservé dans une solution de sucrose 30% + Azide 0.1%.*

Lors de cette expérience, les souris NTg-PBS montrent une diminution significative de 59,30 % [18,68 à 99,93%] du temps d'interaction avec la souris présentatrice dès le deuxième essai (**Fig.94A & B** ; ANOVA à un facteur, essai, $F_{6,65} = 8,386$ ; d = 6 ; p < 0,0001 ; $R^2 = 43,63$ ; test post-hoc de Dunnett : essai 1 *vs* essai 2, p = 0,0015). De plus, elles maintiennent cette mémoire sociale jusqu'au lendemain, où le temps d'interaction avec la souris présentatrice est toujours diminué de 68,94% [19,89 à 119,4%] par rapport au premier essai (test post-hoc de Dunnett : essai 1 *vs* essai 6, p = 0,0024). La même observation peut être effectuée chez les souris NTg-NRG1 (ANOVA à un facteur, essai, $F_{6,51} = 5,851$ ; d = 6 ; p < 0,0001 ; $R^2 = 40,77$ ; test post-hoc de Dunnett : essai 1 *vs* essai 2, p = 0,0015 ; essai 1 *vs* essai 6, p = 0,0039 pas meme nombre entre essais 1 et 6/7). Ces résultats indiquent que l'injection de NRG1 dans l'aire CA2 de souris NTg ne perturbe pas la mémoire sociale à long terme.

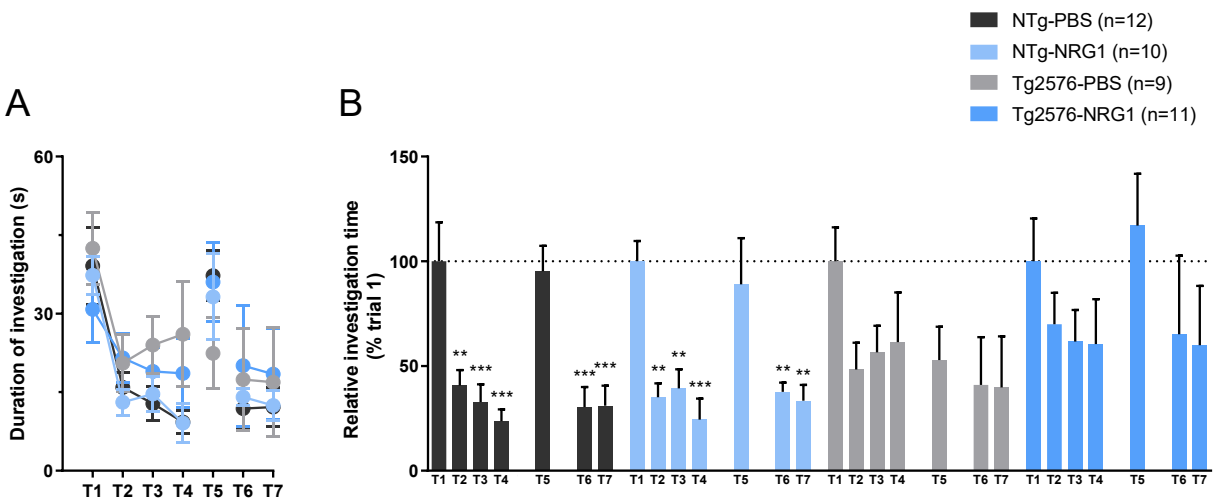



*Figure 94 Test de mémoire sociale à 7 essais. (A) Temps d'interaction (s) de la souris testée envers la souris présentatrice. (B) Temps d'interaction en % relatif à l'essai 1. La ligne pointillée indique 100%, correspondant au temps d'interaction relatif de l'essai 1. Les bâtons représentent les moyennes, et les barres d'erreurs correspondent à la SEM. * = p<0,05 ; ** = p<0,01 ; *** p<0,001 au test de Tukey après ANOVA 1 facteur.*

En revanche, aucune différence statistique n'est mesurée sur les performances de mémoire sociale entre les groupes Tg2576-PBS et Tg2576-NRG1. Cependant, il n'est pas réellement possible de conclure quant à un éventuel effet sur la mémoire sociale 40 jours après une injection de NRG1 dans l'aire CA2. En effet, même si le groupe Tg2576-PBS ne démontre aucune différence significative du temps d'interaction entre l'essai 1 et les autres essais, la courbe d'apprentissage parait perturbée et peu similaire à ce que nous avons l'habitude d'observer pour des souris modèles de la MA de cet âge. De plus, les souris semblent s'être souvenues de la souris présentatrice lors des essais 6 et 7 le jour suivant. Nous avons réalisé cette expérience deux fois, et nous avons eu, à deux reprises, une incapacité à conclure à cause des performances atypiques du groupe Tg2576-PBS.

## F. Discussion

Dans cette étude nous avons démontré que **1)** l'injection de ChABC entraine une diminution du nombre de cellules PV+/PNN+ pour une durée d'au moins 10 jours dans CA1 ; **2)** le séjour en EE de 10 jours permet de restaurer la présence des interneurones PV et leur PNN dans les sous-régions hippocampiques CA1 et CA2, mais l'injection de ChABC dans CA1 empêche cette restauration spécifiquement dans cette région ; **3)** dix jours d'EE induisent un effet bénéfique sur la mémoire spatiale et sociale des souris Tg2576, à court et à long terme ; **4)** l'injection de ChABC dans CA1 empêche l'effet bénéfique de l'EE sur les capacités de mémoire spatiale, liées à la fonction CA1, mais pas sur les capacités de mémoire sociale, liées à la fonction de CA2 ; et enfin **5)** l'injection de NRG1 dans l'aire CA1 permet également de remodeler les interneurones PV et leur PNN, ainsi que de restaurer spécifiquement la mémoire spatiale des souris Tg2576 (**Fig.95**)

L'objectif de cette étude était d'observer si l'absence de remodelage des interneurones PV et de leur PNN pendant toute la durée de l'EE empêchait les bénéfices cognitifs de celui-ci sur les capacités mnésiques des souris modèles de la MA. Jusqu'à cette étude, le protocole d'EE utilisé au laboratoire et ayant démontré des effets bénéfiques était de 10 semaines (Verret et al., 2013). Le principal problème auquel nous avons fait face était donc de trouver une méthode expérimentale permettant d'empêcher le remodelage des interneurones PV sur cette longue durée. Pour bloquer le remodelage des neurones PV/PNN, nous disposions de l'outil ChABC (Yamagata et al., 1968) qui dégrade grossièrement les PNN autour des interneurones PV lorsqu'elle est injectée dans une région cérébrale.

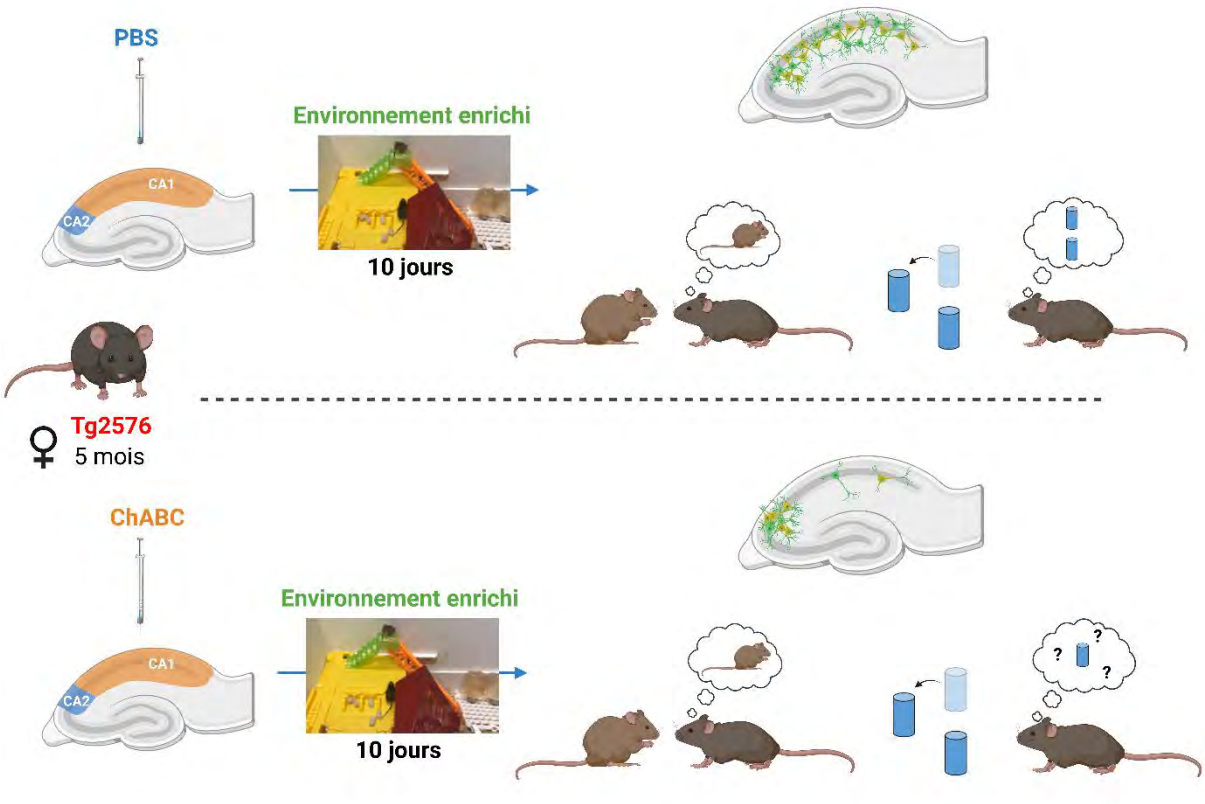



*Figure 95 Schéma récapitulatif des résultats obtenus lors des expériences effectuées avec les souris Tg2576 et l'EE. Les souris Tg2576 placées dans l'EE après avoir reçu une injection de PBS dans CA1, présentent une augmentation du nombre de cellules PV+/PNN+ dans les régions CA1 et CA2, ainsi qu'une amélioration de la mémoire spatiale et sociale. En revanche, les souris Tg2576 ayant reçu une injection de ChABC avant l'EE dans CA1, présentent une restauration des cellules PV+/PNN+ seulement dans CA2, ainsi qu'une amélioration de la mémoire sociale, mais pas spatiale.*

Cependant, il était difficilement réalisable de répéter les injections intrahippocampiques sur une durée de 10 semaines sans détruire une grande partie du tissu. Nous savions qu'après une injection de ChABC dans l'hippocampe, les PNN « repoussent » après 14 jours environ. De plus, dans l'étude de Donato et al., 2013, les auteurs démontrent que le changement de configuration des interneurones PV (**Fig.45**) se produit après 10 jours d'EE. Nous avons alors opté pour un paradigme expérimental qui consistait à limiter le remodelage des interneurones PV et de leur PNN pendant un EE de 10 jours avec une injection intrahippocampique d'une solution de ChABC dans notre modèle Tg2576. De plus, l'injection était réalisée dans CA1, afin de vérifier si nous pouvions seulement impacter les interneurones PV et la mémoire spatiale, liés à cette région hippocampique, tout en laissant l'EE remodeler les interneurones PV et améliorer la mémoire sociale, liés à CA2.

En ce qui concerne les modifications anatomiques, il fallait donc confirmer que l'injection de ChABC dans CA1 permettait bien une diminution du nombre de cellules

PV+/PNN+ dans cette aire. Cette observation a pu être faite chez les souris NTg permettant alors de confirmer que l'effet de la ChABC pouvait couvrir la durée de l'EE, et donc valider notre protocole. En revanche, lorsque ces mêmes souris sont placées en EE, nous n'observions plus cette diminution du nombre de neurones PV et de leur PNN dans l'aire CA1. Chez les souris NTg, l'EE a permis de compenser la dégradation induite par la ChABC que l'on observe chez les souris restées en SH.

Toujours avec les souris NTg, lorsqu'elles sont simplement injectées avec du PBS, l'EE à tendance à augmenter le nombre de cellules PV+, PNN+ et PV+/PNN+ dans CA1. Cela s'oppose à ce qui a été démontré lors d'un EE de 10 semaines, où le nombre d'interneurones PV et de PNN diminue (Cattaud et al., 2018). Or, dans notre EE, la durée du séjour est de 10 jours. Cela soulève l'hypothèse qu'avec les souris NTg de la lignée Tg2576, les stimulations sensorielles induites par l'EE augmentent le nombre d'interneurones PV détectables dans les premiers jours, avant de diminuer si le séjour en EE se prolonge. La réponse adaptative des interneurones PV pourrait donc connaître différentes phases, comme proposé dans l'article Donato et al., 2013. En revanche, dans leurs travaux les résultats penchent plutôt en faveur d'un changement vers une configuration « low-PV » dans CA1 et CA3 après 10 jours d'EE. Si les individus sains de ces deux lignées donnent des résultats qui s'opposent, ils nous indiquent tout de même que 10 jours d'EE modifient la configuration des interneurones PV dans l'hippocampe.

D'autre part, on observe une restauration du nombre de cellules PV+, PNN+ et PV+PNN+ dans l'aire CA1 après un séjour de 10 jours en EE chez les souris Tg2576. Ceci n'est cependant plus vrai si les animaux reçoivent une injection de ChABC dans cette même région hippocampique avant l'EE. Ces résultats permettent de conclure que 10 jours d'EE sont suffisants pour induire des remodelages des interneurones PV et de leur PNN (Donato et al., 2013), et que la restauration de ces cellules chez les souris Tg2576 permet de retrouver des quantifications proches de celles observées sur les souris NTg (Cattaud et al., 2018). En revanche, l'injection de ChABC dans l'aire CA1 des souris Tg2576 empêche la restauration des neurones PV et de leur PNN ou du moins, la visualisation de PNN mature *via* le marquage WFA, qui diminue lors d'une injection de ChABC (Yamada et al, 2015). Cependant, l'EE permet de remodeler les interneurones PV et leur PNN dans CA2, malgré l'injection de ChABC dans CA1. Ces résultats suggèrent que, pour les individus Tg2576, l'EE ne compense pas les effets

de l'injection de ChABC, contrairement aux souris NTg. Il est possible que, pour les souris NTg qui possèdent donc des interneurones PV et des PNN non-dégradés, l'EE contrebalance facilement la dégradation induite par la ChABC, en stimulant des mécanismes de remodulation qui sont intacts chez les souris saines.

En revanche, en ce qui concerne les souris Tg2576 qui possèdent déjà une forte altération des interneurones PV et de la structure des PNN, les stimulations de l'EE ne contrecarrent pas les effets de la ChABC. Pour s'intéresser à ce phénomène, il est important de rappeler que des travaux montrent que l'injection de ChABC modifie le phénotype moléculaire de neurones corticaux (*in vitro*), vers une configuration qui reflète la plasticité neuronale de type juvénile (Pizzorusso et al., 2002 ; Willis et al., 2022). On pourrait alors apparenter l'effet de la ChABC à l'effet de l'EE chez les souris NTg, qui place également les interneurones PV dans une configuration juvénile (diminution du marquage PV+ : Cattaud et al., 2018), créant un environnement permissif aux nouvelles expériences (Donato et al., 2013). Rendre les neurones PV plus immatures chez les souris NTg permettrait alors d'obtenir une configuration idéale pour s'enrichir de nouvelles expériences, avant que ces neurones puissent maturer à nouveau pour consolider ces apprentissages. En revanche chez les Tg2576, il semblerait que ce processus soit altéré, et que si l'on dégrade plus encore les PNN autour des neurones PV avec de la ChABC, l'EE et/où les mécanismes de formation des PNN ne sont pas en mesure de remodeler ces cellules comme cela est possible chez les NTg.

En ce qui concerne l'effet comportemental, il fallait s'assurer qu'un EE de 10 jours permettait un bénéfice cognitif sur les processus mnésiques hippocampiques des souris Tg2576, par rapport à un EE de 10 semaines. Nous avons choisi d'utiliser des souris âgées de 5 mois, car c'est un âge ou elles présentent de légers troubles cognitifs, notamment lors de test de mémoire spatiale (Hsiao et al., 1996 ; Verret et al., 2013 ; Duffy et al., 2015), mais également car les individus sont suffisament jeunes pour qu'un séjour en EE puisse contrecarrer à long terme ces altérations cognitives (Verret et al., 2013), ainsi que l'activité des interneurones PV (Cattaud et al., 2018). Les résultats de notre étude permettent donc de conclure que 10 jours d'EE sont suffisants pour permettre l'amélioration des fonctions cognitives des souris Tg2576 dans le test de localisation d'objets et le test de mémoire sociale à 5 et 7 essais, et ce même après 20 jours d'hébergement standard suite à l'EE. S'il a déjà été démontré

que l'EE pouvait restaurer la mémoire spatiale des souris Tg2576 (Verret et al., 2013), notre étude est la première démonstration que l'EE permet une restauration de la mémoire sociale chez ces souris modèles de la MA. Ces résultats démontrent que les stimulations cognitives induites par l'EE, permettent une restauration globale des mémoires hippocampo-dépendantes, et permettent également de contrecarrer les déficits cognitifs liés à la pathologie lorsque les animaux y sont placés suffisamment jeunes (Verret et al., 2013).

En revanche, l'injection de ChABC dans l'aire CA1 des souris Tg2576 a d'une part limité les remodelages des interneurones PV et de leur PNN induits par l'EE, mais a également empêché les bénéfices cognitifs de ce dernier sur la mémoire spatiale, dépendante de CA1. En outre, dans cette condition expérimentale, la mémoire sociale liée à l'aire CA2 a pu être restaurée normalement, indépendemment de l'injection de ChABC dans l'aire CA1. Ces observations suggèrent que nous sommes capables d'agir spécifiquement sur une région hippocampique et la mémoire qui lui est associée. Nous savions qu'un séjour en EE améliore les performances mnésiques de ces animaux à long terme (Verret et al., 2013) et qu'il augmente le nombre de cellule PV+ dans l'hippocampe (Cattaud et al., 2018). Nos résultats démontrent que l'EE permet de remodeler les interneurones PV et les PNN dans les régions hippocampiques, et que c'est par le biais des modifications induites dans ces neurones que l'amélioration des fonctions cognitives est possible dans le modèle Tg2576. On peut donc penser que les stimulations induites par l'EE permettent de remodeler les interneurones PV dans une configuration plus optimale, en restaurant leur activité (proxi de l'augmentation du nombre de cellules PV+), ainsi que la formation de la matrice autour de ces neurones, elle-même dépendante de l'expérience (Celio et al., 1998 ; Pizzorusso et al., 2002 ; Carulli et al., 2010).

De plus, les résultats comportementaux nous montrent, par exemple avec les souris NTg élevées en condition standard, que l'injection de ChABC dans CA1 n'altère pas la capacité à former une mémoire spatiale 30 jours après l'injection (hors des délais d'action de la ChABC). En revanche, une autre étude démontre qu'une injection de ChABC dans CA2 détériore la mémoire sociale 5 jours après l'injection (Dominguez et al., 2019). Ces deux résultats confirment donc que la ChABC limite le remodelage des neurones PV et de leur PNN sur une durée relativement courte après l'injection, mais qu'il y a une restauration de ces cellules qui s'opère après une dizaine de jours. Cette

hypothèse soutient l'idée que lorsque les souris Tg2576 sont placées en EE après une injection de ChABC, leurs interneurones PV ne sont pas capables d'intégrer les stimulations environnementales de cette condition d'hébergement afin de permettre des bénéfices cognitifs à long terme.

Pour conclure, il a déjà été démontré que restaurer l'activité des interneurones PV dans l'hippocampe de souris MA (hAPP-J20) améliore les fonctions cognitives des animaux, que cette restauration provienne d'une intervention génétique (Verret et al., 2012) ou d'une greffe intracérébrale d'interneurones embryonnaires (Martinez-Losa et al., 2018). Enfin, ces résultats sont en accord avec les études démontrant que restaurer les interneurones PV chez des souris modèles de la MA renforce la puissance du gamma et les processus cognitifs (Verret et al, 2012), et que l'EE renforce l'activité gamma dans l'hippocampe (Shinohara et al., 2013).

En complément de ces démonstrations, les résultats obtenus avec les injections de NRG1 sont en accord avec l'idée selon laquelle un remodelage du réseau PV/PNN permet une amélioration cognitive des souris Tg2576 (**Fig.96**). En effet, nos travaux démontrent que l'activation de la signalisation NRG1/ErbB4 (5 jours avant les tests comportementaux), impliquée dans la maturation des interneurones PV (Mei & Nave, 2014 ; Sun et al., 2016), permet de restaurer le nombre de cellules PV+ et PV+/PNN+ détectables dans l'aire CA1 des souris Tg2576, ainsi que la capacité des animaux à former une mémoire spatiale. Cette étude est en accord avec les résultats observés dans l'article Rey et al., 2022, dans laquelle l'injection de NRG1 dans l'aire CA2 des souris Tg2576 permet de restaurer les interneurones PV et leur PNN dans cette aire, ainsi que la mémoire sociale des animaux. Dans leur ensemble, les travaux de cette thèse et ceux publiés dans Rey et al., 2022 confirment l'hypothèse selon laquelle il est possible de restaurer spécifiquement une mémoire hippocampo-dépendante en stimulant l'activité des neurones PV dans l'aire hippocampique associée ainsi que la maturation des PNN autour de ces cellules.

D'après la littérature, l'activité des neurones excitateurs permet la libération de NRG1 (Mei & Xiong, 2008 ; Mei & Nave, 2014 ; Ting et al., 2011), afin d'induire la maturation des interneurones PV et des PNN (Mei & Nave, 2014). On peut donc penser que lorsque nous avons placé les animaux dans l'EE, les stimulations multisensorielles et cognitives induites par ce paradigme expérimental ont permi d'activer la voie

NRG1/ErbB4, conduisant à l'augmentation du nombre de cellules PV+ et PV+/PNN+ détectables, ainsi qu'à l'amélioration des fonctions cognitives des souris Tg2576.

De plus, le récepteur ErbB4 est particulièrement présent sur les interneurones PV et sa détection coïncide avec la présence des PNN (Domínguez et al., 2019). Il est donc possible que l'injection de ChABC entraine une diminution du récepteur ErbB4 sur les interneurones PV. Cela pourrait soutenir l'hypothèse selon laquelle l'injection de ChABC altère les processus de remodelage des interneurones PV, et que lorsque nous avons injecté la ChABC dans l'aire CA1 des souris Tg2576 lors de l'EE, les neurones PV étaient limités dans leur plasticité, et n'ont alors pas permis d'obtenir les bénéfices cognitifs de l'EE sur les capacités mnésiques des souris.

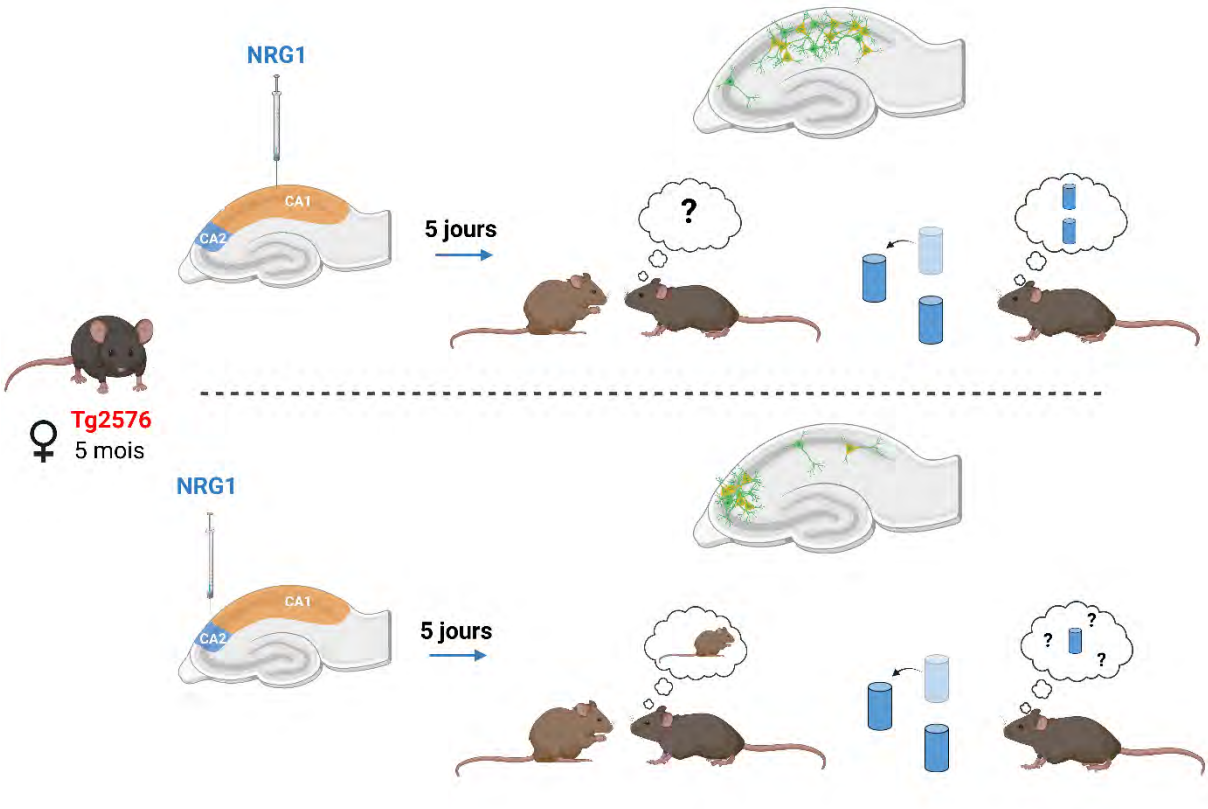



*Figure 96 Schéma récapitulatif des résultats obtenus après l'injection de NRG1 dans l'aire CA1 et CA2 (Rey et al., 2022) de souris Tg2576. Cinq jours après l'injection, les souris présentent une restauration du nombre de cellules PV+/PNN+ dans l'aire ou la NRG1 a été injectée, ainsi qu'une amélioration spécifique de la mémoire qui dépend de l'aire d'injection.*

L'ensemble des résultats présentés dans cette première partie fait l'objet d'un article en cours de rédaction (Bouisset et al., in prep).

# II. Les stimulations sensorielles multimodales à 40Hz miment-elles les effets de l'EE sur les neurones PV et les performances de mémoire des souris Tg2576 ?

## A. Effets de stimulations lumineuses à 40 Hz sur les neurones PV des souris Tg2576

Le remodelage des interneurones PV apparait nécessaire pour observer des bénéfices cognitifs à moyen terme dans le modèle de souris Tg2576 de la MA. Ce remodelage serait associé à la stimulation des interneurones PV *via* des expériences environnementales accrues dans l'EE. Sur la base de cette idée et des travaux du groupe de la neurobiologiste Li-Huei Tsai (Iaccarino et al., 2016 ; Singer et al, 2016), nous nous sommes interrogés sur une méthode expérimentale par le biais de laquelle il serait possible de stimuler directement l'activité des interneurones PV, en utilisant par exemple, la propriété de « photic driving » (Herrmann, 2001). Dans un article princeps du laboratoire de Li-Huei Tsai, les auteurs exposent des souris modèles de la MA (5xFAD) à des stimulations visuelles d'une fréquence de 40Hz, correspondant à la fréquence des oscillations gamma, et constatent une diminution de la charge amyloïde dans le cortex visuel des souris. Dans une étude suivante, les auteurs intégrent des stimulations auditives à la fréquence de gamma en plus des stimulations visuelles ; ils observent alors une diminution d'Aβ dans l'hippocampe, ainsi que des améliorations cognitives lors de tests de mémoire spatiale (Martorell et al., 2019).

À la lecture de ces travaux, nous avons émis l'hypothèse selon laquelle les bénéfices observés dans les travaux sus-cités étaient liés à une augmentation de l'activité des neurones PV. Plus précisemment, on peut penser que des stimulations sensorielles à une fréquence de 40Hz seraient capables d'induire un remodelage durable du réseau PV/PNN, tel que nous l'avons observé suite à l'exposition à un EE ou une injection de NRG1, à savoir une augmentation des neurones PV détectables et une augmentation de la présence de PNN. Nous avons ainsi cherché à reproduire le protocole décrit dans l'article méthodologique de Singer et al., 2016 afin de déterminer si les stimulations visuelles à la fréquence gamma avaient bien un effet sur l'activité des neurones PV, et si elles induisaient un remodelage de ces cellules qui pourraient sous-tendre des effets bénéfiques sur les fonctions cognitives des souris Tg2576. Si tel était le cas, cela

permettrait la mise en place d'un paradigme simple et standardisé, pour lequel les stimulations sensorielles sont plus contrôlées que dans le cadre d'un EE, et dont la durée est plus courte que le protocole d'EE alors validé dans le laboratoire (10 semaines ; Verret et al., 2013 ; Bezzina et al., 2015b ; Cattaud et al., 2018), même si les résultats présents en partie 1 nous ont demontré par la suite que nous pouvions déjà réduire cette durée à 10 jours pour obtenir des bénéfices cognitifs.

Nous avons ainsi reproduit la procédure expérimentale décrite dans Iaccarino et al., 2016 et Singer et al., 2016 (cf Méthodes III.D). Dans un premier temps, nous avons placé une cohorte de souris (NTg sans stimulation (n=4), Tg2576 sans stimulation (n=6), NTg avec stimulation (n=7), Tg2576 avec stimulation (n=5)) dans le dispositif permettant de délivrer des stimulations visuelles à 40Hz, ce 1h par jour pendant une semaine, dans une pièce par ailleurs maintenue à l'obscurité. Un maximum de deux souris étaient placées dans le dispositif afin qu'elles ne puissent créer une occlusion en se cachant l'une derrière l'autre. Les animaux ont été sacrifié 180 minutes après la dernière exposition aux stimulations lors du 7ème jour d'expérience. Sur les tissus cérébraux prélevés, nous avons réalisé un double marquage pour PV et PNN (cf Méthodes IV.B), et quantifié la densité de cellules PV+, PNN+ et PV+/PNN+ dans le cortex somatosensoriel (S1), *a priori* non sensible aux stimulations visuelles, et dans le cortex visuel, dans lequel on s'attend à observer un effet des stimulations (V1) (**Fig.97**).

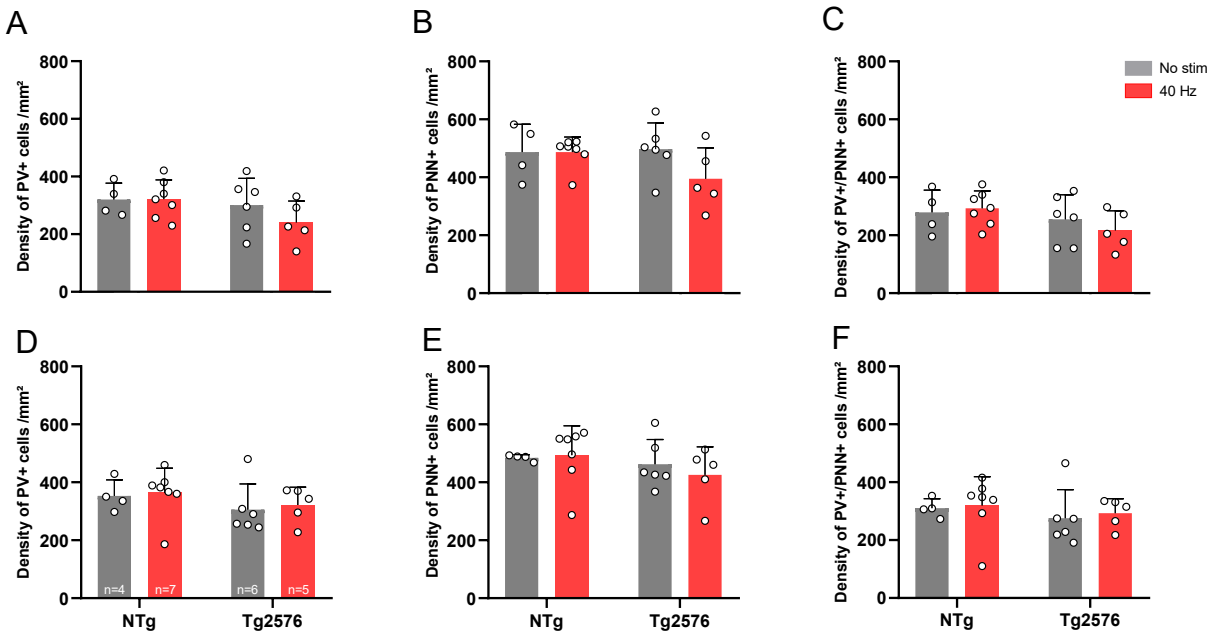



*Figure 97 Densité de cellules PV+, PNN+ et PV+/PNN+ dans S1 (haut) et V1 (bas) de souris soumises 1h/jour pendant 7 jours à des stimulations visuelles à 40Hz (rouge), ou à aucune stimulation visuelle (gris). Les bâtons représentent les moyennes, et les barres d'erreurs correspondent à l'écart type (SD).*

La quantification des cellules PV+, PNN+ et PV/PNN+ dans S1 et V1 ne révèle aucune différence entre les génotypes (NTg *vs* Tg2576). De plus, les stimulations lumineuses à 40Hz ne semblent pas avoir eu d'effet sur les différentes quantifications réalisées. Suite à ces résultats, nous avons décidé d'augmenter la durée des stimulations lumineuses (de 1h à 1h30), ainsi que le nombre de jours consécutifs (de 7 à 10 jours) pendant lesquelles les souris d'une seconde cohorte (NTg sans stimulation (n=4), Tg2576 sans stimulation (n=4), NTg avec stimulation (n=4), Tg2576 avec stimulation (n=3)) sont placées dans le dispositif.

Lors de cette expérience, les quantifications des interneurones PV et de leur PNN n'ont également donné aucun résultat convaincant (**Fig.98**).

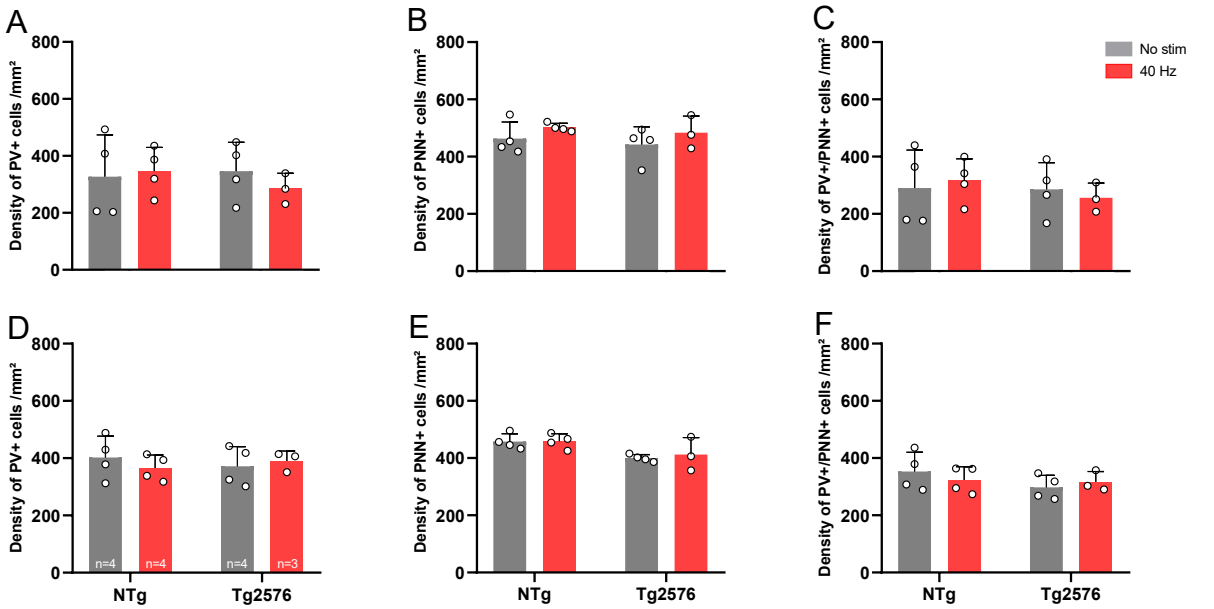



*Figure 98 Densité de cellules PV+, PNN+ et PV+/PNN+ dans S1 (haut) et V1 (bas) de souris soumises 1h30/jour pendant 10 jours à des stimulations visuelles à 40Hz (rouge), ou à aucune stimulation visuelle (gris). Les bâtons représentent les moyennes, et les barres d'erreurs correspondent à l'écart type (SD).*

Afin de vérifier si notre dispositif de stimulation permettait de générer des effets similaires à ce qui est montré chez les souris 5xFAD dans l'étude Iaccarino et al., 2016, à savoir une diminution de la taille du soma et une augmentation de la longueur des protubérances des cellules microgiales, nous avons quantifié la taille totale (**Fig.99A**) et le diamètre somatique (**Fig.99B**) des cellules microgiales de V1 (marqués grâce à l'anticorps anti Iba1) des souris de cette deuxième cohorte. Là encore, nous n'avons pas observé de différence dans ces deux mesures, et nous n'avons donc pas été en mesure de reproduire ce qui a été trouvé par les auteurs de l'étude citée

précédemment. Nous avons également sacrifié 4 souris 1h30 après les stimulations lumineuses afin de déterminer si ce protocole est en mesure de provoquer une augmentation de l'activité des neurones dans l'aire V1, évaluée par la présence de cellules cFos+. Nous n'avons pas observé de différence d'expression de cFos dans le cortex V1 des souris soumises aux stimulations visuelles par rapport aux souris contrôles (données non présentées).

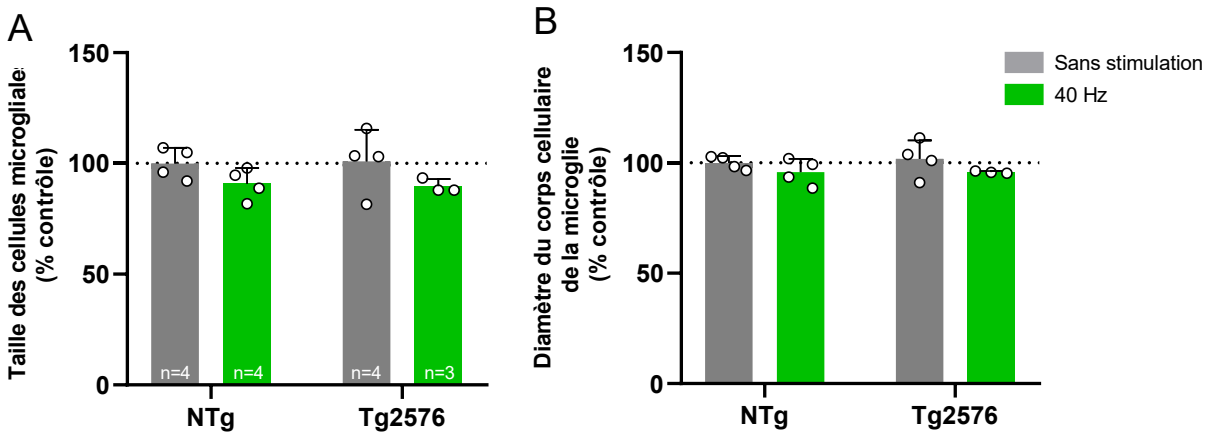



*Figure 99 (A) Taille des cellules Iba1+ en pourcentage du groupe contrôle (NTg-no stim). (B) Diamètre des cellules Iba1+ en pourcentage du groupe contrôle. La ligne pointillée indique 100%, correspondant à la valeur du groupe contrôle. Les bâtons représentent les moyennes, et les barres d'erreurs correspondent à l'écart type (SD).*

À ce stade, nous ne pouvions pas déterminer si les stimulations lumineuses à 40Hz n'avaient bien aucun effet sur les paramètres mesurés chez les souris Tg2576, ou si le dispositif lui-même était en cause (bien que fidèlement reproduit de l'étude Singer et al., 2016). Pour lever le voile, nous avons décidé de soumettre les souris à des enregistrements EEG lors de la présentation des stimulations à 40Hz, afin de déterminer si celles-ci pouvaient avoir un effet sur les activités cérébrales oscillatoires, en particulier sur la puissance des oscillations gamma.

## B. Effets de stimulations multi-modales à 40 Hz sur l'activité cérébrale

Notre objectif était ici de déceler si nous observions une augmentation de l'activité des ondes cérébrales gamma lentes (30-50Hz) lors des stimulations visuelles à 40Hz, ce qui refléterait une activation des interneurones PV lors des stimulations. Dans cette étude, nous avons également soumis les animaux à des stimulations auditives. Ainsi, les stimulations pouvaient être visuelles, auditives, ou multi-modales (visuelles + auditives) ; elles ont été émises à une fréquence de 20Hz, 40Hz, 80Hz, ou aléatoire.

Pour rappel, le casque EEG est constitué de 3 électrodes, implantées respectivement dans le cortex visuel (V1), auditif (A1), et frontal (F) (cf Méthodes II.D). Les données présentées ici sont exclusivement celles recueillies par l'électrode implantée dans V1.

Nous avons tout d'abord fait le constat que seules les stimulations à la fréquence de 20 Hz et dans la modalité visuelle semblaient avoir un effet sur la puissance des ondes gamma (**Fig.100** ; F30-50, encadré rouge). Cependant, nous avons également testé le protocole sur une souris implantée mais sacrifiée avant l'expérience ; dans ces conditions, l'augmentation de puissance de gamma étaient toujours visible, ce qui nous a permis de conclure que cela traduisait en réalité un bruit électrique enregistré par les casques EEG. Afin de pallier cela, nous avons sorti le dispositif de la cage de Faraday, empêchant la souris d'être en contact direct avec une surface touchant l'alimentation de la bande de LED. Cependant, ces expérimentations ne nous ont pas totalement permis d'exclure la possible présence de bruit électrique lors de stimulations visuelles à 20Hz. De plus, après avoir analysé finement chacune des électrodes en fonction de tous les types de stimulations, nous n'avons pu établir aucun consensus sur les résultats.

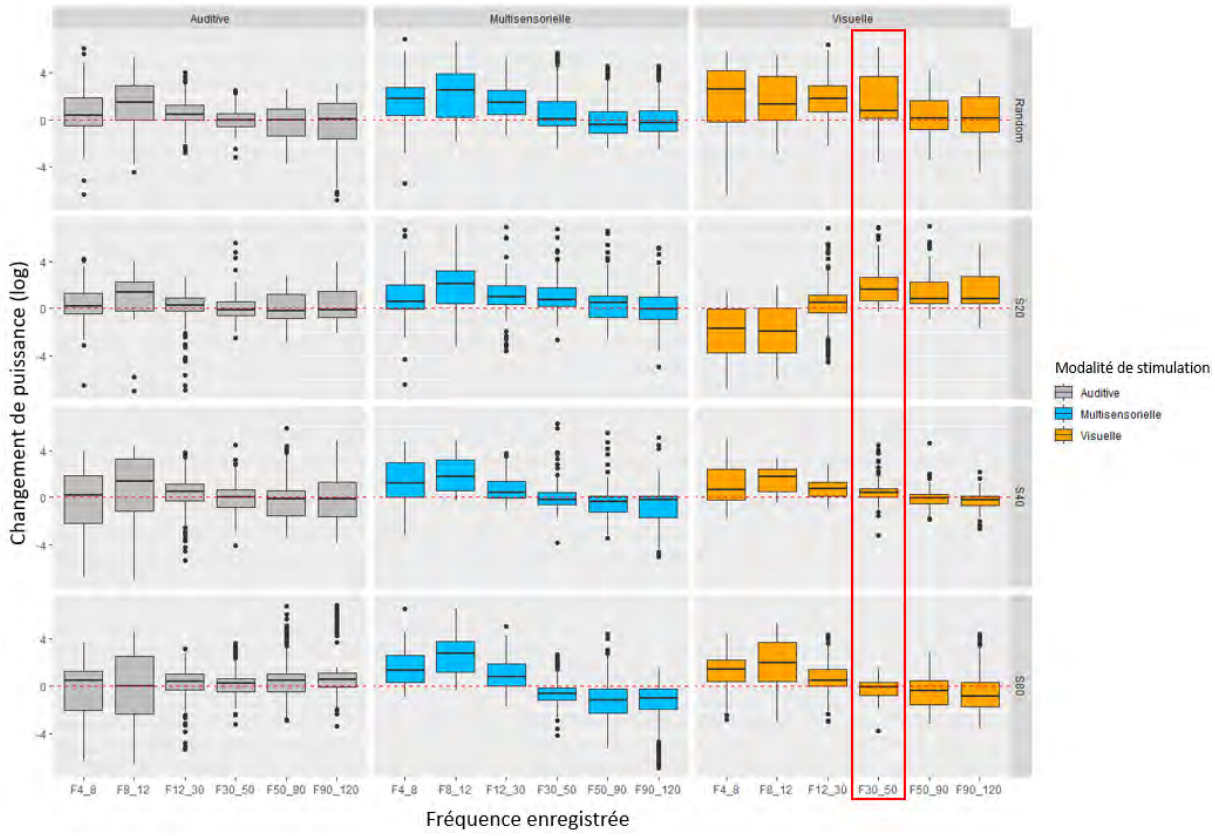



*Figure 100 Les enregistrements de l'électrode placée au-dessus de V1 sont segmentés en bandes de fréquences représentant les différents types d'activités cérébrales (thêta (4-8 Hz), alpha (8- 12 Hz), bêta (13-30 Hz), gamma lent (30-50 Hz), gamma*

*rapide (50-90 Hz)). La nature (auditive, visuelle ou multisensorielle) est décrite en haut des panneaux, et leur fréquence (Random, 20, 40 ou 80 Hz) est représentée à droite. Les résultats sont exprimés en changement de puissance (log), soit un delta entre la puissance des oscillations enregistrées pendant les stimulations, et leur puissance lorsque l'animal est au repos.*

## C. Discussion

Dans cette partie, nous émettions l'hypothèse selon laquelle les bénéfices observés dans les travaux utilisant les stimulations multimodales à 40Hz (Martorell et al., 2019) sont liés à une augmentation de l'activité des neurones PV et du réseau PV/PNN, tel que nous l'avons observé suite à l'exposition à un EE ou une injection de NRG1. Nous avons donc reproduit le dispositif expérimental publié par Singer et al., 2016 pour déterminer si activer les interneurones PV par des stimulations visuelles et/ou auditives à 40Hz pouvait reproduire en partie les effets d'un EE sur ces cellules, tout en proposant une méthode directe et non invasive du renforcement de l'activation de ces neurones.

Ce dispositif repose sur des stimulations lumineuses à 40Hz, permettant de générer directement des oscillations gamma dans le cortex des souris. Les auteurs démontrent que, chez les souris 5xFAD, une forme beaucoup plus aggressive de la pathologie que le modèle Tg2576, les stimulations gamma réduisent la charge amyloïde dans le cortex visuel, et induisent une modification de la microglie (Iaccarino et al., 2016). Cependant, les auteurs ne démontrent aucune diminution de la charge amyloïde dans l'hippocampe. En revanche, lorsqu'ils utilisent un dispositif de stimulation multi-modales (visuelles + auditives), ils mesurent une diminution de la charge amyloïde dans l'hippocampe, ainsi qu'une amélioration sur les performances de mémoire spatiale des souris 5xFAD (Martorell et al., 2019).

En utilisant le même dispositif que dans Singer et al., 2016, nous souhaitions mesurer si les stimulations visuelles à la fréquence gamma avaient un effet sur l'activité des interneurones, en utilisant le nombre d'interneurones PV détectables dans le cortex visuel (V1) comme variable. Dans nos deux cohortes de souris (stimulations 1h/j pendant 7 jours et 1h30/j pendant 10 jours), les stimulations visuelles à 40Hz n'ont pas révélé de changement dans le nombre de cellules PV+ détectables. Cependant, nous étions dans l'incertitude de pouvoir affirmer que **1)** soit les stimulations n'avaient pas d'effet sur les neurones PV de l'aire V1 ; **2)** soit le dispositif ne permettait pas d'induire

de gamma chez nos souris, malgré le fait que nous aillons scrupuleusement suivi le protocole publié dans Singer et al., 2016. Pour lever cette incertitude, nous avons mesuré un paramètre indentique à celui caractérisé dans les deux études Iaccarino et al., 2016 et Martorell et al., 2019, à savoir les changements morphologiques observables sur la microglie. Là encore, nous n'avons observé aucune différence entre les groupes NTg et Tg2576, que les souris aient reçu les stimulations visuelles à 40Hz ou non. À ce stade nous ne pouvions toujours pas déterminer si le dispositif de stimulation était en cause, ou si les résultats étaient différents dans notre modèle murin de la MA. Plus étonnant encore, que ce soit chez les souris NTg ou Tg2576, les observations du marquage cFos n'ont pas révélé d'activation neuronale plus importante dans le cortex visuel 1h30 après les stimulations, suggérant que le paradigme utilisé ne permet pas l'activation neuronale attendue. Dans ces conditions, il nous est donc impossible de répondre à notre hypothèse de départ.

## III. Quelle est la conséquence des conditions expérimentales testées (EE, ChABC, NRG1) sur les modifications synaptiques des neurones PV et la structure des PNN dans l'hippocampe des souris NTg et Tg2576 ?

Lors des expériences précédentes, les manipulations expérimentales que nous avons réalisées ont permis de remodeler les interneurones PV/PNN. Par exemple, l'injection de ChABC dans l'aire CA1 de souris NTg diminue le nombre de neurones PV détectables. En revanche chez les souris Tg2576, l'injection de NRG1 ou un séjour en EE permet de restaurer la présence de ces neurones dans l'hippocampe, ainsi que d'améliorer la mémoire des animaux. Dans cette partie, nous souhaitions utiliser une nouvelle approche expérimentale afin de déterminer si l'augmentation de la présence de PNN autour des neurones PV des souris Tg2576 après un EE ou une injection de NRG1 est sous-tendue par une restauration de la nature et du nombre de synapses afférentes et/ou de l'organisation de la structure des PNN par rapport à ce qui est observé sur les neurones PV de souris NTg.

Pour cela, nous avons eu l'opportunité de développer un protocole de quantification de marquages synaptiques et des PNN à partir d'images haute-résolution obtenues par RIM. Cette étude a été réalisée en collaboration avec Dr. Thomas Mangeat, ingénieur de recherche à la plateforme d'imagerie de notre institut (LITC-CBI). La microscopie RIM, mise en place et récemment publié par Thomas Mangeat (Mangeat et al., 2020), présente l'avantage de pouvoir obtenir des images sur des tissus fixés, conservés et traités selon des protocoles d'histologie classiques, ce qui n'est pas le cas des autres techniques de microscopie haute-résolution comme le dSTORM. Cependant, jusqu'alors cette approche ne microscopie n'avait jamais été réalisée sur du tissu cérébral.

Nous avons donc réalisé des marquages immunohistologiques sur les tissus cérébraux de 4 souris pour chacun des groupes expérimentaux présents dans cette thèse (NTg, NTg-ChABC (CA1), Tg2576, Tg2576-NRG1 (CA1), Tg2576-EE). Nous avons réalisé un triple-marquage sur ces tissus : PV, pour visualiser les somas des neurones PV+ ; WFA, pour visualiser les PNN matures (résidus N-acetylgalactosamine des chaines de sucre) ; puis, l'un des marqueurs suivants : aggrecan, composant des PNN ; Syt2, marqueur des boutons inhibiteurs des cellules

en panier ; ou Vglut1 marqueur présynaptique des terminaisons glutamatergiques. Un total de 10 à 15 neurones PV+ répartis sur 3 niveaux de coupe de l'aire CA1 ont été scannés avec le RIM (cf Méthodes IV.D), sur 2 plans de l'axe z sélectionnés aléatoirement sur ces neurones. Cela nous a ainsi permis d'obtenir environ 50 à 80 images pour chacun des groupes expérimentaux et chacun des triple-marquages immunohistochimiques. Chacune des images est ensuite soumise à un protocole d'analyse réalisé sur Icy, grâce au pluggin Soda (https://icy.bioimageanalysis.org/plugin/soda-suite/). Ceci permet d'identifier des points pour les différents marquages aggrecan, Syt2 ou Vglut1, ainsi que pour le marquage WFA, qui est lui présent sur toutes les préparations. La détection de ces points est déterminée *via* des paramètres sur le pluggin qui sont choisis lorsque la détection est cohérente avec ce qui est observé sur les images (**Fig.101**). Ensuite, le logiciel met en place une analyse de colocalisation, qui détermine des couples de points entre les 2 marquages, puis calcule leur probabilité de couplage, en fonction de la distance qui les sépare (variable rmax (**Fig.102**), qui représente la distance qui sépare 2 points, et donc un rmax = 1 équivaut à un rayon d'un pixel).

Les données dont nous disposons méritent encore de la réflexion quant à leur organisation et leur représentation, car certaines d'entres elles semblent contradictoires. Ainsi, nous présenterons ici seulement les résultats concernant le marquage Syt2, afin d'obtenir un aperçu des données que nous pouvons obtenir avec cette approche. Les descriptions ci-dessous sont donc à considérées avec précaution, et d'autres expériences et analyses permettront de compléter ces données préliminaires. Les paramètres mesurés pour le marquage Syt2/PV/WFA sont **1)** le nombre de points Syt2 détectés au niveau des PNN visibles autour des neurones PV, et **2)** la probabilité qu'un couplage existe entre le marquage Syt2 et le marquage WFA, en fonction de la distance qui les sépare. D'après ces résultats, l'injection de ChABC dans l'aire CA1 des souris NTg semble diminuer le nombre de points Syt2 détectables, mais ne modifie pas l'interaction spatiale entre les terminaisons Syt2+ et les PNN marqués par WFA (**Fig.102**), par rapport aux souris NTg sans injection. Cela suggère que la ChABC diminue le nombre de synapses inhibitrices sur ces neurones, mais pas l'organisation spatiale des PNN autour de ces synapses.

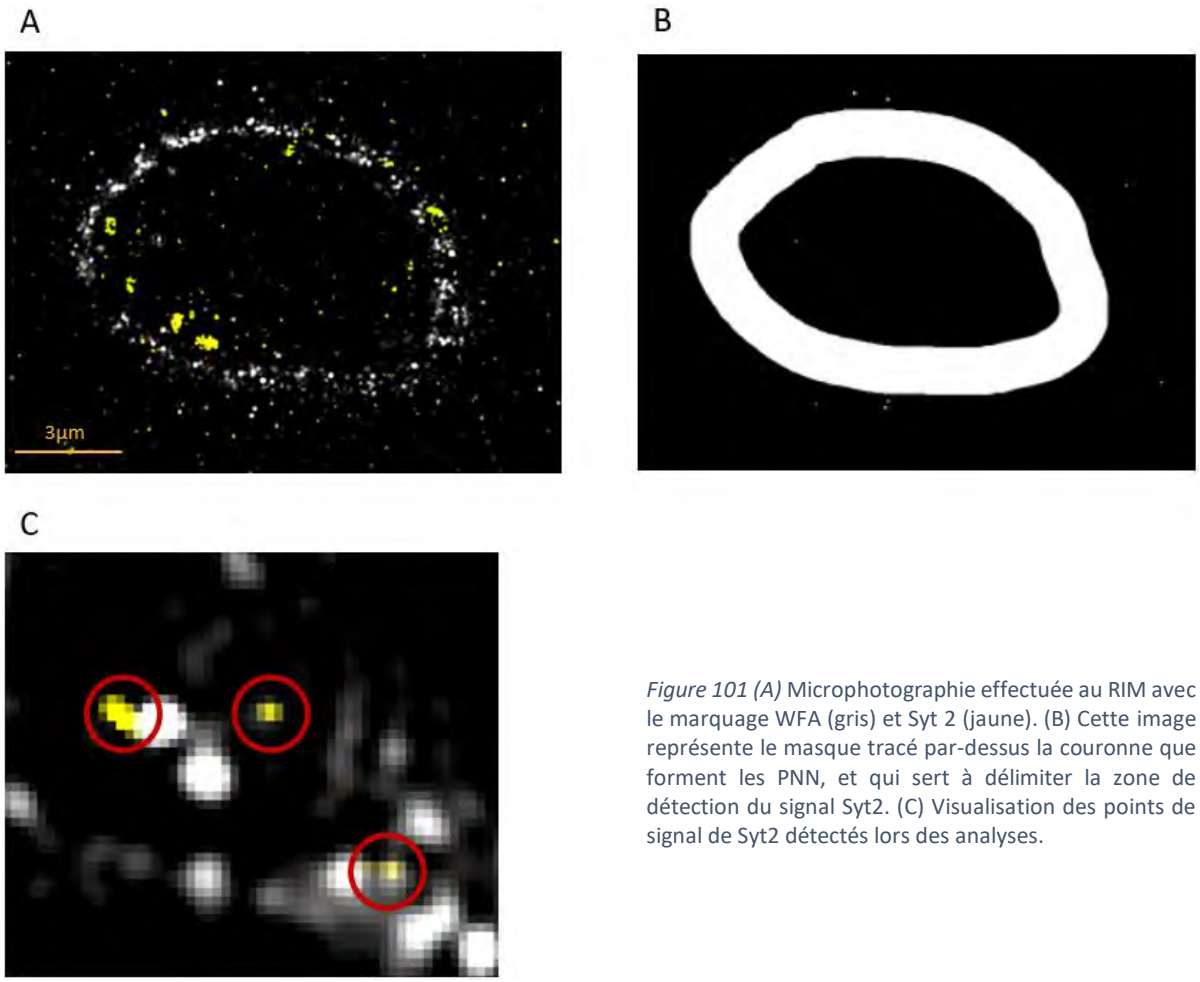



*Figure 101 (A)* Microphotographie effectuée au RIM avec le marquage WFA (gris) et Syt 2 (jaune). (B) Cette image représente le masque tracé par-dessus la couronne que forment les PNN, et qui sert à délimiter la zone de détection du signal Syt2. (C) Visualisation des points de signal de Syt2 détectés lors des analyses.

En revanche, on observe une diminution du nombre de synapses inhibitrices autour des neurones PV des souris Tg2576-NRG1 et Tg2576-EE par rapport aux souris Tg2576. De plus, la probabilité de couplage semble augmenter chez les souris Tg2576-NRG1 par rapport aux souris Tg2576 pour des distances courtes entre les marquages (rayons de 1 à 11 pixels), et également chez les souris Tg2576-EE, sur l'ensemble des distances entre les marquages (**Fig.102**). Ces observations suggèrent que l'augmentation du nombre d'interneurones PV+ mesurée après une injection de NRG1 dans l'aire CA1 ou après un séjour en EE est associée à une diminution du nombre de synapses inhibitrices sur ces neurones. De plus, l'augmentation de la probabilité de couplage pour des distances faibles entre le marquage WFA et Syt2 chez les souris Tg2576-NRG1 pourrait traduire le fait que les PNN se concentrent autour des synapses inhibitrices restantes, afin de les stabiliser, de la même manière que que ce qui est observé pour les synapses excitatrices (Favuzzi et al., 2017).

Enfin, on peut constater que pour les deux groupes de souris NTg, nous observons une anti-colocalisation (probabilité <0) autour d'un rmax > 18, suggérant ainsi qu'il est peu probable qu'un point de marquage Syt2 et un point de marquage WFA soit en interaction lorsque les distances s'éloignent. Autrement dit, pour ces groupes, on observe une structuration des PNN plus importante (traduite par le marquage WFA, présent sur les PNN matures) autour des synapses inhibitrices, structuration qui est beaucoup moins présente chez les souris Tg2576.

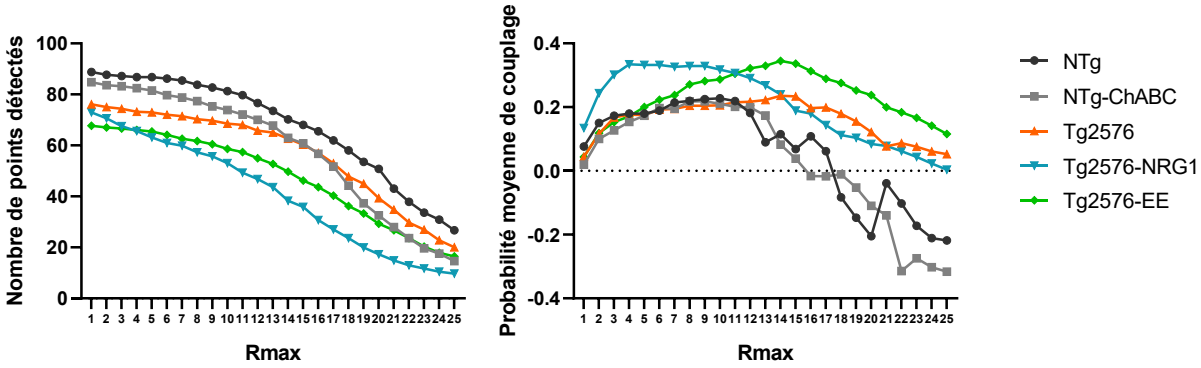



*Figure 102 (A) Nombre de points du marquage Syt2 détectés en fonction du rmax pour chacune des conditions expérimentales testées. (B) Probabité de couplage entre le marquage WFA et Syt2 en fonction de la distance qui sépare un couple de point.*

## A. Discussion

Les résultats obtenus avec le RIM permettent d'ouvrir un nouveau champ de recherche quant aux hypothèses présentées dans cette thèse. En effet, la quantification du nombre de synapses excitatrices et inhibitrices réalisées sur ces neurones permettrait d'approfondir notre compréhension du remodelage des interneurones PV et de leur PNN qui s'opère lors des différentes conditions expérimentales utilisées.

En revanche, les données présentées sont à interpréter avec précaution, car les associations avec les résultats que nous avons obtenu avec le marquage Vglut1 et aggrecan sont difficilement interprétables, et sont parfois en opposition avec les données de la littérature, ainsi que les résultats présentés lors des expériences précédentes. Cela nous amène à questionner l'échantillonage aléatoire effectué lors de ce premier protocole expérimental avec le RIM.

Pour cette raison, nous envisageons à l'avenir de travailler sur des fichiers plus volumineux, qui permettrait de réaliser ces mesures sur un neurone entier, plutôt que sur des plans aléatoires pris sur l'axe z. Malgré ces considérations, il apparait intéressant d'utiliser cette méthode pour réaliser des analyses sur un l'ensemble des composants des PNN, comme les protéoglycans, l'acide hyaluronique ou les protéines de liaisons. Cela nous permettrait de discriminer si certains composants sont particulièrement solicités lors des remodelages des PNN.

Pour proposer une alternative aux marquages réalisés, nous aurions pu utiliser le marquage aggrecan comme référence, à la place du marquage WFA. En effet, celui-ci est insensible à la dégradation des PNN par la ChABC (Yamada & Jinno, 2017). Il pourrait donc avoir l'avantage de ne pas subir de modification dans le nombre de points détéctés, ce qui n'est pas le cas du marquage WFA en fonction des conditions. Ainsi, des modifications observées du marquage aggrecan autour des terminaisons inhibitrices et excitatrices ne dépendraient que de modifications de l'organisation spatiale.

Cette collaboration avec le centre d'imagerie du CBI (LITC) nous a permis d'éprouver la pertinence de l'utilisation du RIM pour l'étude de la structure des PNN, la présence de synapses sur les neurones, ainsi que leurs interactions spatiales. Bien que des ajustements sont nécessaires, en particulier en ce qui concerne l'échantillonage des images analysées, cette approche apparait valide, tout en présentant l'intérêt de pouvoir travailler sur des préparations histologiques « classiques », ce qui n'est pas le cas pour les autres techniques d'imagerie à haute-résolution.

# DISCUSSION GÉNÉRALE

Les travaux effectués lors de cette thèse apportent des résultats qui s'articulent autour des trois objectifs suivants :

1) **Les effets bénéfiques de l'EE sur les capacités cognitives des souris Tg2576 sont-ils liés à la restauration du nombre d'interneurone PV et des PNN dans l'hippocampe ?**

Nos résultats démontrent qu'un séjour de 10 jours en EE permet de restaurer la mémoire spatiale et sociale des souris Tg2576, ainsi que le nombre de cellules PV+, PNN+ et PV+/PNN+ dans l'hippocampe de ces souris. D'autre part, nous montrons que l'injection de ChABC dans l'aire CA1 permet d'entrainer une diminution du nombre de cellules PV+/PNN+ pour une durée de 10 jours, soit une durée qui couvre la période d'enrichissement environemental des souris. De plus, l'injection de ChABC dans l'aire CA1 empêche la restauration des interneurones PV et de leur PNN *via* l'EE dans cette aire, et ceci est associé à une absence d'amélioration de mémoire spatiale. En revanche, l'injection de ChABC dans l'aire CA1 n'empêche pas les bénéfices de l'EE sur les neurones PV de l'aire CA2, et une amélioration des performances de mémoire sociale est observée chez les souris Tg2576. Enfin, l'injection de NRG1 dans l'aire CA1 des souris Tg2576 permet également d'engager un remodelage des interneurones PV et de leur PNN, et restaure spécifiquement leur mémoire spatiale.

2) **Les stimulations sensorielles multimodales à 40Hz miment-elles les effets de l'EE sur les neurones PV et les performances de mémoire des souris Tg2576 ?**

Lors de cette étude, nous avons utilisé des stimulations gamma lumineuses et auditives à 40 Hz afin de reproduire en partie, les stimulations sensorielles et cognitives induitent par un EE. Les différentes cohortes ne nous ont pas permis d'estimer si ces stimulations à 40Hz avaient un effet sur les neurones PV du cortex visuel, sur la microglie ou sur l'activation neuronale de l'aire en question. De plus, les enregistrements EEG n'ont pas permis de mettre en évidence des modifications des oscillations cérébrales, en particulier gamma, lors des stimulations à 40Hz.

3) **Quelle est la conséquence des conditions expérimentales testées (EE, ChABC, NRG1) sur les modifications synaptiques des neurones PV et la structure des PNN dans l'hippocampe des souris NTg et Tg2576 ?**

Ces travaux s'inscrivent dans une étude préliminaire, qui permet de mettre en place une approche nouvelle, *via* le RIM, pour étudier les connexions synaptiques excitatrices et inhibitrices présentes sur les interneurones PV, ainsi que la présence des différents composants des PNN, dans les différentes conditions expérimentales testées lors de cette thèse. Cependant, la comparaison des résultats obtenus avec les différents marquages rend difficile l'interprétation des données. En revanche, les données présentées pour le marquage Syt2 permettent d'obtenir un aperçu du type d'informations que l'on peut obtenir avec cette nouvelle approche.

Lors de cette thèse, nous avons établi un lien de cause à effet entre le remodelage des interneurones PV dans l'hippocampe dû à des stimulations environnementales et les bénéfices cognitifs chez les souris Tg2576.

Ces travaux permettent d'accroître notre compréhension des résultats obtenus par Verret et al., 2012, 2013 et Cattaud et al., 2018, concernant l'implication de la restauration des interneurones PV et de leur PNN sur l'amélioration des fonctions cognitives dans des modèles murins de la MA. Précisemment, ces études antérieures démontrent que restaurer l'activité des interneurones PV permet d'améliorer les performances cognitives des souris hAPPJ20 (Verret et al., 2012), que l'EE améliore les capacités de mémoire des souris Tg2576 (Verret et al., 2013), et que l'EE augmente également le nombre de cellules PV+ et PV+/PNN+ dans l'hippocampe de ces souris (Cattaud et al., 2018). Les stimulations sensorielles et cognitives au cours de l'EE permettraient donc de stimuler les interneurones PV, qui sont eux-mêmes impliqués dans les processus cognitifs, comme par exemple, le codage d'informations spatiales et visuelles (Agestuma et al., 2017 ; Rupert et al., 2022). De plus, l'activité des interneurones PV est associée à l'émergence des oscillations gamma (Cardin et al., 2009 ; Sohal et al., 2009), et ces oscillations sont notamment impliquées dans la mémoire spatiale, comme l'encodage ou le rappel (Colgin & Moser, 2010 ; Yamamoto et al., 2014). Il se dégage de ces études, un lien tryptique entre les oscillations gamma, l'activité des interneurones PV et l'EE.

Notre travail se base donc sur l'idée que l'expérience vécue par les individus induit un remodelage des neurones PV et de leur PNN. Or, il est important de préciser ce terme de « remodelage » que l'on peut définir comme une modification des connexions excitatrices et inhibitrices sur les neurones PV, ainsi que la maturation des PNN autour de ces cellules, se traduisant par un changement de leur activité intrinsèque et du réseau dépendant de celle-ci. Ce remodelage dépendant de l'expérience vécue par l'individu est notamment décrit dans l'étude de Donato et al., 2013. En effet, lorsque des souris sont placées dans un EE, cela induit une diminution d'expression de la protéine parvalbumine, soit une configuration « low-PV » (Donato et al., 2013 ; Cattaud et al., 2018). Puis, toujours selon ces auteurs, lorsque les prédictions acquises au cours de l'apprentissage sont en accord avec l'expérience réellement vécue par l'individu, cette mémoire est consolidée, et cela s'accompagne d'une augmentation de l'expression en parvalbumine, soit une configuration « high-PV ».

Plusieurs éléments de la littérature indiquent que, suite à un séjour dans un EE, les interneurones PV sont moins actifs (Donato et al., 2013 ; Cattaud et al., 2018), ce qui s'accompagne d'une augmentation du nombre de synapses inhibitrices sur ces neurones (Donato et al., 2013). En conséquence de cela, l'EE induit une diminution du contrôle inhibiteur qu'exerce les neurones PV sur les neurones excitateurs, et cette désinhibition des neurones principaux va être permissive à l'acquisition de nouvelles expériences. Par exemple, les neurones pyramidaux de CA3 expriment plus fortement la protéine cFos lors d'un test de reconnaissance d'objets lorsque celui-ci est effectué après un EE, par rapport à ce qui est observé chez des souris restées en conditions standard, ce qui suggère que le contrôle inhibiteur sur ces neurones a été diminué par le séjour en EE (Donato et al., 2013).

En revanche, le séjour dans un EE induit une augmentation du nombre de cellules PV+ observables dans l'hippocampe des souris modèles de la MA, telles les souris Tg2576, par rapport à ce qui est observé en conditions stardard (cf Résultats I.A ; Cattaud et al., 2018). Cela indique que, pour les souris MA, les stimulations sensorielles et cognitives permettent d'accroitre le nombre de cellules détectables, suggèrant une diminution de l'inhibition de ces cellules, et/ou une augmentation de leur excitation. Pour rappel, les souris modèles de la MA, parmi lesquelles les souris Tg2576, présentent une hyperexcitabilité neuronale, ainsi que des activités épileptiformes (Bezzina et al., 2015b, Karn et al., 2016, Szabo et al., 2022). On peut donc penser que l'EE permet d'augmenter le contrôle inhibiteur des neurones PV sur les neurones principaux, afin de réduire l'hyperexcitabilité neuronale (bien que les travaux publiés dans Bezzina et al., 2015b ne soutiennent pas cette hypothèse). Si l'on transpose chez l'humain, il est montré que les patients MA présentent une hyperactivation de l'hippocampe, et une désactivation réduite du DMN (Quiroz et al., 2010), essentielle à l'encodage de nouvelles informations (Raichle et al., 2001). Dans ce cadre, l'augmentation du contrôle inhibiteur pourrait diminuer l'hyperactivation de l'hippocampe et faciliter la désactivation du DMN, et apporter des bénéfices cognitifs.

Prises ensemble, les observations sur les changements de conformation des interneurones PV dus à l'EE avec des souris saines et des souris MA démontrent que l'EE permet un remodelage des connexions sur les interneurones PV et donc de leur activité, et que ces modifications dépendent de l'état de base de ces neurones. Après un EE, l'activité défaillante des interneurones PV d'un individu MA va être restaurée,

et cela va avoir pour effet d'augmenter le contrôle inhibiteur, ainsi qu'induire une amélioration de ses fonctions cognitives. En revanche, pour un individu sain, l'EE aura pour conséquence de diminuer l'activité des interneurones PV qui vont lever le contrôle inhibiteur qu'ils exercent sur les neurones principaux, afin de promouvoir une activité de l'hippocampe permissive à l'intégration de nouvelles expériences.

### A. Effet de l'EE sur les réseaux PV-dépendants de l'aire CA1 de l'hippocampe

Comme dit précédemment l'EE permet un remodelage des connexions sur les interneurones PV, dépendant du niveau d'activité de base de ces neurones. Afin d'aller plus loin dans l'interprétation de nos données, il faut prendre en compte le fait que les neurones PV observés ne ciblent pas nécessairement que des neurones principaux. En effet, certains neurones PV+ de l'aire CA1 exercent une inhibition sur d'autres interneurones inhibiteurs (Cobb et al., 1997 ; Pawelzik et al. 2003). D'autre part, les neurones PV reçoivent des informations en provenance de neurones pyramidaux, mais aussi d'autres sous-types d'interneurones, en particulier d'autres neurones PV (Cobb et al., 1997 ; Bartos et al., 2002), mais aussi des neurones VIP (Hioki et al., 2013). Fait intéressant, la répartition des synapses excitatrices et inhibitrices sur les neurones PV est de 94% et 6%, respectivement (Gulyás et al., 1999). D'après nos connaissances, il n'est pas possible de définir des sous-populations d'interneurones PV qui pourraient être impliquées dans certaines fonctions spécifiques. En revanche, il existe différents sous-types d'interneurones PV dans CA1, qui sont spatialement intégrés différemment dans le réseau (Somogyi & Klausberger, 2005 ; Klausberger & Somogyi, 2008), comme les cellules O-LM, dont le soma se situe dans la couche oriens et qui innervent les dendrites distales des cellules principales (Maccaferri et al., 2000), mais également d'autres interneurones (Katona et al., 1999). On peut alors penser que certains neurones PV+ observés dans notre étude inhibent principalement des neurones pyramidaux, et/ou que d'autres exercent un contrôle inhibiteur sur d'autres interneurones afin d'induire une désinhibition des neurones pyramidaux. Il pourrait donc y avoir différents sous-types d'interneurones PV qui ont une fonction spécifique, et qui sont alors différemment affectés par l'EE (**Fig.103**).

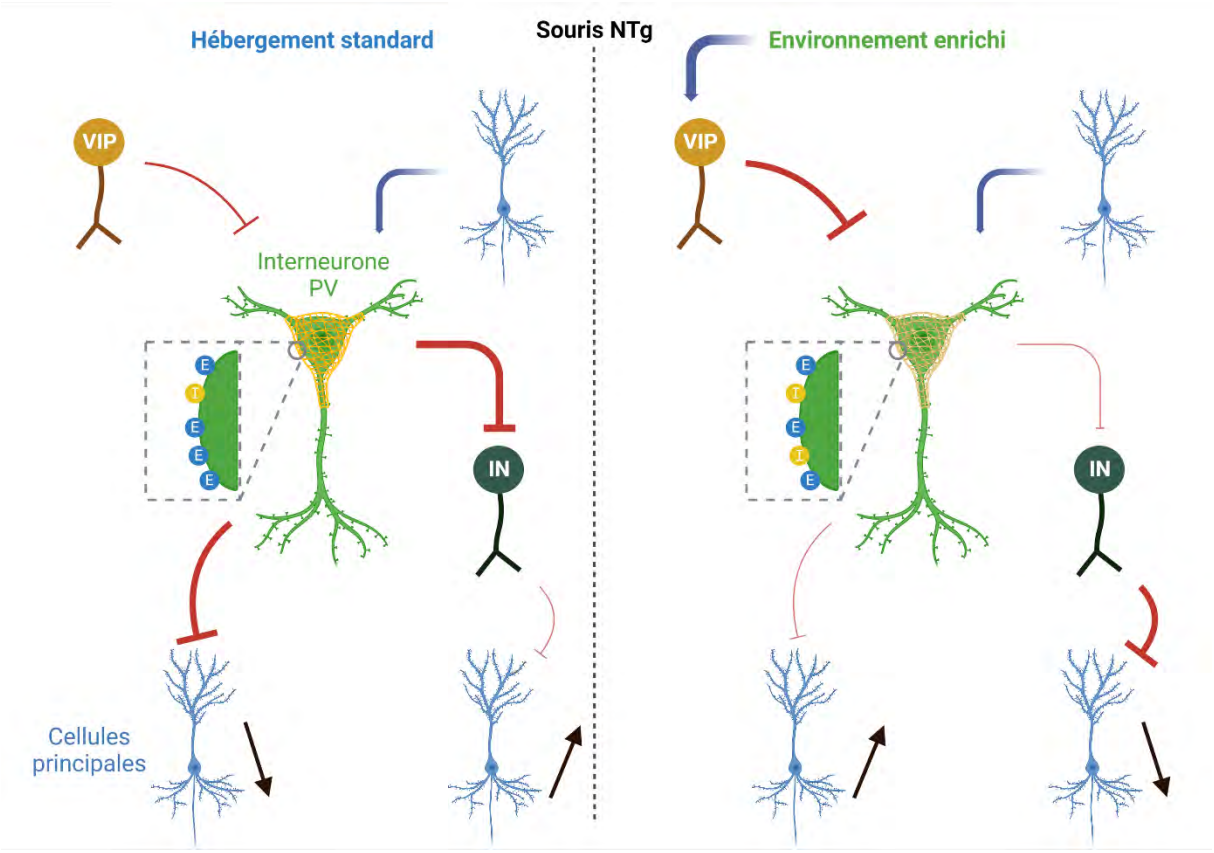



*Figure 103 Schéma représensatif du modèle proposé quant à la modulation des interneurones PV des souris NTg lors de d'un enrichissement environnemental. À gauche, les souris NTg sont élevées en condition d'hébergement standard. L'activité des neurones PV est alors contrôlée par d'autres interneurones, en particulier les neurones VIP (en jaune) et des cellules principales. Ils possèdent des PNN matures, qui stabilisent les synapses excitatrices (rond bleu). Ces neurones PV exercent un contrôle inhibiteur sur des neurones pyramidaux (bleu) ou sur d'autres interneurones (IN). A droite, lorsque les souris sont placées dans un EE, celui-ci module l'activité des neurones VIP, et augmente le contrôle inhibiteur qu'ils exercent sur les neurones PV. Ceux-ci reçoivent alors plus de terminaisons inhibitrices (jaune), et la présence de PNN autour de ces cellules est réduite. Cela permet aux cellules principales de décharger, afin d'être permissives à l'intégration des nouvelles expériences sensorielles induites par l'EE. Cette désinhibition peut également permettre à d'autre interneurones, y compris des neurones PV, d'être activés afin d'inhiber des populations spécifiques de cellules principales permettant par exemple, d'affiner les encodages réalisés lors de l'EE.*

Selon ce scénario, lorsque les souris NTg sont placées dans un EE, il est possible que le remodelage des interneurones PV par l'expérience soit la conséquence de modifications d'activité des neurones VIP, *via* la libération d'acétylcholine ou de sérotonine lors de l'EE (Letzkus et al., 2011 ; Hensch, 2014 ; Hensch & Quinlan, 2018). L'augmentation de l'activité des neurones VIP par l'EE permettrait ainsi de lever l'inhibition exercée par les neurones PV sur les neurones pyramidaux, leur permettant de décharger pour appréhender les nouvelles informations. Il est également possible que certains de ces neurones PV inactivés en conséquence des stimulations sensorielles et cognitives de l'EE diminuent le contrôle inhibiteur qu'ils exercent sur d'autres interneurones, résultant en l'inhibition d'assemblées spécifiques de neurones pyramidaux, ce qui permettrait d'affiner l'encodage de nouvelles informations.

D'après ce modèle, on peut alors s'attendre à observer une augmentation du nombre de synapses inhibitrices (ou une diminution du nombre de synapses excitatrices) sur les neurones PV, suite à un EE (**Fig.103**). C'est ce que nous avons tenté d'observer avec l'approche du RIM et le marquage Syt2, qui est spécifique des terminaisons inhibitrices des cellules à panier (cf Résultats III). Ce marquage Syt2 permet donc d'identifier les terminaisons de neurones PV, mais également de neurones cholecystokinine (Klausberger & Somogyi, 2008) ou VIP (Tyan et al., 2014) sur d'autres neurones PV. Une augmentation du marquage Syt2 sur les neurones PV supporterait l'idée que l'EE stimule des interneurones PV qui vont à leur tour inhiber d'autres interneurones PV afin d'être permissifs à l'augmentation de l'activation des neurones excitateurs (Donato et al., 2013). De plus, cela est cohérent avec la diminution de la présence de PNN observée chez ces souris NTg après un EE (Cattaud et al., 2018), qui est associée à une augmentation du nombre de synapses inhibitrices (Donato et al., 2013). Il apparaît donc primordial de pouvoir caractériser les connexions afférentes et efférentes de neurones PV avant et après un séjour en EE, pour tenter de différencier des classes d'interneurones PV qui pourraient jouer un rôle spécifique dans l'intégration et le contrôle de nouvelles informations.

Les souris Tg2576 présentent quant à elles une hyperexcitabilité neuronale liée à une hypoactivité des interneurones PV. Ces neurones PV, également dépourvus de PNN (cf Résultats I.A & I.B.2), seraient donc contactés par un faible nombre de synapses excitatrices (Favuzzi et al., 2017), ou seraient particulièrement inhibés, ce qui aurait pour conséquence de diminuer leur contrôle inhibiteur sur les neurones pyramidaux, causant ainsi les troubles cognitifs (**Fig.104**). En revanche, les stimulations de l'EE favoriseraient l'augmentation des synapses excitatrices sur les interneurones PV des souris Tg2576, et ce serait en lien avec l'augmentation de la présence des PNN (cf Résultats I.A & I.B.2 ; Cattaud et al., 2018).

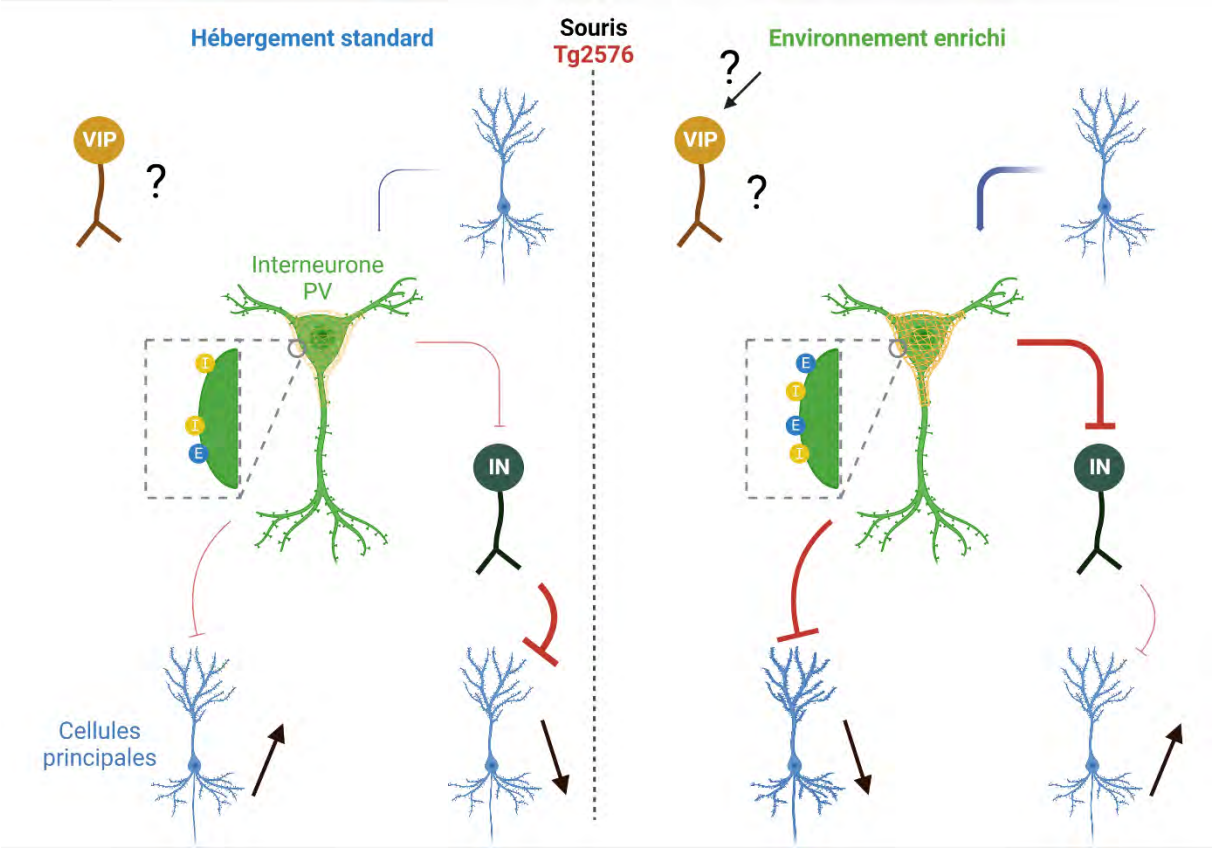



*Figure 104 Schéma représensatif du modèle proposé quant à la modulation des interneurones PV des souris Tg2576 lors de d'un enrichissement environnemental. À gauche, les souris Tg2576 sont élevées en condition d'hébergement standard. Les interneurones PV chez ces souris sont hypoactifs, et les PNN sont très peu présent autour de ces cellules. On retrouve alors une hyperactivité cérébrale, corrélée aux altérations des processus cognitifs chez ces animaux. Il est également possible qu'en l'absence de contrôle inhibiteur, d'autres interneurones inhibent des circuits de façon non synchrone/optimale. À droite, l'EE permet d'après nos observations et la littérature, de restaurer l'activité des interneurones PV et de restaurer la présence de PNN. Cela peut être induit par une augmentation de synapses excitatrices sur ces neurones, et le maintient de ces synapses par la présence des PNN. Cela permettrait de diminuer l'hyperexcitabilité cérébrale, bien cela n'a pas été démontré chez les souris Tg2576. De plus, la modulation des neurones VIP par l'EE chez les souris Tg2576 est difficilement interprétable, car il existe peu de données à ce sujet.*

En effet, la présence de PNN est également nécessaire au maintien des canaux sodiques présents sur la membrane des neurones PV, et donc à leur capacité d'être « fast spiking ». Restaurer la présence des PNN autour des neurones PV permettrait de stabiliser la sous-unité Nav1.1, et ainsi pallier l'hypoactivité des interneurones PV (Verret et al., 2012). Cela permettrait d'une part, de diminuer l'excitation neuronale en inhibant les neurones pyramidaux et d'autre part, d'inhiber d'autres interneurones (PV ou non) qui pourraient bloquer certains réseaux neuronaux nécessaires à l'élaboration des processus cognitifs. En revanche, il est difficile de conclure sur l'impact de l'EE sur l'activité des neurones VIP dans le contexte de la MA ; en effet, si l'EE a pour effet de stimuler les neurones VIP, cela devrait résulter en partie à l'inhibition des neurones PV. Cependant, des travaux démontrent que le fonctionnement de ces neurones VIP est perturbé dans le cadre de la MA (Arai et al., 1984 ; Yasuda et al., 1995), ce qui

rend difficilement prédictible la réponse de ces neurones à l'EE. Enfin, nos travaux indiquent que l'injection de ChABC dans l'aire CA1 des souris Tg2576 avant un séjour en EE résulte en une absence d'augmentation du nombre de cellules PV+/PNN+ après EE (cf Résultats I.A & I.B.2). Cela suggère que la dégradation des PNN par la ChABC aurait, par exemple, limité la formation de synapses excitatrices sur ces neurones, résultant en une absence de restauration de leur activité.

Enfin, le fait que les souris Tg2576 injectées avec la ChABC ne montrent pas non plus l'amélioration des performances cognitives normalement observée après un séjour en EE (cf Résultats I.B.1) indique que le remodelage des neurones PV et de leur PNN est une condition nécessaire à l'établissement de cette « réserve cognitive » chez ces souris modèles de la MA.

### B. Les neurones PV/PNN des souris Tg2576 après enrichissement ont-ils les mêmes propriétés que des neurones sains ?

Pour faire suite aux résultats obtenus dans la première partie de cette thèse (cf Resultats I), on peut se demander si les interneurones PV ainsi « restaurés » par l'EE chez les souris Tg2576 présentent les mêmes propriétés (en termes de connectivité synaptique et/ou de la structure des PNN) que ceux présents dans l'hippocampe des souris saines. L'utilisation du RIM sur les tissus cérébraux des souris soumises aux différentes conditions expérimentales avait pour but de répondre cette question (cf Résultats III), bien que plusieurs limitations, liées en particulier à la méthode d'analyse choisie, ne nous permettent pas de conclure pour le moment.

En ce qui concerne les entrées synaptiques GABAergiques et glutamatergiques sur les neurones PV des souris Tg2576, on pourrait s'attendre à ce que le séjour en EE rétablisse leur présence relative, et donc une balance E/I, telle qu'observée chez les souris NTg. Il aurait par ailleurs été intéressant de mettre en relation les résultats sur la nature et le nombre des synapses sur les neurones PV avec des quantifications de composants des PNN, comme les protéoglycans ou l'acide hyaluronique. En effet, il est possible que la restauration des interneurones PV ainsi que des PNN soit sous-tendue par l'expression différentielle d'un type de composant en particulier, suite à l'EE. Cet hypothétique composant pourrait alors être une cible majeure sur les expérimentations de restauration des PNN ou de modification de leur structure. À

l'inverse, les PNN étant une forme spécifique et mature d'une matrice composée de matériels déjà présents dans les ECM interstitielles (Fawcett et al., 2022), il est également possible que ce type de quantification ne révele pas de différence entre les souris NTg et Tg2576, car la maturation des PNN pourrait être majoritairement une question d'organisation structurelle des composants, qui eux seraient toujours présents autour des interneurones PV. Cette dynamique des composants pourrait jouer un rôle clé sur le niveau d'activité des neurones, *via* la régulation de connexions synaptiques spécifiques sur les interneurones PV, comme par exemple, les corrélations entre la présence de brevican, et la mémoire spatiale de travail et à court terme (Klausberger & Somogyi, 2008 ; Favuzzi et al., 2017). Pour le moment, nos résultats ne permettent pas de conclure clairement sur les modifications possibles des connexions synaptiques et de l'organisation des PNN entre les conditions expérimentales testées au cours de cette thèse. Une autre approche expérimentale envisagée était l'utilisation de la microscopie à force atomique, qui aurait permis d'analyser la topographie de la surface des PNN des interneurones PV. En effet, cette procédure permet d'étudier par exemple, l'état structurel d'une matrice extracellulaire (Tajerian et al., 2018), comme la complexité de la structure des PNN en fonction de l'âge de l'individu (Smolyakov et al., 2018), et en particulier sa rigidité et sa rugosité. Cela pourrait permettre de comparer les propriétés mécaniques de la matrice en fonction des différentes conditions expérimentales utilisées lors de cette thèse, et d'en déduire des modifications structurelles.

### C. Ouverture sur d'autres approches expérimentales

Dans la première partie des résultats de cette thèse (cf Résultats I), nous souhaitions empêcher tous remodelages sur les interneurones PV et leur PNN pendant la période de l'EE pour en évaluer les effets sur les performances mnésiques. Idéalement, nous aurions souhaité inactiver spécifiquement les neurones PV pendant la période d'EE et/ou modifier la présence de certains composants des PNN.

Une approche possible aurait été d'utiliser la pharmacogénétique dans le but d'inhiber spécifiquement les neurones PV *via* l'expression d'un DREADD inhibiteur. Cependant, cela nécessitait l'expression de la Cre-recombinase dans les neurones PV pour obtenir une expression de DREADD spécifiquement dans ces neurones, *via* l'injection locale d'un AAV-Cre-dépendant. Il aurait donc fallu croiser les souris Tg2576 avec une lignée PV-Cre (Hippenmeyer et al., 2005) afin d'obtenir des souris NTg-PV-Cre et Tg2576-

PV-Cre. Malheureusement, ce croisement implique une modification du fond génétique de la lignée de souris MA (75% C57Bl6 et 25% SJL *vs* 50% C57Bl6 et 50% SJL dans la lignée initiale). Or, des travaux antérieurs dans l'équipe ont montré que ce changement de fond génétique induisait une modification du phénotype comportemental des souris Tg2576, et en particulier des déficits de mémoires contextuelle et sociale moins prononcés (Cattaud, 2018). Nous avons donc opté pour l'utilisation de la ChABC. Cependant, la ChABC ne se contente pas de limiter le remodelage des PNN par l'expérience. En effet, cette enzyme bactérienne dégrade une partie de la matrice (Pizzorusso et al., 2002). La ChABC semble tout de même induire des perturbations du remodelage des PV induit par l'EE qui sont suffisants pour abolir l'amélioration des fonctions cognitives des souris Tg2576 à la sortie de celui-ci.

Nous avons également cherché à stimuler directement la formation de PNN, afin de mimer, en quelque sorte, les effets d'un EE sur le remodelage des PNN (cf Résultats I.E.1). Pour cela, nous avons utilisé la NRG1, qui est un facteur neurotrophique (Pantazopoulos & Berretta, 2016), connu pour réguler l'activité des interneurones PV *via* l'activation des récepteurs ErbB4 (Fazzari et al., 2010 ; Gu et al., 2016), et induire la maturation des neurones PV et de leur PNN (Mei & Nave, 2014). De plus, l'activation de cette voie permet d'atténuer la production de MMP-9 (Li et al., 2009), connue pour dégrader une partie des composants des PNN (Howell et al., 2012). Nos expériences, en accord avec les travaux de Rey et al., 2022, démontre qu'il est possible chez les souris Tg2576, de restaurer une mémoire spéficiquement dépendante d'une sous-région hippocampique avec une injection de NRG1, 5 jours avant les tests comportementaux (cf Résultats I.E.1). Une approche expérimentale alternative pour induire une augmentation de la présence de PNN aurait été l'utilisation d'inhibiteurs des MMP-9 pour limiter la dégradation de cette ECM, ou utiliser un autre facteur neurotrophique, comme le BDNF. En effet, le BDNF permet d'engager la maturation des interneurones PV lors du développement post-natal (Huang et al., 1999). Lorsqu'il est utilisé dans des cultures primaires de neurones corticaux, le BDNF induit 7 jours plus tard, une augmentation du niveau d'expression de GAD65/67 et de l'intensité des PNN révélés par la WFA (Willis et al., 2021). Enfin, nous aurions pu également utiliser l'homéoprotéine Otx2 qui est également connue pour remodeler les PNN (Beurdeley et al., 2012). En effet, l'injection de cette protéine dans le cortex visuel primaire permet d'avancer la fin de la période critique de dominance oculaire en accélérant la

maturation post-natale des interneurones PV, et en induisant la formation de PNN (Sugiyama et al., 2008). Il existe donc différentes voies de signalisation qui peuvent potentiellement influencer la formation des PNN. Cependant, aucune étude ne permet d'établir quelles sont celles précisément mises en jeu dans le processus de restauration des cellules PV+ et PV+/PNN+ par le séjour en EE.

De plus, il serait intéressant de déterminer si les remodelages des interneurones PV et de leur PNN dans l'hippocampe et les bénéfices cognitifs obtenus associés chez les souris Tg2576 après un EE ont une incidence sur d'autres régions cérébrales. Pour cela, on pourrait placer les animaux dans un EE pendant 20 jours, en injectant la ChABC 10 jours seulement après le début de l'EE. En effet, ces 10 jours d'EE constituent la durée de séjour nécessaire aux améliorations cognitives des souris Tg2576, d'après nos observations (cf Résultats I.B.1 & I.D.1). Dans ces conditions, si les animaux présentent toujours des améliorations de leurs performances mnésiques, cela indiquerait que les 10 premiers jours d'EE sont suffisants pour induire des modifications neuronales extra-hippocampiques, insensibles à la dégradation du remodelage des interneurones PV obtenu par l'injection de ChABC lors des 10 jours suivants.

### D. L'environnement enrichi : une approche expérimentale de la réserve cognitive

La réserve cognitive chez l'humain peut être mesurée/quantifiée (questionnaire d'évaluation de la réseve cognitive : « Cognitive Reserve Index questionnaire » (CRIq, Nucci et al., 2012) mais ses substrats demeurent difficiles à déterminer. Premièrement, il faut différencier la réserve cérébrale qui fait référence à la matière neurale disponible pour le fonctionnement cérébral (Satz et al., 2010), et la réserve cognitive qui fait référence à la capacité du cerveau à utiliser des réseaux neuronaux préexistants, ou activer de nouvelles connexions (Stern, 2002). Il existe cependant un autre concept qui vient s'ajouter à celui de la réserve cognitive, c'est la « brain maintenance » (BM). Elle se définie par les facteurs liés à un mode de vie qui protège l'individu contre le développement d'une pathologie, alors que la réserve cognitive permet elle, de protéger notre cerveau contre le déclin cognitif, une fois que les facteurs de démence se manifestent (Nyberg et al., 2012 ; Habeck et al., 2017 ; Stern & Barulli, 2019). Dans

notre étude, le modèle Tg2576 étant génétiquement programmée pour développer la maladie, l'EE permettrait donc de renforcer la réserve cognitive, là où l'enrichissement préventif préconisé pour diminuer les risques de développer des démences chez l'humain serait associé à la BM. Fonctionnellement, comparativement aux personnes avec une réserve cognitive faible, les réseaux neuronaux des personnes ayant une grande réserve cognitive pourraient être plus performants en raison de connexions synaptiques plus efficaces pour un niveau d'activation similaire en IRMf. Par ailleurs, une grande réserve cognitive pourrait engager un réseau neuronal plus large pour répondre à une tâche difficile (Stern & Barulli, 2019). Ces hypothèses sur le renforcement de l'efficacité des connexions neuronales pourraient expliquer que, chez les souris Tg2576 pour lesquelles les neurones PV sont hypoactifs en condition standard (cf Résultats I.A & B.2 & D.2), l'EE induit une restauration de leur activité (identifiée dans ce travail par une augmentation du niveau d'expression de la protéine parvalbumine), les rendant plus efficaces au sein des réseaux neuronaux auxquels ils participent.

La formation de nouveaux neurones, issus de la neurogenèse adulte pourrait également contribuer à l'établissement de la réserve cognitive. Ces neurones nouvellements formés sont impliqués dans la formation de la mémoire hippocampique (Deng et al., 2010). De plus, leur survie est améliorée suite à un EE (Kempermann et al., 1997), ce qui apparait être un élément nécessaire à l'effet pro-mnésique du milieu enrichi (Bruel-Jungerman et al., 2005).

Un autre élément qui pourrait contribuer aux effets bénéfiques de l'EE est que celui-ci stimule le système noradrénergique, et renforcerait notre capacité d'attention par ce biais. En effet, chez l'humain, le risque de développer une démence, dont la MA, est associé à des pertes cellulaires dans le locus coeruleus, source majeure de noradrénaline cérébrale (Robertson, 2013). De plus, l'augmentation du signal noradrénergique dans cette aire cérébrale est corrélée au niveau d'éducation (Clewett et al., 2015).

Afin d'appréhender les modifications cérébrales induites par l'EE, il est également important de prendre en compte l'état cérébral de l'individu avant une expérience enrichissante. En effet, les protocoles de renforcement cognitif dans le cadre de démences sont plus efficaces chez les patients qui ont une réserve cognitive faible, en comparaison à ceux qui ont une grande réserve cognitive (Mondini et al., 2016). Cela

soulève l'idée que l'expérience, pour être considérée comme telle, est liée à l'état interne de l'individu, et à l'écart, sensoriel ou cognitif, que va produire cet évenement chez l'individu. En d'autres termes, pour qu'une expérience soit considérée comme telle, il faut que celle-ci pousse l'individu concerné en dehors de son état basal/interne, qui est propre à chacun. Dans les travaux réalisés dans cette thèse, le séjour en EE représente un changement radical des conditions d'hébergement par rapport aux cages standards pour les souris Tg2576. Ce constat amène aujourd'hui à remettre en question le terme même d'environnement enrichi au profit du terme « renversement de l'appauvrissement », car l'on s'approche plus des conditions que l'animal peut rencontrer lorsqu'il est en liberté (Kempermann, 2019).

Les résultats de cette thèse indiquent que la capacité des expériences vécues lors du séjour en EE à modifier l'activité des interneurones PV constitue un élément important, voire nécessaire, à l'amélioration des performances mnésiques des animaux, et potentiellement à la construction d'une réserve cognitive. Il est toutefois possible que la stimulation directe des interneurones PV constitue une méthode alternative pour atteindre les mêmes effets, faisant ainsi abstraction du contenu réel des expériences vécues et de leur contexte. En accord avec cette idée, les récents travaux du groupe Li-Huei Tsai ont utilisé la propriété du « photic driving » et autres « sensorial driving » des interneurones PV corticaux afin d'en évaluer les bénéfices sur les souris modèles de la MA (Iaccarino et al., 2016 ; Martorell et al., 2019), et aujourd'hui chez les patients (Chan et al., 2021). Malgré nos tentatives de reproduire cette approche expérimentale (cf Resultats II), nous n'avons pas réussi à démontrer si ces stimulations pouvaient avoir un éventuel effet sur l'activité des interneurones PV. Cependant, l'intérêt pour les fondements de cette hypothèse est croissant, et cela peut devenir à terme, un champ de recherche important pour la compréhension du fonctionnement cérébral, mais aussi pour les solutions thérapeutiques proposées aux patients souffrants de la MA (et plus largement, de maladies neurodégénératives). Cela peut paraitre utopique d'imaginer un dispositif de stimulation gamma que l'on puisse avoir à la maison, et dont l'utilisation permettrait de réduire les risques de développer cette maladie qui est la cause de démence la plus fréquente chez l'humain. Cependant, l'utilisation de ces stimulations apporte des informations sur le fonctionnement cérébral, mais s'éloigne également de ce que l'on peut considérer comme une expérience enrichissante pour un patient. Nous pouvons penser que ces stimulations gamma induisent un renforcement des

interneurones PV, défaillant dans la MA (Verret et al., 2012) mais que l'ensemble du contexte de l'expérience demeure indispensable concernant l'état émotionnel du patient, ou sa qualité de vie.

Pour conclure, l'ensemble des résultats présents dans cette thèse montre qu'un EE induit un remodelage des interneurones PV et de leur PNN qui est nécessaire à l'amélioration des fonctions cognitives des souris Tg2576, modèle de la MA. Ces travaux permettent d'ouvrir des champs de recherche concernant ces remodelages des interneurones PV, au niveau des connexions synaptiques excitatrices et inhibitrices, mais également au niveau de la structure des PNN. La compréhension du fonctionnement de ces neurones PV/PNN, substrat des oscillations gamma (Cardin et al., 2009 ; Sohal et al., 2009), permet de proposer de nouvelles cibles thérapeuthiques dans le cadre de maladie neurodégénérative comme la MA, mais également d'approfondir nos connaissances sur l'intégration des informations provenants de notre environnement.

# RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abraham, C., Selkoe, D.J., & Potter, H. (1988). Immunochemical identification of the serine protease inhibitor alpha 1- antichymotrypsin in the brain amyloid deposits of Alzheimer's disease. *Cell*, *52*, 487–501.

Adaikkan, C., & Tsai, L. (2019a). Gamma entrainment : impact on neurocircuits , glia , and therapeutic opportunities. *Trends in Neurosciences*, 1–18.

Adaikkan, C., Middleton, S. J., Marco, A., Pao, P. C., Mathys, H., Kim, D. N. W., Gao, F., Young., J.Z., Suk, H.J., Boyden, E.S., McHugh, T.J., & Tsai, L. H. (2019b). Gamma Entrainment Binds Higher-Order Brain Regions and Offers Neuroprotection. *Neuron*, *102*(5), 929-943.e8.

Agetsuma, M., Hamm, J. P., Tao, K., Fujisawa, S., & Yuste, R. (2017). Parvalbumin-Positive Interneurons Regulate Neuronal Ensembles in Visual Cortex. *Cerebral Cortex*, *28*, 1–15.

Aimone, J. B., Deng, W., & Gage, F. H. (2011). Resolving New Memories: A Critical Look at the Dentate Gyrus, Adult Neurogenesis, and Pattern Separation. *Neuron*, *70*(4), 589–596.

Ajmo, J. M., Bailey, L. A., Howell, M. D., Cortez, L. K., Pennypacker, K. R., Mehta, H. N., Morgan, D., Gordon, M.N., & Gottschall, P.E. (2010). Abnormal post-translational and extracellular processing of brevican in plaque-bearing mice over-expressing APPsw. *Journal of Neurochemistry*, *113*, 784–795

Alaiyed, S., Bozzelli, P. L., Caccavano, A., Wu, J. Y., & Conant, K. (2019). Venlafaxine stimulates PNN proteolysis and MMP-9-dependent enhancement of gamma power; relevance to antidepressant efficacy. *Journal of Neurochemistry*, *148*(6), 810–821.

Albuquerque, M. S., Mahar, I., & Davoli, M. A. (2015). Regional and sub-regional differences in hippocampal GABAergic neuronal vulnerability in the TgCRND8 mouse model of Alzheimer' s disease. *Frontiers in Aging Neuroscience*, *7*(30), 1–7.

Alexander, G. M., Farris, S., Pirone, J. R., Zheng, C., Colgin, L. L., & Dudek, S. M. (2016). Social and novel contexts modify hippocampal CA2 representations of space. *Nature Communications*, *7*, 1–14.

Allen, T. A., Salz, D. M., McKenzie, S., & Fortin, N. J. (2016). Nonspatial sequence coding in CA1 neurons. *Journal of Neuroscience*, *36*(5), 1547–1563.

Alzheimer, A. (1907). Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie und psychisch-gerichtliche Medizin. Band, Verlag von Georg Reimer 64.

Apelt, J., & Schliebs, R. (2001). β-Amyloid-induced glial expression of both pro- and anti- inflammatory cytokines in cerebral cortex of aged transgenic Tg2576 mice with Alzheimer plaque pathology. *Brain research*, *894*(1), 21-30.

Arai, H., Moroji, T., & Kosaka, K. (1984) Somatostatin and vasoactive intestinal polypeptide in postmortem brains from patients with Alzheimer-type dementia. *Neurosci Lett*, *52*, 73-78.

Arai, J. A., & Feig, L. A. (2011). Long-lasting and transgenerational effects of an environmental enrichment on memory formation. *Brain Research Bulletin*, *85*(1–2), 30–35.

Arendash, G. W., Garcia, M. F., Costa, D. A., Cracchiolo, J. R., Wefes, I. M., & Potter, H. (2004). Environmental enrichment improves cognition in aged Alzheimer's transgenic mice despite stable β-amyloid deposition. *NeuroReport*, *15*(11), 1751–1754.

Arlotta, P., Molyneaux, B. J., Chen, J., Inoue, J., Kominami, R., & MacKlis, J. D. (2005). Neuronal subtype-specific genes that control corticospinal motor neuron development in vivo. *Neuron*, *45*(2), 207–221.

Aron, L., & Yankner, B.A. (2016). Neural synchronization in Alzheimer's disease. *Nature 540*, 207.

Ascoli, G.A., Alonso-Nanclares, L., Anderson, S.A., Barrionuevo, G., Benavides-Piccione, R., Burkhalter, A., Buzsáki, G., Cauli, B., Defelipe, J., Fairén, A., Feldmeyer, D., Fishell, G., Fregnac, Y., Freund, T.F., Gardner, D., Gardner, E. P., Goldberg, J.H., Helmstaedter, M., Hestrin, S., Karube, F., Kisvárday, Z.F., Lambolez, B., Lewis, D.A., MarÍn, O., Markram, H., Muñoz, A., Packer, A., Petersen, C.C.H., Rockland, K.S., Rossier, J., Rudy, B., Somogyi, P., Staiger, J.F., Tamas, G., Thomson, A.M., Toledo-Rodriguez, M., Wang, Y., West, D.C., & Yuste, R. (2008). Petilla terminology: nomenclature of features of GABAergic interneurons of the cerebral cortex. *Nat Rev Neuroscience* 9, 557–568.

Ashe, K. H. (2001). Learning and memory in transgenic mice modeling Alzheimer's disease. *Learning and Memory*, *8*(6), 301–308.

Atoji, Y., Hori, Y., Sugimura, M., & Suzuki, Y. (1989). Extracellular matrix of the superior olivary nuclei in the dog. *J Neurocytol 18*(5), 599-610.

Atoji, Y., & Suzuki, Y. (1992). Chondroitin sulfate in the extracellular matrix of the medial and lateral superior olivary nuclei in the dog. *Brain research 585*(1-2), 287-290.

Baig, S., Wilcock, G.K., & Love, S. (2005). Loss of perineuronal net N-acetylgalactosamine in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol*, *110*, 393–401.

Bakker, A., Krauss, G. L., Albert, M. S., Speck, C. L., Jones, L. R., Stark, C. E., Yassa, M.A., Bassett, S.S., Shelton, A.L., & Gallagher, M. (2012). Reduction of Hippocampal Hyperactivity Improves Cognition in Amnestic Mild Cognitive Impairment. *Neuron*, *74*(3), 467–474.

Balietti, M., Giorgetti, B., Casoli, T., Solazzi, M., Tamagnini, F., Burattini, C., Aicardi, G., & Fattoretti, P. (2013). Early selective vulnerability of synapses and synaptic

mitochondria in the hippocampal CA1 region of the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, *34*(4), 887–896.

Balleza-Tapia, H., Arroyo-García, L. E., Isla, A. G., Loera-Valencia, R., & Fisahn, A. (2022). Functionally-distinct pyramidal cell subpopulations during gamma oscillations in mouse hippocampal area CA3. *Progress in Neurobiology*, *210*.

Barrientos, S. A., & Tiznado, V. (2016). Hippocampal CA1 subregion as a context decoder. *Journal of Neuroscience*, *36*(25), 6602–6604.

Barron, H. C. (2021). Neural inhibition for continual learning and memory. *Current Opinion in Neurobiology*, *67*, 85–94.

Bartos, M., Vida, I., Frotscher, M., Meyer, A., Monyer, H., Geiger, H., & Jonas, P. (2002). Fast synaptic inhibition promotes synchronized gamma oscillations in hippocampal interneuron networks. *PNAS*, *99*, 13222–13227.

Bayer, T. A., & Wirths, O. (2010). Intracellular accumulation of amyloid-beta – a predictor for synaptic dysfunction and neuron loss in Alzheimer' s disease. *Frontier in Aging Neuroscience*, 2, 1–10.

Bean, J. C., Lin, T. W., Sathyamurthy, A., Liu, F., Yin, D. M., Xiong, W. C., & Mei, L. (2014). Genetic labeling reveals novel cellular targets of schizophrenia susceptibility gene: distribution of GABA and non-GABA ErbB4-positive cells in adult mouse brain. *The Journal of Neuroscience*, *34*, 13549-13566.

Bechard, A. R., & Lewis, M. H. (2016). Transgenerational effects of environmental enrichment on repetitive motor behavior development. *Behavioural Brain Research*, *307*, 145–149.

Benaroya-Milshtein, N., Hollander, N., Apter, A., Kukulansky, T., Raz, N., Wilf, A., Yaniv, I., & Pick, C. G. (2004). Environmental enrichment in mice decreases anxiety, attenuates stress responses and enhances natural killer cell activity. *European Journal of Neuroscience*, *20*(5), 1341–1347.

Benilova, I., Karran, E., & De Strooper, B. (2012). The toxic Aβ oligomer and Alzheimer's disease: An emperor in need of clothes. *Nature Neuroscience*, *15*(3), 349–357.

Bennett, J. C., McRae, P. A., Levy, L. J., & Frick, K. M. (2006). Long-term continuous, but not daily, environmental enrichment reduces spatial memory decline in aged male mice. *Neurobiology of Learning and Memory*, *85*(2), 139–152.

Benson, M.D., & Kleiner, E. (1980). Synthesis and secretion of serum amyloid protein A (SAA) by hepatocytes in mice treated with casein. *The Journal of Immunology* 124(2), 495-499.

Bernard, C., Vincent, C., Testa, D., Bertini, E., Ribot, J., Di Nardo, A. A., Volovitch, M., & Prochiantz, A. (2016a). A Mouse Model for Conditional Secretion of Specific Single-Chain Antibodies Provides Genetic Evidence for Regulation of Cortical

Plasticity by a Non-cell Autonomous Homeoprotein Transcription Factor. *PLoS Genetics*, *12*(5), 1–15.

Bernard, C., & Prochiantz, A. (2016b). Otx2-PNN Interaction to Regulate Cortical Plasticity. *Neural Plasticity*, *2016*.

Bero, A. W., Yan, P., Roh, J. H., Cirrito, J. R., Stewart, F. R., Raichle, M. E., Lee, J.M., & Holtzman, D. M. (2011). Neuronal activity regulates the regional vulnerability to amyloid-b deposition. *Nature Neuroscience*, *14*(6), 750–757.

Beurdeley, M., Spatazza, J., Lee, H. H. C., Sugiyama, S., Bernard, C., Di Nardo, A. A., Hensch, T.K., & Prochiantz, A. (2012). Otx2 binding to perineuronal nets persistently regulates plasticity in the mature visual cortex. *Journal of Neuroscience*, *32*(27), 9429–9437.

Bezzina, C., & Rampon, C. (2013). Réserve cérébrale et réserve cognitive dans la maladie d'Alzheimer : l'apport des modèles murins. *Revue de neuropsychologie*, 5, 293-297.

Bezzina, C., Verret, L., Juan, C., Remaud, J., Halley, H., Rampon, C., & Dahan, L. (2015a). Early onset of hypersynchronous network activity and expression of a marker of chronic seizures in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *PLoS ONE*, *10*(3), 1–14.

Bezzina, C., Verret, L., Halley, H., Dahan, L., & Rampon, C. (2015b). Environmental enrichment does not influence hypersynchronous network activity in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *Frontiers in Aging Neuroscience*, *7*(SEP), 1–8.

Bilkey, D. K., Cheyne, K. R., Eckert, M. J., Lu, X., Chowdhury, S., Worley, P. F., Crandall, J.E., & Abraham, W. C. (2017). Exposure to complex environments results in more sparse representations of space in the hippocampus. *Hippocampus*, *27*(11), 1178–1191.

Blennow, K., Leon, M. J. De, & Zetterberg, H. (2006). Alzheimer' s disease. *Lancet*, 368(9533), 387–403.

Bobinski, M., Wegiel, J., Wisniewski, H.M., Tarnawski, M., Mlodzik, B., Reisberg, B., de Leon, M.J., & Miller, D.C., (1995). Atrophy of Hippocampal Formation Subdivisions Correlates with Stage and Duration of Alzheimer Disease. Dementia and Geriatric Cognitive Disorders 6(4), 205-210.

Boehringer, R., Polygalov, D., Huang, A. J. Y., Middleton, S. J., Robert, V., Wintzer, M. E., Pisorowski, R.A., Chevaleyre, V., & McHugh, T. J. (2017). Chronic Loss of CA2 Transmission Leads to Hippocampal Hyperexcitability. *Neuron*, *94*(3), 642-655.e9.

Bonds, J. A., Kuttner-Hirshler, Y., Bartolotti, N., Tobin, M. K., Pizzi, M., Marr, R., & Lazarov, O. (2015). Presenilin-1 dependent neurogenesis regulates hippocampal learning and memory. *PLoS ONE*, *10*(6), 1–22.

Borchelt, D. R., Davis, J., Fischer, M., Lee, M. K., Slunt, H. H., Ratovitsky, T., Regard, J., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Sisodia, S.S., & Price, D. L. (1996). A vector for expressing foreign genes in the brains and hearts of transgenic mice. *Genetic Analysis - Biomolecular Engineering*, *13*(6), 159–163.

Bouisset, G., Gauzin, S., Riviere, J., Lejards, C., & Verret, L. (2022). Transient stay in an enriched environment ameliorates cognitive improvements of the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease through parvalbumin cell remodelling. *In prep*.

Brady, D.R., & Mufson, E.J., (1997). Parvalbumin-immunoreactive neurons in the hippocampal formation of Alzheimer's diseased brain. *Neuroscience*, *80*(4), 1113-1125.

Brakebusch, C., Seidenbecher, C. I., Asztely, F., Rauch, U., Matthies, H., Meyer, H., Krug, M., Böckers, T.M., Zhou, X., Kreutz, M.R., Montag, D., Gundelfinger, E.D., & Fässler, R. (2002). Brevican-Deficient Mice Display Impaired Hippocampal CA1 Long-Term Potentiation but Show No Obvious Deficits in Learning and Memory. *Molecular and Cellular Biology*, *22*(21), 7417–7427.

Brion, J. P., Couck, A. M., Passareiro, E., & Flament-Durand, J., (1985). Neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease: an immunohistochemical study. *J. Submicrosc. Cytol.*, 17, 89-96.

Brouillette, J., Caillierez, R., Zommer, N., Alves-Pires, C., Benilova, I., Blum, D., De Strooper, B. & Buée, L. (2012). Neurotoxicity and memory deficits induced by soluble low-molecular-weight amyloid-β 1-42 oligomers are revealed in vivo by using a novel animal model. *Journal of Neuroscience*, *32*(23), 7852–7861.

Brown, R. E., & Milner, P. M. (2003). The legacy of Donald O. Hebb: More than the Hebb Synapse. *Nature Reviews Neuroscience*, *4*(12), 1013–1019.

Brückner, G., & Grosche, J., (2001). Perineuronal nets show intrinsic patterns of extracellular matrix differentiation in organotypic slice cultures. *Exp Brain Res 137*(1), 83-93.

Brückner, G., Bringmann, A., Härtig, W., Köppe, G., Delpech, B., & Brauer, K. (1998). Acute and long-lasting changes in extracellular-matrix chondroitin-sulphate proteoglycans induced by injection of chondroitinase ABC in the adult rat brain. *Experimental Brain Research*, *121*(3), 300–310.

Bruel-jungerman, E., Laroche, S., & Rampon, C. (2005). New neurons in the dentate gyrus are involved in the expression of enhanced long-term memory following environmental enrichment. *European Journal of Neuroscience*, 21, 513–521.

Brunet, I., Di Nardo, A. A., Sonnier, L., Beurdeley, M., & Prochiantz, A. (2007). The topological role of homeoproteins in the developing central nervous system. *Trends in Neurosciences*, *30*(6), 260–267.

Buee, L., Bussiere, T., Buee-Scherrer, V., Delacourte, A., & Hof, P. R. (2000). Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Res. Rev.*, 33: 95- 130.

Bukalo, O., Schachner, M., & Dityatev, A. (2001). Modification of extracellular matrix by enzymatic removal of chondroitin sulfate and by lack of tenascin-R differentially affects several forms of synaptic plasticity in the hippocampus. *Neuroscience*, *104*(2), 359–369.

Buzsáki, G., & Draguhn, A. (2004). Neuronal Oscillations in Cortical Networks. *Science*, *304*.

Buzsáki, G., & Watson, B. O. (2012). Brain rhythms and neural syntax: implications for efficient coding of cognitive content and neuropsychiatric disease. *Dialogues Clin Neurosci, 14,* 345- 367.

Cabelli, R., Hohn, A., & Shatz, C. (1995). Inhibition of ocular dominance column formation by infusion of NT-4/5 or BDNF. Science 267(5204), 1662-1666.

Cabungcal, J. H., Steullet, P., Morishita, H., Kraftsik, R., Cuenod, M., Hensch, T. K., & Do, K. Q. (2013). Perineuronal nets protect fast-spiking interneurons against oxidative stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(22), 9130–9135.

Caccuci, F., Yi, M., Wills, T. J., Chapman, P., & O'Keefe, J. (2008). Place cell firing correlates with memory deficits and amyloid plaque burden in Tg2576 Alzheimer mouse model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*(22), 7863–7868.

Cancedda, L., Putignano, E., Sale, A., Viegi, A., Berardi, N., & Maffei, L. (2004). Acceleration of visual system development by environmental enrichment. *Journal of Neuroscience*, *24*(20), 4840–4848.

Cao, M., Zhang, P. H. Y., Christopher, Y. Y., Gang, Y. Z., & Ming, H. (2017). Enriched physical environment reverses spatial cognitive impairment of socially isolated APPswe / PS1dE9 transgenic mice before amyloidosis onset. *CNS Neurosci. Ther*, *24*(3), 202–211.

Cattaud, V. (2018). Altérations anatomo-fonctionnelles des interneurones à parvalbumine dans un modèle murin de la maladie d'Alzheimer. *Thèse de doctorat en Neurosciences, Université de Toulouse.*

Cattaud, V., Bezzina, C., Rey, C. C., Lejards, C., Dahan, L., & Verret, L. (2018). Early disruption of parvalbumin expression and perineuronal nets in the hippocampus of the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease can be rescued by enriched environment. *Neurobiology of Aging*, *72*, 147–158.

Cardin, J. A., Carlén, M., Meletis, K., Knoblich, U., Zhang, F., Deisseroth, K., Tsai, L.H., & Moore, C. I. (2009). Driving fast-spiking cells induces gamma rhythm and controls sensory responses. *Nature*, *459*(7247), 663–667.

Cardin, J. A. (2018). Inhibitory Interneurons Regulate Temporal Precision and Correlations in Cortical Circuits. *Trends in Neurosciences*, *41*(10), 689–700.

Caroni, P. (2015). Inhibitory microcircuit modules in hippocampal learning. *Current Opinion in Neurobiology*, *35*, 66–73.

Caruana, D. A., Alexander, G. M., & Dudek, S. M. (2012). New insights into the regulation of synaptic plasticity from an unexpected place: Hippocampal area CA2. *Learning and Memory*, *19*(9), 391–400.

Carulli, D., Pizzorusso, T., Kwok, J. C. F., Putignano, E., Poli, A., Forostyak, S., Andrews, M.R., Deepa, S.S., Glant, T.T., & Fawcett, J. W. (2010). Animals lacking link protein have attenuated perineuronal nets and persistent plasticity. *Brain*, *133*(8), 2331–2347.

Carulli, D., & Verhaagen, J. (2021). An extracellular perspective on cns maturation: Perineuronal nets and the control of plasticity. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(5), 1–26.

Celio, M. R., Spreafico, R., De Biasi, S., & Vitellaro-Zuccarello, L. (1998). Perineuronal nets: Past and present. *Trends in Neurosciences*, *21*(12), 510–515.

Celone, K. A., Calhoun, V. D., Dickerson, B. C., Atri, A., Chua, E. F., Miller, S. L., DePeau, K., Rentz, D.M., Selkoe, D.J., Blacker, D., Albert, M.S., & Sperling, R. A. (2006). Alterations in Memory Networks in Mild Cognitive Impairment and Alzheimer's Disease : An Independent Component Analysis. *Neurobiology of Disease*, *26*(40), 10222–10231.

Cerofolini, L., Ravera, E., Bologna, S., Wiglenda, T., Böddrich, A., Purfürst, B., Belinova, I., Korsak, M., Gallo, G., Rizzo, D., Gonnelli, L., Fragai, M., De Strooper, B., Wanker, E.E., & Luchinat, C. (2020). Mixing Aβ(1-40) and Aβ(1-42) peptides generates unique amyloid fibrils. *Chemical Communications*, *56*(62), 8830–8833.

Chamberland, S., & Topolnik, L. (2012). Inhibitory control of hippocampal inhibitory neurons. *Frontiers in Neuroscience*, *6*(155), 1-13.

Chan, D., Suk, H.-J., Jackson, B. L., Milman, N. P., Stark, D., Klerman, E. B., Kitchener, E., Fernandez Avalos, V.S., Banerjee, A., Beach, S.D., Blanchard, J., Stearns, C., Boes, A., Uitermarkt, B., Gander, P., Howard III, M., Sternberg, E.J., Nieto-Castanon, A., Anteraper, S., Whitfield-Gabrieli, S., Brown, E.N., Boyden, E.S., Dickerson, B., & Tsai, L.-H. (2021). Gamma Frequency Sensory Stimulation in Probable Mild Alzheimer's Dementia Patients: Results of a Preliminary Clinical Trial. *Neuron*, 1–49.

Chang, C. H., Lin, C. H., & Lane, H. Y. (2021). Machine learning and novel biomarkers for the diagnosis of alzheimer's disease. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(5), 1–12.

Chapman, P. F., White, G. L., Jones, M. W., Cooper-Blacketer, D., Marshall, V. J., Irizarry, M., Younkin, L., Good, M.A., Bliss, T.V.P., Hyman, B., Younkin, S.G., &

Hsiao, K. K. (1999). Impaired synaptic plasticity and learning in aged amyloid precursor protein transgenic mice. *Nature Neuroscience*, *2*(3), 271–276.

Chen, Y. J., Zhang, M., Yin, D. M., Wen, L., Ting, A., Wang, P., Yi-Sheng, L., Xin-Hong, Z., Shu-Ji, L., Cui-Ying, W., Xue-Ming, W., Cary, L., Wen-Cheng, X., Mei, L., & Gao, T. M. (2010). ErbB4 in parvalbumin-positive interneurons is critical for neuregulin 1 regulation of long-term potentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(50), 21818–21823.

Chen, Z., & Zhong, C. (2013). Progress in Neurobiology Decoding Alzheimer' s disease from perturbed cerebral glucose metabolism : Implications for diagnostic and therapeutic strategies. *Progress in Neurobiology*, *108*, 21–43.

Christensen, A. C., Lensjø, K. K., Lepperød, M. E., Dragly, S. A., Sutterud, H., Blackstad, J. S., Fyhn, M., & Hafting, T. (2021). Perineuronal nets stabilize the grid cell network. *Nature Communications*, *12*(1), 1–17.

Chu, P., Abraham, R., Budhu, K., Khan, U., De Marco Garcia, N., & Brumberg, J. C. (2018). The Impact of Perineuronal Net Digestion Using Chondroitinase ABC on the Intrinsic Physiology of Cortical Neurons. *Neuroscience*, *388*, 23–35.

Chun, M. M., & Turk-Browne, N. B. (2007). Interactions between attention and memory. *Current Opinion in Neurobiology*, *17*(2), 177–184.

Cipriani, G., Dolciotti, C., Picchi, L., & Bonuccelli, U. (2011). Alzheimer and his disease : a brief history. *Neurol Sci*, *32*, 275–9.

Citron, M., Diehl, T. S., Gordon, G., Biere, A. L., Seubert, P., & Selkoe, D. J. (1996). Evidence that the 42- and 40-amino acid forms of amyloid β protein are generated from the β-amyloid precursor protein by different protease activities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *93*(23), 13170–13175.

Clewett, D. V, Lee, T., Greening, S., Ponzio, A., Margalit, E., & Mather, M. (2016). Neurobiology of Aging Neuromelanin marks the spot : identifying a locus coeruleus biomarker of cognitive reserve in healthy aging. *Neurobiology of Aging*, *37*, 117–126.

Cobar, L. F., Yuan, L., & Tashiro, A. (2017). Place cells and long-term potentiation in the hippocampus. *Neurobiology of Learning and Memory*, *138*, 206–214.

Cobb, S.R., Halasy, K., Vida, I., Nyiri, G., Tamas, G., Buhl, E.H., & Somogyi, P. (1997). Synaptic effects of identified interneurons innervating both interneurons and pyramidal cells in the rat hippocampus. *Neuroscience*, *79*, 629–648.

Colgin, L. L., & Moser, E. I. (2010). Gamma oscillations in the hippocampus. *Physiology*, *25*(5), 319–329.

Copeland, J.R., Dewey, M.E., Henderson, A.S., Kay, D.W., Neal, C.D., Harrison, M.A., McWilliam, C., Forshaw, D., & Shiwach, R. (1988). The Geriatric Mental State

(GMS) used in the community: replication studies of the computerized diagnosis AGECAT. *Psychol Med 18*(1), 219-223.

Corbett, B. F., You, J. C., Zhang, X., Pyfer, M. S., Tosi, U., Iascone, D. M., Petrof, I., Hazra, A., Fu, C.H., Stephens, G.S., Ashok, A.A., Aschmies, S., Zhao, L., Nestler, E.J. & Chin, J. (2017). ΔFosB Regulates Gene Expression and Cognitive Dysfunction in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Cell Reports*, *20*(2), 344–355.

Cordella, A., Krashia, P., Nobili, A., Pignataro, A., La Barbera, L., Viscomi, M.T., Valzania, A., Keller, F., Ammassari-Teule, M., Mercuri, N.B., Berretta, N., & D'Amelio, M. (2018). Dopamine loss alters the hippocampus-nucleus accumbens synaptic transmission in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiology of Disease*, *116*, 142-154.

Corkin, S. (1984). Lasting consequences of bilateral medial temporal lobectomy: Clinical course and experimental findings in H.M. *Seminars in Neurology*, *4*(2), 249-259.

Craig-Schapiro, R., Fagan, A. M., & Holtzman, D. M. (2009). Biomarkers of Alzheimer Disease. *Neurobiology of Disease*, *35*(2).

Cramer, P. E., Cirrito, J. R., Wesson, D. W., Lee, C. Y. D., Karlo, J. C., Zinn, A. E., Casali, B.T., Restivo, J.L., Goebel, W.D., James, M.J., Brunden, K.R., Wilson, D.A., & Landreth, G. E. (2012). ApoE-directed therapeutics rapidly clear β-amyloid and reverse deficits in AD mouse models. *Science*, *335*(6075), 1503–1506.

Crapser, J. D., Ochaba, J., Soni, N., Reidling, J. C., Thompson, L. M., & Green, K. N. (2020). Microglial depletion prevents extracellular matrix changes and striatal volume reduction in a model of Huntington's disease. *Brain*, *143*(1), 266–288.

Crapser, J. D., Spangenberg, E. E., Barahona, R. A., Arreola, M. A., Hohs, L. A., & Green, K. N. (2020). Microglia facilitate loss of perineuronal nets in the Alzheimer' s disease brain. *EBioMedicine*, *58*, 102919.

Crook, R., Verkkoniemi, A., Perez-Tur, J., Metha, N., Baker, M., & Henry Houlden, M.F. (1998). A variant of Alzheimer's disease with spastic paraparesis and unusual plaques due to deletion of exon 9 of presenilin 1. *Nat Med.,* 4, 452–455

Cukalevski, R., Yang, X., Meisl, G., Weininger, U., Bernfur, K., Frohm, B., Knowles, T.P.J., & Linse, S. (2015). The Aβ40 and Aβ42 peptides self-assemble into separate homomolecular fibrils in binary mixtures but cross-react during primary nucleation. *Chemical Science*, *6*(7), 4215–4233.

Cushman, L. A., Stein, K., & Duffy, C. J. (2008). Detecting navigational deficits in cognitive aging and Alzheimer disease using virtual reality. *Neurology*, *71*(12), 888–895.

Cynader, M., & Mitchell, D.E. (1980). Prolonged sensitivity to monocular deprivation in dark- reared cats. *Journal of Neurophysiology 43*(4), 1026-1040.

D'Amelio, M., Cavallucci, V., Middei, S., Marchetti, C., Pacioni, S., Ferri, A., Diamantini, A., De Zio, D., Carrara, P., Battistini, L., Moreno, S., Bacci, A., Ammassari-Teule, M., Marie, H., & Cecconi, F. (2010). Caspase-3 triggers early synaptic dysfunction in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nature Neuroscience*, *14*(1), 69–79.

Daumas, S., Halley, H., Francés, B., & Lassalle, J. M. (2005). Encoding, consolidation, and retrieval of contextual memory: Differential involvement of dorsal CA3 and CA1 hippocampal subregions. *Learning and Memory*, *12*(4), 375–382.

Day, A. J., & Prestwich, G. D. (2002). Hyaluronan-binding proteins: Tying up the giant. *Journal of Biological Chemistry*, *277*(7), 4585–4588.

de Flores, R., La Joie, R., & Chételat, G. (2015). Structural imaging of hippocampal subfields in healthy aging and Alzheimer's disease. *Neuroscience*, *309*, 29–50.

De Vivo, L., Landi, S., Panniello, M., Baroncelli, L., Chierzi, S., Mariotti, L., Spolidoro, M., Pizzorusso, T., Maffei, L., & Ratto, G. M. (2013). Extracellular matrix inhibits structural and functional plasticity of dendritic spines in the adult visual cortex. *Nature Communications*, *4*, 1410–1484.

Deacon, R. M. J., Koros, E., Bornemann, K. D., & Rawlins, J. N. P. (2009). Aged Tg2576 mice are impaired on social memory and open field habituation tests. *Behavioural Brain Research*, *197*(2), 466–468.

DeFelipe, J., & Fariñas, I. (1992). The pyramidal neuron of the cerebral cortex: Morphological and chemical characteristics of the synaptic inputs. *Progress in Neurobiology*, *39*(6), 563–607.

Devienne, G., Picaud, S., Cohen, I., Piquet, J., Tricoire, L., Testa, D., Di Nardo, A.A., Rossier, J., Cauli, B., & Lambolez, B. (2021). Regulation of Perineuronal Nets in the Adult Cortex by the Activity of the Cortical Network. *The Journal of Neuroscience*, *41*(27), 5779–5790.

del Río, M. R., & DeFelipe, J. (1994). A study of SMI 32-stained pyramidal cells, parvalbumin-immunoreactive chandelier cells, and presumptive thalamocortical axons in the human temproal neocortex. *Journal of Comparative Neurology*, *342*(3), 389–408.

Deng, W., Aimone, J.B., & Gage, F.H. (2010). New neurons and new memories: How does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? *Nat Rev Neurosci*, *11*, 339-50.

DeVille, D. C., Kerr, K. L., Avery, J. A., Burrows, K., Bodurka, J., Feinstein, J. S., Khalsa, S.S., Paulus, M.P., & Simmons, W. K. (2018). The Neural Bases of Interoceptive Encoding and Recall in Healthy Adults and Adults With Depression. *Biological Psychiatry: Cognitive Neuroscience and Neuroimaging*, *3*(6), 546–554.

Diamond, M. C., Krech, D., & Rosenzweig, M. R. (1964). The effects of an enriched environment on the histology of the rat cerebral cortex. *Journal of Comparative Neurology*, *123*(1), 111–119.

Didic, M., Barbeau, E. J., Felician, O., Tramoni, E., Guedj, E., Poncet, M., & Ceccaldi, M. (2011). Which memory system is impaired first in alzheimer's disease? *Journal of Alzheimer's Disease*, *27*(1), 11–22.

Dimsdale-Zucker, H. R., Ritchey, M., Ekstrom, A. D., Yonelinas, A. P., & Ranganath, C. (2018). CA1 and CA3 differentially support spontaneous retrieval of episodic contexts within human hippocampal subfields. *Nature Communications*, *9*(1).

Dityatev, A., Bruckner, G., Dityateva, G., Grosche, J., Kleene, R., & Schachner, M. (2007). Activity-dependent formation and functions of chondroitin sulfate-rich extracellular matrix of perineuronal nets. *Dev Neurobiol, 67*, 570-588.

Dolan, R. J., & Fletcher, P. C. (1997). Dissociating prefrontal and hippocampal function in episodic memory encoding. *Nature*, *388*(6642), 582–585.

Domínguez, S., Rey, C. C., Therreau, L., Fanton, A., Massotte, D., Verret, L., Piskorowski, R.A., & Chevaleyre, V. (2019). Maturation of PNN and ErbB4 Signaling in Area CA2 during Adolescence Underlies the Emergence of PV Interneuron Plasticity and Social Memory. *Cell Reports*, *29*(5), 1099-1112.e4.

Donato, F., Rompani, S. B., & Caroni, P. (2013). Parvalbumin-expressing basket-cell network plasticity induced by experience regulates adult learning. *Nature*, *504*(7479), 272–276.

Donato, F., Chowdhury, A., Lahr, M., & Caroni, P. (2015). Early- and Late-Born Parvalbumin Basket Cell Subpopulations Exhibiting Distinct Regulation and Roles in Learning. *Neuron*, *85*(4), 770–786.

Drolle, E., Hane, F., Lee, B., & Leonenko, Z. (2014). Atomic force microscopy to study molecular mechanisms of amyloid fibril formation and toxicity in Alzheimer's disease. *Drug Metabolism Reviews*, *46*(2), 207–223.

Du, J., Zhang, L., Weiser, M., Rudy, B., & McBain, C. J. (1996). Developmental expression and functional characterization of the potassium-channel subunit Kv3.1b in parvalbumin-containing interneurons of the rat hippocampus. *The Journal of Neuroscience*, *16*(2): 506-518.

Dubois, B., & Albert, M. L. (2004). Amnestic MCI or prodromal Alzheimer's disease? *Lancet Neurology*, *3*(4), 246–248.

Duffy, Á. M., Morales-Corraliza, J., Bermudez-Hernandez, K. M., Schaner, M. J., Magagna-Poveda, A., Mathews, P. M., & Scharfman, H. E. (2015). Entorhinal cortical defects in Tg2576 mice are present as early as 2-4months of age. *Neurobiology of Aging*, *36*(1), 134–148.

Dupret, D., O'Neill, J., Pleydell-Bouverie, B., & Csicsvari, J. (2010). The reorganization and reactivation of hippocampal maps predict spatial memory performance. *Nature Neuroscience*, *13*(8), 995–1002.

Duyckaerts, C., Potier, M.C., & Delatour, B. (2008). Alzheimer disease models and human neuropathology: similarities and differences. *Acta Neuropathol,* 115(1), 5-38.

Eckert, M. J., Bilkey, D. K., & Abraham, W. C. (2010). Altered Plasticity in Hippocampal CA1, But Not Dentate Gyrus, Following Long-Term Environmental Enrichment. *J Neurophysiol*, *103*, 3320–3329.

Eichenbaum, H. (1992). The hippocampal system and declarative memory in animals. *J Cogn Neurosci*, *4*(3), 217-31.

Elie, A., Prezel, E., Guérin, C., Denarier, E., Ramirez-, S., Serre, L., Andrieux, A., Fourest-Lieuvin, A., Blanchoin, L., & Arnal, I. (2014). Tau co-organizes dynamic microtubule and actin networks. *Scientific Reports*, 1–10.

Engel, A. K., & Singer, W. (2001). Temporal binding and the neural correlates of sensory awareness. *Trends in Cognitive Sciences*, *5*(1), 16–25.

Ennaceur, A., & Delacour, J. (1988). A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behavioural Brain Research*, *31*(1), 47–59.

Fagiolini, M., Pizzorusso, T., Berardi, N., Domenici, L., & Maffei, L. (1994). Functional postnatal development of the rat primary visual cortex and the role of visual experience: Dark rearing and monocular deprivation. *Vision Research*, *34*(6), 709–720.

Farrer, L. A., Cupples, L. A., Haines, J. L., Hyman, B., Kukull, W. A., Mayeux, R., Myers, R.H., Pericak-Vance, M.A., Risch, N., & Van Duijn, C. M. (1997). Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease: A meta-analysis. *Journal of the American Medical Association*, *278*(16), 1349–1356.

Favuzzi, E., Marques-Smith, A., Deogracias, R., Winterflood, C. M., Sánchez-Aguilera, A., Mantoan, L., Maeso, P., Fernandes, C., Ewers, H., & Rico, B. (2017). Activity-Dependent Gating of Parvalbumin Interneuron Function by the Perineuronal Net Protein Brevican. *Neuron*, *95*(3), 639-655.e10.

Fawcett, J. W., Fyhn, M., Jendelova, P., Kwok, J. C. F., & Sorg, B. A. (2022). The extracellular matrix and perineuronal nets in memory. *Molecular Psychiatry*, 1–12.

Fazzari, P., Paternain, A. V., Valiente, M., Pla, R., Luján, R., Lloyd, K., Lerma, J., Marín, O., & Rico, B. (2010). Control of cortical GABA circuitry development by Nrg1 and ErbB4 signalling. *Nature*, *464*(7293), 1376–1380.

Fenton, A. A., Kao, H. Y., Neymotin, S. A., Olypher, A., Vayntrub, Y., Lytton, W. W., & Ludvig, N. (2008). Unmasking the CA1 ensemble place code by exposures to small and large environments: More place cells and multiple, irregularly arranged, and expanded place fields in the larger space. *Journal of Neuroscience*, *28*(44), 11250–11262.

Feldman, H.H., & Woodward, M. (2005). The staging and assessment of moderate to severe Alzheimer disease. Neurology 65(6 suppl 3), S10-S17.

Fell, J., Fernández, G., Klaver, P., Axmacher, N., Mormann, F., Haupt, S., & Elger, C. E. (2006). Rhinal-hippocampal coupling during declarative memory formation: Dependence on item characteristics. *Neuroscience Letters*, *407*(1), 37–41.

Filali, M., Lalonde, R., & Rivest, S. (2011). Anomalies in social behaviors and exploratory activities in an APPswe/PS1 mouse model of Alzheimer's disease. *Physiology and Behavior*, *104*(5), 880–885.

Fisahn, A., Neddens, J., Yan, L., & Buonanno, A. (2009). Neuregulin-1 modulates hippocampal gamma oscillations: Implications for schizophrenia. *Cerebral Cortex*, *19*(3), 612–618.

Fischer, A. (2016). Environmental enrichment as a method to improve cognitive function. What can we learn from animal models? *NeuroImage*, *131*, 42–47.

Folstein, M.F., Folstein, S.E., & McHugh, P.R. (1975). "Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatr Res*, *12*(3), 189-198.

Foscarin, S., Ponchione, D., Pajaj, E., Leto, K., Gawlak, M., Wilczynski, G. M., Rossi, F., & Carulli, D. (2011). Experience-dependent plasticity and modulation of growth regulatory molecules at central synapses. *PLoS ONE*, *6*(1).

Foster, T. C., Fugger, H. N., & Cunningham, S. G. (2000). *Receptor blockade reveals a correspondence between hippocampal- dependent behavior and experience-dependent synaptic enhancement*. *871*, 39–43.

Frankland, P. W., O'Brien, C., Ohno, M., Kirkwood, A., & Silva, A. J. (2001). α-CaMKII-dependent plasticity in the cortex is required for permanent memory. *Nature*, *411*(6835), 309–313.

Fratiglioni, L., Paillard-borg, S., & Winblad, B. (2004). An active and socially integrated lifestyle in late life might protect against dementia. *Lancet Neurol*, *3*(6), 343–353.

Freude, S., Hettich, M. M., Schumann, C., Stöhr, O., Koch, L., Köhler, C., Udelhoven, M., Leeser, U., Müller, M., Kubota, N., Kadowaki, T., Krone, W., Schröder, H., Brüning, J.C., & Schubert, M. (2009). Neuronal IGF-1 resistance reduces Aβ accumulation and protects against premature death in a model of Alzheimer's disease. *The FASEB Journal*, *23*(10), 3315–3324.

Freund, T. F., & Buzsáki, G. (1996). Interneurons of the Hippocampus. *Hippocampus*, *6*(4), 347–470.

Freund, F., & Katona, I. (2007). Perisomatic Inhibition. *Neuron*, *56*, 33–42.

Fries, P. (2009). Neuronal Gamma-Band Synchronization as a Fundamental Process in Cortical Computation. *Annual Review of Neuroscience*, *32*(1), 209–224.

Frischknecht, R., Heine, M., Perrais, D., Seidenbecher, C. I., Choquet, D., & Gundelfinger, E. D. (2009). Brain extracellular matrix affects AMPA receptor lateral mobility and short-term synaptic plasticity. *Nat Neurosci.*, *12*, 897–904.

Frisoni, G. B., Fox, N. C., Jr, C. R. J., Scheltens, P., & Thompson, P. M. (2010). The clinical use of structural MrI in Alzheimer disease. *Nature Reviews Neurology*, *6*(2), 67–77.

Ganguly, K., Rejmak, E., Mikosz, M., Nikolaev, E., Knapska, E., & Kaczmarek, L. (2013). Matrix metalloproteinase (MMP) 9 transcription in mouse brain induced by fear learning. *Journal of Biological Chemistry*, *288*(29), 20978–20991.

Gao, Y., Tan, L., Yu, J., & Tan, L. (2018). *Tau in Alzheimer's Disease: Mechanisms and Therapeutic Strategies*. *Bentham Science*, 15, 283–300.

Garcia-Alloza, M., Robbins, E. M., Zhang-Nunes, S. X., Purcell, S. M., Betensky, R. A., Raju, S., Prada, C., Greenberg, S.M., Bacsai, B.J., & Frosch, M. P. (2006). Characterization of amyloid deposition in the APPswe/PS1dE9 mouse model of Alzheimer disease. *Neurobiology of Disease*, *24*(3), 516–524.

Garthe, A., Roeder, I., & Kempermann, G. (2016). Mice in an Enriched Environment Learn More Flexibly Because of Adult Hippocampal Neurogenesis. *Hippocampus*, *26*, 261–271.

Gerenu, G., Dobarro, M., Ramirez, M. J., & Gil-bea, F. J. (2013). Biochimica et Biophysica Acta Early cognitive stimulation compensates for memory and pathological changes in Tg2576 mice. *BBA - Molecular Basis of Disease*, *1832*(6), 837–847.

Giamanco, K. A., & Matthews, R. T. (2012). Deconstructing the perineuronal net: cellular contributions and molecular composition of the neuronal extracellular matrix. *Neuroscience, 218*, 367-384.

Gogolla, N., Caroni, P., Lüthi, A., & Herry, C. (2009). Perineuronal nets protect fear memories from erasure. *Science*, *325*(5945), 1258–1261.

Gold, A. E., & Kesner, R. P. (2005). The role of the CA3 subregion of the dorsal hippocampus in spatial pattern completion in the rat. *Hippocampus*, *15*(6), 808–814.

Gonchar, Y., Wang, Q., & Burkhalter, A. (2008). Multiple distinct subtypes of GABAergic neurons in mouse visual cortex identified by triple immunostaining. *Front Neuroanat, 1*:3.

Good, M. A., & Hale, G. (2007). The "Swedish" Mutation of the Amyloid Precursor Protein (APPswe) Dissociates Components of Object-Location Memory in Aged Tg2576 Mice. *Behavioral Neuroscience*, *121*(6), 1180–1191.

Gray, H. (1918). Anatomy of the Human Body

Grice, SJ, Spratling, M.W., Karmiloff-Smith, A., Halit, H., Csibra, G., de Haan, M., & Johnson, M.H. (2001). Disordered visual processing and oscillatory brain activity in autism and Williams syndrome. *Neuroreport*, *12*, 2697–700.

Gu, Y., Tran, T., Murase, S., Borrell, A., Kirkwood, A., & Quinlan, E. M. (2016). Neuregulin- Dependent Regulation of Fast-Spiking Interneuron Excitability Controls the Timing of the Critical Period. *The Journal of Neuroscience, 36*, 10285-10295.

Guimaraes, A., Zaremba, S., & Hockfield, S. (1990). Molecular and morphological changes in the cat lateral geniculate nucleus and visual cortex induced by visual deprivation are revealed by monoclonal antibodies Cat-304 and Cat-301. *The Journal of Neuroscience 10*(9), 3014-3024.

Gulyás, A. I., Megías, M., Emri, Z., & Freund, T. F. (1999). Total Number and Ratio of Excitatory and Inhibitory Synapses Converging onto Single Interneurons of Different Types in the CA1 Area of the Rat Hippocampus. *The Journal of Neuroscience*, *19*(22), 10082–10097.

Guzman, S. J., Schlögl, A., Frotscher, M., & Jonas, P. (2016). Synaptic mechanisms of pattern completion in the hippocampal CA3 network. *Science*, *353*(6304), 1117–1123.

Habeck, C., Razlighi, Q., Gazes, Y., Barulli, D., Steffener, J., & Stern, Y. (2017). Cognitive Reserve and Brain Maintenance : Orthogonal Concepts in Theory and Practice. *Cerebral Cortex*, *27*, 3962–3969.

Hafting, T., Fyhn, M., Molden, S., Moser, M. B., & Moser, E. I. (2005). Microstructure of a spatial map in the entorhinal cortex. *Nature*, *436*(7052), 801–806.

Hamm, V., Héraud, C., Bott, J. B., Herbeaux, K., Strittmatter, C., Mathis, C., & Goutagny, R. (2017). Differential contribution of APP metabolites to early cognitive deficits in a TgCRND8 mouse model of Alzheimer's disease. *Science Advances*, *3*(2), 1–12.

Happel, M. F. K., Niekisch, H., Castiblanco Rivera, L. L., Ohl, F. W., Deliano, M., & Frischknecht, R. (2014). Enhanced cognitive flexibility in reversal learning induced by removal of the extracellular matrix in auditory cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *111*(7), 2800–2805.

Harauzov, A., Spolidoro, M., DiCristo, G., De Pasquale, R., Cancedda, L., Pizzorusso, T., Viegi, A., Berardi, N., & Maffei, L. (2010). Reducing intracortical inhibition in the adult visual cortex promotes ocular dominance plasticity. *Journal of Neuroscience*, *30*(1), 361–371.

Hardy, J. A., & Higgins, G. A. (1992). Alzheimer' s Disease: The Amyloid Cascade Hypothesis. *Science*, 256(5054), 184–185.

Hardy, J., & Selkoe, D. J. (2002). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: Progress and problems on the road to therapeutics. *Science*, *297*(5580), 353–356.

Harris, S. S., Wolf, F., De Strooper, B., & Busche, M. A. (2020). Tipping the Scales: Peptide-Dependent Dysregulation of Neural Circuit Dynamics in Alzheimer's Disease. *Journal of Cleaner Production*, *107*(3), 417–435.

Härtig, W., Derouiche, A., Welt, K., Brauer, K., Grosche, J., Mäder, M., Reichenbach, A., & Brückner, G. (1999). Cortical neurons immunoreactive for the potassium channel Kv3.1b subunit are predominantly surrounded by perineuronal nets presumed as a buffering system for cations. *Brain Research*, *842*(1), 15–29.

Härtig, W., Singer, A., Grosche, J., Brauer, K., Ottersen, O. P., & Brückner, G. (2001). Perineuronal nets in the rat medial nucleus of the trapezoid body surround neurons immunoreactive for various amino acids, calcium-binding proteins and the potassium channel subunit Kv3.1b. *Brain Research*, *899*(1–2), 123–133.

Hartley, D. M., Walsh, D. M., Ye, C. P., Diehl, T., Vasquez, S., Vassilev, P. M., Teplow, D.B., & Selkoe, D. J. (1999). Protofibrillar intermediates of amyloid β-protein induce acute electrophysiological changes and progressive neurotoxicity in cortical neurons. *Journal of Neuroscience*, *19*(20), 8876–8884.

Heizmann, C. W., & Braun, K. (1992). Changes in Ca2+-binding proteins in human neurodegenerative disorders. *Trends in Neurosciences*, *15*(7), 259–264.

Hensch, T.K., Fagiolini, M., Mataga, N., Stryker, M.P., Baekkeskov, S., & Kash, S.F. (1998). Local GABA circuit control of experience-dependent plasticity in developing visual cortex. *Science 282*(5393), 1504-1508.

Hensch, T. K. (2005). Critical period plasticity in local cortical circuits. *Nature Reviews Neuroscience*, *6*(11), 877–888.

Hensch, T. K. (2014). Bistable Parvalbumin Circuits Pivotal for Brain Plasticity. *Cell*, *156*(1–2), 17–19.

Hensch, T. K., & Quinlan, E. M. (2018). Critical periods in amblyopia. *Visual Neuroscience*, *35*, E014.

Herrmann, C. S. (2001). Human EEG responses to 1-100 Hz flicker: Resonance phenomena in visual cortex and their potential correlation to cognitive phenomena. *Experimental Brain Research*, *137*(3–4), 346–353.

Herrmann, C. S., & Demiralp, T. (2005). Human EEG gamma oscillations in neuropsychiatric disorders. *Clinical Neurophysiology*, *116*(12), 2719–2733.

Higley, M. J., & Contreras, D. (2006). Balanced Excitation and Inhibition Determine Spike Timing during Frequency Adaptation. *The Journal of Neuroscience*, *26*(2), 448–457.

Hijazi, S., Heistek, T. S., Scheltens, P., Neumann, U., Shimshek, D. R., Mansvelder, H. D., Smit, A.B., & van Kesteren, R. E. (2020). Early restoration of parvalbumin interneuron activity prevents memory loss and network hyperexcitability in a mouse model of Alzheimer's disease. *Molecular Psychiatry*, *25*(12), 3380–3398.

Hioki, H., Okamoto, S., Konno, M., Kameda, H., Sohn, J., Kuramoto, E., Fujiyama, F., & Kaneko, T. (2013). Cell Type-Specific Inhibitory Inputs to Dendritic and Somatic Compartments of Parvalbumin-Expressing Neocortical Interneuron. *The Journal of Neuroscience*, *33*(2), 544–555.

Hippenmeyer, S., Vrieseling, E., Sigrist, M., Portmann, T., Laengle, C., Ladle, D.R., & Arber, S. (2005). A developmental switch in the response of DRG neurons to ETS transcription factor signaling. *PLoS Biol, 3*(5), e159.

Hirni, D. I., Kivisaari, S. L., Monsch, A. U., & Taylor, K. I. (2013). Distinct neuroanatomical bases of episodic and semantic memory performance in Alzheimer's disease. *Neuropsychologia*, *51*(5), 930–937.

Hirokawa, N., Shiomura, Y., & Okabe, S. (1988). Tau proteins: the molecular structure and mode of binding on microtubules. *J. Cell Biol* 107(4), 1449-1459.

Hitti, F. L., & Siegelbaum, S. A. (2014). The hippocampal CA2 region is essential for social memory. *Nature*, *508*(1), 88-92.

Hockfield, S., & McKay, R.D. (1983). A surface antigen expressed by a subset of neurons in the vertebrate central nervous system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 80*(18), 5758-5761.

Hockfield, S., Kalb, R.G., Zaremba, S., & Fryer, H. (1990). Expression of Neural Proteoglycans Correlates with the Acquisition of Mature Neuronal Properties in the Mammalian Brain. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology 55*, 505-514.

Hodkinson, H.M. (1972). Evaluation of a mental test score for assessment of mental impairment in the elderly. *Age Ageing*, *1*(4), 233-238.

Hof, P.R., Cox, K., Young, W.G., Celio, M.R., Rogers, J., & Morrison, J.H. (1991). Parvalbumin- immunoreactive neurons in the neocortex are resistant to degeneration in Alzheimer's disease. *J Neuropathol Exp Neurol*, *50*(4), 451-462.

Holcomb, L., Gordon, M.N., McGowan, E., Yu, X., Benkovic, S., Jantzen, P., Wright, K., Saad, I., Mueller, R., Morgan, D., Sanders, S., Zehr, C., O'Campo, K., Hardy, J., Prada, C.M., Eckman, C., Younkin, S., Hsiao, K., & Duff, K. (1998). Accelerated Alzheimer-type phenotype in transgenic mice carrying both mutant amyloid precursor protein and presenilin 1 transgenes. *Nat Med*, 4(1), 97–100.

Howard, M. W., Rizzuto, D. S., Caplan, J. B., Madsen, J. R., Lisman, J., Aschenbrenner-Scheibe, R., Schulze-Bonhage, A., & Kahana, M. J. (2003). Gamma Oscillations Correlate with Working Memory Load in Humans. *Cerebral Cortex*, *13*(12), 1369–1374.

Howell, M. D., & Gottschall, P. E. (2012). Lectican proteoglycans, their cleaving metalloproteinases, and plasticity in the central nervous system extracellular microenvironment. *Neuroscience*, *217*, 6–18.

Hsiao, K., Chapman, P., Nilsen, S., Ec, C., Harigaya, Y., Younkin, S., Yang, F., & Cole, G. (1996). *Correlative Memory Deficits, AP Elevation, and Amyloid Plaques in Transgenic Mice*. *258*(1996), 7–10.

Hu, H., Gan, J., & Jonas, P. (2014). Fast-spiking, parvalbumin+ GABAergic interneurons: From cellular design to microcircuit function. *Science*, *345*(6196).

Hu, H., & Jonas, P. (2014). A supercritical density of Na + channels ensures fast signaling in GABAergic interneuron axons. *Nature Neuroscience*, *17*, 686-693.

Huang, Y. (2011). Roles of apolipoprotein E4 (ApoE4) in the pathogenesis of Alzheimer's disease: Lessons from ApoE mouse models. *Biochemical Society Transactions*, *39*(4), 924–932.

Huang, Y., Happonen, K. E., Burrola, P. G., Connor, C. O., Hah, N., Huang, L., Nimmerjahn, A., & Lemke, G. (2021). Microglia use TAM receptors to detect and engulf amyloid β plaques. *Nature Immunology*, 22(5), 586-594.

Huang, Z.J., Kirkwood, A., Pizzorusso, T., Porciatti, V., Morales, B., Bear, M.F., Maffei, L., & Tonegawa, S. (1999). BDNF regulates the maturation of inhibition and the critical period of plasticity in mouse visual cortex. Cell 98(6), 739-755.

Hubel, D.H., Wiesel, T.N., LeVay, S., Barlow, H.B., & Gaze, R.M. (1977). Plasticity of ocular dominance columns in monkey striate cortex. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences 278*(961), 377-409.

Huh, S., Baek, S.-J., Lee, K.-H., Whitcomb, D.J., Jo, J., Choi, S.-M., Kim, D.H., Park, M.-S., Lee, K.H., & Kim, B.C. (2016). The reemergence of long-term potentiation in aged Alzheimer's disease mouse model. *Scientific Reports*, *6*, 29152.

Iaccarino, H. F., Singer, A. C., Martorell, A. J., Rudenko, A., Gao, F., Gillingham, T. Z., Mathys, H., Seo, J., Kritskiy, O., Abdurrob, F., Adaikkan, C., Canter, R.G., Rueda, R., Brown, E.N., Boyden, E.S., & Tsai, L. H. (2016). Gamma frequency entrainment attenuates amyloid load and modifies microglia. *Nature*, *540*(7632), 230–235.

Idier, J., Labouesse, S., Allain, M., Liu, P., Bourguignon, S., & Sentenac, A. (2018). On the Superresolution Capacity of Imagers Using Unknown Speckle Illuminations. *IEEE Trans. Comput. Imaging*, *4*, 87–98.

Ikarashi, Y., Harigaya, Y., Tomidokoro, Y., Kanai, M., Ikeda, M., Matsubara, E., Kawarabayashi, T., Kuribara, H., Younkin, S.G., Maruyama, Y., & Shoji, M. (2004). Decreased level of brain acetylcholine and memory disturbance in APPsw mice. *Neurobiology of Aging*, *25*(4), 483-490.

Inoue, S. (2008). In situ Aβ pores in AD brain are cylindrical assembly of Aβ protofilaments. *Amyloid*, *15*(4), 223–233.

Irvine, G. I., Logan, B., Eckert, M., Abraham, W. C., & Al, I. E. T. (2006). Enriched Environment Exposure Regulates Excitability, Synaptic Transmission, and LTP in the Dentate Gyrus of Freely Moving Rats. *Hippocampus*, *16*, 149–160.

Jacobsen, J. S., Wu, C. C., Redwine, J. M., Comery, T. A., Arias, R., Bowlby, M., Martone, R., Morrison, J.H., Pangalos, M.N., Reinhart, P.H., & Bloom, F. E. (2006). Early-onset behavioral and synaptic deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(13), 5161–5166.

Jaffard, R. (2011). La mémoire déclarative et le modèle de Squire. *Revue de neuropsychologie*, *3*(2), 83-93.

Jankowsky, J. L., Xu, G., Fromholt, D., Gonzales, V., & Borchelt, D. R. (2003). Environmental Enrichment Exacerbates Amyloid Plaque Formation in a Transgenic Mouse Model of Alzheimer Disease. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, *62*(12), 1220–1227.

Jankowsky, J. L., Melnikova, T., Fadale, D. J., Xu, G. M., Slunt, H. H., Gonzales, V., Younkin, L.H., Youkin, S.G., Borchelt, D.R., & Savonenko, A. V. (2005). Environmental enrichment mitigates cognitive deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *Journal of Neuroscience*, *25*(21), 5217–5224.

Joliot, A., & Prochiantz, A. (2004). Transduction peptides: from technology to physiology. *Nature Cell Biology, 6*, 189-196.

Kaczmarek, L., & Lapinska-dzwonek, J. (2002). Matrix metalloproteinases in the adult brain physiology: a link between c-Fos, AP-1 and remodeling of neuronal connections? *The EMBO Journal*, *21*(24), 6643–6648.

Kam, K., Duffy, Á. M., Moretto, J., LaFrancois, J. J., & Scharfman, H. E. (2016). Interictal spikes during sleep are an early defect in the Tg2576 mouse model of β-amyloid neuropathology. *Scientific Reports*, *6*(December 2015), 1–16.

Kang J., Lemaire H. G., Unterbeck A., Salbaum J. M., Masters C. L., Grzeschik K. H., Multhaup, G., Beyreuther, K., Müller-Hill, B. (1987). The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature*, 325, 733–736.

Kaplan, M. S., & Hinds, J. W. (1977). Neurogenesis in the adult rat: Electron microscopic analysis of light radioautographs. *Science*, *197*(4308), 1092–1094.

Katona, I., Acsady, L., & Freund, T.F. (1999). Postsynaptic targets of somatostatin-immunoreactive interneurons in the rat hippocampus. *Neuroscience*, *88*, 37–55.

Kawaguchi, Y., Katsumaru, H., Kosaka, T., Heizmann, C.W., & Hama, K. (1987). Fast spiking cells in rat hippocampus (CA1 region) contain the calcium-binding protein parvalbumin. *Brain research 416*(2), 369-374.

Kawaguchi, Y., & Kubota, Y. (1997). GABAergic cell subtypes and their synaptic connections in rat frontal cortex. *Cerebral Cortex*, *7*(6), 476–486.

Kay, K., Sosa, M., Chung, J. E., Karlsson, M. P., Larkin, M. C., & Frank, L. M. (2016). A hippocampal network for spatial coding during immobility and sleep. *Nature*, *531*(7593), 185–190.

Kayed, R., Pensalfini, A., Margol, L., Sokolov, Y., Sarsoza, F., Head, E., Hall, J., & Glabe, C. (2009). Annular protofibrils area structurally and functionally distinct type of amyloid oligomer. *Journal of Biological Chemistry*, *284*(7), 4230–4237.

Kelsom, C., & Lu, W. (2013). Development and specification of GABAergic cortical interneurons. *Cell and Bioscience*, *3*(1), 1.

Kempermann, G., Kuhn, H. G., & Gage, F. H. (1997). More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature* 386, 493–495.

Kempermann, G., Kuhn, H. G., & Gage, F.H. (1998). Experience-Induced Neurogenesis in the Senescent Dentate Gyrus. *The Journal of Neuroscience*, 18(9), 3206–3212.

Kempermann, G. (2008). The neurogenic reserve hypothesis : what is adult hippocampal neurogenesis good for ? *Trends Neurosci*, *31*, 163–169.

Kempermann, G. (2019). Environmental enrichment, new neurons and the neurobiology of individuality. *Nature Reviews Neuroscience*, 20, 235–245.

Kennedy, P. J., & Shapiro, M. L. (2009). Motivational states activate distinct hippocampal representations to guide goal-directed behaviors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(26), 10805–10810.

Kepecs, A., & Fishell, G. (2014). Interneuron Cell Types: Fit to form and formed to fit. *Nature*, *505*(7483), 318–326.

Khoo, G. H., Lin, Y. T., Tsai, T. C., & Hsu, K. Sen. (2019). Perineuronal Nets Restrict the Induction of Long-Term Depression in the Mouse Hippocampal CA1 Region. *Molecular Neurobiology*, *56*(9), 6436–6450.

Kim, H., Ährlund-Richter, S., Wang, X., Deisseroth, K., & Carlén, M. (2016). Prefrontal Parvalbumin Neurons in Control of Attention. *Cell*, *164*(1–2), 208–218.

Kim, J. E., Park, J. J., Lee, M. R., Choi, J. Y., Song, B. R., Park, J. W., Kang, M. J., Son, H. J., Hong, J. T., & Id, H. (2019). Constipation in Tg2576 mice model for Alzheimer's disease associated with dysregulation of mechanism involving the mAChR signaling pathway and ER stress response. *PLoS ONE*, *14*(4), 1–24.

King, D. L., Arendash, G. W., Crawford, F., Sterk, T., Menendez, J., & Mullan, M. J. (1999). Progressive and gender-dependent cognitive impairment in the APP(SW) transgenic mouse model for Alzheimer's disease. *Behavioural Brain Research*, *103*(2), 145–162.

King, D. L., & Arendash, G. W. (2002). Behavioral characterization of the Tg2576 transgenic model of Alzheimer's disease through 19 months. *Physiology and Behavior*, *75*(5), 627–642.

Kitamura, T., Sun, C., Martin, J., Kitch, L. J., Schnitzer, M. J., & Tonegawa, S. (2015). Entorhinal Cortical Ocean Cells Encode Specific Contexts and Drive Context-Specific Fear Memory. *Neuron*, *87*(6), 1317–1331.

Klausberger, T., Somogyi, P. (2008). Neuronal Diversity and Temporal Dynamics: The Unity of Hippocampal Circuit Operations. *Science 321*(5885), 53-57.

Klein, A. S., Donoso, J. R., Kempter, R., Schmitz, D., & Beed, P. (2016). Early cortical changes in gamma oscillations in alzheimer's disease. *Frontiers in Systems Neuroscience*, *10*, 1–11.

Kobayashi, T., Tran, A. H., Nishijo, H., Ono, T., & Matsumoto, G. (2003). Contribution of hippocampal place cell activity to learning and formation of goal-directed navigation in rats. *Neuroscience*, *117*(4), 1025–1035.

Kobayashi, K., Oka, M., Akiyama, T., Inoue, T., Abiru, K., Ogino, T., Yoshinaga, H., Ohtsuka, Y., & Oka, E. (2007). Rhythmic 60–100Hz activity on scalp EEG associated with epileptic spasms. *Clinical Neurophysiology*, *118*(10), e204.

Kobilo, T., Liu, Q., Gandhi, K., Mughal, M., Shaham, Y., & Praag, H. Van. (2015). Running is the neurogenic and neurotrophic stimulus in environmental enrichment. *Learning & memory, 18,* 605–609.

Kochlamazashvili, G., Henneberger, C., Bukalo, O., Dvoretskova, E., Senkov, O., Lievens, P. M. J., Westenbroek, R., Engel, A. K., Catterall, W. A., Rusakov, D. A., Schachner, M., & Dityatev, A. (2010). The extracellular matrix molecule hyaluronic acid regulates hippocampal synaptic plasticity by modulating postsynaptic L-type Ca2+ channels. *Neuron*, *67*(1), 116–128.

Koenig, T., Prichep, L., Dierks, T., Hubl, D., Wahlund, L. O., John, E. R., & Jelic, V. (2005). Decreased EEG synchronization in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Neurobiology of Aging*, *26*(2), 165–171.

Kogan, J. H., Frankland, P. W., & Silva, A. J. (2000). Long-Term Memory Underlying Hippocampus-Dependent Social Recognition in Mice. *Hippocampus, 56*, 47–56.

Konietzko, U. (2012). AICD Nuclear Signaling and Its Possible Contribution to Alzheimers Disease. *Current Alzheimer Research*, *9*(2), 200–216.

Kosel, F., Pelley, J. M. S., & Franklin, T. B. (2020). Behavioural and psychological symptoms of dementia in mouse models of Alzheimer's disease-related pathology. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *112*, 634–647.

Krezymon, A., Richetin, K., Halley, H., Roybon, L., Lassalle, J. M., Francès, B., Verret, L., & Rampon, C. (2013). Modifications of Hippocampal Circuits and Early Disruption of Adult Neurogenesis in the Tg2576 Mouse Model of Alzheimer's Disease. *PLoS ONE*, *8*(9), 9–11.

Kruger, L., & Mandelkow, E.M. (2016) Tau neurotoxicity and rescue in animal models of human Tauopathies. *Curr Opin Neurobiol*, 36, 52-8.

Kullmann, D. M., & Lamsa, K. P. (2007). Long-term synaptic plasticity in hippocampal interneurons. *Nature Reviews Neuroscience*, *8*, 687–69.

Kumar, A., Rani, A., Tchigranova, O., Lee, W., & Foster, T. C. (2012). Influence of late-life exposure to environmental enrichment or exercise on hippocampal function and CA1 senescent physiology. *Neurobiology of Aging*, *33*(4), 828.e1-828.e17.

Kurth, S., Moyse, E., Bahri, M. A., Salmon, E., & Bastin, C. (2015). Recognition of personally familiar faces and functional connectivity in Alzheimer's disease. *Cortex*, *67*, 59–73.

Kurudenkandy, F. R., Zilberter, M., Biverstål, H., Presto, J., Honcharenko, D., Strömberg, R., Johansson, J., Winblad, B., & Fisahn, A. (2014). Amyloid-β-induced action potential desynchronization and degradation of hippocampal gamma oscillations is prevented by interference with peptide conformation change and aggregation. *Journal of Neuroscience*, *34*(34), 11416–11425.

Kwok, J. C. F., Carulli, D., & Fawcett, J. W. (2010). In vitro modeling of perineuronal nets: Hyaluronan synthase and link protein are necessary for their formation and integrity. *Journal of Neurochemistry*, *114*(5), 1447–1459.

Kwok, J. C. F., Dick, G., Wang, D., & Fawcett, J. W. (2011). Extracellular matrix and perineuronal nets in CNS repair. *Developmental Neurobiology*, *71*(11), 1073–1089.

La Joie, R., Perrotin, A., La, V. De, Egret, S., & Doeuvre, L. (2013). NeuroImage : Clinical Hippocampal subfield volumetry in mild cognitive impairment , Alzheimer' s disease and semantic dementia. *YNICL*, *3*, 155–162.

Lazarov, O., Robinson, J., Tang, Y. P., Hairston, I. S., Korade-Mirnics, Z., Lee, V. M. Y., Hersh, L. B., Sapolsky, R. M., Mirnics, K., & Sisodia, S. S. (2005). Environmental enrichment reduces Aβ levels and amyloid deposition in transgenic mice. *Cell*, *120*(5), 701–713.

Lee, A. T. C., Richards, M., Chan, W. C., Chiu, H. F. K., Lee, R. S. Y., & Lam, L. C. W. (2018). Association of Daily Intellectual Activities With Lower Risk of Incident Dementia Among Older Chinese Adults. *JAMA Psychiatry*, *75*(7), 697–703.

Lee, S. H., Kim, K. R., Ryu, S. Y., Son, S., Hong, H. S., Mook-Jung, I., Lee, S. H., & Ho, W. K. (2012). Impaired short-term plasticity in mossy fiber synapses caused by mitochondrial dysfunction of dentate granule cells is the earliest synaptic deficit in a mouse model of Alzheimer's disease. *Journal of Neuroscience*, *32*(17), 5953–5963.

Lein, E. S., Hawrylycz, M. J., Ao, N., Ayres, M., Bensinger, A., Bernard, A., Boe, A. F., Boguski, M. S., Brockway, K. S., Byrnes, E. J., Chen, L., Chen, L., Chen, T.M., Chin, M.C., Chong, J., Crook, B.E., Czaplinska, A., Dang, C.N., Datta, S., Dee, N. R., Desaki, A. L., Desta, T., Diep, E., Dolbeare, T.A., Donelan, M. J., Dong, H. W., Dougherty, J. G., Duncan, B. J., Ebbert, A. J., Eichele, G., Estin, L. K., Faber, C., Facer, B. A., Fields, R., Fischer, S. R., Fliss, T. P., Frensley, C., Gates, S. N., Glattfelder, K. J., Halverson, K. R., Hart, M. R., Hohmann, J. G., Howell, M. P., Jeung, D. P., Johnson, R. A., Karr, P. T., Kawal, R., Kidney, J. M., Knapik, R. H., Kuan, C. L., Lake, J. H., Laramee, A. R., Larsen, K. D., Lau, C., Lemon, T. A., Liang, A. J., Liu, Y., Luong, L. T., Michaels, J., Morgan, J. J., Morgan, R. J., Mortrud, M. T., Mosqueda, N. F., Ng, L. L., Ng, R., Orta, G. J., Overly, C. C., Pak, T. H., Parry, S. E., Pathak, S. D., Pearson, O. C., Puchalski, R. B., Riley, Z. L., Rockett, H. R., Rowland, S. A., Royall, J. J., Ruiz, M. J., Sarno, N. R., Schaffnit, K., Shapovalova, N. V., Sivisay, T., Slaughterbeck, C. R., Smith, S. C., Smith, K. A., Smith, B. I., Sodt, A. J., Stewart, N. N., Stumpf, K. R., Sunkin, S. M., Sutram, M., Tam, A., Teemer, C. D., Thaller, C., Thompson, C. L., Varnam, L. R., Visel, A., Whitlock, R. M., Wohnoutka, P. E., Wolkey, C. K., Wong, V. Y., Wood, M., Yaylaoglu, M. B., Young, R. C., Youngstrom, B. L., Yuan, X. F., Zhang, B., Zwingman, T. A., & Jones, A. R. (2007). Genome-wide atlas of gene expression in the adult mouse brain. *Nature*, *445*(7124), 168–176.

Lendvai, D., Morawski, M., Négyessy, L., Gáti, G., Jäger, C., Baksa, G., Glasz, T., Attems, J., Tanila, H., Arendt, T., Harkany, T., & Alpár, A. (2013). Neurochemical mapping of the human hippocampus reveals perisynaptic matrix around functional synapses in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol*, *125*, 215–229.

Leroy, F., Park, J., Asok, A., Brann, D. H., Meira, T., Boyle, L. M., Buss, E. W., Kandel, E. R., & Siegelbaum, S. A. (2018). A circuit from hippocampal CA2 to lateral septum disinhibits social aggression. *Nature*, *564*(7735), 213–218.

Lesné, S., Ming, T. K., Kotilinek, L., Kayed, R., Glabe, C. G., Yang, A., Gallagher, M., & Ashe, K. H. (2006). A specific amyloid-β protein assembly in the brain impairs memory. *Nature*, *440*(7082), 352–357.

Letzkus, J. J., Wolff, S. B. E., Meyer, E. M. M., Tovote, P., Courtin, J., Herry, C., & Lüthi, A. (2011). A disinhibitory microcircuit for associative fear learning in the auditory cortex. *Nature*, *480*(7377), 331–335.

Leung, L., Andrews-Zwilling, Y., Yoon, S. Y., Jain, S., Ring, K., Dai, J., Wang, M. M., Tong, L., Walker, D., & Huang, Y. (2012). Apolipoprotein E4 Causes Age- and Sex-Dependent Impairments of Hilar GABAergic Interneurons and Learning and Memory Deficits in Mice. *PLoS ONE*, *7*(12).

Leutgeb, J. K., Leutgeb, S., Moser, M. B., & Moser, E. I. (2007). Pattern separation in the dentate gyrus and CA3 of the hippocampus. *Science*, *315*(5814), 961–966.

Li, Q., Zhang, R., Ge, Y.-l., Mei, Y.-w., & Guo, Y.-l. (2009). Effects of Neuregulin on Expression of MMP-9 and NSE in Brain of Ischemia/Reperfusion Rat. *Journal of Molecular Neuroscience*, *38*(2), 207-215.

Li, J. Z., Hao, X. H. U. A., Wu, H. A. I. P., Li, M., Liu, X. U. E. M. I. N., & Wu, Z. H. I. B. (2021). An enriched environment delays the progression from mild cognitive impairment to Alzheimer' s disease in senescence - accelerated mouse prone 8 mice. *Experimental and Therapeutic Medicine*, *22*(5), 1320.

Li, S., Jin, M., Koeglsperger, T., Shepardson, N. E., Shankar, G. M., & Selkoe, D. J. (2011). Soluble a β oligomers inhibit long-term potentiation through a mechanism involving excessive activation of extrasynaptic NR2B-containing NMDA receptors. *Journal of Neuroscience*, *31*(18), 6627–6638.

Lindner, K., Beckenbauer, K., van Ek, L. C., Titeca, K., de Leeuw, S. M., Awwad, K., Hanke, F., Korepanova, A. V., Rybin, V., van der Kam, E. L., Mohler, E. G., Tackenberg, C., Lakics, V., & Gavin, A. C. (2022). Isoform- and cell-state-specific lipidation of ApoE in astrocytes. *Cell Reports*, *38*(9), 110435.

Loisy, M., Bouisset, G., Lopez, S., Muller, M., Spitsyn, A., Duval, J., Piskorowski, R. A., Verret, L., & Chevaleyre, V. (2022). Sequential inhibitory plasticities in hippocampal area CA2 and social memory formation. *Neuron*. 1–13.

Lorente de Nò, R. (1934). Studies on the Structure of the Cerebral Cortex II. Continuation of the Study of the Ammonic System. *Journal für Psychologie und Neurologie*, 46, 113-177.

Lu, Y., Sun, X. D., Hou, F. Q., Bi, L. L., Yin, D. M., Liu, F., Chen, Y. J., Bean, J. C., Jiao, H. F., Lui, X., Li, B. M., Xiong, W. C., Gao, T. M., & Mei, L. (2014). Maintenance of GABAergic activity by neuregulin 1-ErbB4 in amygdala for fear memory. *Neuron*, *84*(4), 835–846.

Lu, L., Igarashi, K. M., Witter, M. P., Moser, E. I., & Moser, M. B. (2015). Topography of Place Maps along the CA3-to-CA2 Axis of the Hippocampus. *Neuron*, *87*(5), 1078–1092.

Lundell, A., Olin, A. I., Morgelin, M., al-Karadaghi, S., Aspberg, A., & Logan, D. T. (2004). Structural basis for interactions between tenascins and lectican C-type lectin domains: Evidence for a crosslinking role for tenascins. *Structure, 12*, 1495-1506.

Lustenberger, C., Patel, Y. A., Alagapan, S., Page, J. M., Price, B., Boyle, M. R., & Frohlich, F. (2017). High-density EEG characterization of brain responses to auditory rhythmic stimuli during wakefulness and NREM sleep. *NeuroImage, 169,* 57-68.

Lüth, H.-J., Apelt, J., Ihunwo, A.O., Arendt, T., & Schliebs, R. (2003). Degeneration of β-amyloid- associated cholinergic structures in transgenic APPSW mice. *Brain research*, *977*(1), 16-22.

Maccaferri, G., Roberts, J.D.B., Szucs, P., Cottingham, C.A., & Somogyi, P. (2000). Cell surface domain specific postsynaptic currents evoked by identified GABAergic neurones in rat hippocampus in vitro. *J Physiol*, *524*, 91–116.

Maguire-Zeiss, K. A., Li, Z. W., Shimodal, L. M. N., & Hamill, R. W. (1995). Calbindin D28k mRNA in hippocampus, superior temporal gyrus and cerebellum: comparison between control and Alzheimer disease subjects. *Molecular Brain Research*, *30*(2), 362–366.

Mahar, I., Albuquerque, M. S., Mondragon-rodriguez, S., Mechawar, N., Quirion, R., Krantic, S., & Stanwood, G. (2017). Phenotypic Alterations in Hippocampal NPY- and PV-Expressing Interneurons in a Presymptomatic Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Frontiers in Aging Neuroscience*, *8*, 1–12.

Mahati, K., Bhagya, V., Christofer, T., Sneha, A., & Shankaranarayana Rao, B. S. (2016). Enriched environment ameliorates depression-induced cognitive deficits and restores abnormal hippocampal synaptic plasticity. *Neurobiology of Learning and Memory*, *134*, 379–391.

Makin, S. (2018). The amyloid hypothesis on trial. *Nature*, 559(7715), 4-7.

Malik, R., & Chattarji, S. (2012). Enhanced intrinsic excitability and EPSP-spike coupling accompany enriched environment-induced facilitation of LTP in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J Neurophysiol*, *107*, 1366–1378.

Mangeat, T., Labouesse, S., Allain, M., Negash, A., Martin, E., Guénolé, A., Poincloux, R., Estibal, C., Bouissou, A., Cantaloube, S., Vega, E., Li, T., Rouvière, C., Allart, S., Keller, D., Debarnot, V., Wang, X. B., Michaux, G., Pinot, M., Le Borgne, R., Tournier, S., Suzanne, M., Idier, J., & Sentenac, A. (2021). Super-resolved live-cell imaging using random illumination microscopy. *Cell Reports Methods*, *1*(1).

Marín, O. (2012). Interneuron dysfunction in psychiatric disorders. *Nat Rev Neuro*, *13*, 107–120.

Marín, O. (2013). Cellular and molecular mechanisms controlling the migration of neocortical interneurons. *European Journal of Neuroscience*, *38*(1), 2019–2029.

Markram, H., Toledo-Rodriguez, M., Wang, Y., Gupta, A., Silberberg, G., & Wu, C. (2004). Interneurons of the neocortical inhibitory system. *Nature Reviews Neuroscience*, *5*(10), 793–807.

Martinez-Losa, M., Tracy, T. E., Ma, K., Verret, L., Clemente-Perez, A., Khan, A. S., Cobos, I., Ho, K., Gan, L., Mucke, L., Alvarez-Dolado, M., & Palop, J. J. (2018). Nav1.1-Overexpressing Interneuron Transplants Restore Brain Rhythms and Cognition in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Neuron*, *98*(1), 75-89.

Martorell, A. J., Paulson, A. L., Suk, H. J., Abdurrob, F., Drummond, G. T., Guan, W., Young, J. Z., Kim, D. N., Kritskiy, O., Barker, S. J., Mangena, V., Prince, S. M., Brown, E. N., Chung, K., Boyden, E. S., Singer, A. C., & Tsai, L. H. (2019). Multi-sensory Gamma Stimulation Ameliorates Alzheimer's-Associated Pathology and Improves Cognition. *Cell*, *177*(2), 256-271.

Maurer, K., Volk, S., & Gerbaldo, H. (1997). Auguste D and Alzheimer's disease. *Lancet* 349(9064), 1546-1549.

Mayur, B., Debjoyti, C., Zaved, K. (2013). Towards understanding Alzheimer's Disease: An Overview. Research *Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences* (4), 286- 298.

McClelland, J. L., McNaughton, B. L., & O'Reilly, R. C. (1995). Why There Are Complementary Learning Systems in the Hippocampus and Neocortex: Insights from the Successes and Failures of Connectionist Models of Learning and Memory. *Psychological Review*, *102*(3), 419–457.

McEwen, B. S. (1997). Hormones as regulators of brain development: Life-long effects related to health and disease. *Acta Paediatrica, International Journal of Paediatrics, Supplement*, *86*(422), 41–44.

McKhann, G., Drachman, D., Folstein, M., Katzman, R., Price, D., & Stadlan, E.M. (1984). Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology 34*(7), 939-944.

McRae, P. A., Rocco, M. M., Kelly, G., Brumberg, J. C., & Matthews, R. T. (2007). Sensory deprivation alters aggrecan and perineuronal net expression in the mouse barrel cortex. *The Journal of Neuroscience, 27*: 5405-5413.

Mei, L., & Xiong, W. (2008). Neuregulin 1 in neural development, synaptic plasticity and schizophrenia. *Nature reviews Neuroscience, 9*(6), 437–452.

Mei, L., & Nave, K. A. (2014). Neuregulin-ERBB signaling in the nervous system and neuropsychiatric diseases. *Neuron*, *83*(1), 27–49.

Meira, T., Leroy, F., Buss, E. W., Oliva, A., Park, J., & Siegelbaum, S. A. (2018). A hippocampal circuit linking dorsal CA2 to ventral CA1 critical for social memory dynamics. *Nature Communications*, *9*(1), 1–14.

Mendez, M.F., Martin, R.J., Smyth, K.A., & Whitehouse, P.J. (1992). Disturbances of person identification in Alzheimer's disease: A retrospective study. *Journal of Nervous and Mental Disease*, 180(2), 94-96.

Micheva, K. D., & Beaulieu, C. (1997). Development and plasticity of the inhibitory neocortical circuitry with an emphasis on the rodent barrel field cortex: A review. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, *75*(5), 470–478.

Mistridis, P., Mata, J., Neuner-Jehle, S., Annoni, J. M., Biedermann, A., Bopp-Kistler, I., Brand, D., Brioschi Guevara, A., Decrey-Wick, H., Démonet, J. F., Hemmeter, U., Kressig, R. W., Martin, B., Rampa, L., Savaskan, E., Stuck, A., Tschopp, P., Zekry, D., & Monsch, A. U. (2017). Use it or lose it! Cognitive activity as a protective factor for cognitive decline associated with Alzheimer's disease. *Swiss Medical Weekly*, *147*, 1–7.

Miyata, S., Nishimura, Y., & Nakashima, T. (2007). Perineuronal nets protect against amyloid β-protein neurotoxicity in cultured cortical neurons. *Brain Research*, *1150*(1), 200–206.

Mohammed, A. H., Zhu, S., Darmopil, S., Hjerling-Leffler, J., Ernfors, P., Winblad, B., Diamond, M. C., & Bogdanovic, N. (2002). Environmental enrichment and the brain. *Prog. Brain Res, 138*(8), 109–133.

Mokhtar, S. H., Bakhuraysah, M. M., Cram, D. S., & Petratos, S. (2013). The Beta-Amyloid Protein of Alzheimer's Disease : Communication Breakdown by Modifying the Neuronal Cytoskeleton. *Int. J. Alzheimers Dis*. 910502.

Mondini, S., Madella, I., Zangrossi, A., Bigolin, A., Tomasi, C., Michieletto, M., Villani, D., Di Giovanni, G., & Mapelli, D. (2016). Cognitive Reserve in Dementia : Implications for Cognitive Training. *Frontiers in Aging Neuroscience*, *8*(84), 1–7.

Montgomery, S. M., & Buzsáki, G. (2007). Gamma oscillations dynamically couple hippocampal CA3 and CA1 regions during memory task performance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(36), 14495–14500.

Mora, F., Segovia, G., & del Arco, A. (2007). Aging, plasticity and environmental enrichment: Structural changes and neurotransmitter dynamics in several areas of the brain. *Brain Research Reviews*, *55*(1), 78–88.

Morawski, M., Brückner, G., Jäger, C., Seeger, G., & Arendt, T. (2010). Neurons associated with aggrecan-based perineuronal nets are protected against tau pathology in subcortical regions in Alzheimer's disease. *Neuroscience*, *169*(3), 1347–1363.

Morawski, M., Reinert, T., Meyer-Klaucke, W., Wagner, F. E., Troger, W., Reinert, A., Jager, C., Bruckner, G., & Arendt, T. (2015). Ion exchanger in the brain: Quantitative analysis of perineuronally fixed anionic binding sites suggests diffusion barriers with ion sorting properties. *Sci Rep*, *5*, 16471.

Moser, M., Rowland, D. C., & Moser, E. I. (2015). Place Cells, Grid Cells, and Memory. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 1–16.

Nair, K. P., Salaka, R. J., Srikumar, B. N., Kutty, B. M., & Rao, B. S. S. (2022). Enriched Environment Rescues Impaired Sleep – Wake Architecture and Abnormal Neural Dynamics in Chronic Epileptic Rats. *Neuroscience*, *495*, 97–114.

Nakano, M., Kubota, K., Hashizume, S., Kobayashi, E., & Chikenji, T. S. (2020). Brain, Behavior, & Immunity - Health An enriched environment prevents cognitive impairment in an Alzheimer' s disease model by enhancing the secretion of exosomal microRNA-146a from the choroid plexus. *Brain, Behavior, & Immunity - Health*, *9*, 100-149.

Nakazono, T., Lam, T. N., Patel, A. Y., Kitazawa, M., Saito, T., Saido, T. C., & Igarashi, K. M. (2017). Impaired in vivo gamma oscillations in the medial entorhinal cortex of knock-in Alzheimer model. *Frontiers in Systems Neuroscience*, *11*, 1–12.

Näslund, J., Haroutunian, V., Mohs, R., Davis, KL., Davies, P., Greengard, P., & Buxbaum, JD. (2000). Correlation between elevated levels of amyloid beta-peptide in the brain and cognitive decline. *JAMA*, 283(12), 1571-7

Chauhan, N. B., & Sandova, J. (2007). Amelioration of early cognitive deficits by aged garlic extract in Alzheimer's transgenic mice. *Phytotherapy Research*, *21*, 629–640.

Nicholson, C., & Syková, E. (1998). Extracellular space structure revealed by diffusion analysis. *Trends in Neurosciences 21*(5), 207-215.

Nikolaev, E., Kaczmarek, L., Zhu, S. W., Winblad, B., & Mohammed, A. H. (2002). Environmental manipulation differentially alters c-Fos expression in amygdaloid nuclei following aversive conditioning. *Brain Research*, *957*(1), 91–98.

Nimmrich, V., Draguhn, A., & Axmacher, N. (2015). Neuronal Network Oscillations in Neurodegenerative Diseases. *NeuroMolecular Medicine*, *17*(3), 270–284.

Nithianantharajah, J., & Hannan, A. J. (2006). Enriched environments, experience-dependent plasticity and disorders of the nervous system. *Nature*, *7*(9), 697–709.

Nobili, A., Latagliata, E. C., Viscomi, M. T., Cavallucci, V., Cutuli, D., Giacovazzo, G., Krashia, P., Rizzo, F. R., Marino, R., Federici, M., De Bartolo, P., Aversa, D., Dell'Acqua, M. C., Cordella, A., Sancandi, M., Keller, F., Petrosini, L., Puglisi-Allegra, S., Mercuri, N. B., Coccurello, R., Berretta, N., & D'Amelio, M. (2017). Dopamine neuronal loss contributes to memory and reward dysfunction in a model of Alzheimer's disease. *Nature Communications*, *8*.

Nucci, M., Mapelli, D., & Mondini, S. (2012). Cognitive reserve index questionnaire [CRIq]: a new instrument for measuring cognitive reserve. *Aging Clin Exp Res*, *24*, 218–226.

Nyberg, L., Lövdén, M., Riklund, K., Lindenberger, U., & Bäckman, L. (2012). Memory aging and brain maintenance. *Trends in Cognitive Sciences*, *16*(5), 292–305.

O'Keefe, J., Dostrovsky, J., & J. O'Keefe, J. D. (1971). Short Communications The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain Research*, *34*(1), 171–175.

Oakley, H., Cole, S. L., Logan, S., Maus, E., Shao, P., Craft, J., Guillozet-Bongaarts, A., Ohno, M., Disterhoft, J., Van Eldik, L., Berry, R., & Vassar, R. (2006). Intraneuronal β-amyloid aggregates, neurodegeneration, and neuron loss in transgenic mice with five familial Alzheimer's disease mutations: Potential factors in amyloid plaque formation. *Journal of Neuroscience*, *26*(40), 10129–10140.

Ogiwara, I., Miyamoto, H., Morita, N., Atapour, N., Mazaki, E., Inoue, I., Takeuchi, T., Itohara, S., Yanagawa, Y., Obata, K., Furuichi, T., Hensch, T. K., & Yamakawa, K. (2007). Nav1.1 localizes to axons of parvalbumin-positive inhibitory interneurons : a circuit basis for epileptic seizures in mice carrying an Scn1a gene mutation. *The Journal of Neuroscience*, *27*(22), 5903–5914.

Ohline, S. M., & Abraham, W. C. (2019). Environmental enrichment effects on synaptic and cellular physiology of hippocampal neurons. *Neuropharmacology*, *145*, 3–12.

Orlando C., Ster J., Gerber U., Fawcett J. W., & Raineteau O. (2012). Peridendritic chondroitin sulfate proteoglycans restrict structural plasticity in an integrin-dependent manner. *J Neurosci.*, *32*, 18009–17.

Otth, C., Concha, II, Arendt, T., Stieler, J., Schliebs, R., Gonzalez-Billault, C., & Maccioni, R.B. (2002). AbetaPP induces cdk5-dependent tau hyperphosphorylation in transgenic mice Tg2576. *Journal of Alzheimers Disease*, *4*(5), 417-430.

Padurariu, M., Ciobica, A., Mavroudis, I., Fotiou, D., & Baloyannis, S. (2012). Hippocampal neuronal loss in the CA1 and CA3 areas of Alzheimer's disease patients. *Psychiatria Danubina*, *24*(2), 152–158.

Palop, J. J. (2006). A network dysfunction perspective on neurodegenerative disease. *Nature*, *443*.

Palop, J. J., Chin, J., Roberson, E. D., Wang, J., Thwin, M. T., Bien-Ly, N., Yoo, J., Ho, K. O., Yu, G. Q., Kreitzer, A., Finkbeiner, S., Noebels, J. L., & Mucke, L. (2007). Aberrant Excitatory Neuronal Activity and Compensatory Remodeling of Inhibitory Hippocampal Circuits in Mouse Models of Alzheimer's Disease. *Neuron*, *55*(5), 697–711.

Pantazopoulos, H., & Berretta, S. (2016). In sickness and in health: Perineuronal nets and synaptic plasticity in psychiatric disorders. *Neural Plasticity*, *2016*.

Pastor, A., Artieda, J., Arbizu, J., Marti-Climent, J. M., Penuelas I., & Masdeu, J. C. (2002). Activation of Human Cerebral and Cerebellar Cortex by Auditory Stimulation at 40 Hz. *The Journal of Neuroscience*, *22*(23), 10501–10506.

Pastor, M. A., Artieda, J., Arbizu, J., Valencia, M., & Masdeu, J. C. (2003). Human Cerebral Activation during Steady-State Visual-Evoked Responses. *Journal of Neuroscience*, *23*(37), 11621–11627.

Patel, N. S., Paris, D., Mathura, V., Quadros, A. N., Crawford, F.C., & Mullan, M. J. (2005). Inflammatory cytokine levels correlate with amyloid load in transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *Journal of Neuroinflammation*, *2*(1), 9.

Patz, S., Grabert, J., Gorba, T., Wirth, M. J., & Wahle, P. (2004). Parvalbumin Expression in Visual Cortical Interneurons Depends on Neuronal Activity and TrkB Ligands during an Early Period of Postnatal Development. *Cerebral Cortex*, *14*(3), 342–351.

Pawelzik, H., Hughes, D. I., & Thomson, A. M. (2003). Modulation of inhibitory autapses and synapses on rat CA1 interneurones by GABA A receptor ligands. *J. Physiol*, *546*(3), 701–716.

Penke, B., Bogár, F., Paragi, G., Gera, J., & Fülp, L. (2019). Key peptides and proteins in Alzheimer's disease. *Curr Protein Pept Sci*, *20*, 577-599.

Piller, C. (2022). Blots on a field? *Science (New York, N.Y.)*, *377*(6604), 358–363.

Pirbhoy P.S., Rais M., Lovelace J.W., Woodard W., Razak K.A., Binder D.K., Devin, K., & Ethell, I.M. (2020). Acute pharmacological inhibition of matrix metalloproteinase-9 activity during development restores perineuronal net formation and normalizes auditory processing in Fmr1 KO mice. *J Neurochem*, *155*, 538–58.

Piskorowski, R. A., Nasrallah, K., Diamantopoulou, A., Mukai, J., Hassan, S. I., Siegelbaum, S. A., Gogos, J. A., Chevaleyre, V. (2016). Age-Dependent Specific Changes in Area CA2 of the Hippocampus and Social Memory Deficit in a Mouse Model of the 22q11.2 Deletion Syndrome. *Neuron*, *89*(1), 163–176.

Pittman-polletta, B. R., Kocsis, B., Vijayan, S., Whittington, M. A., & Kopell, N. J. (2015). Review Brain Rhythms Connect Impaired Inhibition to Altered Cognition in Schizophrenia. *Biological Psychiatry*, *77*(12), 1020–1030.

Pinto, T. C. C., Machado, L., Bulgacov, T. M., Rodrigues-, A. L., Costa, M. L. G., Ximenes, R. C. C., & Sougey, E. B. (2019). Is the Montreal Cognitive Assessment (MoCA) screening superior to the Mini-Mental State Examination (MMSE) in the detection of mild cognitive impairment (MCI) and Alzheimer' s Disease (AD) in the elderly*? International Psychogeriatrics*, *31*(4), 491–504.

Pizzorusso, T., Medini, P., Berardi, N., Chierzi, S., Fawcett, J. W., & Maffei, L. (2002). Reactivation of Ocular Dominance Plasticity in the Adult Visual Cortex. *Science*, *298*(5596), 1248-51.

Popugaeva, E., Pchitskaya, E., & Bezprozvanny, I. (2018). Dysregulation of Intracellular Calcium Signaling in Alzheimer's Disease. *Antioxidants and Redox Signaling*, *29*(12), 1176–1188.

Possin, K.L., Sanchez, P.E., Anderson-Bergman, C., Fernandez, R., Kerchner, G.A., Johnson, E.T., Davis, A., Lo, I., Bott, N.T., Kiely, T., Fenesy, M.C., Miller, B.L., Kramer, J.H., & Finkbeiner, S. (2016). Cross-species translation of the Morris

maze for Alzheimer's disease. *The Journal of Clinical Investigation*, *126*(2), 779-783.

Puzzo, D., Privitera, L., Leznik, E., Fà, M., Staniszewski, A., Palmeri, A., & Arancio, O. (2008). Picomolar amyloid-β positively modulates synaptic plasticity and memory in hippocampus. *Journal of Neuroscience*, *28*(53), 14537–14545.

Quattromani, M. J., Pruvost, M., Guerreiro, C., Backlund, F., Englund, E., Aspberg, A., Jaworski, T., Hakon, J., Ruscher, K., Kaczmarek, L., Vivien, D., & Vivien, D. (2018). Extracellular Matrix Modulation Is Driven by Experience-Dependent Plasticity During Stroke Recovery. *Molecular Neurobiology*, *55*, 2196–2213.

Querfurth, H. W., & LaFerla, F. M. (2010). Alzheimer's disease. The New Englang Journal of Medicine, 4(362), 329-344.

Quiroz, Y. T., Budson, A. E., Celone, K., Ruiz, A., Newmark, R., Castrillón, G., Lopera, F., & Stern, C. E. (2010). Hippocampal Hyperactivation in Presymptomatic Familial Alzheimer's Disease. *Annals of Neurology*, *68*(6), 865–875.

Raam, T., McAvoy, K. M., Besnard, A., Veenema, A., & Sahay, A. (2017). Hippocampal oxytocin receptors are necessary for discrimination of social stimuli. *Nature Communications*, *8*(1), 1–14.

Raber, J., Wong, D., Yu, G.Q., Buttini, M., Mahley, R.W., Pitas, R. E., & Mucke, L. (2000). Apolipoprotein E and cognitive performance. *Nature*, *404*(6776), 352–353.

Rabinovici, G. D., & Jagust, W. J. (2009). Amyloid imaging in aging and dementia: Testing the amyloid hypothesis in vivo. *Behavioural Neurology*, *21*, 117–128.

Rae, E. A., & Brown, R. E. (2015). The problem of genotype and sex differences in life expectancy in transgenic AD mice. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *57*, 238–251.

Rager, G., & Singer, W. (1998). The response of cat visual cortex to flicker stimuli of variable frequency. *European Journal of Neuroscience*, *10*(5), 1856–1877.

Raichle, M. E., Macleod, A. M., Snyder, A. Z., Powers, W. J., Gusnard, D. A., & Shulman, G. L. (2001). A default mode of brain function. *PNAS*, *98*(2), 676–682.

Ramaroson, H., Helmer, C., Barberger-Gateau, P., Letenneur, L., Dartigues, J.F., & PAQUID (2003). Prevalence of dementia and Alzheimer's disease among subjects aged 75 years or over: updated results of the PAQUID cohort. *Rev Neurol, 159*(4), 405-411.

Ramos, B., Baglietto-Vargas, D., Rio, J.C.d., Moreno-Gonzalez, I., Santa-Maria, C., Jimenez, S., Caballero, C., Lopez-Tellez, J.F., Khan, Z.U., Ruano, D., Gutierrez, A., & Vitorica, J. (2006). Early neuropathology of somatostatin/NPY GABAergic cells in the hippocampus of a PS1×APP transgenic model of Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, *27*(11), 1658-1672.

Reagh, Z. M., Noche, J. A., Tustison, N. J., Delisle, D., Murray, E. A., & Yassa, M. A. (2018). Functional Imbalance of Anterolateral Entorhinal Cortex and Hippocampal Dentate/CA3 Underlies Age-Related Object Pattern Separation Deficits. *Neuron*, *97*(5), 1187-1198.e4.

Reagh, Z. M., & Ranganath, C. (2018). What does the functional organization of cortico-hippocampal networks tell us about the functional organization of memory? *Neuroscience Letters*, *680*(April), 69–76.

Rebsam, A., & Mason, C. A. (2008). Otx2's Incredible Journey. *Cell*, *134*(3), 386–387.

Regan, D. M. (1989). Human Brain Electrophysiology. *Appleton & Lange*

Ribeiro, F. F., & Xapelli, S. (2021). An Overview of Adult Neurogenesis. Advances in Experimental Medicine and Biology. *Adv Exp Med Biol*, *1331*, 77-94.

Reid, H. M. O., Chen-Mack, N., Snowden, T., & Christie, B. R. (2021). Understanding Changes in Hippocampal Interneurons Subtypes in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease: A Systematic Review. *Brain Connectivity*, *11*(3), 159–179.

Reitz, C., Way, R., & Cb, C. (2012). Epidemiology of Alzheimer disease. *Nat Rev Neuro 7*(3), 137–152.

Ren, J. Q., Aika, Y., Heizmann, C. W., & Kosaka, T. (1992). Quantitative analysis of neurons and glial cells in the rat somatosensory cortex, with special reference to GABAergic neurons and parvalbumin-containing neurons. *Experimental Brain Research*, *92*(1), 1–14.

Rey, C. C., Cattaud, V., Rampon, C., & Verret, L. (2020). What's New on Alzheimer's Disease? Insights From AD Mouse Models. *Encyclopedia of Biomedical Gerontology*, *3*, 431–442.

Rey, C. C., Robert, V., Bouisset, G., Loisy, M., Lopez, S., Cattaud, V., Lejards, C., Piskorowski, R.A., Rampon, C., Chevaleyre, V., & Verret, L. (2022). Altered inhibitory function in hippocampal CA2 contributes in social memory deficits in Alzheimer's mouse model. *IScience*, *25*(3), 103895.

Reyes-Marin, K. E., & Nuñez, A. (2017). Seizure susceptibility in the APP/PS1 mouse model of Alzheimer's disease and relationship with amyloid β plaques. *Brain Research*, *1677*, 93–100.

Richetin, K., Leclerc, C., Toni, N., Gallopin, T., Pech, S., Roybon, L., & Rampon, C. (2015). Genetic manipulation of adult-born hippocampal neurons rescues memory in a mouse model of Alzheimer's disease. *Brain*, *138*(2), 440–455.

Ringland, C., Schweig, J. E., Eisenbaum, M., Paris, D., Ait-Ghezala, G., Mullan, M., Crawford, F., Abdullah, L., & Bachmeier, C. (2021). MMP9 modulation improves specific neurobehavioral deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *BMC Neuroscience*, *22*(1), 1–25.

Robertson, I. H. (2013). A noradrenergic theory of cognitive reserve : implications for Alzheimer ' s disease. *Neurobiology of Aging*, *34*(1), 298–308.

Rosenzweig, M. R., Krech, D., Bennett, E. L., & Diamond, M. C. (1962). Effects of environmental complexity and training on brain chemistry and anatomy: A replication and extension. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, *55*(4), 429–437.

Rotstein, H. G., Pervouchine, D. D., Acker, C. D., Gillies, M. J., White, J. A., Buhl, E. H., Whittington, M. A., & Kopell, N. (2005). Slow and fast inhibition and an H-current interact to create a theta rhythm in a model of CA1 interneuron network. *J Neurophysiol*, *94*, 1509–1518.

Ruden, J. B., Dugan, L. L., & Konradi, C. (2021). Parvalbumin interneuron vulnerability and brain disorders. *Neuropsychopharmacology*, *46*, 279–287.

Rudy, B., & Mcbain, C. J. (2001). Kv3 channels : voltage-gated K + channels designed for high-frequency repetitive firing. *Trends in Neurosciences*, *24*(9), 517–526.

Rupert, D. D., Shea, S. D., Moss, E. H., & Shea, S. D. (2022). Parvalbumin-Positive Interneurons Regulate Cortical Sensory Plasticity in Adulthood and Development Through Shared Mechanisms. *Frontiers in Neural Circuits*, *16*, 1–12.

Ruzicka, J., Dalecka, M., Safrankova, K., Peretti, D., Mallucci, G., Jendelova, P., Kwok, J. C. F., & Fawcett, J. W. (2021). Perineuronal nets affect memory and learning after synapse withdrawal. *BioRxiv*, 2021.04.13.439599.

Sahakian, B. J., Morris, R. G., Evenden, J. L., Heald, A., Levy, R., Philpot, M., & Robbins, T. W. (1988). A comparative study of visuospatial memory and learning in alzheimer-type dementia and parkinson's disease. *Brain*, *111*(3), 695–718.

Sale, A., Berardi, N., & Maffei, L. (2009). Enrich the environment to empower the brain. *Trends in Neurosciences*, *32*(4), 233–239.

San Antonio, A., Liban, K., Ikrar, T., Tsyganovskiy, E., & Xu, X. (2014). Distinct physiological and developmental properties of hippocampal CA2 subfield revealed by using anti-Purkinje cell protein 4 (PCP4) immunostaining. *Journal of Comparative Neurology*, *522*(6), 1333–1354.

Satz, P., Cole, M. A., Hardy, D. J., & Rassovsky, Y. (2010). Brain and cognitive reserve: Mediator(s) and construct validity, a critique. *Journal of Clinical and Experimental Neuropsychology*, *33*(1), 121–130.

Scarlett, J. M., Hu, S. J., & Alonge, K. M. (2022). The " Loss " of Perineuronal Nets in Alzheimer ' s Disease : Missing or Hiding in Plain Sight ? *Frontiers in Integrative Neuroscience*, *16*, 1–16.

Schacter, D.L., & Tulving, E. (1994). Memory Systems 1994. MIT Press.

Scheff, S. W., Price, D. A., Schmitt, F. A., Dekosky, S. T., & Mufson, E. J. (2007). Synaptic alterations in CA1 in mild Alzheimer disease and mild cognitive impairment. *Neurology*, *68*(18), 1501–1508.

Schneider, F., Baldauf, K., Wetzel, W., & Reymann, K. G. (2014). Behavioral and EEG changes in male 5xFAD mice. *Physiology and Behavior*, *135*, 25–33.

Sederberg, P. B., Schulze-Bonhage, A., Madsen, J. R., Bromfield, E. B., McCarthy, D. C., Brandt, A., Tully, M. S., & Kahana, M. J. (2007). Hippocampal and neocortical gamma oscillations predict memory formation in humans. *Cerebral Cortex*, *17*(5), 1190–1196.

Shi, F., Liu, B., Zhou, Y., Yu, C., & Jiang, T. (2009). Hippocampal Volume and Asymmetry in Mild Cognitive Impairment and Alzheimer's Disease : Meta-Analyses of MRI Studies. Hippocampus*, 19*, 1055–1064.

Shinohara, Y., Hosoya, A., & Hirase, H. (2013). Experience enhances gamma oscillations and interhemispheric asymmetry in the hippocampus. *Nature Communications*, *4*, 1652–1659.

Sik, A., Penttonen, M., Ylinen, A., & Buzsáki, G. (1995). Hippocampal CA1 interneurons : labeling study an in vivo intracellular. *The Journal of Neuroscience*, *15*(10), 6651–6665.

Singer, A. C., Martorell, A. J., Douglas, J. M., Abdurrob, F., Attokaren, M. K., Tipton, J., Mathys, H., Adaikkan, C., & Tsai, L. H. (2018). Noninvasive 40-Hz light flicker to recruit microglia and reduce amyloid beta load. *Nature Protocols*, *13*(8), 1850–1868.

Smith, A. S., Williams Avram, S. K., Cymerblit-Sabba, A., Song, J., & Young, W. S. (2016). Targeted activation of the hippocampal CA2 area strongly enhances social memory. *Molecular Psychiatry*, *21*(8), 1137–1144.

Smolyakov, G., Dague, E., Roux, C., Seguelas, M. H., Galés, C., Senard, J. M., & Arvanitis, D. N. (2018). Nanoscale structural mapping as a measure of maturation in the murine frontal cortex. *Brain Structure and Function*, *223*(1), 255–265.

Snyder, H. M., Asthana, S., Bain, L., Brinton, R., Craft, S., Dubal, D. B., Espeland, M. A., Gatz, M., Mielke, M. M., Raber, J., Rapp, P. R., Yaffe, K., & Carrillo, M. C. (2016). Sex biology contributions to vulnerability to Alzheimer's disease : A think tank convened by the Women's Alzheimer's Research Initiative. *Alzheimer's & Dementia*, *12*(11), 1186–1196.

Sohal, V. S., Zhang, F., Yizhar, O., & Deisseroth, K. (2009). Parvalbumin neurons and gamma rhythms enhance cortical circuit performance. *Nature*, *459*(7247), 698–702.

Somogyi, P., & Klausberger, T. (2005). Defined types of cortical interneurone structure space and spike timing in the hippocampus. *Journal of Physiology*, *562*(1), 9–26.

Spalding, K. L., Bergmann, O., Alkass, K., Bernard, S., Salehpour, M., Huttner, H. B., Boström, E., Westerlund, I., Vial, C., Buchholz, B. A., Possnert, G., Mash, D. C., Druid, H., & Mash, D. C. (2013). Dynamics of Hippocampal Neurogenesis in Adult Humans. *Cell*, *153*(6), 1219–1227.

Spatazza, J., Lee, H. H. C., DiNardo, A. A., Tibaldi, L., Joliot, A., Hensch, T. K., & Prochiantz, A. (2013). Choroid-Plexus-Derived Otx2 Homeoprotein Constrains Adult Cortical Plasticity. *Cell Reports*, *3*(6), 1815–1823.

Squire, L. R. (1992). Memory and the Hippocampuss: A Synthesis From Findings With Rats, Monkeys, and Humans. *Psychological Review*, *99*(2), 195–231.

Stamenkovic, V., Stamenkovic, S., Jaworski, T., & Gawlak, M. (2016). The extracellular matrix glycoprotein tenascin-C and matrix metalloproteinases modify cerebellar structural plasticity by exposure to an enriched environment. *Brain Structure and Function*, *222*(1), 393-415.

Stelzmann, R. A., Norman Schnitzlein, H., & Reed Murtagh, F. (1995). An english translation of alzheimer's 1907 paper, "über eine eigenartige erkankung der hirnrinde." *Clinical Anatomy*, *8*(6), 429–431.

Stern, E. A., Bacskai, B. J., Hickey, G. A., Attenello, F. J., Lombardo, J. A., & Hyman, B. T. (2004). Cortical synaptic integration in vivo is disrupted by amyloid-β plaques. *Journal of Neuroscience*, *24*(19), 4535–4540.

Stern, Y., Moeller, J. R., Anderson, K. E., Luber, B., Zubin, N. R., DiMauro, A. A., Park, A., Campbell, C. E., Marder, K., Bell, K., Van Heertum, R., & Sackeim, H. A. (2000). Different brain networks mediate task performance in normal aging and AD: Defining compensation. *Neurology*, *55*(9), 1291–1297.

Stern, Y. (2002). What is cognitive reserve? Theory and research application of the reserve concept. *Journal of the International Neuropsychological Society*, *8*, 448–460.

Stern, Y. (2009). Cognitive reserve. *Neuropsychologia*, *47*(10), 2015–2028.

Stern, Y., & Barulli, D. (2019). Cognitive reserve. In *Geriatric Neurology* (1st ed., Vol. 167).

Stevenson, E. L., & Caldwell, H. K. (2014). Lesions to the CA2 region of the hippocampus impair social memory in mice. *European Journal of Neuroscience*, *40*(9), 3294–3301.

Stewart, S., Cacucci, F., & Lever, C. (2011). Which memory task for my mouse? A systematic review of spatial memory performance in the Tg2576 alzheimer's mouse model. *Journal of Alzheimer's Disease*, *26*(1), 105–126.

Sugiyama, S., Di Nardo, A. A., Aizawa, S., Matsuo, I., Volovitch, M., Prochiantz, A., & Hensch, T. K. (2008). Experience-Dependent Transfer of Otx2 Homeoprotein into the Visual Cortex Activates Postnatal Plasticity. *Cell*, *134*(3), 508–520.

Sun, B., Halabisky, B., Zhou, Y., Palop, J. J., Yu, G., Mucke, L., & Gan, L. (2009). Imbalance between GABAergic and Glutamatergic Transmission Impairs Adult Neurogenesis in an Animal Model of Alzheimer's Disease. *Cell Stem Cell*, *5*(6), 624–633.

Sun, Y., Ikrar, T., Davis, M. F., Gong, N., Zheng, X., Luo, Z. D., Lai, C., Mei, L., Holmes, T. C., Gandhi, S. P., & Xu, X. (2016). Neuregulin-1/ErbB4 Signaling Regulates Visual Cortical Plasticity. *Neuron*, *92*, 160-173.

Sung, P. S., Lin, P. Y., Liu, C. H., Su, H. C., & Tsai, K. J. (2020). Neuroinflammation and neurogenesis in alzheimer's disease and potential therapeutic approaches. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(3).

Szabo, A., Cretin, B., Gérard, F., Curot, J., J. Barbeau, E., Pariente, J., Dahan, L., & Valton, L. (2022). Sleep: The Tip of the Iceberg in the Bidirectional Link Between Alzheimer's Disease and Epilepsy. *Frontiers in Neurology*, *13*.

Sztainberg, Y., & Chen, A. (2010). An environmental enrichment model for mice. *Nature Protocols*, *5*(9), 1535–1539.

Tajerian, M., Hung, V., Nguyen, H., Lee, G., Joubert, L. M., Malkovskiy, A. V., Zou, B., Xie, S., Huang, T. T., & Clark, J. D. (2018). The hippocampal extracellular matrix regulates pain and memory after injury. *Molecular Psychiatry*, *23*(12), 2302–2313.

Takahashi-Iwanaga, H., Mukakami, T., & Abe, K. (1998). Three-dimensional microanatomy of perineuronal proteoglycan nets enveloping motor neurons in the rat spinal cord. *Journal of Neurocytology*, *27*(11), 817–827.

Takahashi, H., Brasnjevic, I., Rutten, B. P., Van Der Kolk, N., Perl, D. P., Bouras, C., Steinbusch, H. W., Schmitz, C., Hof, P. R., & Dickstein, D. L. (2010). Hippocampal interneuron loss in an APP/PS1 double mutant mouse and in Alzheimer's disease. *Brain Struct Funct*, *214*(2-3), 145-160.

Tan, C., Yu, J., & Tan, L. (2014). Biomarkers for Preclinical Alzheimer' s Disease. *Journal of Alzheimer's Disease, 42*, 1051–1069.

Tang, M., Jacobs, D., Stern, Y., Marder, K., Schofield, P., Gurland, B., & Andrews, H. (1996). Effect of oestrogen during menopause on risk and age at onset of Alzheimer' s disease. *Lancet*, *348*, 429–432.

Tang, B., Dutt, K., Papale, L., Rusconi, R., Shankar, A., Hunter, J., Tufik, S., Yu, F. H., Catterall, W. A., Mantegazza, M., Goldin, A. L., & Escayg, A. (2009). A BAC transgenic mouse model reveals neuron subtype-specific effects of a Generalized Epilepsy with Febrile Seizures Plus (GEFS+) mutation. *Neurobiology of Disease*, *35*(1), 91–102.

Tekell, J. L., Hoffmann, R., Hendrickse, W., Greene, R. W., Rush, A. J., & Armitage, R. (2005). High frequency EEG activity during sleep: characteristics in schizophrenia and depression. *Clin EEG Neurosci*, 36, 25–35.

Terry, R. D., Masliah, E., Salmon, D. P., Butters, N., Deteresa, R., Hill, R., Hansen, L. A., & Katzman, R. (1991). Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease : synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *American Neurological Association*, *30,* 572–580.

Testa, D., Prochiantz, A., & Di Nardo, A. A. (2019). Perineuronal nets in brain physiology and disease. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, *89*(August 2018), 125–135.

Thompson, E.H., Lensjø, K.K., Wigestrand, M.B., Malthe-Sørenssen, A., Hafting, T., & Fyhn, M. (2017). Removal of perineuronal nets disrupts recall of a remote fear memory. *Proceedings of the National Academy of Sciences 115*(3), 607-612.

Thompson, L., Khuc, J., Saccani, M. S., Zokaei, N., & Cappelletti, M. (2021). Gamma oscillations modulate working memory recall precision. *Experimental Brain Research*, *239*(9), 2711–2724.

Thomson, H. (2018). Wave therapy. *Nature*, *555*(7694), 20–22.

Tillerson, J. L., Caudle, W. M., Reverón, M. E., & Miller, G. W. (2003). Exercise induces behavioral recovery and attenuates neurochemical deficits in rodent models of Parkinson's disease. *Neuroscience*, *119*(3), 899–911.

Ting, A. K., Chen, Y., Wen, L., Yin, D. M., Shen, C., Tao, Y., Liu, X., Xiong, W. C., & Mei, L. (2011). Neuregulin 1 promotes excitatory synapse development and function in GABAergic interneurons. *The Journal of Neuroscience*, *31*, 15-25.

Tondelli, M., Wilcock, G. K., Nichelli, P., Jager, C. A. De, Jenkinson, M., & Zamboni, G. (2012). Structural MRI changes detectable up to ten years before clinical Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, *33*(4), 825.e25-825.e36.

Tong, L. M., Djukic, B., Arnold, C., Gillespie, A. K., Yoon, S. Y., Wang, M. M., Zhang, O., Knoferle, J., Rubenstein, J. L. R., Alvarez-Buylla, A., & Huang, Y. (2014). Inhibitory interneuron progenitor transplantation restores normal learning and memory in ApoE4 knock-in mice without or with Aβ accumulation. *Journal of Neuroscience*, *34*(29), 9506–9515.

Tu, S., Okamoto, S., Lipton, S. A., & Xu, H. (2014). Oligomeric A β -induced synaptic dysfunction in Alzheimer' s disease. *Mol. Neurodegeneration*, 9, 48.

Tyan, L., Chamberland, S., Magnin, E., Camire, O., Francavilla, R., David, L. S., Deisseroth, K., & Topolnik, L. (2014). Dendritic Inhibition Provided by Interneuron-Specific Cells Controls the Firing Rate and Timing of the Hippocampal Feedback Inhibitory Circuitry. *The Journal of Neuroscience*, *34*(13), 4534–4547.

Ueno, H., Suemitsu, S., Murakami, S., Kitamura, N., Wani, K., Okamoto, M., Matsumoto, Y., & Ishihara, T. (2017). Region-specific impairments in parvalbumin interneurons in social isolation-reared mice. *Neuroscience*, *359*, 196–208.

Vafadari, B., Mitra, S., Stefaniuk, M., & Kaczmarek, L. (2019). Psychosocial Stress Induces Schizophrenia-Like Behavior in Mice with Reduced MMP-9 Activity. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, *13*(August), 1–8.

van Deursen, J. A., Vuurman, E. F. P. M., van Kranen-Mastenbroek, V. H. J. M., Verhey, F. R. J., & Riedel, W. J. (2011). 40-Hz steady state response in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Neurobiology of Aging*, *32*(1), 24–30.

van Dijk, M. T., & Fenton, A. A. (2018). On How the Dentate Gyrus Contributes to Memory Discrimination. *Neuron*, *98*(4), 832-845.e5.

van Ess, P. J., Pedersen, W. A., Culmsee, C., Mattson, M. P., & Blouin, R. A. (2002). Elevated hepatic and depressed renal cytochrome P450 activity in the Tg2576 transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry*, *80*(4), 571–578.

van Praag, H., Kempermann, G., & Gage, F. H. (2000). Neural consequences of enviromental enrichment. *Nature Reviews Neuroscience*, *1*(3), 191–198.

van Vugt, M., Schuleze-Bonhageb, A., Armin Brandt, B. L., & Kahana, M. J. (2013). Hippocampal gamma oscillations increase with memory load. *Journal of Neuroscience*, *18*(9), 1199–1216.

Vanderwolf, C. H. (1969). Hippocampal electrical activity and voluntary movement in the rat. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol, 26*, 407-418.

Varman, D. R., & Rajan, K. E. (2015). Environmental enrichment reduces anxiety by differentially activating serotonergic and neuropeptide y (NPY)-ergic system in Indian field mouse (Mus booduga): An animal model of post-traumatic stress disorder. *PLoS ONE*, *10*(5), 1–23.

Végh, M.J., Heldring, C.M., Kamphuis, W., Hijazi, S., Timmerman, A.J., Li, K.W., van Nierop, P., Mansvelder, H.D., Hol, E.M., Smit, A.B., & van Kesteren, R.E. (2014). Reducing hippocampal extracellular matrix reverses early memory deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol Commun*, *2*, 76.

Verdaguer, E., Brox, S., Petrov, D., Olloquequi, J., Romero, R., de Lemos, M. L., Camins, A., & Auladell, C. (2015). Vulnerability of calbindin, calretinin and parvalbumin in a transgenic / knock-in APPswe / PS1dE9 mouse model of Alzheimer disease together with disruption of hippocampal neurogenesis. *Experimental Gerontology*, *69*, 176–188.

Verghese, J., Lipton, R.B., Katz, M. J., Hall, C. B., Derby, C. A., Kuslansky, G., Ambrose, A. F., Sliwinski, M., & Buschke, H. (2003). Leisure activities and the risk of dementia in the elderly. *The New England Journal of Medicine*, *348*(25), 2508–2516.

Verret, L., Jankowsky, J. L., Xu, G. M., Borchelt, D. R., & Rampon, C. (2007). Alzheimer's-type amyloidosis in transgenic mice impairs survival of newborn

neurons derived from adult hippocampal neurogenesis. *Journal of Neuroscience*, *27*(25), 6771–6780.

Verret, L., Mann, E. O., Hang, G. B., Barth, A. M. I., Cobos, I., Ho, K., Devidze, N., Masliah, E., Kreitzer, A. C., Mody, I., Mucke, L., & Palop, J. J. (2012). Inhibitory Interneuron Deficit Links Altered Network Activity and Cognitive Dysfunction in Alzheimer Model. *Cell*, *149*(3), 708–721.

Verret, L., Krezymon, A., Halley, H., Trouche, S., Zerwas, M., Lazouret, M., Lassalle, J. M., & Rampon, C. (2013). Transient enriched housing before amyloidosis onset sustains cognitive improvement in Tg2576 mice. *Neurobiology of Aging*, *34*(1), 211–225.

Vitellaro-Zuccarello, L., De Biasi, S., & Spreafico, R. (1998). One hundred years of Golgi's "perineuronal net": History of a denied structure. *Italian Journal of Neurological Sciences*, *19*(4), 249–253.

Vivar, C., Potter, M. C., & van Praag, H. (2013). All about running: synaptic plasticity, growth factors and adult hippocampal neurogenesis. *Curr Top Behav Neurosci*, 15, 189-210.

Vossel, K. A., Beagle, A. J., Rabinovici, G. D., Shu, H., Lee, S. E., Naasan, G., Hegde, M., Cornes, S. B., Henry, M. L., Nelson, A. B., Seeley, W. W., Geschwind, M. D., Gorno-Tempini, M. L., Shih, T., Kirsch, H. E., Garcia, P. A., Miller, B. L., & Mucke, L. (2013). Seizures and epileptiform activity in the early stages of Alzheimer disease. *JAMA Neurology*, *70*(9), 1158–1166.

Wan, H., Aggleton, J. P., & Brown, M. W. (1999). Different contributions of the hippocampus and perirhinal cortex to recognition memory. *Journal of Neuroscience*, *19*(3), 1142–1148.

Wang, S., Li, K., Zhao, S., Zhang, X., Yang, Z., Zhang, J., & Zhang, T. (2020). Early-stage dysfunction of hippocampal theta and gamma oscillations and its modulation of neural network in a transgenic 5xFAD mouse model. *Neurobiology of Aging*, *94*, 121–129.

Wegner, F., Härtig, W., Bringmann, A., Grosche, J., Wohlfarth, K., Zuschratter, W., & Brückner, G. (2003). Diffuse perineuronal nets and modified pyramidal cells immunoreactive for glutamate and the GABAA receptor α1 subunit form a unique entity in rat cerebral cortex. *Experimental Neurology*, *184*(2), 705–714.

Wehr, M., & Zador, A. M. (2003). Balanced inhibition underlies tuning and sharpens spike timing in auditory cortex. *Nature*, *426*, 860–863.

Wen, T. H., Binder, D. K., Ethell, I. M., & Razak, K. A. (2018). The Perineuronal 'Safety' Net? Perineuronal Net Abnormalities in Neurological Disorders. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, *11*, 1–17.

Werheid, K., & Clare, L. (2007). Are faces special in Alzheimer's disease? Cognitive conceptualisation, neural correlates, and diagnostic relevance of impaired memory for faces and names. *Cortex*, *43*(7), 898–906.

West, M.J. (1993). New stereological methods for counting neurons. *Neurobiology of Aging*, *14*(4), 275-285

Westerman, M. A., Cooper-Blacketer, D., Mariash, A., Kotilinek, L., Kawarabayashi, T., Younkin, L. H., Carlson, G. A., Younkin, S. G., & Ashe, K. H. (2002). The relationship between Aβ and memory in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *Journal of Neuroscience*, *22*(5), 1858–1867.

Wiesel, T. N., & Hubel, D. H. (1963). Responses in Striate Deprived of Vision Cortex of One Eye. *Journal of Neurophysiology*, *26*(6), 1003–1017.

Willem, M., Tahirovic, S., Busche, M. A., Ovsepian, S. V., Chafai, M., Kootar, S., Hornburg, D., Evans, L. D., Moore, S., Daria, A., Hampel, H., Müller, V., Giudici, C., Nuscher, B., Wenninger-Weinzierl, A., Kremmer, E., Heneka, M. T., Thal, D. R., Giedraitis, V., Lannfelt, L., Müller, U., Livesey, F. J., Meissner, F., Herms, J., Konnerth, A., Marie, H., & Haass, C. (2015). σ-Secretase processing of APP inhibits neuronal activity in the hippocampus. *Nature*, *526*(7573), 443–447.

Willis, A., Pratt, J. A., & Morris, B. J. (2021). BDNF and JNK Signaling Modulate Cortical Interneuron and Perineuronal Net Development : Implications for Schizophrenia-Linked 16p11 . 2 Duplication Syndrome. *Schizophrenia Bulletin*, *47*(3), 812–826.

Willis, A., Pratt, J. A., & Morris, B. J. (2022). Enzymatic Degradation of Cortical Perineuronal Nets Reverses GABAergic Interneuron Maturation. *Molecular Neurobiology*, 2874–2893.

Yamada, J., Ohgomori, T., & Jinno, S. (2015). Perineuronal nets affect parvalbumin expression in GABAergic neurons of the mouse hippocampus. *European Journal of Neuroscience*, *41*(3), 368–378.

Yamada, J., & Jinno, S. (2017). Molecular Heterogeneity of Aggrecan-Based Perineuronal Nets Around Five Subclasses of Parvalbumin-Expressing Neurons in the Mouse Hippocampus. *The Journal of Comparative Neurology*, *525*, 1234–1249.

Yamagata, T., Saito, H., Habuchi, O., & Suzuki, S. (1968). Purification and properties of bacterial chondroitinases and chondrosulfatases. *Journal of Biological Chemistry*, *243*(7), 1523–1535.

Yamamoto, J., Suh, J., Takeuchi, D., & Tonegawa, S. (2014). Successful execution of working memory linked to synchronized high-frequency gamma oscillations. *Cell*, *157*(4), 845–857.

Yang, S., Cacquevel, M., Saksida, L. M., Bussey, T. J., Schneider, B. L., Aebischer, P., Melani, R., Pizzorusso, T., Fawcett, J. W., & Spillantini, M. G. (2015).

Perineuronal net digestion with chondroitinase restores memory in mice with tau pathology. *Experimental Neurology*, *265*, 48–58.

Yang, X., Yao, C., Tian, T., Li, X., Yan, H., Wu, J., Li, H., Pei, L., Liu, D., Tian, Q., Zhu, L. Q., & Lu, Y. (2018). A novel mechanism of memory loss in Alzheimer's disease mice via the degeneration of entorhinal-CA1 synapses. *Molecular Psychiatry*, *23*(2), 199–210.

Yasuda, M., Maeda, K., Kakigi, T., Minamitani, N. I., Kawaguchii, T., & Tanaka, C. (1995). Low Cerebrospinal Fluid Concentrations of Peptide Histidine Valine and Somatostatin-28 in Alzheimer's Disease : Altered Processing of Prepro-Vasoactive Intestinal Peptide and Prepro-Somatostatin. *Neuropeptides*, *29*, 325–330.

Ye, S., Huang, Y., Müllendorff, K., Dong, L., Giedt, G., Meng, E. C., Cohen, F. E., Kuntz, I. D., Weisgraber, K. H., & Mahley, R. W. (2005). Apolipoprotein (apo) E4 enhances amyloid β peptide production in cultured neuronal cells: ApoE structure as a potential therapeutic target. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(51), 18700–18705.

Zhang, B., Veasey, S. C., Wood, M. A., Leng, L. Z., Kaminski, C., Leight, S., Abel, T., Lee, V. M. Y., & Trojanowski, J. Q. (2005). Impaired rapid eye movement sleep in the Tg2576 APP murine model of Alzheimer's disease with injury to pedunculopontine cholinergic neurons. *American Journal of Pathology*, *167*(5), 1361–1369.

Zhang, T. Y., Keown, C. L., Wen, X., Li, J., Vousden, D. A., Anacker, C., Bhattacharyya, U., Ryan, R., Diorio, J., O'Toole, N., Lerch, J. P., Mukamel, E. A., & Meaney, M. J. (2018). Environmental enrichment increases transcriptional and epigenetic differentiation between mouse dorsal and ventral dentate gyrus. *Nature Communications*, *9*(1), 1–11.

Zou, G., Su, J., Jiang, Z., Chen, K., Zeng, Z., Zhang, L., Li, C. Q., & Li, F. (2022). Environmental enrichment ameliorates high-fat diet induced olfactory deficit and decrease of parvalbumin neurons in the olfactory bulb in mice. *Brain Research Bulletin*, *179*, 13–24.

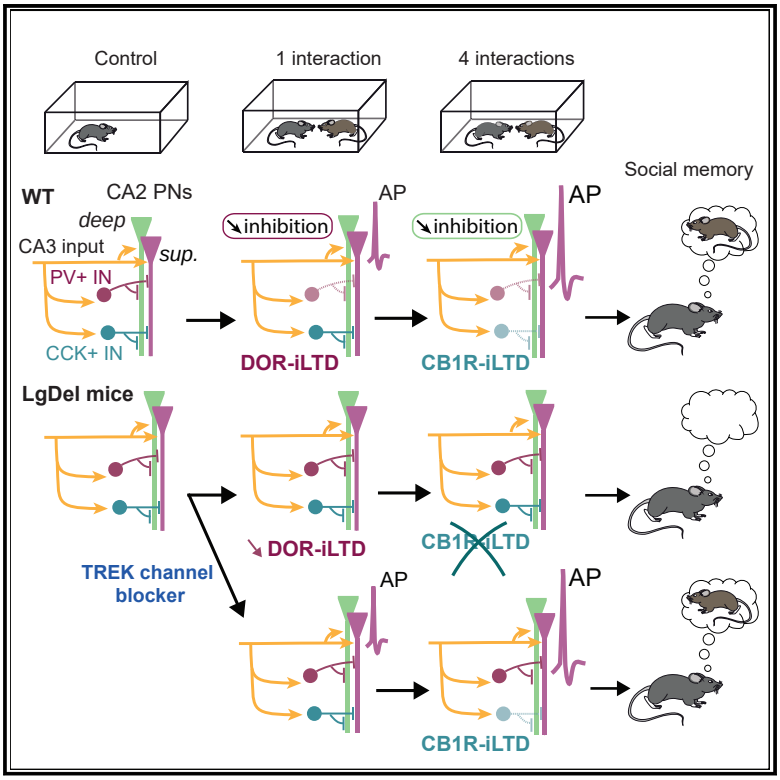
# ANNEXES

Neuron

Article

# Sequential inhibitory plasticities in hippocampal area CA2 and social memory formation

## Graphical abstract




## Highlights

- CB1R induces a long-term depression at inhibitory synapses in hippocampal area CA2
- CB1R-LTD induction requires action potential firing in CA2 pyramidal neurons
- CB1R-LTD is induced by social interactions and is required for social memory
- CB1R-LTD is impaired in the 22q11.2 mouse model of schizophrenia

## Authors

Maïthé Loisy, Guillaume Bouisset, Sébastien Lopez, ..., Rebecca Ann Piskorowski, Laure Verret, Vivien Chevaleyre

## Correspondence

vivien.chevaleyre@u-paris.fr

## In brief

Social recognition is important for gregarious animals. In this issue of *Neuron*, Loisy et al. describe a plasticity induced by CB1R that contributes to social memory formation. This plasticity is impaired in a mouse model of schizophrenia but is rescued by manipulation that rescues social memory in these mice.

Loisy et al., 2022, Neuron *110*, 1–13
September 7, 2022 © 2022 Elsevier Inc.
https://doi.org/10.1016/j.neuron.2022.06.013

CellPress

Please cite this article in press as: Loisy et al., Sequential inhibitory plasticities in hippocampal area CA2 and social memory formation, Neuron (2022), https://doi.org/10.1016/j.neuron.2022.06.013

Neuron

CellPress

Article

# Sequential inhibitory plasticities in hippocampal area CA2 and social memory formation

Maïthé Loisy,[1] Guillaume Bouisset,[3] Sébastien Lopez,[3] Maud Muller,[1] Alena Spitsyn,[1] Jeanne Duval,[1] Rebecca Ann Piskorowski,[1,2] Laure Verret,[3] and Vivien Chevaleyre[1,2,4,*]

[1]Université Paris Cité, INSERM U1266, Institute of Psychiatry and Neuroscience of Paris, 75014 Paris, France
[2]GHU Paris Psychiatrie et Neurosciences, France
[3]Research Center on Animal Cognition, Center for Integrative Biology, Toulouse University, CNRS, UPS, 31062 Toulouse, France
[4]Lead contact
*Correspondence: vivien.chevaleyre@u-paris.fr
https://doi.org/10.1016/j.neuron.2022.06.013

## SUMMARY

Area CA2 is a critical region for diverse hippocampal functions including social recognition memory. This region has unique properties and connectivity. Notably, intra-hippocampal excitatory inputs to CA2 lack canonical long-term plasticity, but inhibitory transmission expresses a long-term depression mediated by Delta-opioid receptors (DOR-iLTDs). Evidence indicates that DOR-iLTDs are insufficient to underlie social coding. Here, we report a novel inhibitory plasticity mediated by cannabinoid type 1 receptor activation (CB1R-iLTD). Surprisingly, CB1R-iLTD requires previous induction of DOR-iLTDs, indicating a permissive role for DOR plasticity. Blockade of CB1Rs in CA2 completely prevents social memory formation. Furthermore, the sequentiality of DOR- and CB1R-mediated plasticity occurs *in vivo* during successive social interactions. Finally, CB1R-iLTD is altered in a mouse model of schizophrenia with impaired social cognition but is rescued by a manipulation that also rescues social memory. Altogether, our data reveal a unique interplay between two inhibitory plasticities and a novel mechanism for social memory formation.

## INTRODUCTION

The hippocampus is a critical structure for episodic memory formation, and much is known about many of the cellular properties underlying spatial encoding (Mehta, 2015). Lesioning studies have shown that area CA2 is a critical region for social memory formation (Stevenson and Caldwell, 2014; Hitti and Siegelbaum, 2014). Furthermore, increasing vasopressin release in area CA2 during social interaction strongly enhanced the duration of social memory (Smith et al., 2016). Because intra-hippocampal excitatory inputs between CA3 and CA2 do not express long-term plasticity under basal conditions (Chevaleyre and Siegelbaum, 2010; Zhao et al., 2007), it was proposed that plasticity of inhibitory transmission could contribute to memory formation. Indeed, inhibitory transmission from parvalbumin-expressing interneurons (PV+ INs) in area CA2 expresses a unique long-term depression (iLTD) mediated by Delta-opioid receptor (DOR) activation (Piskorowski and Chevaleyre, 2013a). This plasticity emerges during adolescence parallel with the emergence of social memory (Domínguez et al., 2019). Furthermore, pharmacological blockade of DORs (Leroy et al., 2017) or down-regulation of DOR expression (Domínguez et al., 2019) reduces social memory.

Area CA2 is particularly vulnerable in the context of psychiatric disease. Human postmortem studies of schizophrenic and bipolar patients have reported a decrease in PV+ INs specifically in hippocampal area CA2 (Benes et al., 1998; Knable et al., 2004). There is also a decrease in PV+ IN density specifically in area CA2 in a mouse model of 22q11.2 deletion syndrome (DS) (Piskorowski et al., 2016), one of the highest genetic factors for developing schizophrenia (Karayiorgou et al., 2010). Social memory formation and DOR plasticity were strongly impaired in these mice (Piskorowski et al., 2016), suggesting that impairment in DOR plasticity might underlie deficits in social memory in psychiatric disorders. In this study, we provide evidence that DOR plasticity is permissive for the induction of another inhibitory plasticity mediated by cannabinoid type 1 receptors (CB1Rs). We further explore how this CB1R-mediated plasticity participates in social memory formation.

## RESULTS

### DOR-iLTD is permissive for CB1R-mediated plasticity

We hypothesized that following induction of DOR-iLTD in area CA2, the depression of the PV-CA2 PN (pyramidal neuron) synapses may allow the expression of a secondary synaptic

Please cite this article in press as: Loisy et al., Sequential inhibitory plasticities in hippocampal area CA2 and social memory formation, Neuron (2022), https://doi.org/10.1016/j.neuron.2022.06.013



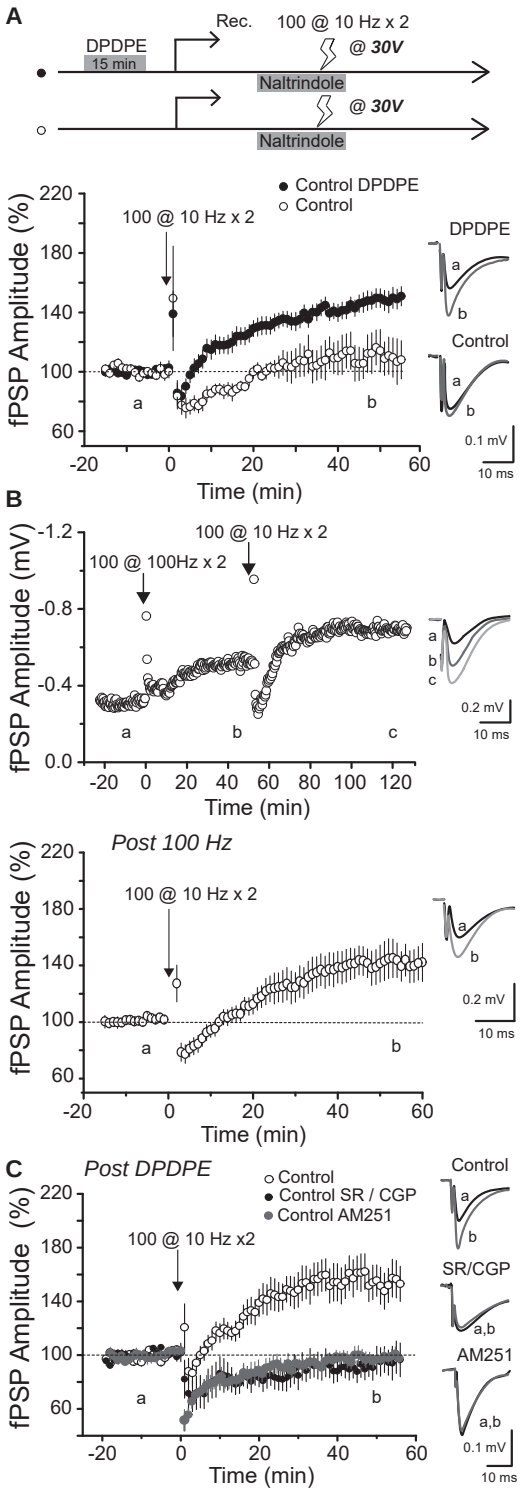



**Figure 1. DOR-mediated plasticity is permissive for CB1R-mediated plasticity**

(A) Top: diagram illustrating the experimental protocol. Before undergoing the recording protocol, slices were incubated in artificial cerebral spinal fluid (ACSF) with or without the delta opioid receptor (DOR) agonist DPDPE (0.5 μM) for 20 min. A 10 Hz stimulation (100 pulses at 10 Hz repeated twice) was applied to induce plasticity in the presence of the DOR antagonist Naltrindole (0.1 μM). The stimulus intensity was increased to 30V only during the 10 Hz stimulation. Bottom: time course of normalized fPSP amplitude with prior DPDPE incubation (filled circles, n = 18, p = 8.2 $10^{-7}$) or in control (open circles, n = 7, p = 0.348). Right: averaged sample fPSP traces corresponding to the time points before (a) and after (b) 10 Hz stimulation.

(B) Top: representative experiment of CA3-CA2 fPSP amplitude in which DOR-mediated plasticity was induced with a high frequency stimulation (HFS; 100 pulses at 100 Hz repeated twice) and then a 10 Hz stimulation protocol was provided (at 30V). Bottom: summary graph showing the effect of the 10 Hz stimulation provided 50–60 min after the 100 Hz stimulation (n = 11, p = 6.7 $10^{-4}$). Right: averaged fPSP traces.

(C) Summary graph of normalized CA3-CA2 fPSP recorded before and after a 10 Hz stimulation at 30V. The increase in fPSP in control (open circles, n = 13, p = 2.4 $10^{-4}$) was blocked by $GABA_{A/B}$ receptor blockers SR95531 (1 μM)/CGP55845 (2 μM; black-filled circles, n = 5, p = 0.64) and by the CB1R inverse agonist AM251 (4 μM; gray-filled circles, n = 5, p = 0.75). Right: averaged fPSP traces. Error bars denote SEM See also Figure S1.

plasticity. We found that following a 20-min incubation of hippocampal slices in the DOR agonist DPDPE, delivery of an electrical stimulation of CA3 inputs (2 trains of 100 pulses at 10 Hz at 20V–30V stimulus intensity) evoked a lasting increase in the field post synaptic potential (fPSP) amplitude in CA2 (Figure 1A; 147.0% ± 6.0%, n = 18, p = 8.2 $10^{-7}$). When slices were not incubated in DPDPE, no significant increase in fPSP was observed following a 10 Hz stimulation (Figure 1A; 109.8% ± 9.6%, n = 7, p = 0.348). The 10 Hz stimulation was performed in the presence of the DOR antagonist Naltrindole, indicating that the lasting increase is not due to further DOR activation. Accordingly, a 10 Hz stimulation provided after DPDPE incubation had an identical effect whether it was provided with or without Naltrindole (Figure S1). This result suggests that DOR-iLTD is permissive for another plasticity.

Next, we predicted that this plasticity will be present following a 100 Hz electrical stimulation, a protocol that is also effective to evoke DOR-iLTD (Piskorowski and Chevaleyre, 2013a). In basal conditions, CA3 excitatory inputs do not express long term potentiation (LTP) in area CA2, and the increase in fEPSP amplitude induced by DOR activation is entirely dependent on DOR-iLTD (Nasrallah et al., 2015). Induction of DOR-iLTD with a 100 Hz electrical stimulation resulted in a long-term increase in the fPSP amplitude (Figure 1B; 130.3% ± 1.4%, n = 11, p = 6.7 $10^{-4}$). In the same slices, we observed a further increase in the fPSP amplitude following a 10 Hz stimulation at 30V (Figure 1B; 40.8% ± 10.7%, n = 11, p = 9.77 $10^{-4}$) that was not different from that induced by a 10 Hz stimulation after incubation in DPDPE (p = 0.62).

We next wondered whether the second increase in fPSP amplitude is due to LTP of excitatory transmission or is caused by further LTD at inhibitory synapses. In the presence of $GABA_{A/B}$ receptor (GABAR) blockers (SR95531/CGP55845) the 10 Hz protocol did not result in any lasting increase in the fPSP amplitude (Figure 1C; 96.3% ± 11.1%, n = 5, p = 0.64), in contrast to interleaved control experiments (Figure 1C; 159.3% ± 12.7%, n = 13, p = 2.4 $10^{-4}$). We thus conclude that the increase in fPSP amplitude following a 10 Hz stimulation is entirely dependent on a change in inhibitory transmission.

In area CA1, inhibitory transmission undergoes an iLTD that depends on cannabinoid type 1 receptor (CB1R) activation (Chevaleyre and Castillo, 2003). We found that in the presence of the

Please cite this article in press as: Loisy et al., Sequential inhibitory plasticities in hippocampal area CA2 and social memory formation, Neuron (2022), https://doi.org/10.1016/j.neuron.2022.06.013



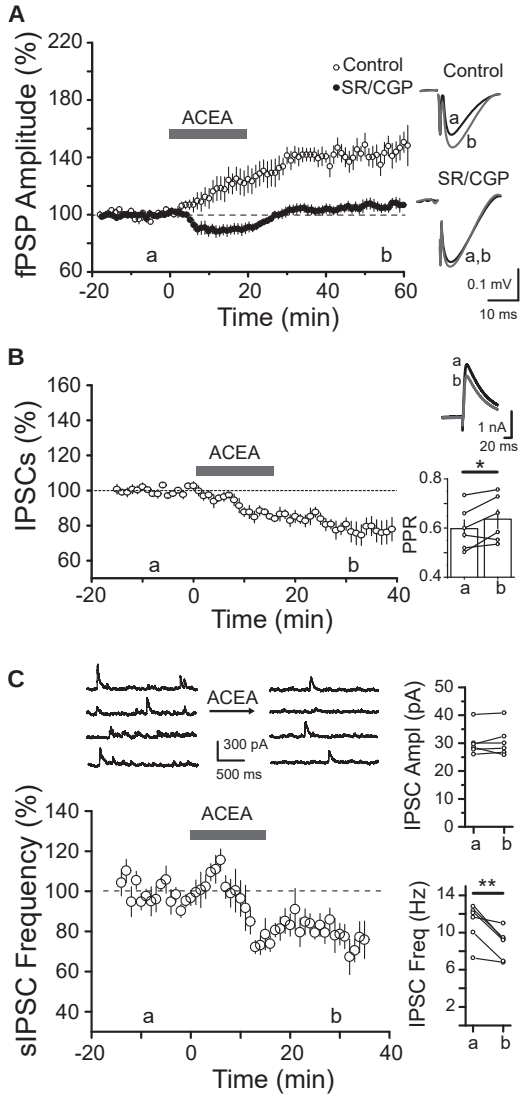



**Figure 2. Activation of CB1Rs decreases GABA release and disinhibits CA3-CA2 excitatory transmission**

(A) Summary graph of normalized CA3-CA2 fPSP amplitude before and after application of the CB1R agonist ACEA (15 μM) in control (open circles, n = 6, p = 6.8 $10^{-4}$) and in presence of $GABA_{A/B}$ receptor blockers (SR95531/CGP55845; filled circles, n = 10, p = 0.353). Right: averaged fPSP traces corresponding to the time points before (a) and after (b) ACEA application.

(B) Summary graph showing the effect of ACEA on IPSC amplitude in the presence of AMPA/NMDA receptor blockers (NBQX/AP-V, 10 and 25 μM respectively, n = 6, p = 0.009). Top right: averaged IPSC traces. Bottom right: the paired-pulse ratio (PPR) for individual experiments before (a) and after (b) ACEA application. Cells were held at +10 mV throughout the experiment.

(C) Top: example traces of spontaneous IPSCs (sIPSCs) recorded in a CA2 PN before and after application of ACEA. Bottom: summary graph of sIPSC frequency during application of ACEA. Right: ACEA induced a significant decrease in sIPSC frequency (n = 6, p = 0.031) but did not affect sIPSC amplitude (n = 6, p = 0.92). Error bars denote SEM.

CB1R inverse agonist AM251, the 10 Hz protocol in CA2 did not result in any lasting change in fPSP amplitude (Figure 1C; 98.3% ± 4.0%, n = 5, p = 0.75). Altogether, these data show that DOR-mediated plasticity is permissive for the induction of a secondary inhibitory plasticity that requires CB1R activation.

## Activation of CB1R induces an iLTD and a disinhibition of CA3-CA2 excitatory transmission

If CB1R activation modulates inhibitory transmission in area CA2, application of a CB1R agonist should result in an increase in the fPSP amplitude. We found that a transient application of the CB1R agonist ACEA induced a lasting increase in the fPSP amplitude (Figure 2A; 144.5% ± 5.5%, n = 6, p = 6.8 $10^{-4}$). This increase was entirely mediated through a decrease in inhibitory transmission because it was prevented by GABAR blockers (Figure 2A; 104.6% ± 5.0%, n = 10, p = 0.353).

Next, we performed whole-cell voltage-clamp recording to monitor inhibitory post synaptic potentials (IPSCs) at +10 mV in the presence of AMPA/NMDA receptor blockers (D-AP5 and NBQX). Application of ACEA induced a lasting decrease in IPSC amplitude (Figure 2B; 78.5% ± 5.3%, n = 6, p = 0.009). In the hippocampus, CB1Rs are mostly expressed at GABAergic terminals where they act to decrease neurotransmitter release (Chevaleyre et al., 2006). Accordingly, ACEA application resulted in a significant increase in the paired-pulse ratio (PPR) of two successive IPSCs, a measure inversely correlated with release probability (Figure 2B; from 0.60 ± 0.04 to 0.64 ± 0.04, n = 6, p = 0.043). In addition, ACEA application also induced a decrease in spontaneous IPSC frequency (Figure 2C; 80.7% ± 4.4%; from 10.98 ± 0.83 to 8.78 ± 0.66 Hz, n = 6, p = 0.031) but did not change their amplitude (from 30.4 ± 2.1 to 30.7 ± 2.3 pA, n = 6, p = 0.92). These data are consistent with the presynaptic location of CB1Rs and indicate that CB1R activation induces a decrease in GABA release probability.

## CA2 PN action potential firing is necessary and sufficient to induce CB1R plasticity

Next, we investigated potential cellular mechanisms involved in the induction of CB1R-mediated plasticity in area CA2. We found that while the 10 Hz stimulation protocol at 30V was efficient to trigger a lasting increase in fPSP amplitude (Figure 3A; 136.8% ± 2.8%, n = 8, p = 7.96 $10^{-6}$), the same stimulation at 10V had little effect (Figure 3A; 109.5% ± 3.6% of baseline, n = 7, p = 0.032). Furthermore, in contrast to DOR-iLTD that can be induced with a 100 Hz stimulus, a 100 Hz stimulation failed to induce any significant increase in fPSP amplitude following DPDPE incubation (Figures S2A and S2B; 106.8% ± 5.4%, n = 5, p = 0.28). Likewise, a 1 Hz stimulation protocol did not trigger any significant increase in fPSP amplitude (Figures S2A and S2B; 104.5% ± 3.3%, n = 5, p = 0.18). One possible explanation for these findings is that CB1R plasticity may require CA2 PNs to fire action potentials (APs) for induction. Indeed, CA3 inputs do not evoke APs in CA2 PNs in basal conditions (Piskorowski and Chevaleyre, 2013b), but they do following DOR-iLTD (Nasrallah et al., 2015).

Thus, we tested whether AP firing by CA2 PNs was sufficient to evoke this plasticity using whole-cell recording of PNs. We monitored the depolarizing component of the CA3-CA2 PSPs at −70 mV and then evoked APs directly in the recorded cell with injected current steps at 10 Hz. This protocol evoked a large and lasting increase in the depolarizing component of the

Please cite this article in press as: Loisy et al., Sequential inhibitory plasticities in hippocampal area CA2 and social memory formation, Neuron (2022), https://doi.org/10.1016/j.neuron.2022.06.013



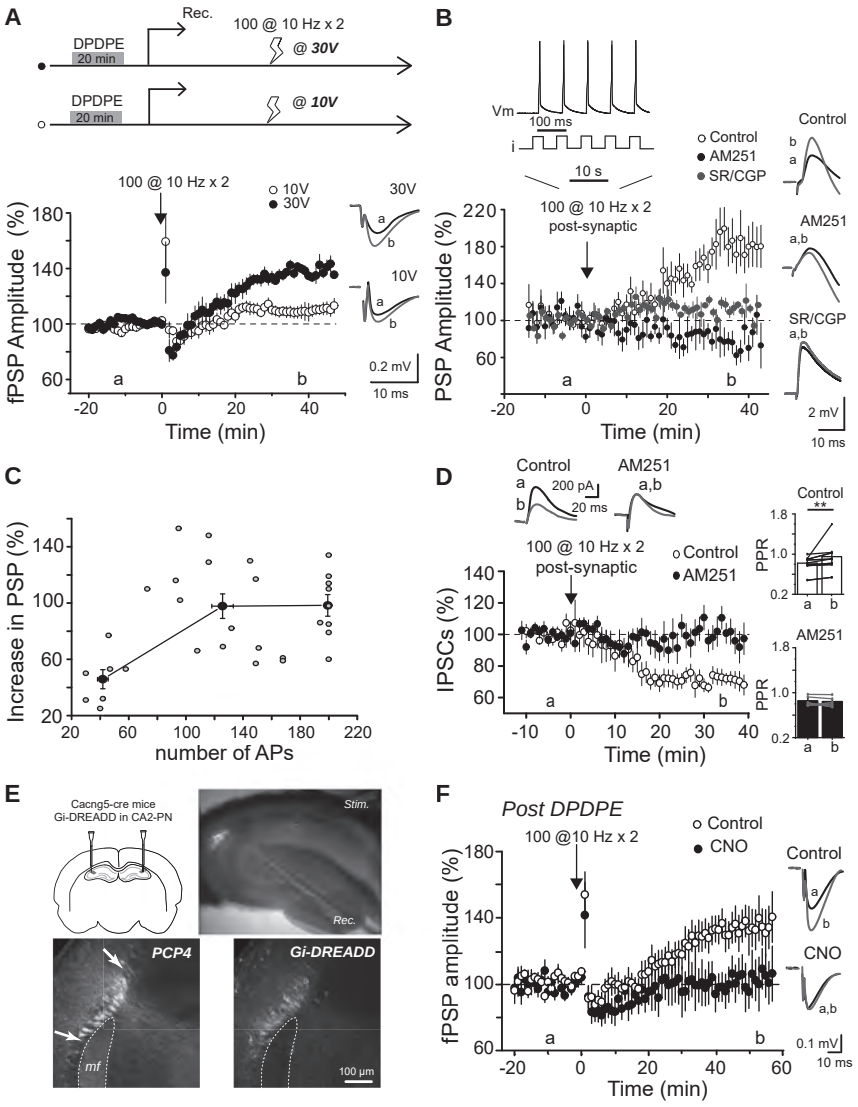



**Figure 3. CA2 PN AP firing is sufficient to induce CB1R-mediated plasticity**

(A) Top: diagram illustrating the experimental protocol. Bottom: summary graph of normalized CA3-CA2 fPSP before and after 10 Hz stimulation at 30V (filled circles, n = 8, p = 7.96 $10^{-6}$) and at 10V (open circles, n = 7, p = 0.032). Right: averaged fPSP example traces corresponding to the time points before (a) and after (b) 10 Hz stimulation.

(B) Summary graph of normalized CA3-CA2 PSP amplitude recorded in whole-cell current-clamp configuration before and after a post-synaptic 10 Hz stimulation (100 depolarizing steps of 7 ms provided at 10 Hz, repeated twice). APs induced by the 10 Hz stimulation provide a lasting increase in PSP (open circles, n = 18, 0.013) that was blocked by AM251 (filled circles, n = 10, p = 0.346) and by GABAA/B receptor blockers (SR95531/CGP55845; gray-filled circles, n = 6, p = 0.09). Right: averaged PSP traces. Cells were held at −70 mV throughout the experiment.

(C) Graph showing the magnitude of increase in the PSP amplitude (percentage of increase from baseline) plotted as a function of AP number induced by post-synaptic 10 Hz stimulation (n = 7, p = 5.1 $10^{-4}$).

(D) Top: averaged IPSC traces. Bottom: summary graph showing the effect of post-synaptic 10 Hz stimulation on IPSC amplitude in control (open circles, n = 8, p = 3.16 $10^{-4}$) and in presence of AM251 (filled circles, n = 5, p = 0.968). Right: PPR for individual experiments before (a) and after (b) 10 Hz stimulation. Cells were held at −70 mV throughout the experiment.

(E) Cacng5-cre mice were injected in CA2 with AAV allowing cre-dependent expression of Gi-DREADD-mCherry. The recorded hippocampal slice shows fluorescence in area CA2. This panel also shows confocal image of the same slice after staining for PCP4 and mCherry. Scale bar is 100 µm.

(F) Summary graph of normalized CA3-CA2 fPSP amplitude before and after 10 Hz stimulation provided in absence of CNO (open circles, n = 8, p = 0.0078) or in presence of CNO (10 µM; filled circles, n = 7, p = 0.86). Right: averaged fPSP example traces. Error bars denote SEM in all panels. See also Figure S2.

EPSP-IPSP sequence (Figure 3B; 176.2% ± 17.1%, n = 18, p = 0.0013). This increase was dependent on inhibitory transmission because it was blocked by GABAR blockers (Figure 3B; 115.0% ± 7.35%, n = 6, p = 0.09). It was also dependent on CB1R activation because it was prevented by AM251 (Figure 3B; 90.8% ± 12.4%, n = 10, p = 0.346). These experiments were performed without prior DOR-iLTD induction, demonstrating that AP firing alone is sufficient to induce CB1R plasticity. Then, we plotted the number of APs that were evoked during the induction protocol versus the percentage of plasticity. We found that a significant increase of PSP amplitude was induced with 30–60 APs (Figure 3C; 45.8% ± 6.8%, n = 7, p = 5.1 $10^{-4}$). Increasing the number of APs increased the magnitude of the plasticity with an apparent plateau at ~100 APs (97.8% ± 8.7%), resulting in an increase in PSP amplitude similar to that evoked with 200 APs (98.3% ± 7.7%).

To directly measure changes in inhibitory transmission, we recorded IPSC amplitude at −70 mV. In order to induce CB1R-iLTD, we transiently switched to current clamp during the induction protocol to evoke APs. We found that 10 Hz AP firing in the PN induced an LTD of IPSC amplitude (Figure 3D; 70.9% ± 4.2%, n = 8, p = 3.16 $10^{-4}$) that was prevented by AM251 (99.8% ± 7.7%, n = 5, p = 0.968). Furthermore, iLTD induction resulted in a significant increase in the PPR of two successive IPSCs (Figure 3D; from 0.82 ± 0.05 to 0.95 ± 0.11, n = 8, p = 0.0078) that was prevented by AM251 (Figure 3C; from 0.85 ± 0.04 to 0.84 ± 0.04, n = 5, p = 0.84).

These experiments show that AP firing in CA2 PNs is sufficient to induce CB1R-iLTD. The CB1R plasticity likely relies on the ability of DOR-iLTD to reveal AP firing in PNs upon CA3 input stimulation. To directly address this, we performed two experiments. First, we performed whole-cell recording and prevented

Please cite this article in press as: Loisy et al., Sequential inhibitory plasticities in hippocampal area CA2 and social memory formation, Neuron (2022), https://doi.org/10.1016/j.neuron.2022.06.013





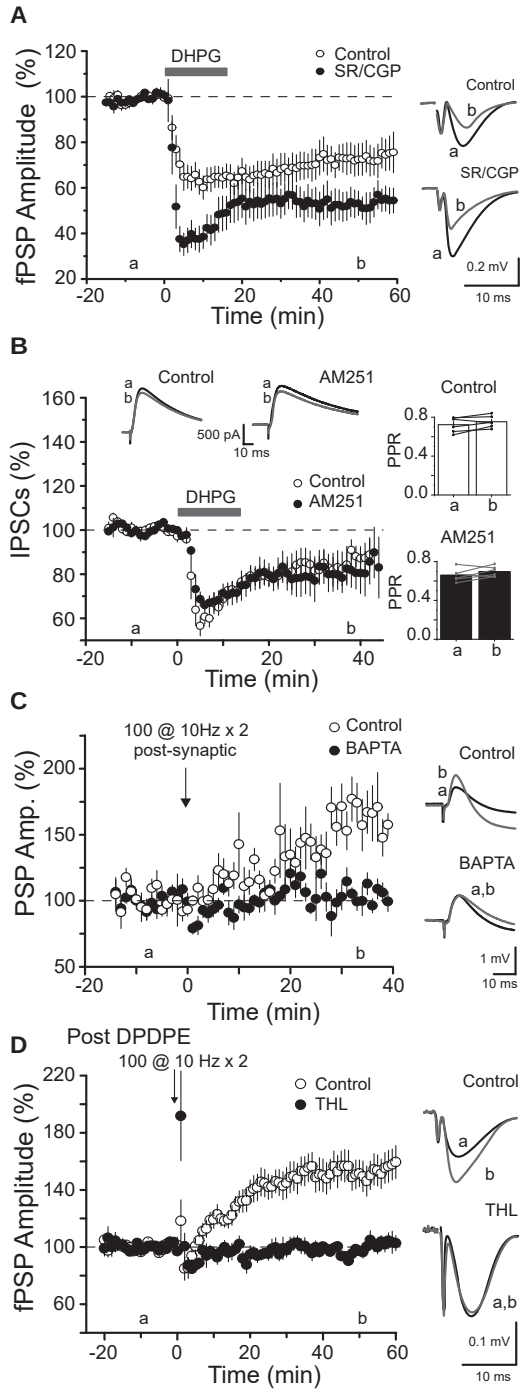



**Figure 4. eCB release in area CA2 depends on $Ca^{2+}$ increase and DAG-L but not on mGluR-I activation**

(A) Summary graph of normalized CA3-CA2 fPSP amplitude showing the effect of a 10 min application of mGluR-1 receptor agonist DHPG (50 μM) in the presence of GABAR blockers (SR95531/CGP55845; filled circles, n = 6, n = 3.98 $10^{-4}$) or in control condition (open circles, n = 9, p = 0.0046). Right: averaged sample fPSP traces corresponding to the time points before (a) and after (b) DHPG application.

(B) Summary graph of IPSCs recorded in the presence of AMPA and NMDA receptor blockers showing the effect of DHPG application in control conditions (open circles, n = 6, p = 0.058) or in presence of AM251 (filled circles, n = 6, p = 0.05). Top: averaged IPSC traces. Right: PPR for individual experiments before (a) and after (b) DHPG application. Cells were held at +10 mV throughout the experiment.

(C) Summary graph of normalized CA3-CA2 PSP recorded in whole-cell before and after a post-synaptic stimulation. APs induced by the 10 Hz stimulation led to a lasting increase in PSP amplitude (open circles, n = 11, p = 2.8 $10^{-4}$) in control but not with intracellular BAPTA (20 mM) (filled circles, n = 7, p = 0.146). Right: averaged PSP traces. Cells were held at −70 mV throughout the experiment.

(D) Summary graph of normalized CA3-CA2 fPSP before and after a 10 Hz electrical stimulation. Stimulation induced a lasting increase in fPSP in control conditions (open circles, n = 16, p = 3.05 $10^{-5}$) but not in the presence of the DAG-L inhibitor THL (10 μM; filled circles, n = 7, p = 0.939). Right: averaged fPSP traces. Error bars indicate the SEM in all panels. See also Figure S3.

AP firing by injecting hyperpolarizing current during the 10 Hz stimulation of CA3 inputs. We simultaneously recorded the fPSP to ensure that the disinhibitory plasticity was induced. We observed no plasticity in the absence of AP firing (Figures S2C and S2D, 104% ± 16.6%, n = 10, p = 0.74) even with plasticity present in the same slice (Figure S2D, 137.1% ± 8.8%, n = 10, p = 0.002). Next, we expressed inhibitory DREADDs in CA2 PNs using the CACNG5-cre mouse line (Boehringer et al., 2017). In slices incubated in DPDPE, a 10 Hz stimulation of CA3 inputs after application of clozapine N-oxide (CNO) did not induce any plasticity (Figures 3E and 3F; 102.2% ± 13.4%, n = 7, p = 0.86), in contrast to 10 Hz stimulation in slices expressing DREADDs but without CNO application (133.9% ± 10.9%, n = 8, p = 0.0078). Altogether, these results show that AP firing in CA2 PNs is necessary and sufficient to evoke CB1R-iLTD.

## CB1R-mediated plasticity depends on calcium increase in PNs and diacylglycerol lipase activation but not on mGluR-I activation

In area CA1, CB1R-iLTD is induced after SC stimulation by activation of group I metabotropic glutamate receptors (mGluR-Is) that trigger the release of the endocannabinoid (eCB) 2-arachidonoylglycerol (2-AG) independently of intracellular [$Ca^{2+}$] (Chevaleyre and Castillo, 2003). To determine if a similar mechanism is present in CA2 PNs, we looked at the effect of the mGluR-I agonist DHPG on fPSPs. When GABARs were blocked, DHPG induced a large and long-lasting depression of the fEPSP (Figure 4A; 53.7% ± 5.6%, n = 6, p = 3.98 $10^{-4}$). When DHPG was applied in slices with intact inhibitory transmission, the depression of the fPSP was smaller (Figure 4A; 75.6% ± 6.3%, n = 9, p = 0.0046), suggesting that inhibitory transmission might also be decreased by DHPG. Therefore, we directly monitored IPSCs at +10 mV and tested the effect of DHPG. DHPG application induced a transient decrease of the IPSC amplitude followed by a smaller but lasting depression (Figure 4B; 83.3% ± 6.72%, n = 6, p = 0.058). In the presence of AM251, DHPG application induced a similar depression of the IPSCs (Figure 4B; 81.3% ± 7.3%, n = 6, p = 0.050). In both conditions, DHPG induced a non-significant increase in the PPR (control: from 0.72 ± 0.03 to 0.75 ± 0.02, n = 6, p = 0.138; in AM251: from 0.66 ± 0.03 to 0.70 ± 0.02, n = 6, p = 0.169). These data show that mGluR-I activation decreases inhibitory transmission in

Please cite this article in press as: Loisy et al., Sequential inhibitory plasticities in hippocampal area CA2 and social memory formation, Neuron (2022), https://doi.org/10.1016/j.neuron.2022.06.013



area CA2 but in a CB1R-independent manner. We also tested whether 10 Hz-induced CB1R plasticity is altered after blocking all mGluRs. We found that in the presence of CPPG and MCPG, the magnitude of the plasticity was identical to that observed in control experiments (Figure S3A, 158.9% ± 6.7%, n = 5, p = 0.001). Therefore, in area CA2, mGluRs are likely not required for CB1R-mediated plasticity.

Next, we tested whether CB1-plasticity is altered after chelating $Ca^{2+}$ in CA2 PNs. With BAPTA in the recording pipette, the induction of the disinhibitory increase in PSP amplitude by post-synaptic 10 Hz stimulation was completely abolished (Figure 4C; 107.1% ± 4.5%, n = 7, p = 0.146), while an increase in PSP was observed in interleaved recordings without BAPTA (Figure 4C; 165.7% ± 10.8%, n = 11, p = 2.8 $10^{-4}$). Altogether, these results support the conclusion that an increase in intracellular [$Ca^{2+}$] during AP firing is a requirement for CB1R-iLTD induction, likely leading to eCB release.

In area CA1, eCB release after CA3 input stimulation is extremely localized, giving this plasticity an input specificity. Because eCB release in area CA2 requires AP-induced increase in intracellular [$Ca^{2+}$], it is possible that in CA2, CB1R-iLTD will not be input specific. To test this, we placed two stimulation pipettes in stratum radiatum (SR) ~200 μm apart from each other (Figure S3B) and verified that the two stimulated pathways were independent. We evoked PSPs from both inputs before and after delivering a 10 Hz stimulation to only one pathway. The 10 Hz stimulation protocol resulted in a large increase in fPSP amplitude in the pathway where it was delivered (Figures S3B and S3C; 139.5% ± 5.2%, n = 7, p = 3.1 $10^{-4}$), as well as in the other pathway that did not undergo the induction protocol (Figures S3B and S3C; 142.0% ± 9.4%, n = 7, p = 0.0028). This result shows that in contrast to CA1 PNs, expression of CB1R-iLTD in CA2 PNs is not input specific.

We then wanted to determine which eCB is involved in CB1R plasticity in area CA2. In area CA1, both iLTD and the short-term decrease in inhibitory transmission have been ascribed to the release of 2-AG. We found that when the diacylglycerol lipase (DAG-L) inhibitor tetrahydrolipstatin (THL) was applied to slices, a 10 Hz stimulation did not induce any lasting increase in fPSP amplitude (Figure 4D; 100.4% ± 3.3%, n = 7, p = 0.939), in contrast to interleaved controls (157.2% ± 10.6%, n = 16, p = 3.05 $10^{-5}$). Therefore, we conclude that 2-AG is likely the eCB released during the plasticity in area CA2.

## CB1R-iLTD targets CCK+ interneurons and increases AP firing in deep CA2 PNs

In order to examine how AP firing is altered in area CA2 following CB1R-iLTD, we performed extracellular recordings to monitor population spikes (PSs) in the pyramidal layer of CA2. We observed a PS after CA2 slices were incubated in DPDPE. The PS amplitude was increased further following a subsequent 10 Hz electrical stimulation (Figure 5A; at 30V: Stim 1: from 102.2 ± 16.4 to 226.1 ± 37.4 μV, n = 8, p = 0.009). Therefore, we conclude that the emergence of AP firing induced by DOR-iLTD at PV + INs can be further increased by induction of CB1R-iLTD.

Although DOR-iLTD is observed by whole-cell recording on all CA2 PNs, not all CA2 PNs are able to fire APs following DOR plasticity (Nasrallah et al., 2019). Therefore, we postulated that only cells that fire APs after DOR plasticity would express CB1R plasticity. To address this in a minimally invasive way, we performed cell-attached recordings to detect AP firing in response to CA3 input stimulation. We first induced DOR plasticity by applying DPDPE and measured AP firing probability. As expected, only a fraction of cells fired APs following DPDPE application (8 out of 15; Figure 5B). Then we applied a 10 Hz stimulation of CA3 inputs and again measured the AP firing probability. Consistent with our prediction, the cells that did not fire APs following DPDPE were unlikely to fire APs following the 10 Hz stimulation (Figure 5B; at 30V: Stim 1: from 0.021 ± 0.021 to 0.068 ± 0.046, n = 7, p = 0.5). However, the cells that fired APs after DOR activation showed a significant increase in AP firing probability following the 10 Hz stimulation (Figure 5B; at 30V: Stim 1: from 0.406 ± 0.084 to 0.716 ± 0.085, n = 8, p = 0.039).

Because we observed a fraction of CA2 PNs that fired APs following DPDPE application, we asked if these cells might have a preferential location. To answer this, we evoked DOR plasticity with DPDPE and then performed cell-attached recordings. Following the recording, we filled the cells with Alexa Fluor 594 Cadaverine and performed post hoc analysis of the somatic location with confocal imaging. Interestingly, the vast majority of PNs that fired APs after DOR plasticity were located in the superficial layer, closer to SR (13 out of 25), while only 1 out of 28 PNs in the deep layer (closer to SO) was firing APs (Figures 5C and 5D).

While deep PNs do not fire APs after DPDPE in response to two stimulations of CA3 input, it is still possible that they fire enough APs during the 10 Hz stimulation to express CB1R plasticity. With cell-attached recordings, we quantified the number of APs evoked during the 10 Hz stimulation. This stimulation evoked 162.9 ± 14.3 APs in superficial cells (Figure 5E; n = 14), but only 38.3 ± 18.6 APs in deep cells (n = 12). Therefore, it is likely that deep PNs express little or no CB1R plasticity after the 10 Hz protocol. We also quantified AP firing with the 100 Hz stimulation and found that both superficial and deep cells fired very few APs (respectively 15.2 ± 4.2, n = 25 and 4.1 ± 1.6 APs, n = 34), thus explaining why 100 Hz stimulation is not efficient to induce CB1R-mediated plasticity.

In the hippocampus, CB1Rs are expressed by cholecystokinin-expressing interneurons (CCK+ INs; Katona et al., 1999). To confirm that CCK+ INs are indeed targeted by CB1R plasticity, we made use of the fact that GABA release from PV+ and CCK+ INs is mediated by different voltage-activated calcium channels ($Ca_V$) (respectively P/Q and N-type) (Hefft and Jonas, 2005). We blocked N-type $Ca_V$ channels with ω-Conotoxin GVIA and then evoked CB1R plasticity with direct AP firing at 10 Hz to prevent plasticity induction failure due to a potential decrease in CA3 transmission. After blocking N-type channels, the 10 Hz protocol did not induce the CB1R plasticity (Figures S4A and S4C: 90.0% ± 11.5%, n = 6, p = 0.56), showing that CCK+ INs are likely the target of CB1R plasticity. Because PV+ and CCK+ INs can interact in CA1 (Dudok et al., 2021), we also wondered whether PV+ INs play a role in this plasticity. We used viral injection to express inhibitory DREADDs in a PV-cre mouse line. We found that silencing PV+ transmission with CNO did not affect the disinhibitory

Please cite this article in press as: Loisy et al., Sequential inhibitory plasticities in hippocampal area CA2 and social memory formation, Neuron (2022), https://doi.org/10.1016/j.neuron.2022.06.013



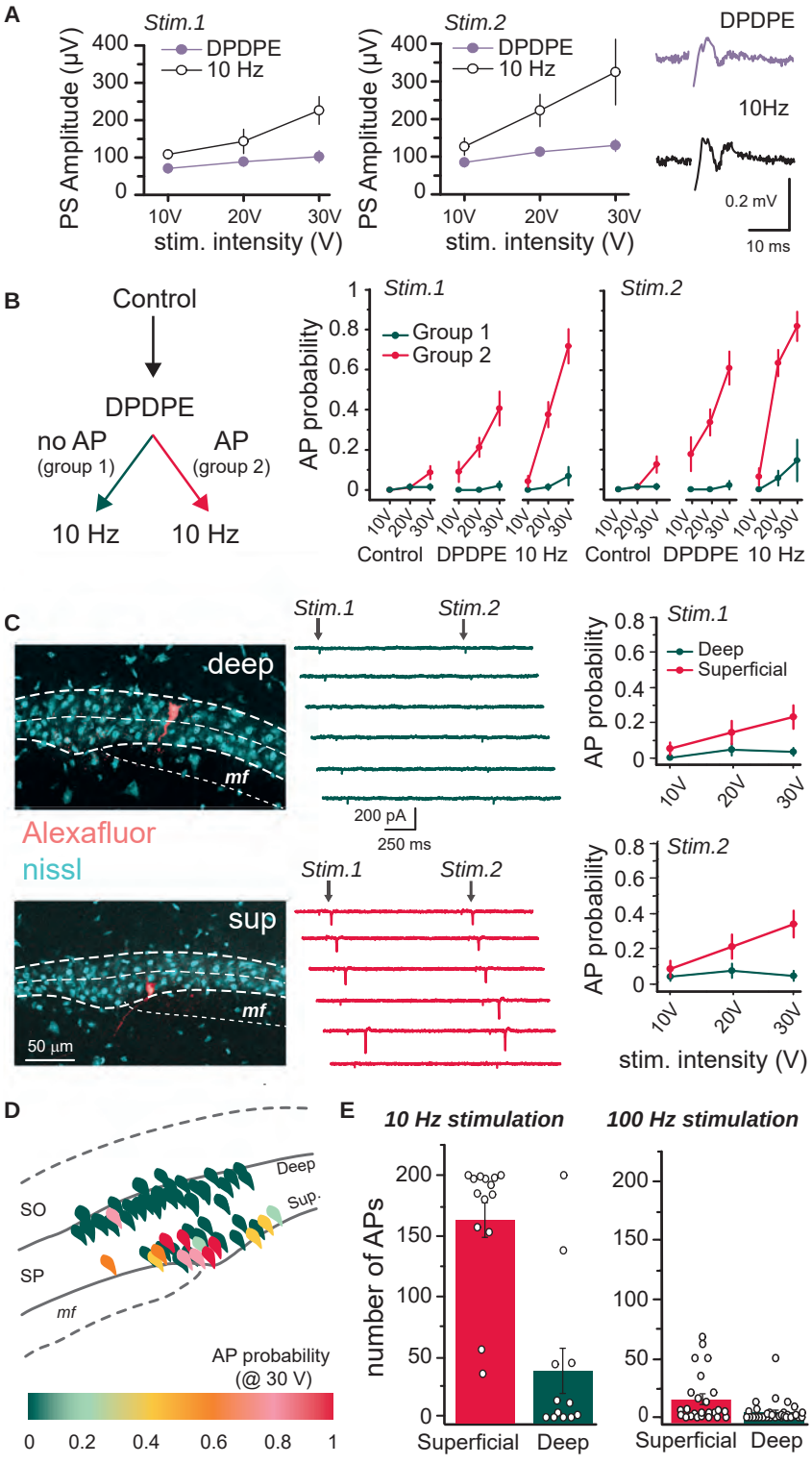



**Figure 5. CB1R-iLTD increases AP firing specifically in CA2 PNs that are firing APs after DOR-iLTD**

(A) Summary graphs of the population spike amplitude monitored in the somatic layer of area CA2 in response to a paired SC input stimulation after DPDPE application (0.5 μM; purple-filled circles, n = 8) and after 10 Hz stimulation (open circles, n = 8). Right: averaged PSP traces corresponding to the time points after DPDPE or 10 Hz stimulation.

(B) Left: diagram illustrating the experimental protocol. AP firing probability was quantified using cell-attached recordings of PNs in control condition, 20 min after DPDPE application, and 20 min after a 10 Hz stimulation of CA3 inputs. Right: summary graphs of AP firing probability in control, after DPDPE, and after 10 Hz stimulation.

(C) Left: sample image of Alexa Fluor-filled PNs located in the deep (top) and superficial (bottom) pyramidal layer. Middle: sample traces of cell-attached recordings following 2 stimulations of CA3 inputs after incubation in DPDPE for the cells shown on the left. Right: summary graph of the AP firing probability for deep PNs (green circles, n = 28) and superficial PNs (red circles, n = 25).

(D) Diagram showing the AP firing probability and location of PN soma.

(E) Summary graph of the number of APs induced by the 10 Hz stimulation in deep (n = 12) and superficial (n = 12) PNs, and number of APs induced by the 100 Hz stimulation in superficial (n = 24) and deep (n = 34) PNs. Error bars denote SEM. See also Figure S4.

plasticity induced by AP firing at 10 Hz (Figures S4B and S4C: 199.2% ± 13.7%, n = 5, p = 0.0019). Together, these experiments confirm that CCK+, but not PV+ INs, are the target of CB1R-mediated plasticity.

## CB1-plasticity is involved in social memory formation

Previous studies have suggested that DOR plasticity could be involved in social memory formation, a process dependent on area CA2 (Domínguez et al., 2019; Leroy et al., 2017). To determine if CB1R-iLTD may also play a role in social memory formation, we used several strategies. First, we bilaterally implanted cannulas in dorsal area CA2 (Figure 6A) and delivered either AM251 or vehicle just before the five-trial social memory test (Figure 6B). In mice injected with vehicle, a significant decrease in interaction time with the familiar mouse was observed during trials 2–4 (Figures 6C and 6D: n = 14, p = 0.0025 for trial 4). In contrast, mice injected with AM251 showed no decrease in interaction time on trials 2–4 as compared to trial 1 (Figures 6C and 6D; n = 14, p = 0.986 for trial 4). In both AM251 and vehicle-injected mice, exposure to a novel mouse during the 5th trial led to a level of interaction similar to that which occurred after the first exposure to a new mouse. On the next day, control mice displayed a reduced interaction time with the now-familiar mouse, indicating that social memory was lasting

Please cite this article in press as: Loisy et al., Sequential inhibitory plasticities in hippocampal area CA2 and social memory formation, Neuron (2022), https://doi.org/10.1016/j.neuron.2022.06.013



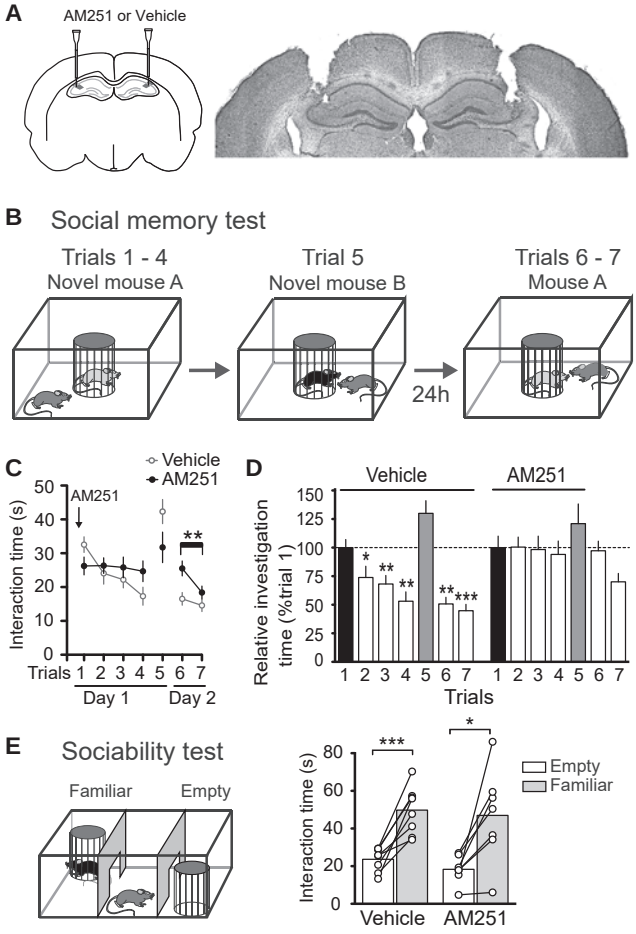



**Figure 6. CB1R blockade in area CA2 prevents social memory formation without altering sociability**

(A) Diagram illustrating the location of the canulae implantation and micrograph of a brain section confirming proper canulae placement.

(B) Social memory was assessed with the 5-trial test followed the next day by two exposures to the first mouse.

(C and D) Investigation times in mice infused with vehicle decreased significantly from trial 2 to 4 (n = 14, p = 0.0025) and remained decreased on the next day (trials 6–7). In contrast, no significant change in investigation time is observed across trials following AM251 infusion (n = 14, p = 0.968 at trial 4).

(E) Left: diagram of sociability test. Right: plot of interaction times for vehicle-infused control (n = 14, n = 0.0004) and animals infused with AM251 (n = 14, p = 0.0133). Error bars denote SEM See also Figure S5.

at least 24 h. Interestingly, the mice that had been perfused with AM251 the day before showed an interaction time during trial 6 similar to that of trial 1. However, a significant decrease in interaction was observed between trial 6 and 7 (p = 0.0013), suggesting that these mice, now devoid of CB1R blockade in area CA2, were able to form a social memory.

Next, we asked whether the deficit in social memory following AM251 injection could be due to compromised sociability. We found that both vehicle- and AM251-injected mice show a strong preference for a mouse versus an empty chamber (Figure 6E; p = 0.0004 for vehicle and p = 0.0133 for AM251). These data indicate that activation of CB1Rs plays a role in social memory formation, but not in sociability. It has been shown that ventral, but not dorsal, CA3 (Chiang et al., 2018) and CA1 (Meira et al., 2018) are involved in social memory formation. Therefore, it is unlikely that diffusion of AM251 in other dorsal hippocampal areas could explain the deficit in social memory. Accordingly, mice injected with AM251 in dorsal CA1 display a decrease in interaction time that is similar to that of vehicle-injected mice (Figure S5A: n = 7 for both groups, p = 0.06). Furthermore, the locomotion in either CA1 or CA2 AM251-injected mice was not altered compared to that of vehicle-injected mice (Figures S5B and S5C), indicating that lower exploratory activity could not explain the deficit in social memory. Altogether, these results indicate that activation of CB1Rs in area CA2 is required for social memory formation.

If CB1R-iLTD is required for social memory formation, this plasticity might be induced during social interaction. We performed the social memory protocol as before (trials 1–4), then sacrificed the mice 5 min after and studied inhibitory plasticity following social interaction (S.I.). Control mice underwent 4 exposures to the identical environment with no social interaction (Figure 7A). First, we found that the DOR-dependent increase in fPSP amplitude induced by a 100 Hz stimulation was reduced in S.I. mice (Figure 7B; 112.4% ± 5.6%, n = 8, p = 6.66 $10^{-4}$ with control mice) and normal in control mice (147.4% ± 5.9%, n = 9), indicating that DOR plasticity was partially occluded following S.I. Then, we examined if CB1R-mediated plasticity was also altered by S.I. We found that the plasticity induced by a 10 Hz stimulation was significantly smaller in S.I. mice (Figure 7C; 109.2% ± 6.1%, n = 11, p = 5.8 $10^{-4}$ with control mice) when compared to control mice (145.8% ± 6.1%, n = 8). To address whether the decrease in the 10 Hz-mediated plasticity was because of a reduced eCB release, we also tested the effect of ACEA. We found that the increase in fPSP amplitude after ACEA application was strongly reduced in S.I. mice (Figure 7D; 111.5% ± 5.2%, n = 9, versus 137.8% ± 8.1%, n = 9, p = 0.017 with control mice).

Then, we directly assessed whether CB1R-sensitive inhibitory transmission was reduced by the S.I. The effect of ACEA on IPSC amplitude in control mice (Figure 7E; 76.3% ± 3.5%, n = 10) was strongly reduced in S.I. mice (91.6% ± 4.0%, n = 8, p = 0.012 compared to control). If CB1R-iLTD were induced by the social memory protocol, we predicted that CA2 PNs would be more likely to fire APs upon CA3 input stimulation. Indeed, in slices from S.I. mice, CA3 stimulation led to a large PS (Figure 7F; n = 10) in contrast to slices from control mice (n = 8, p = 0.016). These results are consistent with the premise that both the DOR- and CB1R-mediated plasticities are induced during the behavioral protocol, leading to reduced inhibitory transmission recruited by CA3 input and to enhanced AP firing.

Our results in slices suggest sequentiality between DOR and CB1R plasticities. However, it is also possible that these two plasticities are evoked simultaneously *in vivo*. To address this, we performed a single 5-min interaction with a novel mouse (5 min S.I.) and then sacrificed the test mouse within 5 min. With this protocol, a 100 Hz stimulation induced DOR plasticity (Figures 7G, 118.8% ± 4.8%, n = 17, 5 mice, p = 0.0014) that was about half the magnitude of that evoked in control mice (143.1% ± 4.4%, n = 14, 6 mice, p = 4.44 $10^{-7}$; p = 0.0011

Please cite this article in press as: Loisy et al., Sequential inhibitory plasticities in hippocampal area CA2 and social memory formation, Neuron (2022), https://doi.org/10.1016/j.neuron.2022.06.013



CellPress

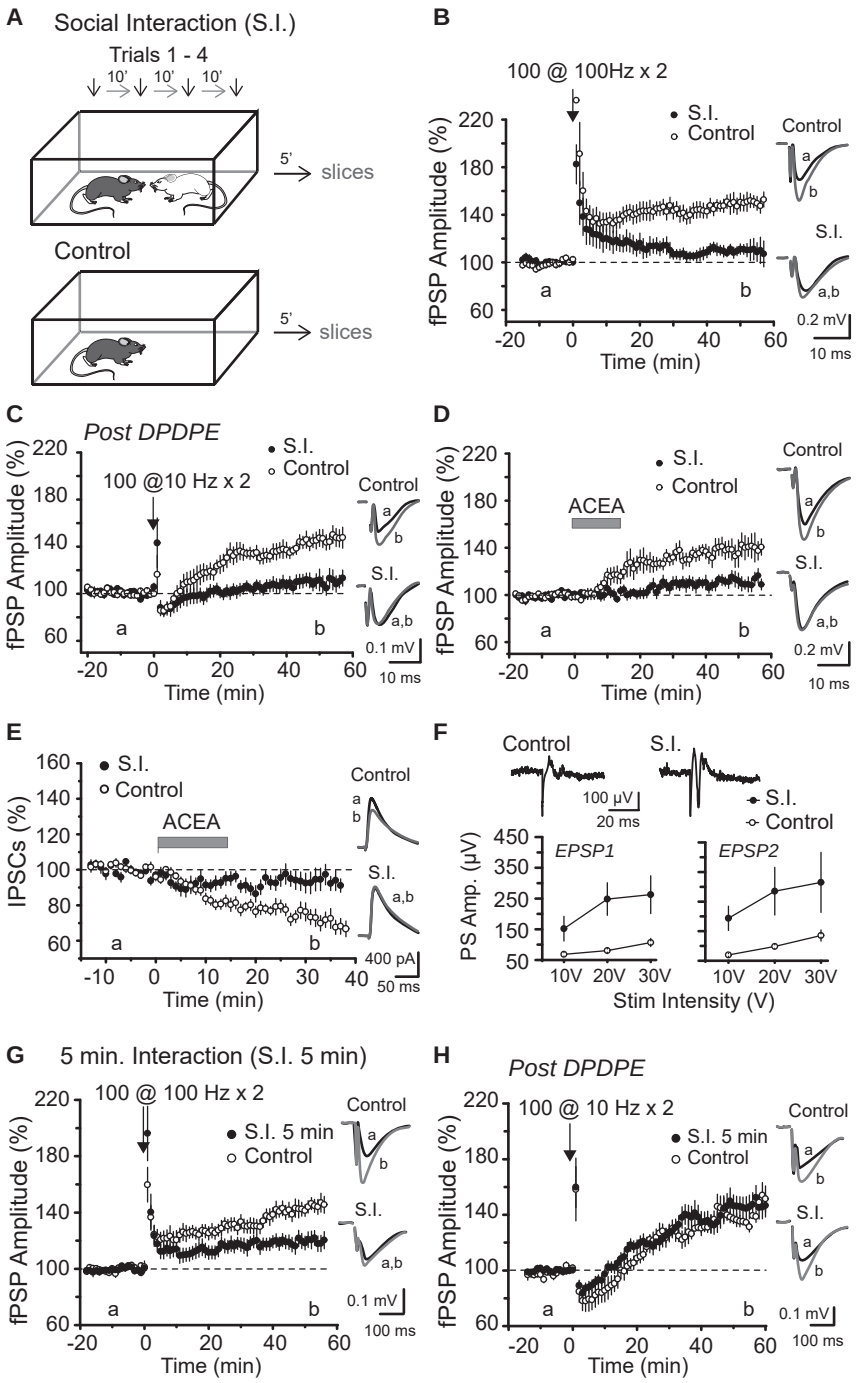



**Figure 7. Social memory formation occludes CB1R-mediated plasticity**

(A) Illustration of the protocol used to determine if social interaction (S.I.) occludes DOR and CB1R-mediated plasticities in area CA2.

(B) Summary graph of normalized CA3-CA2 fPSP before and after a 100 Hz stimulation (100 pulses at 10 Hz) in control mice (open circles, n = 9) and in S.I. mice (filled circles, n = 8; p = 6.66 $10^{-4}$ comparison with control mice). Right: averaged fPSP traces corresponding to the time points before (a) and after (b) stimulation.

(C) Summary graph of normalized CA3-CA2 fPSP amplitude before and after a 10 Hz stimulation (100 pulses at 10 Hz) in control mice (open circles, n = 8) and in S.I. mice (filled circles, n = 11; p = 5.8 $10^{-4}$ comparison with control mice). Right: averaged fPSP traces.

(D) Summary graph of normalized CA3-CA2 fPSP before and after application of the CB1R agonist ACEA in control mice (open circles, n = 9) and in S.I. mice (filled circles, n = 9; p = 0.017 comparison with control mice). Right: averaged fPSP traces.

(E) Summary graph showing that application of ACEA in presence of AMPA and NMDA receptor blockers induced a lasting decrease in the IPSC amplitude in control mice (open circles, n = 10) but not in S.I. mice (filled circles, n = 8; p = 0.012 comparison with control mice). Right: averaged IPSC traces. Cells were held at +10 mV throughout the experiment.

(F) Summary graphs of the amplitude of the population spike monitored in the somatic layer of area CA2 in response to a paired stimulation of CA3 input in control conditions (open circles, n = 8) and after S.I. (filled circles, n = 10; p = 0.016 comparison with control mice). Top: averaged traces.

(G and H) Summary graph of normalized CA3-CA2 fPSP before and after a 100 Hz stimulation (G; control n = 14, S.I. n = 17, p = 0.0011) or a 10 Hz stimulation (H; control n = 5, S.I. n = 15, p = 0.691) following a single 5-min S.I. Right: averaged fPSP traces. Error bars denote SEM.

with S.I. 5 min), indicating that DOR-iLTD was partially occluded. In contrast, when we provided a 10 Hz stimulation to induce CB1R plasticity, the increase in fPSP was identical between 5 min S.I. (Figure 7H; 146.7% ± 7.3%, n = 15) and control mice (141.4% ± 4.0%, n = 5, p = 0.691 with S.I. 5min). Altogether, these data strongly support a role for CB1R plasticity in social memory formation, and they indicate that the sequentiality of DOR and CB1R plasticity occurs *in vivo* during social memory formation.

## CB1-plasticity is impaired in the 22q11.2 DS mouse model and rescued by a manipulation that rescues social memory

In the mouse model of 22q11.2 deletion syndrome (DS), social recognition memory is impaired (Piskorowski et al., 2016). This impairment likely results from the fact that CA2 PNs are more hyperpolarized in these mice, thus preventing AP firing, even following DOR-iLTD. We thus asked if CB1-plasticity is altered in these mice. In wild-type (WT) littermate controls, a 10 Hz stimulation after DPDPE incubation induced a large increase in the fPSP (Figure 8A; 165.8% ± 18.4%, n = 8, p = 0.008). In contrast, a 10 Hz stimulation induced a small increase in the fPSP amplitude in slices from 22q11.2DS mice (LgDel; Figure 8A; 114.7% ± 3.7%, n = 11; p = 0.005).

This impairment could be explained by the fact that CA2 PNs are more hyperpolarized in 22q11.2DS mice, firing fewer APs

Please cite this article in press as: Loisy et al., Sequential inhibitory plasticities in hippocampal area CA2 and social memory formation, Neuron (2022), https://doi.org/10.1016/j.neuron.2022.06.013



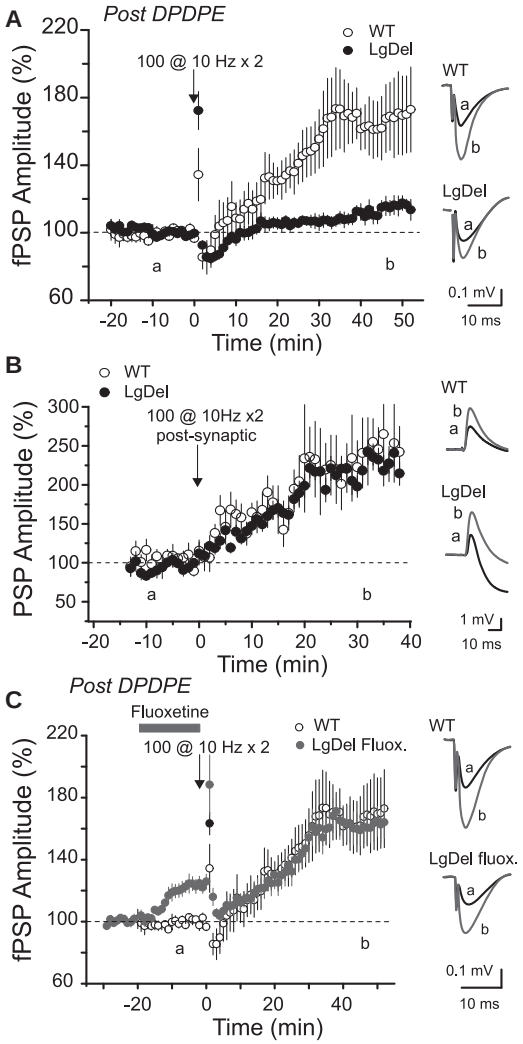



**Figure 8. CB1-plasticity is impaired in the 22q11.2 DS mouse model**

(A) Summary graph of normalized CA3-CA2 fPSP amplitude before and after a 10 Hz stimulation in WT (open circles, n = 8, p = 0.008) and LgDel (filled circles, n = 11, p = 0.005) mice. Right: averaged fPSP traces corresponding to the time points before (a) and after (b) stimulation.

(B) Summary graph of normalized CA3-CA2 PSP amplitude recorded in whole-cell before and after a post-synaptic 10 Hz stimulation in WT (open circles, n = 10, p = 3.56 $10^{-4}$) and in LgDel mice (filled circles, n = 11, p = 6.34 $10^{-7}$). Cells were maintained at −70 mV throughout the experiment. Right: averaged PSP traces.

(C) Summary graph of normalized CA3-CA2 fPSP amplitude before and after 10Hz stimulation. The 10 Hz stimulation provided at the end of the TREK channel blocker application (fluoxetine 100 μM) induced an increase in fPSP amplitude in LgDel mice (gray-filled circles, n = 8, p = 8.1 $10^{-4}$) that was similar to that observed in WT mice (open circles, n = 8, p = 4.7 $10^{-4}$), same experiments as panel A). Right: averaged fPSP traces. Error bars indicate the SEM in all panels. See also Figure S6.

during the induction protocol and not releasing eCBs. Alternatively, the molecular pathways underlying CB1R-mediated plasticity could be impaired. To address this point, we performed whole-cell recordings and used the 10 Hz depolarizing protocol to force AP firing in the PN. With this protocol, the disinhibitory increase in the PSP amplitude was identical between WT and LgDel mice (Figure 8B; WT: 226.1% ± 21.4%, n = 10, 10 mice, p = 3.56 $10^{-4}$; LgDel: 216.2% ± 10.3%, n = 11, 8 mice, p = 6.34 $10^{-7}$, p = 0.68 between WT and LgDel). Thus, the impairment in CB1-plasticity in LgDel mice likely results from an impairment in AP firing and not from impaired signaling downstream of CB1R activation. Therefore, CB1-plasticity could potentially be rescued in LgDel mice assuming that PNs fire enough APs during the induction protocol.

CA2 PNs are more hyperpolarized in 22q11.2DS mice because of a higher conductance through the $K^+$ leak channel, TREK-1 (Piskorowski et al., 2016). Reducing TREK-1 conductance in CA2 PNs can restore social memory in 22q11.2DS mice (Donegan et al., 2020). Thus, we postulated that blocking TREK-1 channels may restore CB1R plasticity. We induced DOR plasticity with DPDPE, then recorded fPSPs and applied fluoxetine to block TREK-1 channels. Fluoxetine application induced a small increase in the fPSP (Figure 8C; 122.2% ± 4.2%, n = 8, p = 8.1 $10^{-4}$). We then applied a 10 Hz stimulation of CA3 inputs at the end of fluoxetine application to induce CB1R plasticity. This protocol resulted in a large increase in the fPSP amplitude (Figure 8C; 161.9% ± 10.4%, n = 8, p = 4.7 $10^{-4}$) that was indistinguishable from that evoked in WT mice (p = 0.86). This increase was not due to a lasting effect of fluoxetine because in separate experiments a 10 min fluoxetine application only transiently increased the fPSP amplitude (Figure S6A; 116.7% ± 5.2%, n = 5, p = 0.043). Blocking TREK-1 channels likely permits plasticity induction because it allows PNs to fire APs. Indeed, while almost no PS was evoked after DOR plasticity in LgDel mice, fluoxetine application was sufficient to reveal AP firing in response to CA3 input stimulation (Figure S6B). Altogether, these data are consistent with a role of CB1R plasticity in social memory formation. Not only is CB1R plasticity altered in a mouse model with impaired social memory, it can also be rescued by a manipulation that was shown to rescue social memory, i.e., depolarization of CA2 PNs through TREK-1 blockade.

## DISCUSSION

### Two forms of inhibitory plasticity coexist in area CA2 of the hippocampus

Inhibitory transmission in area CA2 expresses a unique iLTD mediated by DOR activation that decreases GABA release from PV+ INs (Piskorowski and Chevaleyre, 2013a). Here we show that in addition to DOR-iLTD, another inhibitory LTD can also be induced in area CA2. This iLTD is mediated by CB1R activation, and in agreement with the described CB1R expression in the hippocampus (Katona et al., 1999), this plasticity does not involve PV+ INs, but likely CCK+ INs. The mechanism of CB1R-iLTD in CA2 differs in several important ways from that in CA1. In CA1, glutamate release from neuronal activity results in activation of mGluR-I, leading to release of the eCB 2-AG independently of intracellular [$Ca^{2+}$] increase in PNs (Chevaleyre and Castillo, 2003). In area CA2, however, our results indicate that mGluR-I activation does not trigger eCB release and blockade of all mGluRs does not prevent CB1R plasticity. Instead, we show that the release of eCBs requires an increase in intracellular

Please cite this article in press as: Loisy et al., Sequential inhibitory plasticities in hippocampal area CA2 and social memory formation, Neuron (2022), https://doi.org/10.1016/j.neuron.2022.06.013





[$Ca^{2+}$] and AP firing by CA2 PNs was sufficient to evoke CB1R-iLTD. This dependence on AP firing explains why a 100 Hz stimulation protocol is ineffective in evoking CB1R-iLTD, as CA2 PNs intrinsically fire at 10–15 Hz (Robert et al., 2020) and fire only a few APs during a 100 Hz stimulation.

The peculiar mode of eCB release in area CA2 has important consequences for the expression of the plasticity. In contrast to CA1, CB1R-iLTD is not input specific, but likely only occurs on synapses targeting CA2 PNs that fire APs (Figure S7). Another peculiarity of CB1R-iLTD in area CA2 is that it was induced only after DOR-iLTD induction. This is because CA3 inputs can only evoke AP firing in CA2 PNs once the feedforward inhibition is reduced by DOR-iLTD. Recently, it was shown in area CA1 that the *in vivo* activity of PV+ and CCK+ IN ensembles is inversely coupled, and that PV+ INs inhibit CCK+ INs (Dudok et al., 2021). Our results demonstrate a consequence of this segregation of activity, as the DOR-iLTD is limited to PV+ INs and can be induced with a single exposure to a novel conspecific. This reduction in PV+ transmission then allows for CA2 PN firing and a reduction of CCK+ transmission with further exposures to the novel animal.

### Role of CB1R-dependent plasticity in social memory formation

Previous studies have suggested that DOR-iLTD plays a role in social memory formation, a form of memory critically dependent on CA2 PN AP firing. However, pharmacological blockade of DORs in area CA2 only slightly reduced social memory (Leroy et al., 2017), and genetic deletion of DORs (Domínguez et al., 2019) delayed, but did not prevent, social memory formation. Our results indicate that CB1R-iLTD also plays a role in social memory formation. However, we cannot discard the possibility that CB1Rs are involved in social memory independently of the plasticity observed in CA2. We hypothesize that the DOR plasticity must occur before the CB1R plasticity *in vivo* based on our finding that a single social interaction can occlude DOR plasticity but has no effect on CB1R plasticity. Interestingly, while DOR-iLTD is observed in every recorded CA2 PN (Piskorowski and Chevaleyre, 2013a), we found that AP firing was enhanced primarily in superficial CA2 PNs. In area CA1, deep and superficial PNs differ by their intrinsic properties, their level of inhibition from PV + interneurons, and their synaptic targets (Soltesz and Losonczy, 2018). It is currently unknown what underlies the facilitated firing in superficial CA2 PNs after DOR plasticity induction. However, differences in firing or in connectivity have also been reported *in vivo* along the radial axis (Oliva et al., 2016) and the proximodistal axis (Fernandez-Lamo et al., 2019). Therefore, our results strengthen the idea that different subpopulations of CA2 PNs contribute differently to hippocampal activity and function.

### Manipulation that restores social memory formation also restores CB1R plasticity in the 22q11.2 mouse model

Here we found that CB1R-iLTD could not be induced in 22q11.2DS mice with stimulation of CA3 inputs but was induced when AP firing was driven with whole-cell current injection. In 22q11.2DS mice, PNs are more hyperpolarized because of an increased conductance through TREK-1 $K^+$ channels (Piskorowski et al., 2016). Decreasing TREK-1 channel conductance in CA2 PNs of 22q11.2DS mice was sufficient to restore social memory (Donegan et al., 2020). TREK-1 channel blockers likely act on every PN but probably induce firing only in some of them, hence potentially altering CA2 network function. However, this action is only transient and cannot account for maintenance of coding. Our results show that by allowing CB1R plasticity to be induced, the action of the TREK channel blocker is not only amplified but also maintained over a longer period of time. Interestingly, inhibitory transmission in area CA2 is disrupted from CCK+, but not from PV+ INs, in the Neuroligin 3 knockout mouse (Modi et al., 2019), a mouse model of autism with social memory impairments, suggesting that CB1-plasticity could be altered in these mice. Altogether, these data strongly support a role for CB1R plasticity in social memory formation and highlight how potential treatments that would favor CB1R plasticity in area CA2 could be used to improve social memory impairment observed in psychiatric or neurodegenerative diseases.

## STAR★METHODS

Detailed methods are provided in the online version of this paper and include the following:

- KEY RESOURCES TABLE
- RESOURCE AVAILABILITY
  - Lead contact
  - Materials availability
  - Data and code availability
- EXPERIMENTAL MODEL AND SUBJECT DETAILS
- METHOD DETAILS
  - Slice preparation
  - Electrophysiological recordings and analysis
  - Electrophysiology following social memory protocol
  - Mice were sacrificed 5 min after the social interaction
  - Immunohistology and analysis
  - Intra-CA2 cannulas implantation and injection procedure
  - Behavioral experiments
  - Histological control of intra-CA2 injections
- QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS

## SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental information can be found online at https://doi.org/10.1016/j.neuron.2022.06.013.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by Agence National de la Recherche (ANR-18-CE16-0006 and ANR-18-CE37-0020), Fondation pour la Recherche Médicale (Equipe FRM EQU202003010457). Confocal imaging was carried out at NeuroImag imaging core facility at IPNP. We acknowledge the Mouse Behavioral Core (MBC-CBI-ANEXPLO, Toulouse, France) for its expertise and assistance in setting up behavioral apparatus and procedures. The cacng5-cre mouse line and the DREADD AAV vectors were a kind gift from the McHugh lab at RIKEN. The LgDel mouse line was kindly provided by Francesco Papaleo's lab at the Fondazione Istituto di Tecnologia.

Please cite this article in press as: Loisy et al., Sequential inhibitory plasticities in hippocampal area CA2 and social memory formation, Neuron (2022), https://doi.org/10.1016/j.neuron.2022.06.013



## AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conceptualization, M.L., V.C., R.A.P., and L.V.; Investigation, M.L., G.B., S.L., M.M., A.S., J.D., R.A.P., and V.C.; Formal analysis, M.L., V.C., and L.V.; Writing, M.L., V.C., R.A.P., and L.V.

## DECLARATION OF INTERESTS

The authors declare no competing interests.

Received: September 21, 2021
Revised: April 22, 2022
Accepted: June 10, 2022
Published: July 19, 2022

## REFERENCES

Benes, F.M., Kwok, E.W., Vincent, S.L., and Todtenkopf, M.S. (1998). A reduction of nonpyramidal cells in sector CA2 of schizophrenics and manic depressives. Biol Psychiatry *44*, 88–97. https://doi.org/10.1016/s0006-3223(98)00138-3.

Boehringer, R., Polygalov, D., Huang, A.J.Y., Middleton, S.J., Robert, V., Wintzer, M.E., Piskorowski, R.A., Chevaleyre, V., and McHugh, T.J. (2017). Chronic Loss of CA2 transmission leads to hippocampal Hyperexcitability. Neuron *94*, 642–655.e9. e9. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.04.014.

Chevaleyre, V., and Castillo, P.E. (2003). Heterosynaptic LTD of hippocampal GABAergic synapses. Neuron *38*, 461–472. https://doi.org/10.1016/s0896-6273(03)00235-6.

Chevaleyre, V., and Siegelbaum, S.A. (2010). Strong CA2 pyramidal neuron synapses define a powerful disynaptic cortico-hippocampal loop. Neuron *66*, 560–572. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.04.013.

Chevaleyre, V., Takahashi, K.A., and Castillo, P.E. (2006). Endocannabinoid-mediated synaptic plasticity in the CNS. Annu. Rev. Neurosci. *29*, 37–76. https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.29.051605.112834.

Chiang, M.-C., Huang, A.J.Y., Wintzer, M.E., Ohshima, T., and McHugh, T.J. (2018). A role for CA3 in social recognition memory. Behav. Brain Res. *354*, 22–30. https://doi.org/10.1016/j.bbr.2018.01.019.

Domínguez, S., Rey, C.C., Therreau, L., Fanton, A., Massotte, D., Verret, L., Piskorowski, R.A., and Chevaleyre, V. (2019). Maturation of PNN and ErbB4 signaling in area CA2 during adolescence underlies the emergence of PV interneuron plasticity and social memory. Cell Rep. *29*, 1099–1112.e4. e4. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.09.044.

Donegan, M.L., Stefanini, F., Meira, T., Gordon, J.A., Fusi, S., and Siegelbaum, S.A. (2020). Coding of social novelty in the hippocampal CA2 region and its disruption and rescue in a 22q11.2 microdeletion mouse model. Nat. Neurosci. *23*, 1365–1375. https://doi.org/10.1038/s41593-020-00720-5.

Dudok, B., Klein, P.M., Hwaun, E., Lee, B.R., Yao, Z., Fong, O., Bowler, J.C., Terada, S., Sparks, F.T., Szabo, G.G., et al. (2021). Alternating sources of perisomatic inhibition during behavior. Neuron *109*, 997–1012.e9. e9. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2021.01.003.

Fernandez-Lamo, I., Gomez-Dominguez, D., Sanchez-Aguilera, A., Oliva, A., Morales, A.V., Valero, M., Cid, E., Berényi, A., and Menendez de la Prida, L. (2019). Proximodistal Organization of the CA2 hippocampal area. Cell Rep. *26*, 1734–1746.e6. e6. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.01.060.

Hefft, S., and Jonas, P. (2005). Asynchronous GABA release generates long-lasting inhibition at a hippocampal interneuron-principal neuron synapse. Nat. Neurosci. *8*, 1319–1328. https://doi.org/10.1038/nn1542.

Hitti, F.L., and Siegelbaum, S.A. (2014). The hippocampal CA2 region is essential for social memory. Nature *508*, 88–92. https://doi.org/10.1038/nature13028.

Karayiorgou, M., Simon, T.J., and Gogos, J.A. (2010). 22q11.2 microdeletions: linking DNA structural variation to brain dysfunction and schizophrenia. Nat. Rev. Neurosci. *11*, 402–416. https://doi.org/10.1038/nrn2841.

Katona, I., Sperlágh, B., Sik, A., Käfalvi, A., Vizi, E.S., Mackie, K., and Freund, T.F. (1999). Presynaptically located CB1 cannabinoid receptors regulate GABA release from axon terminals of specific hippocampal interneurons. J. Neurosci. *19*, 4544–4558. https://doi.org/10.1523/jneurosci.19-11-04544.1999.

Knable, M.B., Barci, B.M., Webster, M.J., Meador-Woodruff, J., and Torrey, E.F.; Stanley Neuropathology Consortium (2004). Molecular abnormalities of the hippocampus in severe psychiatric illness: postmortem findings from the Stanley Neuropathology Consortium. Mol. Psychiatry *9*, 609–620. 544. https://doi.org/10.1038/sj.mp.4001471.

Kogan, J.H., Franklandand, P.W., and Silva, A.J. (2000). Long-term memory underlying hippocampus-dependent social recognition in mice. Hippocampus *10*, 47–56. https://doi.org/10.1002/(sici)1098-1063(2000)10:1<47::aid-hipo5>3.0.co;2-6.

Leroy, F., Brann, D.H., Meira, T., and Siegelbaum, S.A. (2017). Input-timing-dependent plasticity in the hippocampal CA2 region and its potential role in social memory. Neuron *95*, 1089–1102.e5. e5. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.07.036.

Mehta, M.R. (2015). From synaptic plasticity to spatial maps and sequence learning. Hippocampus *25*, 756–762. https://doi.org/10.1002/hipo.22472.

Meira, T., Leroy, F., Buss, E.W., Oliva, A., Park, J., and Siegelbaum, S.A. (2018). A hippocampal circuit linking dorsal CA2 to ventral CA1 critical for social memory dynamics. Nat. Commun. *9*, 4163. https://doi.org/10.1038/s41467-018-06501-w.

Modi, B., Pimpinella, D., Pazienti, A., Zacchi, P., Cherubini, E., and Griguoli, M. (2019). Possible Implication of the CA2 hippocampal circuit in social cognition deficits observed in the Neuroligin 3 knock-out mouse, a non-Syndromic animal model of autism. Front Psychiatry *10*, 513. https://doi.org/10.3389/fpsyt.2019.00513.

Moy, S.S., Nadler, J.J., Dold, G., Trang, D., Simmons, N., Perez, A., Young, N.B., Barbaro, R.P., Piven, J., Magnuson, T.R., and Crawley, J.N. (2004). Automated apparatus for quantitation of social approach behaviors in mice. Gene Brain Behav. *3*, 303–314. https://doi.org/10.1111/j.1601-183x.2004.00071.x.

Nasrallah, K., Piskorowski, R.A., and Chevaleyre, V. (2015). Inhibitory plasticity permits the Recruitment of CA2 pyramidal neurons by CA3. eNeuro *2*. ENEURO.0049–15.2015. https://doi.org/10.1523/ENEURO.0049-15.2015.

Nasrallah, K., Therreau, L., Robert, V., Huang, A.J.Y., McHugh, T.J., Piskorowski, R.A., and Chevaleyre, V. (2019). Routing hippocampal information flow through parvalbumin interneuron plasticity in area CA2. Cell Rep. *27*, 86–98.e3. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.03.014.

Oliva, A., Fernández-Ruiz, A., Buzsáki, G., and Berényi, A. (2016). Role of hippocampal CA2 region in triggering Sharp-Wave Ripples. Neuron *91*, 1342–1355. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.08.008.

Piskorowski, R.A., and Chevaleyre, V. (2013a). Delta-opioid receptors mediate unique plasticity onto parvalbumin-expressing interneurons in area CA2 of the Hippocampus. J. Neurosci. *33*, 14567–14578. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0649-13.2013.

Piskorowski, R.A., and Chevaleyre, V. (2013b). Delta-opioid receptors mediate unique plasticity onto parvalbumin-expressing interneurons in area CA2 of the Hippocampus. J. Neurosci. *33*, 14567–14578. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0649-13.2013.

Piskorowski, R.A., Nasrallah, K., Diamantopoulou, A., Mukai, J., Hassan, S.I., Siegelbaum, S.A., Gogos, J.A., and Chevaleyre, V. (2016). Age-dependent specific changes in area CA2 of the Hippocampus and social memory deficit in a mouse model of the 22q11.2 deletion syndrome. Neuron *89*, 163–176. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.11.036.

Robert, V., Therreau, L., Davatolhagh, M.F., Bernardo-Garcia, F.J., Clements, K.N., Chevaleyre, V., and Piskorowski, R.A. (2020). The mechanisms shaping CA2 pyramidal neuron action potential bursting induced by muscarinic acetylcholine receptor activation. J. Gen. Physiol. *152*. https://doi.org/10.1085/jgp.201912462.

Smith, A.S., Avram, S.K.W., Cymerblit-Sabba, A., Song, J., and Young, W.S. (2016). Targeted activation of the hippocampal CA2 area strongly enhances social memory, pp. 1–8. https://doi.org/10.1038/mp.2015.189.

Please cite this article in press as: Loisy et al., Sequential inhibitory plasticities in hippocampal area CA2 and social memory formation, Neuron (2022), https://doi.org/10.1016/j.neuron.2022.06.013



Soltesz, I., and Losonczy, A. (2018). CA1 pyramidal cell diversity enabling parallel information processing in the hippocampus. Nat. Neurosci. *21*, 484–493. https://doi.org/10.1038/s41593-018-0118-0.

Stevenson, E.L., and Caldwell, H.K. (2014). Lesions to the CA2 region of the hippocampus impair social memory in mice. Eur. J. Neurosci. *40*, 3294–3301. https://doi.org/10.1111/ejn.12689.

Zhao, M., Choi, Y.-S., Obrietan, K., and Dudek, S.M. (2007). Synaptic plasticity (and the lack thereof) in hippocampal CA2 neurons. J. Neurosci. *27*, 12025–12032. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4094-07.2007.

Merscher, S., Funke, B., Epstein, J.A., Heyer. J., Puech, A., Lu, M.M., Xavier, R.J., Demay, M.B., Russell, R.G., Factor, S., et al., 2001. TBX1 is responsible for cardiovascular defects in velo-cardio-facial/DiGeorge syndrome. Cell. 104(4):619-29. doi: 10.1016/s0092-8674(01)00247-1. PMID: 11239417.

Please cite this article in press as: Loisy et al., Sequential inhibitory plasticities in hippocampal area CA2 and social memory formation, Neuron (2022), https://doi.org/10.1016/j.neuron.2022.06.013



## STAR★METHODS

### KEY RESOURCES TABLE

| REAGENT or RESOURCE | SOURCE | IDENTIFIER |
|---|---|---|
| Chemicals, peptides, and recombinant proteins | | |
| CGP 55845 Hydrobromide | Hello Bio | HB0960-50mg Batch: E0704-8-1 |
| SR 95531 Hydrobromide | Tocris | Cat#1262-50mg Batch:11A/170178 |
| D-AP5 | Hello Bio | HB0225-100mg batch:E0714-4-2 |
| DPDPE | Tocris | J66293- 5mg CAS: 88373-73-3 Lot: Q21G072 |
| NBQX | Hello Bio | HB0443-50mg Batch:E1040-2-1 |
| Naltrindol | Tocris | Cat#0740-10mg Batch:14A/190520 |
| ACEA | Tocris | Cat#1319-25mg Batch:14A/232359 |
| AM251 | Hello Bio | HB2776-10mg Batch: E0637-4-6 |
| (S)-3,5-DHPG | Hello Bio | HB0045-10mg Batch: E0791-10-3 |
| THL | Hello Bio | HB4009-250mg batch:E1351-1-1 |
| BAPTA | Sigma Aldrich | A4926-250mg CAS#85233-19-8 Lot: SLBW9824 |
| Fluoxetine | Hello Bio | HB1600-50mg Batch: E0142-1-1 |
| CPPG | Tocris | Cat#0972-10mg Batch: 12A/130814 |
| (S)-MCPG | Tocris | Cat#0337-10mg Batch: 16*A/86419 |
| Clozapine N-oxide (CNO) | Hello Bio | HB6149-10mg Batch: E0945-1-1 |
| ω-Conotoxin GVIA | Hello Bio | HB1218-500μg Batch: E1660-1-1 |
| Biocytin | Hello Bio | HB5035-50mg Batch: E1477-1-1 |
| Far-Red Nissl | Life Technologies | Cat#N21483 |
| Streptavidin-conjugated Alexa 594 | Life Technologies | Cat#S1125 |
| Streptavidin-conjugated Alexa 647 | Life Technologies | Cat#S21374 |
| Bacterial and virus strain | | |
| AAV.hSyn.DIO.hM4D.Gi.mCherry | McHugh Lab | N/A |
| Antibodies | | |
| Alexa Fluor™ 594 Cadaverine | ThermoFischer | A30678 - Lot: 2431320 |
| Rabbit α-PCP4 | Sigma Aldrich | HPA005792 - RRID: AB_1855086 - Lot: B97113 |
| Alexa 555 Goat α-Rabbit | Life Technologies | A21428 - RRID: AB_2535849 - Lot: 1858260 |
| Rat α-mCherry | Life Technologies | M11217 - RRID: AB_2536611 - Lot: QE214609 |
| Alexa 555 Goat α-Rat | Life Technologies | A21434 - RRID: AB_2535855 - Lot: 1670155 |
| Experimental models: Organisms/strains | | |
| Mouse: Swiss | Janvier Labs | N/A |
| Mouse: C57BL/6J | Janvier Labs | N/A |
| Mouse model: LgDel | Merscher et al., 2001 | N/A |
| Mouse: Swiss/J-Cacng5-Cre | McHugh Lab Boehringer et al., 2017 | N/A |
| Mouse: B6:129P2-Pvalbtm1(cre)ArbrlJ (Pvalb-cre) | The Jackson Laboratory | Cat#017320 |

(*Continued on next page*)

Please cite this article in press as: Loisy et al., Sequential inhibitory plasticities in hippocampal area CA2 and social memory formation, Neuron (2022), https://doi.org/10.1016/j.neuron.2022.06.013





*Continued*

| REAGENT or RESOURCE | SOURCE | IDENTIFIER |
|---|---|---|
| Software and algorithms | | |
| Axograph X software for data acquisition | Axograph | https://axograph.com |
| pClamp10- data acquisition | Molecular devices | https://www.moleculardevices.com |
| OriginPro- data analysis | Origin Lab | https://www.originlab.com |
| ImageJ-data analysis | ImageJ | https://imagej.net/Welcome |

## RESOURCE AVAILABILITY

### Lead contact

Further information and requests for resources and reagents should be directed to and will be fulfilled by the lead contact, Vivien Chevaleyre (vivien.chevaleyre@parisdescartes.fr).

### Materials availability

This study did not generate unique reagents.

### Data and code availability

This study did not generate datasets and code.

## EXPERIMENTAL MODEL AND SUBJECT DETAILS

Animals were raised in conditions that are in accordance with the Federation of European Laboratory Animal Science Associations standards. All breeding was done in an environment that was specific and opportunistic pathogen free.

All electrophysiology experiments were performed on Swiss WT or LgDel male mice (5–10 week old). C57B6J male mice (6–7 month old, Charles River, France) were used for behavioral experiments.

Mice were housed in groups of five since weaning at P21 in standard breeding cages with food and water *ad libitum* and were placed at a constant temperature (23 ± 1 °C) under diurnal conditions (light-dark: 8:00AM–8:00PM). Mice were tested during the first half of the light period. Mice were not involved in previous procedures.

All the experiments were performed in strict accordance with the recommendations of the local ethic committee and the French Ministry for Research (#2019041014597476, # 02,118.02, 2017, #2016040417305913)

## METHOD DETAILS

### Slice preparation

400 μm thick transverse hippocampal slices were prepared from Swiss or LgDel male mice. Animals were euthanized in accordance with institutional regulations under anesthesia with isofluorane. Mice were transcardially perfused with ice-cold solution containing (in mM): 10 NaCl, 110 sucrose, 2.5 KCl, 25 glucose, 30 NaHCO3, 20 HEPES, 1.25 NaH2PO4, 2 thiourea, 5 Na ascorbate, 3 Na pyruvate, 0.5 CaCl2 and 10 MgCl2. Hippocampi were removed and placed upright into an agar mold and cut with a vibratome (Leica VT1200S, Germany). The slices were then transferred to 30°C artificial cerebral spinal fluid (ACSF), (in mM): 125 NaCl, 2.5 KCl, 10 glucose, 26 NaHCO3, 1.25 NaH2PO4, 2 Na Pyruvate, 2 CaCl2 and 1 MgCl2 for 30 min and kept at room temperature for at least 1.5 h before recording. For experiments that required DOR-induction, slices were further incubated in a separate chamber with the DOR agonist DPDPE (0.5μM) in ACSF. All experiments were performed at 33°C.

### Electrophysiological recordings and analysis

Field recordings of fPSPs were performed in current-clamp mode with a recording patch pipette (3–5 MΩ) containing 1 M of NaCl and positioned in the middle of *stratum radiatum* of CA2. Whole-cell recordings were obtained from CA2 PNs in current-clamp mode with appropriate DC current injection to maintain the cells at −70mV. Recording pipettes (3–5 MΩ) contained (in mM): 135 KMethylSulfate, 5 KCl, 0.1 EGTA-Na, 10 HEPES, 2 NaCl, 5 ATP, 0.4 GTP, 10 phosphocreatine; pH 7.2; 280–290 mOsm.

Inhibitory currents were recorded in voltage clamp mode with a patch pipette (3–5 MΩ) containing CesiumMethylSulfate in place of KMethylSulfate. For some experiments (Figure 4D), 20 mM $K^+$ was substituted for 20 mM BAPTA in the internal solution used for current clamp recordings.

Membrane potentials were not corrected for the liquid junction potential. Series resistance (between 12 and 18 MΩ) was monitored throughout each experiment and cells with more than 15% change were excluded from analysis.

Please cite this article in press as: Loisy et al., Sequential inhibitory plasticities in hippocampal area CA2 and social memory formation, Neuron (2022), https://doi.org/10.1016/j.neuron.2022.06.013



Before beginning whole cell experiments, we identified the CA2 PNs by somatic location and size. Furthermore, the cell type was confirmed by several electrophysiological properties as previously described (Chevaleyre and Siegelbaum, 2010). Cells were also filled with biocytin and post hoc labeling of filled cells and imaging was performed to confirm CA2 recording when necessary.

Cell attached recordings were performed with ACFS in the pipette or with internal solution containing Alexa 594 conjugated cadaverine when cells were labeled at the end of the recording. AP probability was calculated by dividing the number of evoked APs by the number of CA3 input stimulation provided every 20 s (usually 10 stimulations for each intensity).

Synaptic currents or potentials were evoked by mono-polar stimulation with a broken patch pipette filled with ACSF and positioned in the middle of CA1 SR. The amplitudes of the IPSCs or EPSPs were normalized to the baseline amplitude. An HFS (100 pulses at 100Hz repeated twice, 20 s apart) or 10Hz stimulation (100 pulses at 10Hz repeated twice, 20s apart) were applied following stable baseline. The magnitude of plasticity was estimated by comparing averaged responses at 30–40 min after the induction protocol (for whole cell experiments) or 50–60 min after induction protocol (for field recording experiments) with baseline-averaged responses from 0 to 10 min before the induction protocol. We used pClamp10 and Axograph X software for data acquisition and Origin Pro for data analysis. Statistical comparisons were performed using Student's *t* test, ANOVA, Wilcoxon, Mann-Witney or Kruskal-Wallis where appropriate. All drugs were bath-applied following dilution into the external solution from concentrated stock solutions. Results are reported as mean ± SEM

### Electrophysiology following social memory protocol

All mice were housed two to five in each cage and given *ad libitum* access to food and water. They were kept on a 12 h (6:00–18:00) light–dark cycle with the room temperature regulated between 21°C and 23°C. Behavioral tests were performed during the light cycle in a testing room adjunct to the mouse housing room, which minimizes any transportation stress. Immediately prior to the experimental sessions, 6 to 8 week-old mice were transferred to the testing room and placed into individual cages, identical to the ones used for housing, where they were allowed to habituate to the new environment for 10 min for 3 days. Male juvenile mice (Swiss, 4–5 weeks old) were also placed in the testing room in their home cages and allowed to habituate for a similar amount of time. Testing began when a novel juvenile mouse was introduced to a cage with one of the adult experimental mice. Activity was monitored for 10 min (trial 1 to 4, 5 min intertrial interval). The control mice were also placed in the testing room in the empty experimental cages for a similar amount of time.

### Mice were sacrificed 5 min after the social interaction

#### *Stereotaxic injection*

The adeno-associated virus, AAV.DJ/8.hSyn.DIO.hM4D.GI .mCherry was used at 3 × 108 vg. 500 nL of virus was injected bilaterally into the hippocampus of 4-6 week-old cacng5-cre or Pvalb-cre mice at 100 nL/min and the injection cannula was removed 5 min after infusion was complete. Injections were centered on: AP: −1.5 mm; ML: +/−1.8 mm; at a depth of 1.5 mm from the brain surface. The resulting infected area spanned at least 2 mm along the longitudinal axis of the hippocampus.

### Immunohistology and analysis

Recorded cells were filled with biocytin and post-hoc labeling of filled cells with streptavidin-conjugated Alexa 488 was performed along with immunohistology to confirm cell identity. Gi-DREADD-mcherry was labeled with rat α-dsRed (Life Technologies) diluted 1:2000 and Cy3-goat α-rat. PCP4 was labeled with rabbit α-PCP4 (Sigma) and Alexa 555-conjugated anti rabbit (Life Technologies). For cell-attached recordings Alexa 594-conjugated cadaverine (Life technologies) was included in the pipette and filled the cells after recording.

In order to assess if CA2 pyramidal cells were deep or superficial, all neuronal soma were stained with a far-red conjugated nissl (Neurotrace, Life Technologies). Slices were mounted with Pro-Long Diamond (Thermofisher) and z series confocal images were collected with a Zeiss 710 LSM microscope. Image analysis was performed with ImageJ and cellular morphologies were reconstructed from confocal images with Neurolucida 360 (MicroBrightField).

### Intra-CA2 cannulas implantation and injection procedure

One week prior the behavioral testing, 6–7 months old C57B6J male mice (n = 28; Charles River, France) were anesthetized with isoflurane (1%–4%) and placed in a stereotaxic instrument (Kopf, CA). All animals were then implanted bilaterally with 7 mm stainless-steel guide cannulas (gauge: 24; diameter: 0.56 mm) positioned 1 mm above the injection site in the area CA2 at the following coordinates: AP −1.98 mm; L ±2.3 mm; and DV −2 mm relative to bregma. The guide cannulas were then anchored to the skull using dental cement. Stainless-steel wire inlet cannulas (7 mm) were placed inside to prevent occlusion. The bilateral infusions were performed with stainless-steel injector needles (length: 8 mm; gauge: 31; diameter: 0.28 mm) inserted inside the guide cannulas and fitted so that they protruded 1 mm below, into the area CA2. The injectors were connected via a polyethylene catheter (Tygon) to 1 μL Hamilton microsyringes fitted to a micropump (Harvard apparatus). For injection into dorsal CA1, the guide cannulas were placed at the following coordinate: AP −1.75 mm; L ±1.4 mm; DV −1.65 mm relative to bregma.

AM251 (3μg/0.25μL) or its vehicle (10% Cremophor-EL; 10% DMSO; 80% NaCl 0.9%) solutions were bilaterally injected into the area CA2 of the hippocampus at a volume of 0.25 μL/side and a flow rate of 0.1 μL/min. Mice were gently maintained by hand on a foam board to allow the experimenter to control the volume and prevent injector needle to move out of the cannula throughout the

Please cite this article in press as: Loisy et al., Sequential inhibitory plasticities in hippocampal area CA2 and social memory formation, Neuron (2022), https://doi.org/10.1016/j.neuron.2022.06.013



injection. Before behavioral testing, the injector needle was left in the guide cannula for one additional minute to allow fluid diffusion.

### Behavioral experiments

All the experiments were performed in strict accordance with the recommendations of the European Union (86/609/EEC) and the French National Committee (87/848). The seven-trial social memory test is based on a modified version from Kogan et al. (2000). Briefly, on test day 1, immediately after injection of AM251 or its vehicle, each mouse was first placed in a large chamber (25 × 35 cm) for 10 min habituation with an empty cylindrical small cage placed in the center (8 cm diameter). Then a stimulus mouse (Mouse A), from same age and sex, but never encountered before, was introduced in the small cage for four successive trials of 5 min (ITI 10 min). On the fifth trial, a novel stimulus mouse was introduced (Mouse B). On test day 2, the same stimulus mouse as day 1 (Mouse A) was presented again for two other 5 min trials following the exact same procedure as day 1 (10 min of habituation; 10 min ITI), but with no intracerebral injections.

Two weeks prior to the seven-trial social memory test, a subset of animals (n = 15) was used to assess the effect of intra-CA2 injection of AM251 or its vehicle on sociability. Briefly, immediately after injection, the mice were placed for 10 min of habituation in an empty three-chamber setup (Moy et al., 2004). To assess sociability, mice were then placed in the presence of a littermate (familiar) mouse confined in a cylindrical cage with bars (8cm diameter) on one side, and an identical cylindrical cage on the opposite side of the three-chamber apparatus. The location of the familiar mouse was counterbalanced between experimental groups. After a 2 weeks wash-out period, mice which received AM251 or its vehicle during the sociability test received the same treatment during the seven-trial social memory test.

For all the behavioral experiments, the direct interactions were scored online by the experimenter. All apparatus and testing chambers were cleaned with 70% ethanol between animals.

### Histological control of intra-CA2 injections

Mice were deeply anesthetized with dolethal solution (ip) before being transcardially perfused with saline solution for 30–45 s. The brains were removed, post-fixed in 4% paraformaldehyde and phosphate buffer 0.1M for 48 h at 4 °C before being transferred into a 30% sucrose and 0.1% sodium azide solution. 40-μm-thick-coronal sections were cut with a sliding microtome (Leica SM2010R) equipped with a freezing-stage (Physitemp BFS-3MP). Sections were placed on a gelatinated slide and counter-stained with cresyl violet.

## QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS

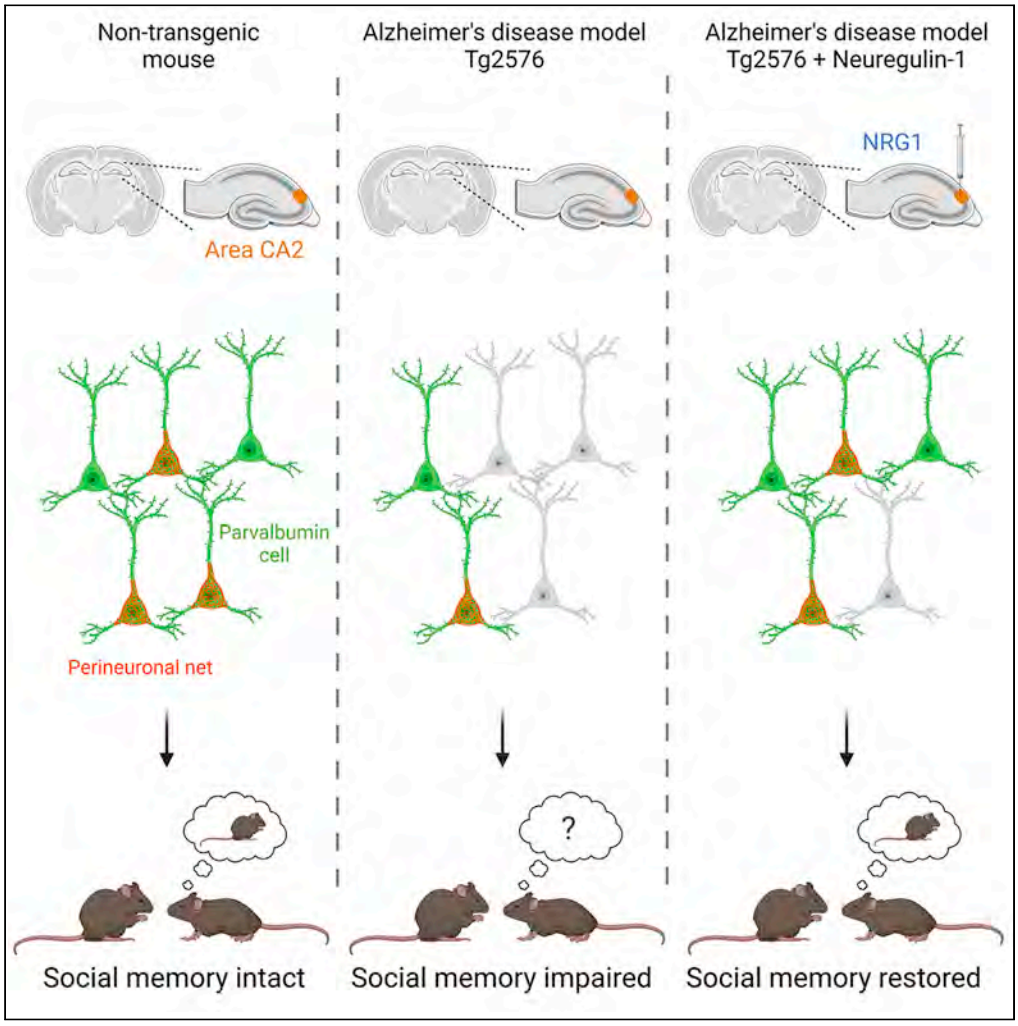
We used Origin Pro for data analysis. We used a Shapiro-Wilk test to determine whether the data followed a normal distribution. We used Student's t tests and ANOVA when the data followed a normal distribution. When the distribution was not normal, we used non-parametric test (Wilcoxon, Man-Whitney and Kruskal-Wallis tests). Statistical significance was set to $p < 0.05$ (*** indicates $p < 0.001$, ** indicates $p < 0.01$, and * indicates $p < 0.05$). All values are reported as the mean ± SEM.

iScience

CellPress
OPEN ACCESS

Article

# Altered inhibitory function in hippocampal CA2 contributes in social memory deficits in Alzheimer's mouse model




Christophe Clément Rey, Vincent Robert, Guillaume Bouisset, ..., Claire Rampon, Vivien Chevaleyre, Laure Verret

laure.verret@univ-tlse3.fr

## Highlights

Tg2576 mouse model of AD have normal sociability, but cannot form social memory

Tg2576 mice have less detectable PV interneurons and PNN in hippocampal area CA2

PV-dependent long-term plasticity is altered in CA2 of Tg2576 mice

NRG1 in CA2 increases PV/PNN and restores social memory of these AD mice

Rey et al., iScience 25, 103895
March 18, 2022 © 2022 The Author(s).
https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.103895

iScience

CellPress
OPEN ACCESS

Article

# Altered inhibitory function in hippocampal CA2 contributes in social memory deficits in Alzheimer's mouse model

Christophe Clément Rey,[1] Vincent Robert,[2,4] Guillaume Bouisset,[1] Maïthé Loisy,[2] Sébastien Lopez,[1] Vanessa Cattaud,[1,5] Camille Lejards,[1] Rebecca Ann Piskorowski,[2,3,5] Claire Rampon,[1] Vivien Chevaleyre,[2,3,5] and Laure Verret[1,6,*]

## SUMMARY

**Parvalbumin (PV)-expressing interneurons which are often associated with the specific extracellular matrix perineuronal net (PNN) play a critical role in the alteration of brain activity and memory performance in Alzheimer's disease (AD). The integrity of these neurons is crucial for normal functioning of the hippocampal subfield CA2, and hence, social memory formation. Here, we find that social memory deficits of mouse models of AD are associated with decreased presence of PNN around PV cells and long-term synaptic plasticity in area CA2. Furthermore, single local injection of the growth factor neuregulin-1 (NRG1) is sufficient to restore both PV/PNN levels and social memory performance of these mice. Thus, the PV/PNN disruption in area CA2 could play a causal role in social memory deficits of AD mice, and activating PV cell pro-maturation pathways may be sufficient to restore social memory.**

## INTRODUCTION

Alzheimer's disease (AD) is characterized by inexorable loss of memory and other cognitive functions. Among the cognitive impairments observed in AD patients, one of the most excruciating is their inability to recognize or remember others. This dysfunction of social memory in AD places an enormous burden on patients, their families, and society, illustrating how much this cognitive function is necessary for appropriate behavioral responses to social interactions. Albeit essential, little is known about the mechanisms responsible for social memory and social recognition deficits in AD.

Long-neglected in studies of hippocampal learning and memory processes, area CA2 has aroused renewed interest because the demonstration of its crucial role in social memory and recognition. Indeed, specific lesioning or genetically-targeted silencing of area CA2 induces social memory deficits without affecting performance in other types of hippocampal-dependent memory (Hitti and Siegelbaum, 2014; Stevenson and Caldwell, 2014). Compared to the CA1 and CA3 hippocampal subfields, area CA2 has atypical anatomical and functional characteristics, including a high density of parvalbumin (PV)-expressing interneurons as well as the perineuronal net (PNN), a specialized extracellular matrix (Botcher et al., 2014; Carstens et al., 2016; Celio, 1993). These PV interneurons are known to exert feedforward inhibition onto area CA2 pyramidal neurons, very tightly regulating CA2 action potential firing (Nasrallah et al., 2019). Moreover, PV cells in area CA2 express a unique form of plasticity in the hippocampus: they undergo a long-term depression of GABA release (iLTD) (Piskorowski and Chevaleyre, 2013), that results in disinhibition of CA2 pyramidal cells (Nasrallah et al., 2015). Hence, iLTD in area CA2 depends on the presence and the activity of PV cells (Nasrallah et al., 2019), and is directly involved in social memory performance (Domínguez et al., 2019; Leroy et al., 2017).

Our previous work has demonstrated that PV cell dysfunction is linked to aberrant brain activity and cognitive deficits in AD mouse models (Verret et al., 2012). We also described that earliest and most significant decrease in PV cells and PNN in the hippocampus of Tg2576 mouse model of AD occurs in the CA2 pyramidal layer (Cattaud et al., 2018), suggesting that both the plasticity of local PV interneuron plasticity as well as associated memory functions may be disrupted in this AD mouse model. The presence of PNN around PV cells is crucial for normal CA2 function, as it is required for the emergence of iLTD at PV interneuron

[1]Centre de Recherches sur La Cognition Animale, Centre de Biologie Intégrative, Université de Toulouse, CNRS, UPS, 31062 Toulouse, France

[2]University of Paris, Inserm UMR_S1266, Institute of Psychiatry and Neuroscience of Paris. Team Synaptic Plasticity and Neural Networks, 102-108 Rue de La Santé, 75014 Paris, France

[3]GHU PARIS Psychiatrie & Neurosciences, 75014 Paris, France

[4]Present address: New York University Neuroscience Institute, New York University, New York, NY 10016, USA

[5]Present address: Neuroscience and Mental Health Institute, Department of Physiology, University of Alberta, T6G 2E2, Canada

[6]Lead contact

*Correspondence: laure.verret@univ-tlse3.fr

https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.103895


This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

terminals and social memory (Domínguez et al., 2019). Hence, we hypothesize that PV cell disturbances in area CA2, and more specifically, the loss of associated PNN could contribute to social memory deficits in the Tg2576 mouse model of AD.

Neuregulin-1 (NRG1) is a growth factor involved in experience-dependent maturation of PV neurons through the activation of the ErbB4 receptor in the postnatal brain (Mei and Nave, 2014; Sun et al., 2016). For instance, maturation of PV neurons during the critical period of ocular dominance depends on the activation of the NRG1/ErbB4 pathway in the visual cortex (Gu et al., 2016). We have previously shown that activating NRG1/ErbB4 signaling is critical for the emergence of iLTD and social memory (Domínguez et al., 2019). Therefore, we now postulate that local administration of exogenous NRG1 could improve PV cell function and/or enhance PNN formation in area CA2 in the context of AD.

Here we confirm that although Tg2576 mice exhibit normal sociability, their social recognition and social memory capacities are deeply impaired. Noticeably, these behavioral deficits are concomitant with decreased expression of both PV and PNN in area CA2, as well as a reduction of associated long-term plasticity. Furthermore, local injection of NRG1 rescues the number of PV and PV/PNN cells detectable in the area CA2 of Tg2576 mice. Strikingly, AD mice injected with NRG1 in area CA2 display normal performance on social memory tests. Therefore, we demonstrate that disruption of PNN around PV interneurons in area CA2 might play a causal role in the social memory deficit of the Tg2576 mouse model of AD, and that their local activation with NRG1 is sufficient to restore normal social memory capacity.

## RESULTS

### Reduced number of PV + cells associated to PNN loss in the area CA2 of Tg2576 mice

To further characterize PV cell depletion in area CA2 associated with AD pathology, we used stereology to estimate the absolute number of PV+ cells in the different layers in area CA2 of naive 9-month-old Tg2576 and NTg mice (Figures 1A, S1A, and S1B). In agreement with our previous study (Cattaud et al., 2018), the estimated absolute number of PV+ cells was decreased in area CA2 of Tg2576 mice compared to NTg (NTg: 558.6 $\pm$ 31.12 cells; Tg2576: 387.1 $\pm$ 52.90 cells; two-sided unpaired t test: $p = 0.0163$; Figure 1A). Furthermore, the number of PV cells harboring PNN (PV+/PNN+) was dramatically reduced in area CA2 of Tg2576 mice compared to age-matched NTg mice (NTg: 478.6 $\pm$ 25.02 cells; Tg2576: 282.9 $\pm$ 40.16 cells; two-sided unpaired t test: $p = 0.0014$; Figures 1B, S1A and S1C), as well as the overall intensity of WFA fluorescence (Figure S1D). Noticeably, this was associated with lower intensity of PV staining in PV+ cells of Tg2576 mice (Mann-Whitney test, $p = 0.001$; Figures 1C and 1D), suggesting that the diminished PNN presence in area CA2 of AD mice is accompanied by a reduced activity of PV interneurons (Donato et al., 2013; Favuzzi et al., 2017; Yamada et al., 2015).

### Inhibitory transmission and PV-dependent long-term plasticity are altered in area CA2 of Tg2576 mice

In the healthy adult brain, inhibitory transmission in area CA2 exerts a powerful control on the excitatory inputs from the Schaffer collaterals (SC), preventing CA3 inputs to evoke action potential firing in CA2 pyramidal neurons (Chevaleyre and Siegelbaum, 2010). To determine whether the observed decrease in PV density in Tg2576 mice affects inhibitory transmission and its control of excitatory inputs, we first recorded postsynaptic potentials (PSP) in CA2 pyramidal neurons after stimulating CA3 inputs. In NTg mice, the amplitude of the depolarizing phase of the PSPs was small because of the large feedforward inhibition. In Tg2576, the depolarizing phase of the PSP was much larger and the following hyperpolarization was nearly absent (two-way ANOVA with repeated measures for trial: $p = 0.037$; Figure 2A). This change in PSP amplitude could result from an increased excitatory drive or from a decrease in inhibitory transmission. To address this, we first used extracellular recording to monitor the strength of excitatory transmission. We measured the slope of the rising phase of the field potential in response to CA3 input stimulation (a parameter not affected by inhibitory transmission) and normalized it to the fibber volley (a measure of the number of axons recruited by the stimulation). We found no difference between NTg and Tg2576 mice (NTg: 0.775 $\pm$ 0.108, Tg2576: 0.780 $\pm$ 0.115, 2-sample t test: $p = 0.972$; Figure S2A). This result indicates that excitatory transmission is not significantly altered in Tg2576 mice and that the change in PSP amplitude recorded in the whole cell likely results from a decrease in inhibitory transmission. Therefore, we performed two experiments to determine whether inhibitory transmission was indeed reduced in Tg2576 mice. First, we isolated inhibitory postsynaptic current (IPSC) in presence of ionotropic glutamatergic receptor blockers and recorded the paired-pulse ratio (PPR, a measure of the release probability of GABA) of two

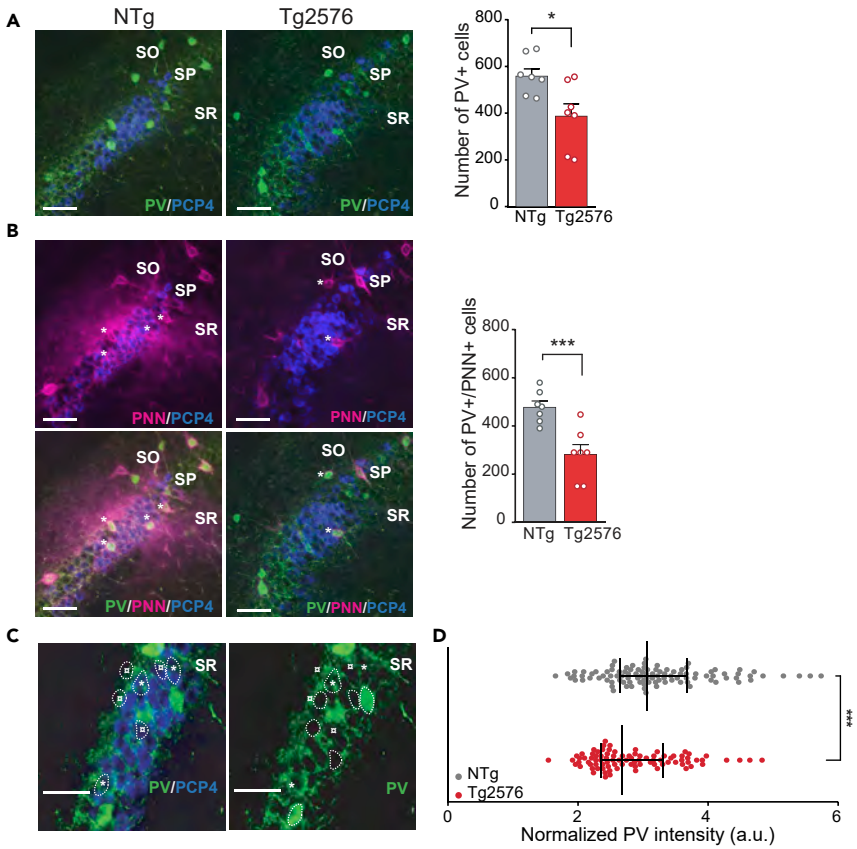



**Figure 1. Reduced number of PV+ cells associated with PNN loss in the area CA2 of Tg2576 mice**

(A) Stainings for PV (green) and PCP4 (blue) in area CA2 of 9-month-old NTg and Tg2576 mice (left) and stereological estimation of PV+ cells in area CA2 (right) reveal reduced numbers of PV+ cells in Tg2576 (n = 7) compared to NTg (n = 7) mice. *: $p < 0.05$, unpaired t test between genotypes.

(B) Stainings for WFA (PNN, magenta) and PCP4 (blue) in area CA2 and stereological estimation of absolute number indicate a decrease of PV+/PNN+ cells in area CA2 of Tg2576 (n = 7) compared to NTg (n = 7) mice. ***: $p < 0.005$, unpaired t test between genotypes.

(C) For assessment of PV intensity in area CA2, PV intensity of fluorescence of PV-/PCP4+ pyramidal neuron soma (dotted lines with ¤) is used as baseline for normalization of PV intensity of PV+/PCP4- cells (with *).

(D) Normalized PV intensity in the soma of PV+ cells from SP of area CA2 shows lower PV signal in PV+ cells of Tg2576 mice (n = 89 cells from seven mice) compared to those of NTg mice (n = 102 cells from seven mice). Bars represent the median with interquartiles and each dot represents a PV+ cell. ***: $p < 0.005$ between genotype, Mann-Whitney test. (A and B) Bar graphs represent the mean and error bars the SEM Scale bars = 50 μm. See also Figure S1.

consecutive IPSCs. We found that the PPR was much larger in Tg2576 compared to NTg mice (Tg2576: 0.777 ± 0.031; NTg: 0.522 ± 0.027; 2-sample t test, $p < 0.0001$; Figure 2B), indicating that GABA release probability was reduced in Tg2576 mice. Next, we recorded the frequency and amplitude of spontaneous IPSCs. We found that the frequency of spontaneous IPSCs was strongly reduced in Tg2576 mice (NTg: 21.5 ± 2.3 Hz; Tg2576: 13.5 ± 1.7Hz; 2-sample t test: $p = 0.017$, Figure S2B), but the amplitude was similar between genotypes (NTg: 32.9 ± 2.7 pA; Tg2576: 29.3 ± 3.7 pA; 2-sample t test: 0.345, Figure S2B). This result confirms that GABA release probability was reduced in Tg2576 mice. We then asked whether this decrease in inhibitory transmission was sufficient to reveal action potential firing in CA2 pyramidal neurons when stimulating CA3 inputs. Using field potential recordings, we found that stimulation of CA3 inputs resulted in population spikes in Tg2576 but not in NTg mice (two-way ANOVA with repeated measures for genotype: $p = 0.030$; Figure 2C). As we did not detect any change in either resting membrane potential or action potential threshold of CA2 pyramidal neurons (resting potential: NTg: −73.5 ± 1.0mV; Tg2576: −73.6 ± 1.0mV; 2-sample t test: $p = 0.958$; action potential threshold: NTg: −47.9 ± 2.2mV; Tg2576: −46.8 ± 1.6mV; 2-sample t test: $p = 0.671$; Figures S2C and S2D), we concluded that this increased action potential firing likely resulted from a change in inhibitory transmission.

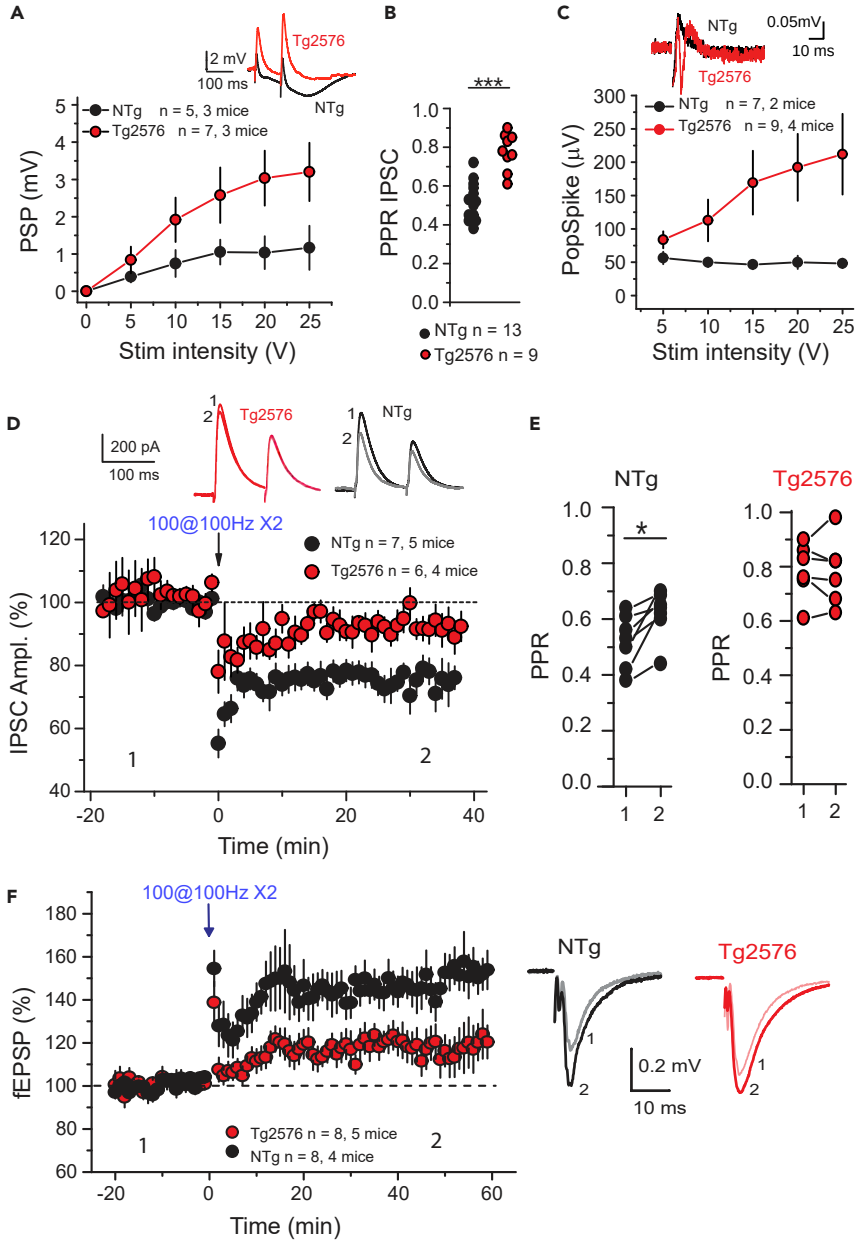



**Figure 2. Inhibitory transmission and PV-dependent long-term plasticity are altered in area CA2 of Tg2576 mice**

(A) Whole-cell recordings of CA2 pyramidal neurons during stimulation of CA3 axons reveal an increased amplitude of the postsynaptic potential (PSP), a composite of excitatory and inhibitory potentials, in slices prepared from Tg2576 mice (red) as compared to those of NTg mice (black). Average sample traces are shown on top.

(B) The paired-pulse ratio (PPR) of two inhibitory postsynaptic currents (IPSC) recorded in CA2 neurons with CA3 axonal stimulation is increased in slices of Tg2576 as compared to NTg mice.

(C) Averaged population spike (PS) amplitudes measured extracellularly in the pyramidal layer of area CA2 reveal that stimulation of CA3 inputs more readily results in action potential firing in Tg2576 than in NTg mice. Average sample traces are shown on top.

(D) The time course of normalized IPSC amplitudes recorded in CA2 pyramidal neurons before and after high frequency stimulations indicates that iLTD can be triggered in slices of NTg mice but only a transient depression is observed in Tg2576 mice.

(E) Averaged sample traces at the time indicated by number are shown on top. (E) The PPR of two IPSCs recorded in CA2 pyramidal neurons is increased following HFS (2) in samples prepared from NTg mice (black, left) (n = 6 recordings from four mice), but remains unchanged between before (1) and after (2) HFS in Tg2576 mice (red, right).

**Figure 2. *Continued***
(F) Amplitude of the field excitatory PSP in area CA2 shows a smaller increase following a high-frequency stimulation in Tg2576 compared to NTg mice.
Average sample traces of fEPSP at the time indicated by number are shown on the right. See also Figure S2.

We next asked whether PV-dependent long-term plasticity was affected in Tg2576 mice (Domínguez et al., 2019; Piskorowski and Chevaleyre, 2013). Whole-cell patch clamp recordings of area CA2 pyramidal cells were performed in order to measure IPSCs evoked by SC stimulation. Following a high-frequency stimulation (HFS), we observed iLTD in area CA2 of NTg animals (74.1 ± 4.1% of baseline; Figure 2D). In contrast, the same stimulation only induced a small depression of IPSC amplitude in Tg2576 mice (90.9 ± 3.8% of baseline; Figure 2D) that was significantly lower than that evoked in NTg mice (2-sample t test: $p = 0.013$). In agreement with the presynaptic locus of iLTD, the HFS was followed by a significant increased PPR in area CA2 of NTg mice (from 0.52 ± 0.03 to 0.62 ± 0.03, paired t test: $p = 0.010$; Figure 2E, left), but not in hippocampal slices from Tg2576 mice (from 0.78 ± 0.04 to 0.78 ± 0.05, paired t test: $p = 0.822$; Figure 2E, right). Finally, iLTD in area CA2 has been found to result in a large increase in the overall net PSP amplitude through a disinhibitory mechanism (Nasrallah et al., 2015). In agreement with the reduced iLTD, we observed that a HFS resulted in a much smaller increase in PSP amplitude in Tg2576 (115.9 ± 8.9%) compared to NTg mice (153.6 ± 7.4%, 2-sample t test: $p = 0.006$; Figure 2F).

## Social recognition and social memory are impaired in Tg2576 mice

The fact that inhibitory transmission and resulting plasticity are altered in area CA2 of Tg2576 mice strongly suggests that social recognition and social memory might be altered in this mouse model of AD (Domínguez et al., 2019; Leroy et al., 2017). To assess social recognition and social memory capacities of 9-month-old Tg2576 mice, we first determined that they demonstrate normal sociability (two-way ANOVA with repeated measures for chambers: $p < 0.0001$; for genotype: $p = 0.9834$; interaction: $p = 0.5966$; Sidak's post-hoc test for empty chamber vs familiar mouse: NTg: 56.58 ± 9.84 s vs 14.20 ± 3.76 s, $p = 0.0002$; Tg2576: 59.78 ± 8.36 s vs 10.69 ± 2.30 s, $p < 0.0001$; Figure 3A). However, when confronted with a choice between a familiar and a novel mouse, Tg2576 mice did not show significant preference for the unfamiliar individual (two-way ANOVA with repeated measures for chambers: $p < 0.0001$; for genotype: $p = 0.3151$; interaction: $p = 0.0038$; Sidak's post hoc test for familiar vs new mouse: 30.51 ± 4.45 s vs 41.27 ± 5.44 s, $p = 0.1180$; Figure 3B), revealing that their social recognition is impaired.

We then examined the ability of Tg2576 mice to form social memory with the 5-trial test (Domínguez et al., 2019; Kogan et al., 2000) (Figure 3C). As expected, NTg and Tg2576 behaved differently during four subsequent exposures to the same mouse (two-way ANOVA with repeated measures for trial: $p < 0.0001$; for genotype: $p = 0.0140$; interaction: $p < 0.0001$; Figure 3C). When a novel mouse was introduced (trial 5), NTg mice showed an expected rebound of interaction time, whereas Tg2576 mice still displayed the same amount of interaction (Figures 3C and 3D). As olfactory functions—crucial for social discrimination in mice—have been described to be impaired early in this mouse model of AD (Guerin et al., 2009), we performed a test to ensure that Tg2576 mice retained the ability to habituate and discriminate different odors (Yang and Crawley, 2009). Importantly, both NTg and Tg2576 mice were able to discriminate and habituate to both social and nonsocial odors (Figure S3), indicating that the inability to form social memory cannot be attributed to olfactory deficits in AD mice. These results indicate that social recognition and social memory, but not sociability, are impaired in 9-month-old Tg2576 mice.

## PNN disruption in area CA2 is sufficient to decrease PV presence and to abolish social memory capacity

We previously demonstrated that the presence of PNN around PV cells in area CA2 is critical to the emergence of both iLTD and social memory capability (Domínguez et al., 2019). Hence, we hypothesized that PV and PNN loss in this hippocampal area is contributing to social memory deficits in the Tg2576 mouse model of AD. To test this hypothesis, we performed bilateral injections of a vehicle (PBS) or Chondroitinase-ABC (ChABC) solution into area CA2 of female wild-type C57BL/6J (WT) mice. Seven days later, the intensity of the PNN staining was significantly decreased in area CA2 following ChABC injection (PBS: 29.46 ± 3.21 a.u.; ChABC: 17.19 ± 2.07 a.u.; $p = 0.0022$, two-sided unpaired t test, Figures 4A and S4). Interestingly, although the estimated absolute number of PV+ cells in area CA2 pyramidal layer was not modified by ChABC injection (Figure S4), this was associated with lower intensity of PV staining in PV+ cells of ChABC

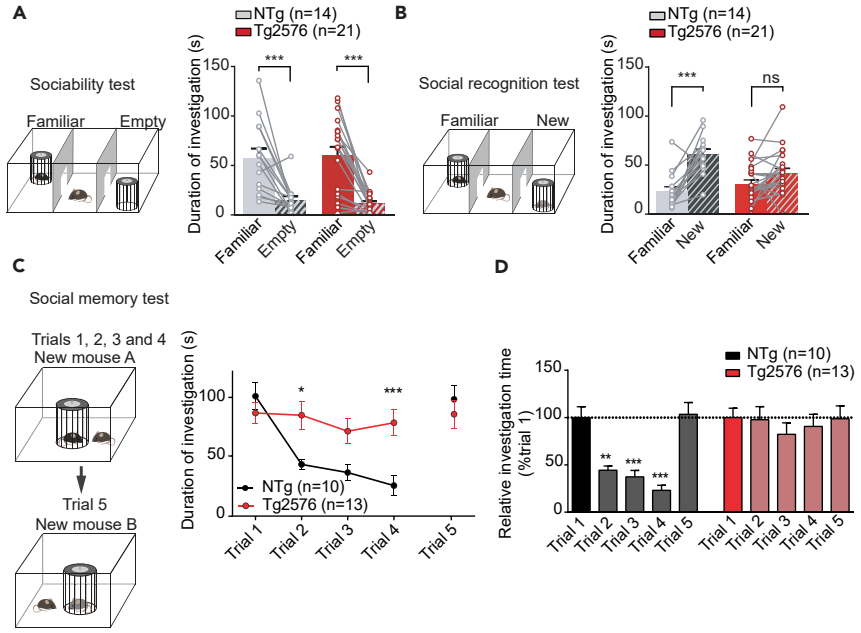



**Figure 3. Social recognition and social memory are impaired in Tg2576 mice**

(A) Sociability test in the 3-chamber paradigm indicates that mice from both genotypes spend more time with a conspecific than an empty cage. ***: $p < 0.005$ repeated-measures two-way ANOVA followed by Sidak's post hoc test between cages.

(B) Social recognition test reveals that NTg mice spend more time with a new mouse than with the familiar one, whereas Tg2576 mice spend an equal amount of time with both mice. ***: $p < 0.005$ repeated-measures two-way ANOVA followed by Sidak's post hoc test between cages.

(C) Social memory assessed with the 5-trial test reveals impairment in Tg2576 mice. *: $p < 0.05$, ***: $p < 0.005$ between trials for NTg and Tg2576 mice, repeated-measures two-way ANOVA followed by Sidak's post hoc test.

(D) Normalized measures show that the investigation time of NTg mice decreases significantly from trial two to 4. In contrast, no significant change in investigation time is observed across trials in Tg2576 mice. Repeated-measures one-way ANOVA followed by Sidak's post hoc test. **$p < 0.01$ and ***$p < 0.005$ between trial n and trial 1. Bar graphs represent the mean and error bars SEM See also Figure S3.

mice (Mann-Whitney test, $p < 0.0001$; Figure 4B), suggesting again that the loss of PNN in area CA2 induces a decrease in PV cell activity.

Local injection of ChABC in area CA2 of female WT mice resulted in impaired social memory (two-way ANOVA with repeated measures for trial: $p < 0.0001$; for treatment: $p = 0.0024$; interaction: $p = 0.0105$; n = 10 PBS-injected and 12 ChABC-injected mice; Figures 4C and 4D). Here, we confirmed that degradation of the PNN in area CA2 is sufficient to preclude the formation of social memory, consistent with our findings using male mice (Domínguez et al., 2019).

## Local NRG1 restores PV+/PNN+ cells and social memory formation in Tg2576 mice

In order to demonstrate that disruption of PNN and PV interneuron function in area CA2 plays a pivotal role in social memory deficits of the Tg2576 mouse model of AD, we aimed at increasing PV cell activity and/or PNN presence locally in area CA2 of Tg2576 mice. To do so, we used bilateral CA2 injections of a control (PBS) or NRG1 solution in NTg and Tg2576 mice (Figure 5A). Noticeably, 5 days following local injections, we observed an increased number of detectable PV+ cells in area CA2 of Tg2576 mice injected with NRG1 (556.0 $\pm$ 27.94 cells) compared to PBS-injected Tg2576 mice (390.9 $\pm$ 43.73 cells; two-way ANOVA for injection: $p = 0.0042$; for genotype: $p = 0.0006$; interaction: $p = 0.3511$; Sidak's post hoc test Tg2576-PBS vs Tg2576-NRG1: $p = 0.0412$; Figure 5A), totally abolishing the differences between genotypes (NTg-PBS mice, 586.0 $\pm$ 47.89 cells; Sidak's post hoc test NTg-PBS vs Tg2576-NRG1: $p = 0.9967$; Figure 5A). This rescue was mainly because of an effect in the SP (Figure S5A). The increased number of PV+ cells following NRG1 injection was accompanied by a restored presence of PNN around PV cells in Tg2576 (344.0 $\pm$ 29.78 cells) compared to NTg mice (425.0 $\pm$ 44.78 cells; two-way ANOVA for injection: $p = 0.0101$; for genotype:

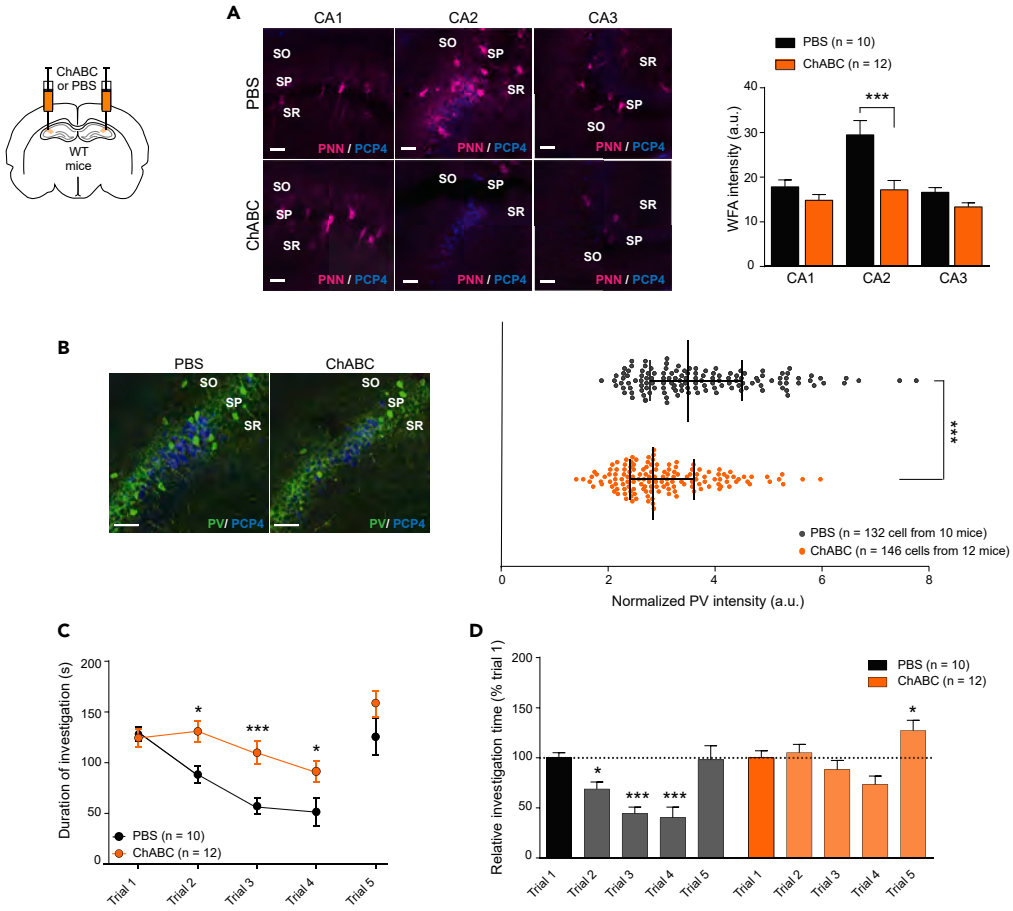



**Figure 4. PNN disruption in area CA2 is sufficient to decrease PV presence and to abolish social memory capacity**

(A) Staining for WFA (PNN, magenta) 7 days after local injections of PBS or ChABC solution in area CA2 shows a large decrease of PNN presence in area CA2 (***: $p < 0.005$ for unpaired t test with Bonferroni's correction for multiple comparisons between treatment), while sparing CA1 and CA3 areas.

(B) Parvalbumin intensity in PV+ cells from SP of area CA2 is reduced after ChABC injection. Bars represent the median with interquartiles and each dot represents a PV+ cell. ***: $p < 0.0001$, Mann-Whitney test.

(C) The total duration of investigation of an unknown mouse reveals alteration of social memory formation in WT mice following ChABC injection in area CA2. *: $p < 0.05$, ***: $p < 0.005$ between trials for NTg and Tg2576 mice, RM two-way ANOVA followed by Sidak's post hoc test.

(D) Normalized data show a significant decrease of the investigation time of PBS mice from trial two to 4. In contrast, no significant change in investigation time is observed in ChABC mice. *$p < 0.05$, ***$p < 0.005$ between trial n and trial 1, repeated-measures one-way ANOVA followed by Sidak's post hoc test. (A, C, and D) Bar graphs represent the mean and error bars the SEM. Scale bar = 50 μm. See also Figure S4.

$p < 0.0001$; interaction: $p = 0.3642$; Sidak's post hoc test NTg-PBS vs Tg2576-NRG1: $p = 0.4455$; Figure 5B). Nonetheless, it did not induce an increase of PNN presence around non-PV neurons (NTg-PBS: 30.00 ± 9.19 cells; NTg-NRG1: 45.00 ± 6.87 cells; Tg2576-PBS: 17.27 ± 3.84 cells; Tg2576-NRG1: 24.00 ± 6.18 cells; Figures S5C–S5F). Noticeably, we observed a significantly higher intensity of PV staining in PV+ cells following NRG1 injection in area CA2 of Tg2576 mice, again abolishing the differences between genotypes (Kruskal-Wallis and Dunn's post hoc test Tg2576-PBS vs Tg2576-NRG1: $p < 0.0001$; NTg-PBS vs Tg2576-NRG1: $p = 0.7363$; Figure 5C). This change in PV expression following NRG1 injection suggests that NRG1 has promoted the maturation of PNN around PV+ cells specifically and/or triggered an increase of activity of PV interneurons in area CA2 of Tg2576 mice.

Five days after intra-CA2 injections of NRG1 or PBS solution, mice from the four experimental groups were subjected to the 5-trial social memory test. We observed that Tg2576-PBS mice showed the same deficit in

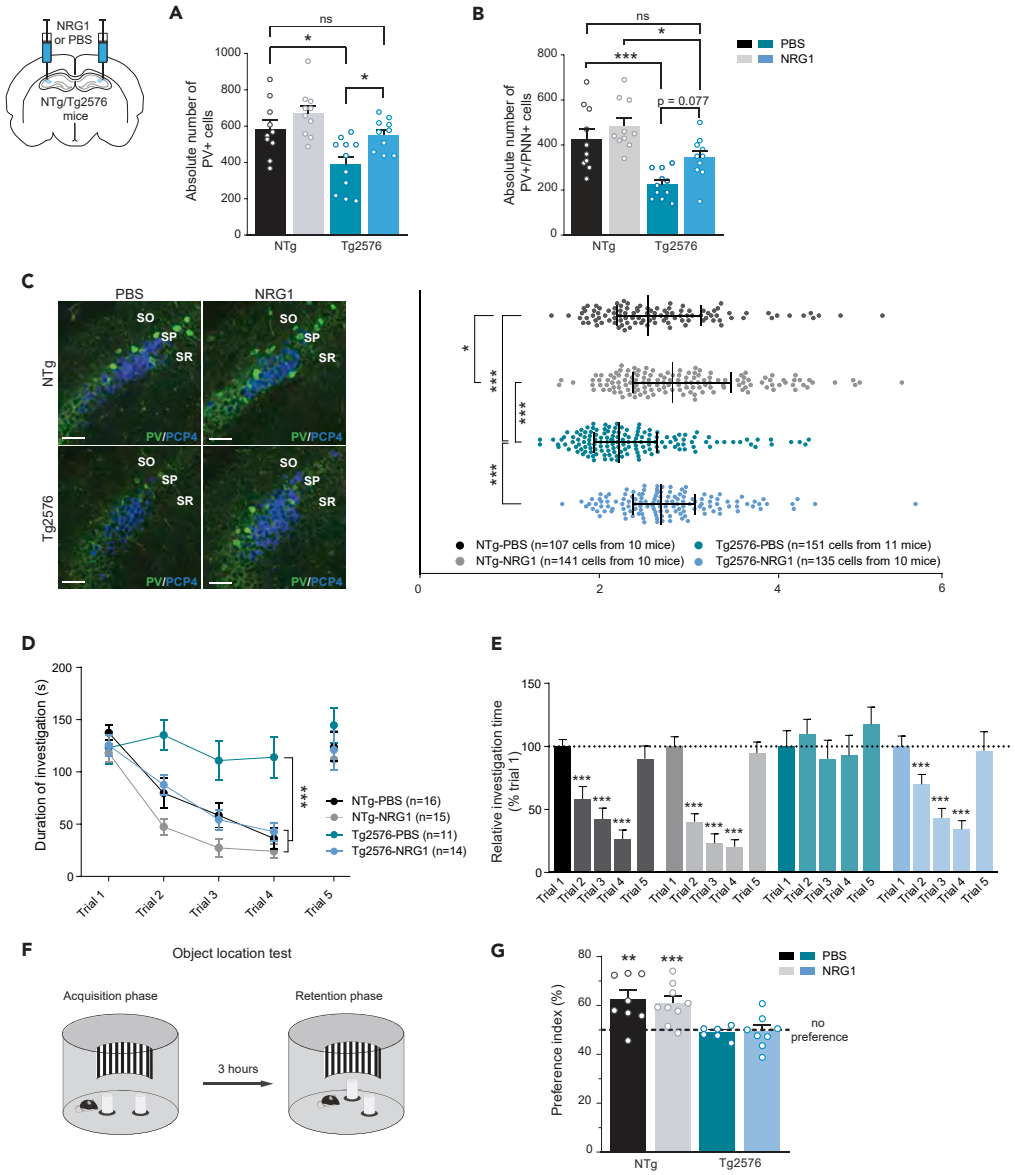



**Figure 5. Local NRG1 restores PV+/PNN+ cells and social memory formation in Tg2576 mice**

(A) Quantification of PV+ cells 5 days after NRG1 injection in area CA2 reveals a restoration of the number of detectable PV+ cells in area CA2 of Tg2576 mice injected with NRG1 compared to Tg2576-PBS mice, abolishing the difference between genotypes. *: $p < 0.05$, ***: $p < 0.005$, two-way ANOVA followed by Sidak's post hoc test.

(B) The increased number of PV+ cells following NRG1 injection was accompanied by a restored presence of PNN around PV cells in Tg2576 mice compared to NTg ones. **: $p < 0.05$, ***: $p < 0.005$, ns: $p > 0.05$, two-way ANOVA followed by Sidak's post hoc test.

(C) PV intensity of the soma of PV+ cells from area CA2 SP shows that PV signal is higher in PV+ cells of Tg2576-NRG1 mice compared to those of Tg2576-PBS mice. Bar represents the median and interquartiles and each dot represents one PV+ cell. *: $p < 0.05$, ***: $p < 0.005$, Kruskal-Wallis followed by Dunn's post hoc test.

(D) Social memory test indicates that local injections of NRG1 in area CA2 induce a restoration of social memory formation in Tg2576 mice. ***: $p < 0.005$ repeated-measures two-way ANOVA.

(E) Normalized data relative to mean interaction time during trial one shows a significant decrease in investigation time in Tg2576 mice injected with NRG1 from trial two to four similar of NTg groups. In contrast, no significant change in investigation time is observed in Tg2576 mice injected with PBS. ***$p < 0.005$ between trial n and trial 1, repeated-measures one-way ANOVA followed by Sidak's post hoc test.

(F) Spatial memory was assessed with an object location test.

**Figure 5. *Continued***
(G) Preference index of the investigation time between displaced and fixed object during retention phase indicate that spatial memory is altered in Tg2576 mice, even following NRG1 injections. **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.005$ for one-sample t test against chance (50%). (A, B, E, and G) Bar graphs represent the mean and error bars of the SEM See also Figure S5.

social memory as previously described (one-way ANOVA with repeated measures, Sidak's post hoc test trial n vs trial 1: $p > 0.05$ for all trials; Figure 5D). However, NRG1 injections into area CA2 accelerated social learning in mice from both genotypes compared to PBS-injected individuals (two-way ANOVA with repeated measures for trial: $p < 0.0001$; for injection: $p < 0.0001$; interaction: $p < 0.0001$; Figure 5D). Strikingly, Tg2576 mice injected with NRG1 exhibited the same learning curve as the NTg-PBS group (Figures 5D and 5E), indicating that local activation of NRG1-dependent signaling was sufficient to restore normal social memory capacity in this mouse model of AD.

Because specific manipulations of area CA2 are known to impact social memory without affecting performance in other types of hippocampal-dependent memory (Hitti and Siegelbaum, 2014), we used another cohort of mice to address whether NRG1 injection in area CA2 impacted spatial memory . Mice from each experimental group were subjected to the novel object location test 5 days after NRG1 or saline injection into area CA2 (Figure 5F). During the test, NTg mice showed a preference for the displaced object, independent of their treatment (one-sample t test vs chance: NTg-PBS: $p = 0.0097$; NTg-NRG1: $p = 0.0033$; Figure 5G). In contrast, all Tg2576 mice spent a similar amount of time exploring the displaced and the fixed objects, regardless of treatment with NRG1 (one-sample t test vs chance: Tg2576-PBS: $p = 0.5097$; Tg2576-NRG1: $p = 0.8457$; Figure 5G), indicating that spatial memory remained impaired in Tg2576 mice. Therefore, activation of NRG1-dependent signaling in area CA2 is able to restore social memory, but not spatial memory, of Tg2576 mice.

## DISCUSSION

Our study shows that disruption of PNN around PV interneurons in area CA2 of the Tg2576 mouse model of AD plays a pivotal role in reduced inhibitory control and plasticity in this hippocampal area, and that these deficits are linked to social memory impairments. Furthermore, local injection of NRG1 is sufficient to enhance PV and PNN presence in area CA2 of Tg2576 mice, as well as restore social memory capacity in this AD mouse model.

Our study indicates that 9-month-old Tg2576 mice have a reduced number of PV+ interneurons and PV+/PNN+ cells in area CA2. This agrees with previous work showing the same deficits in area CA2 of Tg2576 mice at 6 months of age (Cattaud et al., 2018). Moreover, the reduced number of PV+ cells and PNN in area CA2 of Tg2576 mice is associated with decreased intensity of PV staining in PV+ cells. As PV content is positively correlated with both PV cell activity and GABA release (Donato et al., 2013; Favuzzi et al., 2017; Yamada et al., 2015), this finding is in accordance with the idea that PV cell activity is reduced in the Tg2576 mouse model of AD, and that PNN absence around PV cells contributes to this reduced neuronal activity. As such, our findings suggest that the lack of PNN around PV cells leads to low neuronal activity associated with low PV protein content, rather than triggering the loss of these interneurons, because of disrupted protection against oxidative stress, for instance (Cabungcal et al., 2013; Suttkus et al., 2012). The approximate increase of about 40% of detectable PV+ neurons 5 days after NRG1 injection supports this idea.

Notably, we described that these PV/PNN modifications are associated with reduced inhibitory control in area CA2 of Tg2576 mice, resulting in hyperexcitability of pyramidal neurons within this hippocampal area. As a consequence, iLTD is also strongly impaired, demonstrating for the first time that this PV-dependent long-term plasticity is dysfunctional in a mouse model of AD. A loss of PV interneuron density was also reported in area CA2 of a mouse model of the 22q11.2 deletion syndrome, which is linked with elevated schizophrenia diagnosis (Piskorowski et al., 2016). In contrast to the Tg2576 mouse model, this was also accompanied by a significant reduction in the resting membrane potential of CA2 pyramidal neurons, reducing the output of area CA2 and likely impacting social memory. Hence, although the loss of PV cells in these two pathological conditions has opposite effect on CA2 output activity, both mouse lines show impaired social memory. This highlights the fact that physiological activity of area CA2 is required to form social memory—directly and/or through its projections to ventral CA1 (Meira et al., 2018) —, and that local PV cells, by maintaining E/I balance, play a crucial role in the maintenance of such physiological activity.

Hence, 9-month-old Tg2576 mice devoid of plaques show deep anatomical and functional changes in area CA2 that may interfere with their social memory capacity. Although social memory deficits are commonly observed in AD patients, the assessment of this specific kind of memory has been poorly explored in AD mouse models. To our knowledge, only one study addressed this question, revealing impaired social memory in very old female Tg2576 mice (22–23 months old) (Deacon et al., 2009). Our findings indicate that the Tg2576 mouse model does not have impaired sociability, but that social recognition and social memory are both affected.

Interestingly, the anatomical and functional properties of area CA2 of 9-month-old Tg2576 mice are reminiscent of those observed in juvenile mice. Indeed, young mice also present low PNN in area CA2 associated with the inability to induce iLTD and to form social memory until late adolescence (Domínguez et al., 2019). This study indicates that PNN maturation during late adolescence controls the emergence of PV-dependent long-term plasticity in area CA2, and that activation of the tyrosine kinase receptor ErbB4 with endogenous NRG1 is required for iLTD induction. Our findings show that a single local injection of NRG1 is sufficient to restore social memory capacity in the Tg2576 mouse model of AD, and that this is associated with a recovery of the PV/PNN network in area CA2.

The growth factor NRG1 is essential for the development of the nervous system. NRG1 drives the experience-dependent maturation of cortical and hippocampal networks through the activation of its receptor ErbB4, which is densely expressed by PV interneurons (Fazzari et al., 2010; Mei and Nave, 2014; Mei and Xiong, 2008). During normal postnatal development, activity-dependent NRG1/ErbB4 signaling regulates excitatory inputs onto PV cells, probably through the stabilization of synaptic glutamatergic AMPA receptors, and thus permits synaptic plasticity and maturation to occur (Li et al., 2007; Sun et al., 2016). Interestingly, NRG1/ErbB4 activation attenuates the Aβ-induced LTP impairment in hippocampal slices (Min et al., 2011). NRG1 infusion for one month into the lateral ventricle of 12-month-old Tg2576 mice was shown to improve their spatial learning and memory, associated with increased dendritic spine density in area CA1 (Ryu et al., 2016). NRG1 activity is highly dependent on its cleavage by the β-secretase BACE1, which is also responsible for the production of Aβ-peptide through the cleavage of APP (Mei and Xiong, 2008). It is thus possible that the beneficial effect of NRG1 in the context of AD is because of shifting BACE1 activity toward NRG1 instead of APP cleavage, leading to reduced amyloidopathy. However, here we show that a single NRG1 local injection is sufficient for inducing changes of PV/PNN network lasting at least 5 days, and able to sustain recovery of a specific cognitive function. This suggests that the beneficial effects of NRG1 are more likely because of long-lasting changes of PV cell function and associated synaptic plasticity rather than reduced local amyloid charge. Many studies suggest the existence of a positive feedback relationship between synaptic activity induced by experience and NRG1 signaling (Li et al., 2007; Sun et al., 2016). It is indeed possible that, in the context of AD, reduced PV cell activity is associated with downregulation of NRG1 signaling. Thus, a single boost of NRG1 may be sufficient to trigger PV cell function in a way that experience-dependent activity will be rescued. We have previously shown that a transient exposure to an environment with high social and sensory stimulations is sufficient to restore PV/PNN presence in the hippocampus of Tg2576 mice (Cattaud et al., 2018), and to induce long-lasting beneficial effect on their memory performance (Verret et al., 2013). It is thus possible that exposure to an enriched environment has provided the trigger necessary to enhance synaptic maturation of PV cells through NRG1-experience-dependent activity. This also suggests that the beneficial effects of NRG1 on the PV/PNN network of Tg2576 mice might not be specific to area CA2 and social memory, and could be generalized to other brain areas in which other cognitive functions rely.

Altogether, our work underpins the critical role of PNN-enwrapped PV cells of area CA2 in social memory deficits of the Tg2576 mouse model of AD. Importantly, local stimulation of NRG1 signaling is sufficient to restore PNN presence around PV cells, and normal social memory. This indicates that promoting experience-dependent PV cell activity, whether it is with environmental simulations (Cattaud et al., 2018; Iaccarino et al., 2016; Martorell et al., 2019), or by mimicking their impact by activating pro-maturation pathways such as NRG1/ErbB4, can be used to tackle AD-related cognitive deficits.

## Limitations of the study

Our study was conducted using female mice only. Social memory tests involve interaction of mice arising from different cages and litters. Tg2576 males have been reported to be significantly more aggressive than their non-transgenic littermates; with aging, their cohabitation becomes difficult because it triggers fighting,

aggressive behavior, and stress. Hence, they usually need to be isolated from their littermate, which is prohibitive for social memory tests.

## STAR★METHODS

Detailed methods are provided in the online version of this paper and include the following:

- KEY RESOURCES TABLE
- RESOURCE AVAILABILITY
  - Lead contact
  - Materials availability
  - Data and code availability
- EXPERIMENTAL MODEL AND SUBJECT DETAILS
- METHOD DETAILS
  - Stereotaxic injections
  - Behavioral experiments
  - Tissue preparation and immunohistochemistry
  - Image analysis
  - Electrophysiological recordings
- QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS

## SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental information can be found online at https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.103895.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Lionel Moulédous and Daniel H. Kim for critically reading the article, and Stéphane Pech for animal care and technical help. Mice were housed in the ABC Facility of ANEXPLO, Toulouse. The authors greatly acknowledge the Mouse Behavioral Core (MBC) of the Center of Integrative Biology. This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique, the University of Toulouse, and by the Association France Alzheimer and the Institut Universitaire de France. Graphical abstract was created with BioRender.com.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conceptualization, C.C.R., V.Ch., and L.V.; Investigation, C.C.R., V.R., G.B., M.L., S.L., V.Ch., and V.Ca.; Writing – Original Draft, V.Ch. and L.V.; Writing – Review & Editing, C.C.R., V.R., G.B., R.A.P., C.R., V.Ch., and L.V.; Funding Acquisition, C.R. and L.V.; Resources, C.L.; Supervision, V.Ch. and L.V.

## DECLARATION OF INTERESTS

The authors declare no conflict of interests.

Received: August 9, 2021
Revised: December 7, 2021
Accepted: February 7, 2022
Published: March 18, 2022

## REFERENCES

Botcher, N.A., Falck, J.E., Thomson, A.M., and Mercer, A. (2014). Distribution of interneurons in the CA2 region of the rat hippocampus. Front. Neuroanat. *8*, 104. https://doi.org/10.3389/fnana.2014.00104.

Cabungcal, J.H., Steullet, P., Morishita, H., Kraftsik, R., Cuenod, M., Hensch, T.K., and Do, K.Q. (2013). Perineuronal nets protect fast-spiking interneurons against oxidative stress. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A *110*, 9130–9135. https://doi.org/10.1073/pnas.1300454110.

Canning, D.R., McKeon, R.J., DeWitt, D.A., Perry, G., Wujek, J.R., Frederickson, R.C., and Silver, J. (1993). beta-Amyloid of Alzheimer's disease induces reactive gliosis that inhibits axonal outgrowth. Exp. Neurol. *124*, 289–298. https://doi.org/10.1006/exnr.1993.1199.

Carstens, K.E., Phillips, M.L., Pozzo-Miller, L., Weinberg, R.J., and Dudek, S.M. (2016). Perineuronal nets suppress plasticity of excitatory synapses on CA2 pyramidal neurons. J. Neurosci. *36*, 6312–6320. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0245-16.2016.

Cattaud, V., Bezzina, C., Rey, C.C., Lejards, C., Dahan, L., and Verret, L. (2018). Early disruption of parvalbumin expression and perineuronal nets in the hippocampus of the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease can be rescued by enriched environment. Neurobiol. Aging *72*, 147–158. https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2018.08.024.

Celio, M.R. (1993). Perineuronal nets of extracellular matrix around parvalbumin-containing neurons of the hippocampus. Hippocampus *3*, 55–60.

Chevaleyre, V., and Siegelbaum, S.A. (2010). Strong CA2 pyramidal neuron synapses define a powerful disynaptic cortico-hippocampal loop. Neuron *66*, 560–572. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.04.013.

Deacon, R.M., Koros, E., Bornemann, K.D., and Rawlins, J.N. (2009). Aged Tg2576 mice are impaired on social memory and open field habituation tests. Behav. Brain Res. *197*, 466–468. https://doi.org/10.1016/j.bbr.2008.09.042.

Domínguez, S., Rey, C.C., Therreau, L., Massotte, D., Verret, L., Piskorowski, R., and Chevaleyre, V. (2019). Maturation of PNN and ErbB4 signaling in area CA2 during adolescence underlies the emergence of Parvalbumin interneuron plasticity and social memory. Cell Rep. *29*, 1099–1112.e4. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.09.044.

Donato, F., Rompani, S.B., and Caroni, P. (2013). Parvalbumin-expressing basket-cell network plasticity induced by experience regulates adult learning. Nature *504*, 272–276. https://doi.org/10.1038/nature12866.

Favuzzi, E., Marques-Smith, A., Deogracias, R., Winterflood, C.M., Sanchez-Aguilera, A., Mantoan, L., Maeso, P., Fernandes, C., Ewers, H., and Rico, B. (2017). Activity-dependent gating of parvalbumin interneuron function by the perineuronal net protein brevican. Neuron *95*, 639–655.e10. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.06.028.

Fazzari, P., Paternain, A.V., Valiente, M., Pla, R., Lujan, R., Lloyd, K., Lerma, J., Marin, O., and Rico, B. (2010). Control of cortical GABA circuitry development by Nrg1 and ErbB4 signalling. Nature *464*, 1376–1380. https://doi.org/10.1038/nature08928.

Gu, Y., Tran, T., Murase, S., Borrell, A., Kirkwood, A., and Quinlan, E.M. (2016). Neuregulin-dependent regulation of fast-spiking interneuron excitability controls the timing of the critical period. J. Neurosci. *36*, 10285–10295. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4242-15.2016.

Guerin, D., Sacquet, J., Mandairon, N., Jourdan, F., and Didier, A. (2009). Early locus coeruleus degeneration and olfactory dysfunctions in Tg2576 mice. Neurobiol. Aging *30*, 272–283. https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2007.05.020.

Hitti, F.L., and Siegelbaum, S.A. (2014). The hippocampal CA2 region is essential for social memory. Nature *508*, 88–92. https://doi.org/10.1038/nature13028.

Hsiao, K., Chapman, P., Nilsen, S., Eckman, C., Harigaya, Y., Younkin, S., Yang, F., and Cole, G. (1996). Correlative memory deficits, Abeta elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. Science *274*, 99–102.

Iaccarino, H.F., Singer, A.C., Martorell, A.J., Rudenko, A., Gao, F., Gillingham, T.Z., Mathys, H., Seo, J., Kritskiy, O., Abdurrob, F., et al. (2016). Gamma frequency entrainment attenuates amyloid load and modifies microglia. Nature *540*, 230–235. https://doi.org/10.1038/nature20587.

Kogan, J.H., Frankland, P.W., and Silva, A.J. (2000). Long-term memory underlying hippocampus-dependent social recognition in mice. Hippocampus *10*, 47–56. https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1063(2000)10:1<47::AID-HIPO5>3.0.CO;2-6.

Leroy, F., Brann, D.H., Meira, T., and Siegelbaum, S.A. (2017). Input-timing-dependent plasticity in the hippocampal CA2 region and its potential role in social memory. Neuron *95*, 1089–1102 e5. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.07.036.

Li, B., Woo, R.S., Mei, L., and Malinow, R. (2007). The neuregulin-1 receptor erbB4 controls glutamatergic synapse maturation and plasticity. Neuron *54*, 583–597. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.03.028.

Martorell, A.J., Paulson, A.L., Suk, H.J., Abdurrob, F., Drummond, G.T., Guan, W., Young, J.Z., Kim, D.N., Kritskiy, O., Barker, S.J., et al. (2019). Multi-sensory gamma stimulation ameliorates Alzheimer's-associated pathology and improves cognition. Cell *177*, 256–271.e22. https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.02.014.

Mei, L., and Nave, K.A. (2014). Neuregulin-ERBB signaling in the nervous system and neuropsychiatric diseases. Neuron *83*, 27–49. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.06.007.

Mei, L., and Xiong, W.C. (2008). Neuregulin 1 in neural development, synaptic plasticity and schizophrenia. Nat. Rev. Neurosci. *9*, 437–452. https://doi.org/10.1038/nrn2392.

Meira, T., Leroy, F., Buss, E.W., Oliva, A., Park, J., and Siegelbaum, S.A. (2018). A hippocampal circuit linking dorsal CA2 to ventral CA1 critical for social memory dynamics. Nat. Commun. *9*, 4163. https://doi.org/10.1038/s41467-018-06501-w.

Min, S.S., An, J., Lee, J.H., Seol, G.H., Im, J.H., Kim, H.S., Baik, T.K., and Woo, R.S. (2011). Neuregulin-1 prevents amyloid beta-induced impairment of long-term potentiation in hippocampal slices via ErbB4. Neurosci. Lett. *505*, 6–9. https://doi.org/10.1016/j.neulet.2011.05.246.

Moy, S.S., Nadler, J.J., Perez, A., Barbaro, R.P., Johns, J.M., Magnuson, T.R., Piven, J., and Crawley, J.N. (2004). Sociability and preference for social novelty in five inbred strains: an approach to assess autistic-like behavior in mice. Genes Brain Behav. *3*, 287–302. https://doi.org/10.1111/j.1601-1848.2004.00076.x.

Nasrallah, K., Piskorowski, R.A., and Chevaleyre, V. (2015). Inhibitory plasticity permits the recruitment of CA2 pyramidal neurons by CA3(1,2,3). eNeuro *2*. https://doi.org/10.1523/ENEURO.0049-15.2015.

Nasrallah, K., Therreau, L., Robert, V., Huang, A.J.Y., McHugh, T.J., Piskorowski, R.A., and Chevaleyre, V. (2019). Routing hippocampal information flow through parvalbumin interneuron plasticity in area CA2. Cell Rep. *27*, 86–98 e3. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.03.014.

Piskorowski, R.A., and Chevaleyre, V. (2013). Delta-opioid receptors mediate unique plasticity onto parvalbumin-expressing interneurons in area CA2 of the hippocampus. J. Neurosci. *33*, 14567–14578. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0649-13.2013.

Piskorowski, R.A., Nasrallah, K., Diamantopoulou, A., Mukai, J., Hassan, S.I., Siegelbaum, S.A., Gogos, J.A., and Chevaleyre, V. (2016). Age-dependent specific changes in area CA2 of the Hippocampus and social memory deficit in a mouse model of the 22q11.2 deletion syndrome. Neuron *89*, 163–176. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.11.036.

Ryu, J., Hong, B.H., Kim, Y.J., Yang, E.J., Choi, M., Kim, H., Ahn, S., Baik, T.K., Woo, R.S., and Kim, H.S. (2016). Neuregulin-1 attenuates cognitive function impairments in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. Cell Death Dis. *7*, e2117. https://doi.org/10.1038/cddis.2016.30.

Stevenson, E.L., and Caldwell, H.K. (2014). Lesions to the CA2 region of the hippocampus impair social memory in mice. Eur. J. Neurosci. *40*, 3294–3301. https://doi.org/10.1111/ejn.12689.

Sun, Y., Ikrar, T., Davis, M.F., Gong, N., Zheng, X., Luo, Z.D., Lai, C., Mei, L., Holmes, T.C., Gandhi, S.P., and Xu, X. (2016). Neuregulin-1/ErbB4 signaling regulates visual cortical plasticity. Neuron *92*, 160–173. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.08.033.

Suttkus, A., Rohn, S., Jager, C., Arendt, T., and Morawski, M. (2012). Neuroprotection against iron-induced cell death by perineuronal nets - an in vivo analysis of oxidative stress. Am. J. Neurodegener. Dis. *1*, 122–129.

Verret, L., Krezymon, A., Halley, H., Trouche, S., Zerwas, M., Lazouret, M., Lassalle, J.M., and Rampon, C. (2013). Transient enriched housing before amyloidosis onset sustains cognitive improvement in Tg2576 mice. Neurobiol. Aging *34*, 211–225. https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2012.05.013.

Verret, L., Mann, E.O., Hang, G.B., Barth, A.M., Cobos, I., Ho, K., Devidze, N., Masliah, E., Kreitzer, A.C., Mody, I., et al. (2012). Inhibitory interneuron deficit links altered network activity and cognitive dysfunction in Alzheimer model. Cell *149*, 708–721. https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.02.046.

Yamada, J., Ohgomori, T., and Jinno, S. (2015). Perineuronal nets affect parvalbumin expression in GABAergic neurons of the mouse hippocampus. Eur. J. Neurosci. *41*, 368–378. https://doi.org/10.1111/ejn.12792.

Yang, M., and Crawley, J.N. (2009). Simple behavioral assessment of mouse olfaction. Curr. Protoc. Neurosci. *Chapter 8*, Unit 8 24. https://doi.org/10.1002/0471142301.ns0824s48.

## STAR★METHODS

### KEY RESOURCES TABLE

| REAGENT or RESOURCE | SOURCE | IDENTIFIER |
|---|---|---|
| Antibodies | | |
| Wisteria Floribunda Agglutinin (WFA)- biotinylated | Sigma-Aldrich | Cat# L-1516, RRID:AB_2620171 |
| Goat polyclonal anti-parvalbumin antibody | Swant | Cat# PVG213, RRID:AB_2721207 |
| Rabbit polyclonal anti-purkinje cell protein 4 (PCP4) | Santa Cruz | Cat# sc-74816, RRID:AB_2236566 |
| DyLight 549 Streptavidin antibody | Vector lab | Cat# SA-5549, RRID:AB_2336408 |
| Donkey anti-Goat IgG (H + L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 488 | ThermoFisher Scientific | Cat# A-11055, RRID:AB_2534102 |
| Donkey anti-Rabbit IgG (H + L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 647 | ThermoFisher Scientific | Cat# A-31573, RRID:AB_2536183 |
| Chemicals, peptides, and recombinant proteins | | |
| Chondroitinase ABC | Sigma-Aldrich | Cat# C3667 |
| Human Hereguline 1b | Peprotech | 100-03 |
| NBQX | TOCRIS | Cat#1431/1mg |
| D-AP5 | Hello bio | HB0225-100mg |
| Experimental models: Organisms/strains | | |
| Tg(APPSWE)2576Kha | Gift from Karen Hsiao | Cat# 3029285, RRID:MGI:3029285 |
| C57BL/6J *Mus musculus* | Jackson lab | Cat# JAX:000664, RRID:IMSR_JAX:000664 |
| Software and algorithms | | |
| ImageJ- Used for image analyzing and quantification of intensity | ImageJ | https://imagej.net/Welcome |
| Mercator – Used for cell counting and stereology | Explora Nova | N/A |
| Axograph X software for data acquisition | Axograph | https://axograph.com |
| pClamp10- data acquisition | Molecular devices | https://www.moleculardevices.com |
| Origin Pro- data analysis | Origin Lab | https://www.originlab.com |
| GraphPad Prism version 6.00 and 9.00 | GraphPad Software | https://www.graphpad.com |

### RESOURCE AVAILABILITY

#### Lead contact

Further information and requests for resources and reagents should be directed to and will be fulfilled by the lead contact, Laure Verret (laure.verret@univ-tlse3.fr).

#### Materials availability

This study did not generate new unique reagents.

#### Data and code availability

- All data reported in this paper will be shared by the lead contact upon request.
- This paper does not report original code.
- Any additional information required to reanalyze the data reported in this paper is available from the lead contact upon request.

### EXPERIMENTAL MODEL AND SUBJECT DETAILS

Experiments were performed on female mice, aged from 9 to 10 months old, of the transgenic line Tg2576 (Hsiao et al., 1996) from our in-house colony. Tg2576 mice overexpress a double mutant form of human APP695 (Lys670-Asn, Met671-Leu [K670N, M671L]), driven by hamster prion protein promoter. Hemizygous Tg2576 males are bred with C57B6/SJL F1 females (Charles River, France). Mice are maintained 2 to 5 per

cage on a 12-hour light/12-hour dark cycle with free access to food and water. Littermates were randomly assigned to experimental groups. ChABC injections were performed on female C57BL/6J wild-type mice (WT; Charles River, France), aged from 4 to 6 months old. All experiments were performed in accordance with the policies of the European Union (2010/63/EU) for the care and use of laboratory animals. Our animal facility is fully accredited by the French Direction of Veterinary Services (D 31–555–11, Sep 19, 2016) and experimental procedures conducted in this study were authorized by local ethical committees and the French Ministry for Research (#20210–2019041014597476 v4, #02118.02, 2017, #12406-2016040417305913 v10).

## METHOD DETAILS

### Stereotaxic injections

Female from the Tg2576 line and C57BL/6J wild-type (WT) mice were anaesthetized with isoflurane before being submitted to two bilateral injections into dorsal hippocampal CA2 (coordinates relative to bregma for NTg and Tg2576 mice: –0.6 mm AP, ± 0.6 mm L and –2.05 mm DV, and –1.38 mm AP, ± 2.3 mm L and –2.00 mm DV; WT C57BL/6J: –1.1 mm AP, ± 0.6 mm L and –2.05 mm DV; and –1.98 mm AP, ± 2.3 mm L and –2.00 mm DV). 100 nL of a solution with ChABC (50 U/mL, Sigma, n = 12 mice), or of vehicle solution (phosphate buffer saline 0.1 M, PBS, n = 10 mice) were injected in female WT C57BL/6J mice. For NTg and Tg2576 mice, 100 nL of a solution with NRG1 (6.66 nM, n = 46 mice), or of vehicle solution (phosphate buffer saline 0.1 M, PBS, n = 41 mice) were injected in area CA2. The animals were then allowed to recover for 5 or 7 days before behavioral testing.

### Behavioral experiments

*Sociability and social recognition tests.* Mice were placed in the center of a three-chamber setup (Moy et al., 2004), and were free to explore for 10 min. To assess sociability, the mice were placed in the presence of a littermate (familiar) mouse confined in a small cylindrical cage with bars, and an empty cage. Social recognition testing consisted of presenting a cage with a littermate (familiar) mouse, and another with an unfamiliar (new) mouse, never encountered before. The investigation time for each cage was measured using the Ethovision software (Noldus).

*Five-trial social memory test.* Mice were placed for 10 min in a 48 × 37 × 21 cm arena containing a small cage with bars (Kogan et al., 2000). An unfamiliar mouse (same age and sex) was introduced in the cage for four successive trials of 5 min (10 min inter-trial interval). On the fifth trial, a different unfamiliar mouse was presented. Mice were sacrificed 3 hours after the social memory test.

*Object location test.* During the acquisition, two identical objects were placed in the middle of a cylindric arena (40 cm diameter) containing a visual cue (striped pattern). The mice could freely explore the environment for 10 min. Three hours later, one object was moved, and the mice were allowed to explore for another 10 min.

*Olfactory habituation/dishabituation test.* Mice were placed in a cage with a perforated lid in the center of which cotton swabs soaked with non-social odors (almond and banana) and social odors (from two different cages of unfamiliar mice) were successively placed. Each odor was presented three times during two minutes.

### Tissue preparation and immunohistochemistry

Mice were deeply anesthetized with dolethal and perfused transcardially with saline. Brains were post-fixed in 4% paraformaldehyde (two days at 4°C), then submerged in 30% sucrose solution. 30-µm-thick sections were cut on a sliding microtome (Leica SM2010R) equipped with a freezing-stage (Physitemp BFS-3MP), and placed in PB 0.1 M with saline and 0.25%Triton-X (PBST). Sections were then incubated in biotin-conjugated *Wisteria floribunda* agglutinin (WFA) lectin (1:1,000; Sigma, L1516), rabbit anti-PCP4 (1:500; Santa Cruz, sc-74816) and goat anti-PV antibodies (1:2,500; Swant, PVG213). The next day, floating sections were incubated for 90 min in a PBST solution containing 10% normal donkey serum, with 1:500 DyLight 549-streptavidin (Vector, SA-5549) for PNN, 1:250 donkey anti-goat A488 (ThermoFischer, A-11055) for PV, and 1:250 donkey anti-rabbit A647 (ThermoFischer, A-31573) for PCP4.

## Image analysis

*Quantification of PV+ and PV+/PNN + cells.* Quantification of PV-immunoreactive (PV+) cells, and PV+ cells with PNN (PV+/PNN+) was conducted from a 1-in-10 series of sections spaced at 300 μm spanning the dorsal hippocampus (starting at -1.10 mm from bregma). For each mouse, quantifications of PV+, PNN+ and PV+/PNN+ cells were assessed manually with a fluorescence microscope (Leica DM6000 B) using controlled camera settings as previously described (Cattaud et al., 2018). The double labeling for PV and PNN was determined when WFA staining was entirely enveloping the soma of a PV+ cell, even if the staining was low. Changes of focal point were used to erase uncertainty. The corresponding surface of area CA2 and its different layers were defined with PCP4 staining and measured using the Mercator stereology system (Explora Nova). The total number of PV+ and PV+/PNN+ cells was estimated by multiplying the reference volume of area CA2 by the density of neurons by sectional volume (Canning et al., 1993; Cattaud et al., 2018).

*Quantification of WFA intensity in whole CA1, CA2 and CA3 areas.* Images were acquired on two sections per animal for CA2 and CA3 (–1.10 and –2.00 mm from bregma), and one section for area CA1 (–2.00 mm from bregma). Stratum oriens (SO), pyramidale (SP), and radiatum (SR) were delimited (ImageJ), and the mean grey value in each zone was measured. All images were analyzed as previously described (Domínguez et al., 2019), with the same methods of quantification by an experimenter blind to group and genotype: identification of the areas, delimitation of the layers, and extraction of the mean intensity of WFA fluorescence using the same parameters for all layers. These intensity values were normalized with WFA fluorescence intensity taken from the fimbria from the same sections in order to minimized variability due to difference of background.

*Quantification of PV intensity in PV+ cells of CA2 area.* To determine the intensity of PV fluorescence in the soma of PV+ cells, all the PV+ cells were picked in images from the SP of area CA2 from 2 sections stained for PV and PCP4 (–1.10 and –2.00 mm from bregma). The outline of the PV+/PCP4– soma was delimited with the free hand tool (ImageJ), and the mean grey value in each neuron was measured. These PV fluorescence intensity values were normalized with the average of PV fluorescence intensity taken from 4 PV–/PCP4+ cells from the same sections in order to minimized variability due to difference of background.

## Electrophysiological recordings

Animals (9-12 months old) were heavily anesthetized with ketamine/xylazine and isofluorane and transcardially perfused with dissection solution containing (in mM): 93 NMDG, 2.5 KCl, 1.25 $NaH_2PO_4$, 30 $NaHCO_3$, 20 HEPES, 25 Glucose, 2 thiourea, 5 NaAscorbate, 3 Na-pyruvate, 0.5 $CaCl_2$, 10 $MgCl_2$, 93 HCl. Hippocampi were removed and placed into an agar mould and 400 μm transverse hippocampal slices were cut with a vibratome (Leica VT1200S, Germany) in ice-cold dissection solution. The slices were transferred to 30°C artificial cerebral spinal fluid (ACSF), (in mM: 125 NaCl, 2.5 KCl, 10 glucose, 26 $NaHCO_3$, 1.25 $NaH_2PO_4$, 2 Na Pyruvate, 2 $CaCl_2$ and 1 $MgCl_2$) for 30 min, and kept at room temperature for at least 1.5 hr before recording. All experiments were performed at 33°C.

Whole-cell recordings were obtained from CA2 pyramidal neurons in voltage- or current-clamp mode with a patch pipette (3–5 MΩ) containing (in mM): 135 K- or Cs-methyl sulfonate, 5 KCl, 0.1 EGTA-Na, 10 HEPES, 2 NaCl, 5 ATP, 0.4 GTP, 10 phosphocreatine; pH 7.2; 280–290 mOsm). Series resistance (12–18 MΩ) was monitored throughout each experiment and cells with more than 15% change were excluded from analysis. Before beginning whole cell experiments, the cell type was confirmed by several electrophysiological properties as previously described (Chevaleyre and Siegelbaum, 2010). Synaptic responses were evoked by mono-polar stimulation with a patch pipette filled with ACSF and positioned in the middle of CA1 SR to evoke antidromic spikes of CA3 input to CA2. Field recordings of PSPs were performed in current clamp mode with a recording patch pipette containing 1M of NaCl and positioned in the middle of SR or SP in area CA2. Field recordings and whole cell recordings of PSP were performed without GABA receptor blockers.

IPSCs were recorded in presence of ionotropic glutamatergic receptor blockers (DAP-V and NBQX). The paired pulse ratio was measured by dividing the amplitude of the second IPSC by the amplitude of the first IPSC (interval 100ms). For LTD experiments, the amplitudes of the IPSCs were normalized to the baseline amplitude. AHFS (100 pulses at 100Hz repeated twice, 20 sec apart) was applied following stable baseline. The magnitude of plasticity was estimated by comparing averaged responses at 30-40 min after the

induction protocol with baseline-averaged responses from 0 to 10 min before the induction protocol. We used pClamp10 and Axograph software for data acquisition and analysis.

## QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS

Statistical analyses were performed using Origin Pro and Prism 6 and 9. Null hypotheses were rejected at the 0.05 level, unless Bonferroni's correction for multiple comparisons was applied; null hypotheses were rejected at the 0.0166 level when three comparisons were made, and at the 0.0125 level when four comparisons were made.

# RÉSUMÉS

## Mon parcours

### Diplômes universitaires

- 2019 : Master 2 en Neurosciences, comportement, cognition (3/18) : Université Paul Sabatier Toulouse III
- 2018 : Master 1 en Écologie et Évolution : Université Paul Sabatier Toulouse III
- 2017 : Licence en Biologie des Organismes, des Populations et des Écosystèmes : Université Paul Sabatier Toulouse III

### Présentations scientifiques

- Juillet 2022 : FENS Forum (Paris) : présentation de poster
- Juillet 2022 : ENCODS meeting (Paris): présentation orale
- Mars 2022: AD/PD meeting (Barcelone): présentation de poster
- Octobre 2021 : GDR mémoire (Vers, Lot) : présentation de poster
- Septembre 2021 : EBBS, 49ème rencontre de la société Européenne du cerveau et du comportement (Lausanne) : présentation de poster
- Mai 2021 : Congrés NeuroFrance 2021 : poster sur une session en ligne

### Enseignements / Encadrement

J'ai été DCE pendant 3 ans, à raison de 64h de cours par an dans ces U.E. :

- M1 Écologie et Évolution : Biologie multi-échelle : TP informatique d'analyse d'image et de données sur Rstudio et ImageJ
- L3 Biologie Cellulaire et Physiologie : Fonctions nerveuse intégrées, TP d'analyse de coupes histologiques
- L3 Biologie des Organismes, des Populations et des Écosystèmes : Écologie comportementale : TP de comportement dans le choix du partenaire sexuel chez le guppy et la mise en place de la hiérarchie sociale chez la souris
- L2 : TD de révision au partiel dans l'U.E. Neuroscience comportementale

J'ai également eu la chance d'encadrer le travail de 3 stagiaires lors de ma thèse.

- 2022 : Tatiana Dupak, Licence 3 BCP, Toulouse (1 mois), aujourd'hui en M1 Neurosciences (Bordeaux)
- 2022 : Fanny Tixier, Licence 3 BCP, Toulouse (3 mois), aujourd'hui en M1 Neurosciences Comportementales et Intégrées (Toulouse)
- 2021 : Benjamin Delteil, Licence 3 BCP, Toulouse (1 mois), aujourd'hui en M2 Neuropsychologie et Neurosciences Cliniques (Toulouse)

## Formations

Catégorie : Diffusion des savoirs

- Atelier Projet : Conférence et animations avec l'association 'Les étoiles brillent pour tous'. Etablissement avec public empêché (prisons, hôpitaux, école de la 2ème chance, etc).

Catégorie : Éthique et intégrité scientifique

- Utilisation et protection de l'animal de laboratoire, fonction concepteur - Parcours A (01 mars 2021 - 12 mars 2021) Ecole nationale vétérinaire de Toulouse

Catégorie : Développement personnel

- Lire vite, bien et augmenter sa concentration et sa mémorisation

## Articles scientifiques

**Bouisset, G.**, Gauzin, S., Riviere, J., Lejards, C., Verret, L. Perineuronal net formation during a transient stay in an enriched housing is necessary for cognitive improvements of the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease *(en préparation).*

Coutens, B., Lejards, C., **Bouisset, G.**, Verret., L, Rampon, C., Guiard, B. Enriched environmental exposure reduces the onset of action of antidepressant through its effect on parvalbumin interneurons plasticity (soumis dans *Molecular Psychiatry*).

Loisy, M., **Bouisset, G.**, Lopez, S., Muller, M., Spitsyn, A., Duval, J., Piskorowski, R. A., Verret, L., & Chevaleyre, V. (2022). Sequential inhibitory plasticities in hippocampal area CA2 and social memory formation. *Neuron*. 1–13.

Rey, C. C., Robert, V., **Bouisset, G.**, Loisy, M., Lopez, S., Cattaud, V., Lejards, C., Piskorowski, R.A., Rampon, C., Chevaleyre, V., Verret, L. (2022). Altered inhibitory function in hippocampal CA2 contributes in social memory deficits in Alzheimer's mouse model. *iScience*, *25*(3), 103895.

Les trois derniers articles cités ci-dessus ne faisant pas l'objet de mon travail de thèse *per se*, leur contenu ne sera pas détaillé dans ce document. Les deux articles publiés sont en revanche présentés en Annexes de ce manuscrit.

Guillaume Bouisset

Neurosciences

Centre de Recherche sur la Cognition Animale, Centre de Biologie Intégrative, Université de Toulouse (UMR 5169, UPS-CNRS) 169 Rue Marianne Grunberg-Manago, 31062 Toulouse Cedex 4, France

---

## Remodeling of parvalbumin interneurons and their extracellular matrix: restoring memory in a mouse model of Alzheimer's disease

Alzheimer's disease (AD) is associated with brain alterations, resulting in an impairment of cognitive functions. In recent years, we have been able to establish a link between the dysfunction of inhibitory neurons expressing the parvalbumin protein (PV) and cognitive disorders in AD mouse models and patients. PV cells are associated with an extracellular matrix, the perineuronal net (PNN), appearing around PV interneurons at the end of the critical period, being associated with the maturation of PV cells. We recently found that the presence of PNNs around PV cells was reduced in the hippocampus of Tg2576 mice (AD model). As the presence of PNNs around PV interneurons appears to be necessary for memory consolidation, their absence could contribute to memory deficits. Moreover, when young Tg2576 mice are exposed to an enriched environment (EE), long-lasting cognitive benefits on the memory of animals are observed. In addition, exposure to EE also restores the number of quantifiable PV/PNN interneurons in the hippocampus of Tg2576 mice. In this thesis, we hypothesize that EE-induced cognitive enhancements in Tg2576 mice are supported by the remodelling of hippocampal PV/PNN interneurons. To answer this question, we firstly injected chondroitinase-ABC (ChABC), an enzyme that degrades PNNs, into the CA1 area of 5-month-old non-transgenic Tg2576 mice, the day before they were put into a EE for 10 days. In doing so, we seek to limit the remodelling of PV interneurons and their PNNs induced by EE in the CA1 area, in particular. Twenty days after the end of the EE, the animals were subjected to the object location test to assess spatial memory (CA1) and social memory (CA2). This allowed to assess the link between the absence of PNNs in a structure and memory performance in a specific task. On the other hand, on the basis of recent studies, we were interested in the potential effects of light and auditory gamma stimulation, which can present similarity to the sensory stimulation induced during an EE. This would provide a non-invasive PV interneuron stimulation paradigm for animals, and to be able to study the effects of repeated exposure on the cognitive abilities of Tg2576 mice. Our data demonstrate that a 10-day stay in EE was sufficient to induce memory improvements in Tg2576 mice. We observed that the limitation of PNN remodelling that is normally induced by EE in the CA1 area of AD mice, prevented the enhancement of memory performance involving this hippocampal subregion. This demonstrates that increased PNN presence around PV cells is necessary for long-lasting beneficial effects of EE on cognitive functions in AD mice. On the other hand, the data resulting from gamma stimulations did not make it possible to obtain conclusive results on the potential effects that they can have on PV interneurons.

---

KEYWORDS: Alzheimer's disease, Tg2576 mice, parvalbumin interneurons, perineuronal net, enriched environment, social memory, spatial memory, hippocampus.

AUTEUR : Guillaume Bouisset

DIRECTRICE DE THESE : Laure VERRET

DATE ET LIEU DE SOUTENANCE : Toulouse, le 13 janvier 2023

DISCIPLINE : Neurosciences

LABORATOIRE : Centre de Recherche sur la Cognition Animale, Centre de Biologie Intégrative, Université de Toulouse (UMR 5169, UPS-CNRS) 169 Rue Marianne Grunberg-Manago, 31062 Toulouse Cedex 4, France

---

## Remodelage des interneurones à parvalbumine et de leur matrice extracellulaire : restauration de la mémoire dans un modèle murin de la maladie d'Alzheimer

La maladie d'Alzheimer (MA) est associée à des altérations cérébrales, entraînant une perturbation des fonctions cognitives. Depuis quelques années, nous avons pu établir un lien entre la dysfonction des neurones inhibiteurs exprimant la protéine parvalbumine (PV) et les troubles cognitifs chez les modèles murins AD et les patients. Les cellules PV sont associées à une matrice extracellulaire, le réseau périneuronal (PNN), apparaissant autour des interneurones à la fin de période critique, étant associé à la maturation des interneurones PV. Nous avons récemment découvert que la présence de PNN autour des cellules PV était réduite dans l'hippocampe de la souris Tg2576 (modèle MA). Comme la présence de PNN autour des interneurones PV semble être nécessaire à la consolidation de la mémoire, leur absence pourrait contribuer aux déficits de mémoire. De plus, lorsque l'on expose les souris Tg2576 suffisamment jeunes à un environnement enrichi (EE), on observe des bénéfices cognitifs durables sur la mémoire des animaux. En outre, l'exposition à l'EE permet également de restaurer le nombre d'interneurones PV/PNN quantifiables dans l'hippocampe des souris Tg2576. Dans cette thèse, nous émettons l'hypothèse que les améliorations cognitives induites par l'EE chez les souris Tg2576 sont soutenues par un remodelage des interneurones PV/PNN de l'hippocampe. Pour répondre à cette question, nous avons d'une part, injecté de la chondroïtinase-ABC (ChABC), une enzyme dégradant les PNN, dans la zone CA1 de souris Tg2576 et non transgéniques âgées de 5 mois, la veille de leur mise en EE pendant 10 jours. Ce faisant, nous cherchons à limiter les remodelages des interneurones PV et de leur de PNN induits par l'EE dans la zone CA1, en particulier. Vingt jours après la fin de l'EE, les animaux ont été soumis au test de localisation d'objets pour évaluer la mémoire spatiale (CA1) et la mémoire sociale (CA2). Cela nous a permis d'évaluer le lien entre l'absence de PNN dans une structure et les performances de la mémoire dans une tâche spécifique. D'autre part, sur la base de récentes études, nous nous sommes intéressés aux effets potentiels de stimulations gamma lumineuses et auditives, qui peuvent s'apparenter aux stimulations sensorielles induites lors d'un EE. Cela permettrait d'obtenir un paradigme de stimulation des interneurones PV non invasif pour les animaux, et de pouvoir étudier les effets d'une exposition répétée sur les capacités cognitives des souris Tg2576. Nos données montrent qu'un séjour de 10 jours en EE était suffisant pour induire des améliorations de la mémoire des souris Tg2576. Nous avons observé que limiter le remodelage des PNN, qui est normalement induit par l'EE dans la zone CA1 des souris AD empêchait l'amélioration des performances de la mémoire sous-jacentes à cette sous-région hippocampique. Cela démontre qu'une présence accrue de PNN autour des cellules PV est nécessaire aux effets bénéfiques durables de l'EE sur les fonctions cognitives des souris AD. En revanche, les données issues des stimulations gamma n'ont pas permis d'obtenir de résultats concluants sur les effets potentiels qu'elles peuvent avoir sur les interneurones PV.

---

MOTS-CLEFS : maladie d'Alzheimer, souris Tg2576, interneurones à parvalbumine, perineuronal net, environnement enrichi, mémoire sociale, mémoire spatiale, hippocampe.