



HAL
open science

Contrôle du réseau périneuronal par l'activité des interneurones à décharge rapide exprimant la parvalbumine

Gabrielle Devienne

► **To cite this version:**

Gabrielle Devienne. Contrôle du réseau périneuronal par l'activité des interneurones à décharge rapide exprimant la parvalbumine. Neurosciences [q-bio.NC]. Sorbonne Université, 2019. Français. NNT : 2019SORUS474 . tel-02931837

HAL Id: tel-02931837

<https://theses.hal.science/tel-02931837v1>

Submitted on 7 Sep 2020

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

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

Sorbonne Université

Ecole doctorale: Cerveau – Cognition – Comportement (ED3C)

Neuroscience Paris Seine- IBPS / Réseau cortical et couplage neurovasculaire

Contrôle du réseau périneuronale par l'activité des interneurons à décharge rapide exprimant la parvalbumine

Par **Gabrielle DEVIENNE**

Thèse de doctorat de Neurosciences

Dirigée par Bertrand LAMBOLEZ

Présentée et soutenue publiquement le 21 Février 2019

Devant un jury composé de :

Dr Alberto BACCI, Président

Pr Carine ALI, Rapporteur

Dr Tania VITALIS, Rapporteur

Dr Maria-Cécilia ANGULO, Examineur

Dr Ariel DI NARDO, Examineur

Dr Bertrand LAMBOLEZ, Directeur de thèse

Imagination is more important than knowledge. For knowledge is limited, whereas imagination embraces the entire world, stimulating progress, giving birth to evolution.

Albert Einstein

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres de mon jury Carine Ali, Tania Vitalis, Maria Cécilia Angulo, Alberto Bacci et Ariel Dinardo, de participer à ce jour si spécial, en particulier mes rapporteurs pour leur relecture et l'évaluation de mon travail.

Bertrand, merci pour la confiance et l'autonomie que tu m'as accordées. J'ai beaucoup apprécié tes nombreux conseils qui m'ont permis d'évoluer et de mener à bien mon projet de thèse. Tu m'as aussi donné la possibilité de participer à la SFN, où j'ai pu présenter nos travaux et rencontrer des chefs de labo pour un post-doc.

Je tiens à dire un grand merci à Bruno Cauli, alias Bruno先生. Partager un bureau a été vraiment génial, j'ai énormément appris au niveau du travail, de l'organisation, mais aussi sur les anciennes émissions de TV, jeux vidéo et autres vidéos qu'on a pu regarder !

Merci à Sandrine Picaud, tu as vraiment été un énorme soutien pendant cette thèse et tu es devenue une véritable amie. Nos fous rires et ton cocooning resteront inoubliables ! C'est également grâce à toi que ce projet a pu aboutir et que j'ai acquis plein de nouvelles compétences. Merci aussi à mon petit pote Erwan, avec qui je partage plein de points communs !

Je remercie tous les collègues de l'institut : Tout d'abord Benji, de ta présence et de ton aide pour la correction de mon manuscrit : grâce à toi les gens vont (peut-être) pouvoir me comprendre ! Sophie pour tous les moments que nous avons partagés, les restos que tu nous as fait découvrir et tes délicieux gâteaux ! Pierre y Paula por nuestras discusiones de la memorable del jamón de París! La team des TPs « Vis ma vie de chercheurs » : Claire, Maxime, PierBruno et Marie Thérèse. Un merci spécial à Claire, t'es au top ! Romain, Damien et Alex pour leurs conseils, Elise pour nos sessions d'escalade, Kasia, Julie, Sara, Arturo et tous les autres. Sylvie, ton départ a laissé un grand vide à côté de mon bureau. Bernadette pour sa franchise et son aide précieuse. Ivan, pour notre collaboration et tes explications. Merci à Agnès pour nos échanges instructifs, Régine et Ludo pour leur présence. A Jean Rossier pour avoir partagé ses connaissances sur cette thématique.

Et les anciens : À Juliette d'avoir partagé ses passions, je reviendrai faire un tour à la barre au sol ! Camille à qui je souhaite du courage, c'est bientôt ton tour ! Jean Yves et Clémentine au labo, et Marie : Escalade force rouge en avant !

Je tiens à exprimer ma gratitude à mes collègues de l'ICM : Carine pour avoir été mon mentor et m'avoir transmis l'envie de faire de l'électrophy. Charlotte pour tes conseils pour mon oral de master et la recherche de post-docs. Corinne pour nos nombreuses discussions et ta présence. 洋介さんと家族、ありがとうございます。私は京都の散歩好きです。

À mes plus vieilles amies : Lynda et Marine. Lynda, ma cible préférée ! On aime se taquiner mais tu es toujours présente quand il le faut. Marine, merci à toi et ta famille de m'avoir intégrée et soutenu toutes ces années. Vivement nos prochaines aventures ! À la team escalade Pitou, Vignesh et Gautier pour vos encouragements se traduisant par des jets de chaussons lorsque je fais une « Gaby ».

À ma famille : mes deux mamies, parties trop tôt. Merci à mon Papy Daniel pour nos conversations très logiques et techniques. Any d'être une grand-mère pour moi. Isa et Alex de toujours m'accueillir quand j'ai besoin de me ressourcer.

À mes parents, Franck (aka Franckenjack) de t'être toujours occupé de moi et de m'avoir inculqué de précieuses valeurs. Maman de ne m'avoir jamais laissée tomber et de m'avoir toujours poussée vers le haut. À ma petite sista MJ, même si on se chamaille parfois (tout le temps), je sais qu'on pourra toujours compter l'une sur l'autre. Le buffet de thèse a intérêt à tout déchirer !

À mon Tomtom !!! On a surmonté beaucoup d'épreuves ensemble. Être éloignés pendant un an n'a pas toujours été évident mais avoir vécu cette expérience nous a renforcés et nous a permis de découvrir ensemble de merveilleux endroits ! J'espère que nous aurons la possibilité de retourner au Japon tous les deux. Je t'aime (plus du plus). Je tiens également à remercier Nathalie (alias The Moumou) et Didou de m'avoir accueillie avec une extrême générosité et gentillesse.

Table des matières

Remerciements.....	3
LISTE DES ABREVIATIONS	7
Résumé	8
Abstract.....	9
INTRODUCTION.....	11
1. Anatomie du néocortex.....	13
1.1.1 Organisation laminaire du néocortex	14
1.1.2 Organisation en colonnes du néocortex	15
2. Les cellules du néocortex.....	17
2.1 Les cellules gliales.....	17
2.1.1 Microglies	17
2.1.2 Les oligodendrocytes	17
2.1.3 Les astrocytes	18
2.2 Les neurones du néocortex.....	18
2.2.1 Les neurones glutamatergiques	18
2.2.2 Les interneurones GABAergiques	20
2.2.3 Un mot sur les interneurones FS-PV	23
2.2.4 Connectivité interneurones FSPV et cellules pyramidales	25
3. Plasticité dans le système nerveux central	27
3.1 Périodes critiques de plasticité.....	27
3.2 Le système visuel et la dominance oculaire	28
3.2.1 Le système visuel	28
3.2.2 La dominance oculaire	30
3.3 Lien entre période critique et inhibition	32
3.4 Plasticité chez l'adulte	35
4. Le réseau périneuronale: Une matrice extracellulaire spécialisée	38
4.1 Structure et composition	39
4.2 Mise en place du réseau périneuronale.....	41
4.3 Rôle du réseau périneuronale dans la plasticité.....	43
4.3.1 Induction de la plasticité des cartes corticales par dégradation du PNN ..	44
4.3.2 Molécules associées au PNN et plasticité neuronale	45
4.3.3 Rôle controversé du PNN dans la plasticité synaptique	45
4.3.4 PNN et régulation de l'homéostasie ionique	47
4.4 Protéases et dégradation de réseau périneuronale.....	48
PROBLEMATIQUE ET OBJECTIF DU TRAVAIL DE THESE	51
MATERIELS ET METHODES	57

1. Les outils chemogénétiques: Contrôle de l'activité d'une population cellulaire	59
2. Technique de RT-PCR sur cellule unique: présentation de l'article Devienne et al. 2018.....	62
RESULTATS.....	63
Résumé de l'article: «Regulation of Perineuronal Nets in the adult cortex by the electrical activity of parvalbumin interneurons» by Devienne et al.....	65
1. L'inhibition ciblée des interneurones à parvalbumine par le DREADD inhibiteur hM4Di induit une régression du PNN dans le cortex visuel chez la souris adulte	65
2. Le traitement CNO induit une inhibition modérée des interneurones PV exprimant hM4Di.....	65
3. L'excitation ciblée des neurones glutamatergiques ou des interneurones PV par le DREADD excitateur hM3Dq n'induit pas de régression du PNN dans le cortex visuel de la souris adulte	66
4. L'inhibition électrique des interneurones PV déclenche la régression du PNN dans le cortex visuel chez la souris adulte	67
5. Le PNN peut être régulé de façon cellule autonome par le niveau d'activité de chaque interneurone PV.....	67
Article: Regulation of Perineuronal Nets in the adult cortex by the electrical activity of parvalbumin interneurons	69
DISCUSSION.....	107
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	113
REFERENCES.....	117
ANNEXES.....	133

LISTE DES ABREVIATIONS

AAV: Virus adéno-associé	NgR: Récepteur Nogo
ADAM: <i>A Disintegrin And Metalloproteinase</i>	NMDA: N-méthyl-D-aspartate
ADAMTS: <i>A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin Motifs</i>	NPY: Neuropeptide Y
AHP: <i>Afterhyperpolarization</i>	OD score: Score de Dominance Oculaire
BC: <i>Basket cell</i> (Cellule en panier)	OTX2: Orthodendricle Homeobox 2
BDNF: Facteur neurotrophique issu du cerveau	PA: Potentiel d'action
CB: Calbindine-D28K	PNN: Perineuronal Net (réseau périneuronal)
CCK: Cholecystokinine	PSAM: <i>Pharmacologically Selective Actuator Modules</i>
CGL: Corps Genouillé Latéral	PSEM: <i>Pharmacologically Selective Effector Molecule</i>
ChABC: Chondroïtinase ABC	PTX: Picrotoxine
CNO: Clozapine-N-Oxyde	PV: Parvalbumine
CR: Caréтинine	RPTPβ: Récepteur à tyrosine phosphate beta
CSPG: Protéoglycane chondroïtine sulfate	RS: <i>Regular spiking</i>
CTRL1: HAPLN1 (protéine de liaison)	SBA: <i>Soy Bean Agglutinin</i>
DREADD: <i>Design Receptor Exclusively Activated by a Designer Drug</i>	SNC: Système nerveux central
EEG: Electroencéphalogramme	SST: Somatostatine
FS: <i>Fast-Spiking</i> (à décharge rapide)	STP: <i>Short Term Potentiation</i>
FS-PV: <i>Fast-Spiking Parvalbumin</i> (à Parvalbumine à décharge rapide)	TnR: Ténascine R
GABA: Acide γ -aminobutyrique	V1: Cortex Visuel Primaire
GAD: Acide Glutamique Décarboxylase	VIP: Peptide vasointestinal
GIRK: <i>G-protein activated Inwardly Rectifying K⁺ current</i>	VVA: <i>Vicia Villosa Agglutinin</i>
GPCR: Récepteur couple aux protéines G	WFA: <i>Wisteria Floribunda Agglutinin</i>
HA: Acide Hyaluronique	
HAS: Acide Hyaluronique synthase	
IB: <i>Intrinsically Bursting</i>	
KO: <i>Knock out</i>	
LTD: Dépression à long terme	
LTP: Potentiation à long terme	
MD: <i>Monocular Deprivation</i> (Privation Monoculaire)	
MEC: Matrice extracellulaire	
MMP: Métalloprotéase de matrice	
nAChR: Récepteur nicotinique à l'acétylcholine	

Résumé

Au cours du développement post-natal, la fermeture des périodes critiques de plasticité active est marquée par deux événements concomitants : la formation d'une matrice extracellulaire spécialisée, le «perineuronal net» (PNN), qui entoure les interneurons inhibiteurs à parvalbumine dits fast-spiking (FS-PV) et l'import de l'homéoprotéine OTX2 dans ces neurones. Le PNN apparaît comme un facteur limitant la plasticité des cartes corticales chez l'adulte, la digestion enzymatique de celui-ci permettant la réouverture de la plasticité de ces cartes corticales. L'inhibition de la transmission GABAergique, en particulier l'inhibition spécifique des interneurons FS-PV, réinstaura une plasticité corticale élevée chez l'adulte qui pourrait être liée à un changement du PNN.

A ce jour le lien entre l'activité des FS-PV et la régulation de la densité du PNN chez l'adulte restent inconnus. Mon projet de thèse vise à déterminer (i) quels sont les effets de la manipulation de l'activité des FS-PV sur la densité de PNN dans le cortex visuel primaire chez la souris adulte et (ii) si les interneurons FS-PV expriment les protéines nécessaires au remodelage du PNN.

Nous avons montré que l'inhibition chemogénétique ciblée des interneurons FS-PV réduit fortement le PNN chez la souris adulte. L'inhibition des cellules pyramidales voisines entraîne le même effet. La surexcitation du réseau induite en excitant les cellules pyramidales, ou l'excitation directe des neurones FS-PV, n'affectent pas le PNN. Ces résultats combinés à la caractérisation électrophysiologique réalisée *ex vivo* par patch-clamp ou *in vivo* par enregistrement EEG, démontre que la désinhibition du réseau n'est pas à l'origine de la régression du PNN. De façon intéressante nos résultats semblent indiquer que chaque cellule FS-PV régule son propre PNN. Nos résultats de RT-PCR sur cellule unique démontrent que le profil d'expression des gènes liés au PNN observé dans les interneurons FS-PV confère à ces cellules la capacité de réguler leur PNN de façon cellule-autonome.

En conclusion, nos résultats indiquent qu'une diminution de l'activité des FS-PV directement ou via l'inhibition des cellules pyramidales environnantes permet de réduire la densité de PNN chez l'adulte. Ces résultats sont novateurs et apportent une meilleure compréhension des mécanismes de régulation du PNN chez l'adulte ce qui pourrait à l'avenir permettre identifier de nouvelles pistes thérapeutiques pour promouvoir la plasticité et la réparation cérébrale.

Abstract

During the post-natal development of the cerebral cortex, the closure of the highly plastic period, called critical period, is concomitant with the accumulation of a specialized extracellular matrix, the perineuronal net (PNN), around fast-spiking inhibitory interneurons that express parvalbumin (FS-PV). The PNN limits the plasticity of cortical maps in the adult, and its enzymatic digestion allows the reopening of cortical maps plasticity. The inhibition of GABAergic transmission, in particular the specific inhibition of FS-PV interneurons, reinstates high cortical plasticity, which may be linked to changes in the PNN.

To date, the link between FS-PV cell activity and the regulation of PNN density in the adult remains unexplored. My thesis project aims to determine (i) what are the effects of the manipulation of FS-PV activity on PNN density in the primary visual cortex of adult mice and (ii) if FS-PV interneurons express keys proteins to remodel the PNN.

We found that targeted chemogenetic inhibition of FS-PV interneurons strongly reduces the PNN in adult mice. Inhibition of neighboring pyramidal cells has a similar effect. Overexcitation of the network induced by exciting pyramidal cells, or direct excitation of FS-PV neurons, does not affect the PNN. These results combined with electrophysiological characterization performed ex vivo using patch-clamp or in vivo using EEG recordings, show that network disinhibition is not the trigger of PNN regression. Interestingly, our results suggest that each FS-PV cells is able to regulate its own PNN. Our single cell RT-PCR results reveal that the expression pattern of PNN-related genes found in FS-PV interneurons endow these cells with the ability to regulate their PNN cell-autonomously.

To conclude, our results show that a decrease of FS-PV cells activity, directly or through inhibition of nearby pyramidal cells, reduces PNN density in the adult. These results are innovative and deepen our understanding of PNN regulation mechanisms in adults. In addition to bringing new fundamental knowledge on the physiology of brain plasticity, our project may lead to therapeutic prospects for some brain diseases.

INTRODUCTION

1. Anatomie du néocortex

Le néocortex est constitué de deux hémisphères cérébraux, subdivisés en quatre lobes nommés d'après l'os crânial sus-jacent : frontal, pariétal, temporal et occipital. Ils sont anatomiquement délimités par des fissures et des sillons, et sont spécialisés dans des fonctions cognitives distinctes. Le lobe frontal est impliqué notamment dans les mouvements volontaires ; le lobe temporal est en relation avec l'audition et le langage, la mémoire, ou encore l'audition ; le lobe pariétal régit la somesthésie ; enfin le lobe occipital est associé à la vision (**Fig 1**).

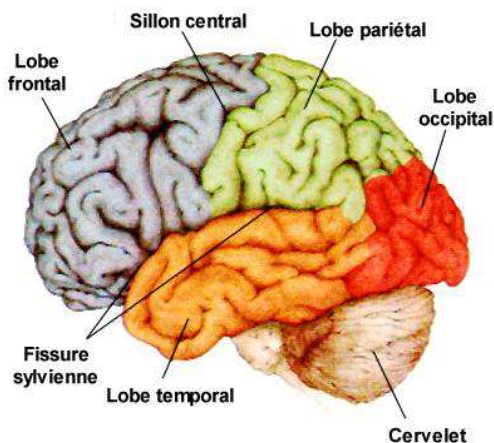


Figure 1- Les lobes du néocortex humain. La fissure Sylvienne sépare le lobe frontal (en gris) du lobe temporal (en orange). Le sillon central sépare le lobe frontal du lobe pariétal (en vert). Le lobe occipital (en rouge) se situe à l'arrière du cerveau.

La surface du néocortex humain contient des *sulci* et des *gyri* lui donnant un aspect plissé contrairement à celui de la plupart des rongeurs qui est lisse (**Fig 2**).

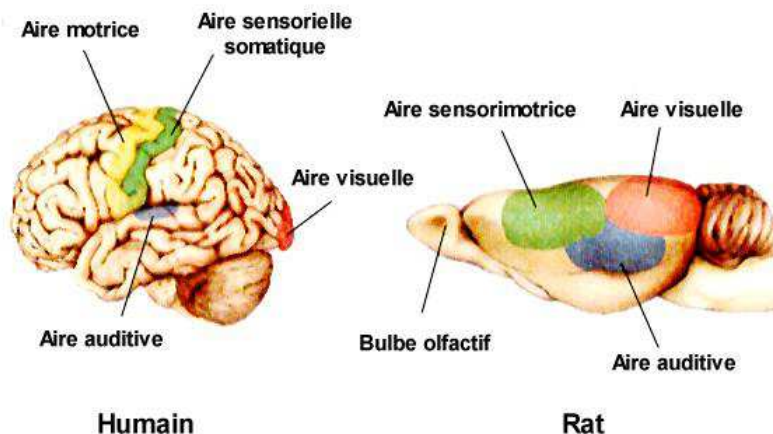


Figure 2- Vue latérale du néocortex chez l'humain et chez le rat. Les aires sensorielles primaires et motrices ont été colorées (vert : aire somatique sensorielle; bleu : aire auditive; rouge : aire visuelle; jaune : aire motrice).

Le néocortex est constitué de deux types de formations : la substance grise située à la surface du cerveau, juste en dessous des méninges, et la substance blanche délimitée par la substance grise, les ventricules et le striatum. La substance grise est essentiellement constituée d'un grand nombre de corps cellulaires tandis que la substance blanche est quant à elle principalement constituée de fibres nerveuses myélinisées. Dans la suite de cette introduction, nous nous intéresserons uniquement à la substance grise du néocortex.

1.1.1 Organisation laminaire du néocortex

Le néocortex est généralement divisé en six couches parallèles, numérotées de la surface du cortex, au niveau de la pie mère, à la substance blanche (**Fig 3**). La couche I, est généralement appelée couche moléculaire, et est principalement constituée de fibres nerveuses. On y trouve néanmoins les corps cellulaires de quelques interneurons. Les couches II et III, respectivement appelées couche granulaire externe et couche pyramidale externe, contiennent de nombreuses cellules pyramidales. Les cellules pyramidales de la couche II sont plus petites que celles de la couche III. La couche IV, ou couche granulaire interne, contient une forte densité de cellules étoilées épineuses (cellules granuleuses). La couche V, couche pyramidale interne, contient les plus grandes cellules pyramidales du néocortex. Enfin, la couche VI ou couche polymorphe, contient des cellules pyramidales de forme irrégulière.

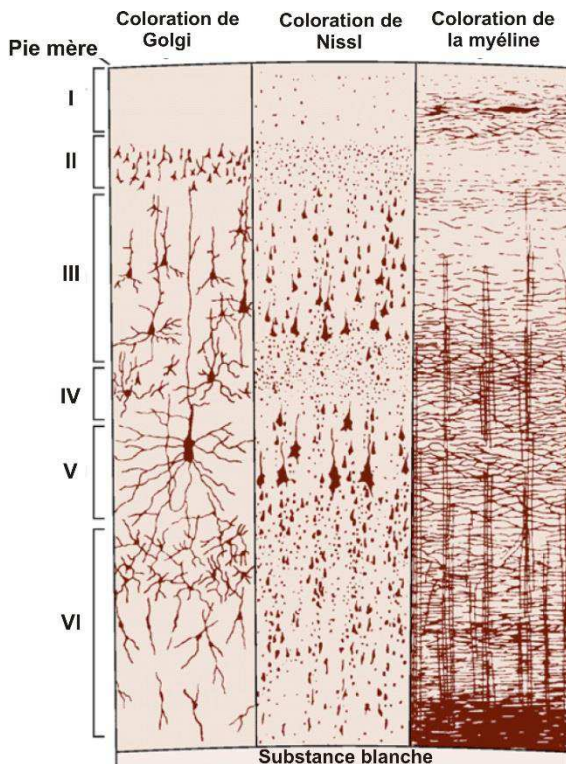


Figure 3- Les différentes couches du néocortex. La même aire corticale a été colorée par trois méthodes différentes. La coloration de Golgi marque les neurones dans leur intégralité. La coloration de Nissl marque les corps cellulaires. La coloration de la myéline marque les axones myélinisés. Les différentes couches corticales sont déterminées par des densités et tailles cellulaires différentes.

D'un point de vue fonctionnel, le néocortex est subdivisé en trois couches, la couche supragranulaire regroupant les couches I à III, une couche granulaire (couche IV), et une couche infragranulaire contenant les couches V et VI. Les neurones pyramidaux des couches supragranulaires envoient des projections vers d'autres aires corticales. La couche granulaire quant à elle est une voie d'entrée de la grande majorité des afférences sensorielles thalamiques. Les neurones pyramidaux des couches infragranulaires projettent des efférences extracorticales. L'épaisseur des couches et leur organisation fonctionnelle varient à travers le cortex. Par exemple, la couche V est particulièrement développée dans le cortex moteur tandis que dans les aires sensorielles primaires c'est la couche IV, qui est particulièrement développée.

1.1.2 Organisation en colonnes du néocortex

Outre son organisation laminaire, le néocortex est aussi organisé en colonnes. Ces colonnes sont caractérisées par une organisation verticale des éléments corticaux. Elles s'étendent sur toute l'épaisseur du cortex et ont un diamètre de 300 à 500 µm. Suivant les espèces et les zones du cortex la forme et la taille de ces colonnes varient, mais cette organisation reste une unité de base générale du néocortex (Mountcastle, 1997).

Cette organisation en colonnes a été particulièrement étudiée dans le cortex visuel primaire. Les colonnes y regroupent tous les neurones qui ont leurs champs récepteurs dans la même région de la rétine. Les afférences provenant de chaque œil, après ségrégation au niveau du corps genouillé latéral, parviennent au niveau de la couche IV et ne sont pas distribuées aléatoirement mais de façon régulière, en bandes provenant alternativement de l'œil droit et gauche (Hubel and Wiesel, 1974) (**Fig 4**). Ce sont les colonnes de dominance oculaire. Nous reviendrons sur la notion de dominance oculaire dans la partie «**3.2.2 La dominance oculaire**».

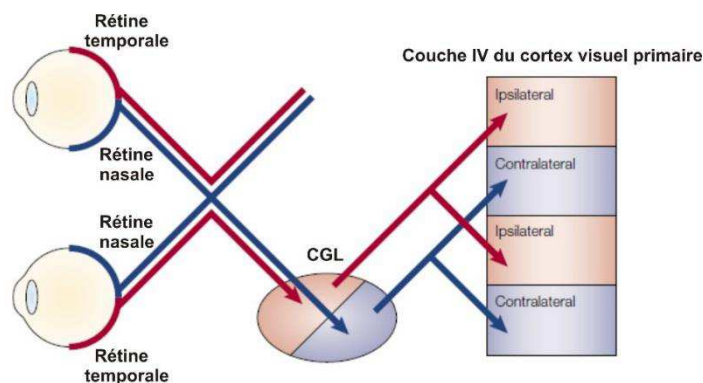


Figure 4- Traitement de l'information visuelle et répartition en colonne de dominance oculaire. Adapté de (Katz et Crowley, 2002).

En résumé de cette première partie, le néocortex est la partie la plus superficielle du cerveau. Il est divisé en deux hémisphères eux-mêmes divisés en différents lobes.

Le néocortex est le siège de plusieurs fonctions complexes telles que la perception de l'environnement, le contrôle volontaire des mouvements, le langage ou encore la mémoire.

Enfin il est important de noter qu'il a une structure laminaire comprenant une variété de type cellulaire et que cette organisation est retrouvée dans l'ensemble du néocortex.

2. Les cellules du néocortex

Dans le système nerveux, deux grands types cellulaires sont retrouvés : les cellules gliales (ou glies) et les neurones.

2.1 Les cellules gliales

Les cellules gliales ont été pour la première fois identifiées dans le courant du 19^{ème} siècle par plusieurs neuroscientifiques dont Rudolph Virchow, Santiago Ramon y Cajal et Pídel Rio-Hortega. On ne leur attribua d'abord qu'un rôle de support physique d'où leur nom « *Glia* » du Grec ancien signifiant « colle ». Un nombre croissant d'observations montrent que ces cellules occupent en réalité bien plus qu'un rôle de soutien mécanique mais qu'elles occupent aussi de nombreuses fonctions dans la physiologie du système nerveux. On peut notamment citer leur importance pour l'isolation électrique des axones, dans l'homéostasie des différents ions, dans le métabolisme cérébral, ou encore dans la physiologie synaptique et vasculaire. Les glies se subdivisent en deux grands types, les microglies et les macroglies. Dans le néocortex, il existe deux grands types de macroglies : les oligodendrocytes et les astrocytes.

2.1.1 Microglies

Les microglies dérivent d'une lignée cellulaire différente de celles des macroglies et ont une origine embryonnaire extra-cérébrale. Ce sont des cellules phagocytaires mobiles et polymorphes recrutés lors des processus d'inflammation (Perry et al., 2010).

2.1.2 Les oligodendrocytes

Les oligodendrocytes sont des cellules de petites tailles avec peu de prolongements. Ils se différencient assez tardivement au cours du développement. En effet, leur guidage est assuré par les neurones et les astrocytes. Leur rôle principal est de former une gaine de myéline autour de certains axones de neurones du système nerveux central. La myélinisation assure une isolation électrique permettant une conduction saltatoire rapide des potentiels d'action (PA). Un oligodendrocyte enveloppe plusieurs axones contrairement aux cellules de Schwann myélinisées retrouvées dans le système nerveux périphérique (**Fig 5**).

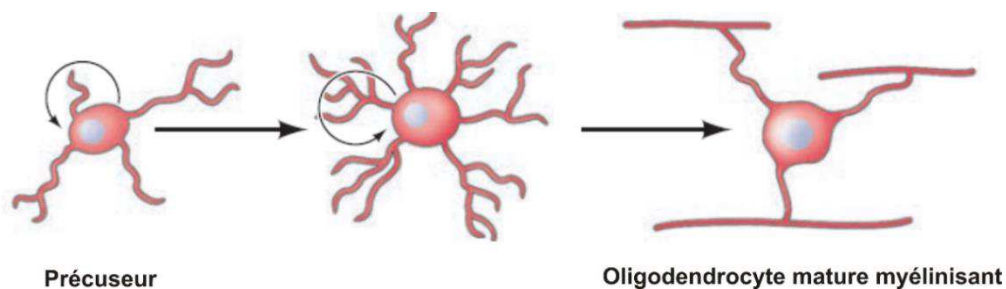


Figure 5- Maturation d'un oligodendrocyte. Oligodendrocyte, dans sa forme mature formant, par enroulement de sa membrane plasmique, des gaines de myéline autour de trois axones différents. Adapté de (Neurosciences, 6th edition, Purves).

2.1.3 Les astrocytes

Les astrocytes sont nommés ainsi d'après leur morphologie (*astro-* étoile et *cyte-* cellule) (**Fig 6**). Ils représentent la majorité des cellules gliales. Les astrocytes envoient souvent des prolongements, ou pieds astrocytaires, au niveau des vaisseaux sanguins et participent à la formation d'une barrière fonctionnelle, la barrière hémato-encéphalique. Ils jouent un rôle dans la régulation du métabolisme neuronal et dans l'apport énergétique (Bélangier et al., 2011; Pellerin et al., 2007). Ils agissent de manière importante au maintien et au fonctionnement des synapses en tant que membre de la synapse dite tripartite (Araque et al., 1999). Ils interviennent dans la recapture et dans la dégradation de certains neurotransmetteurs, notamment le glutamate, libérés au niveau de la fente synaptique par les neurones (Pellerin and Magistretti, 1994).

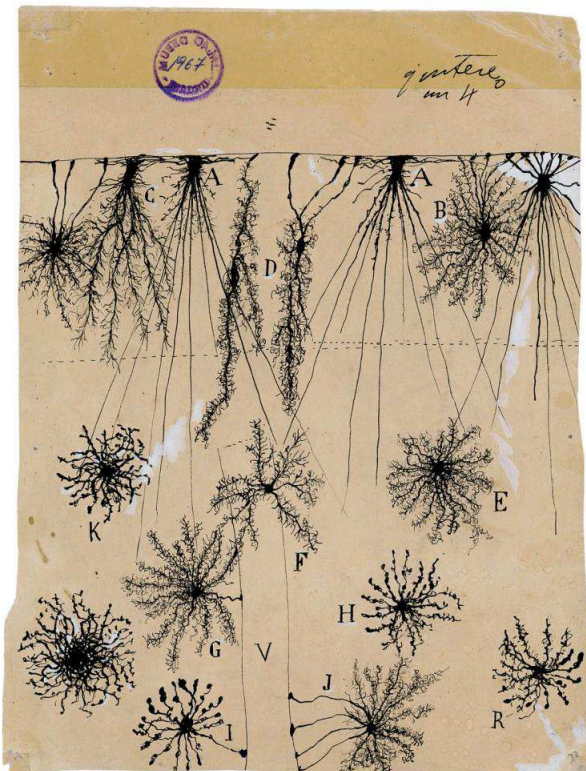


Figure 6- Différents types d'astrocytes. (A, B, C, et D) Astrocytes dans la couche moléculaire. (E, F, G, H) Astrocytes dans les couches II et III. (I et J), Astrocytes présentant des pieds astrocytaires vasculaires. (V) Vaisseau sanguin (d'après Ramón y Cajal).

2.2 Les neurones du néocortex

Dans le néocortex, les neurones sont classiquement subdivisés en deux grandes populations: les neurones glutamatergiques excitateurs représentant environ 80% de la population neuronale et les neurones GABAergiques locaux inhibiteurs (les 20% restants).

2.2.1 Les neurones glutamatergiques

Les neurones glutamatergiques utilisent le glutamate comme neurotransmetteur (Storm-Mathisen et al., 1983). Ils se divisent en deux grandes classes morphologiques : les cellules pyramidales et les cellules étoilées épineuses.

2.2.1.1 Les neurones pyramidaux

Les neurones pyramidaux sont le type neuronal le plus abondant du néocortex. Les neurones pyramidaux présentent un corps cellulaire de forme pyramidale, avec une dendrite apicale principale généralement orientée vers les couches superficielles (**Fig 7**). Le soma de ces neurones émet plusieurs dendrites basales qui se ramifient rapidement. Les dendrites des neurones pyramidaux présentent de nombreuses épines. L'axone de ces cellules quant à lui émerge généralement à la base du soma. Il est émis vers les couches profondes où il va se ramifier en de nombreuses collatérales, puis entrer dans la substance blanche.

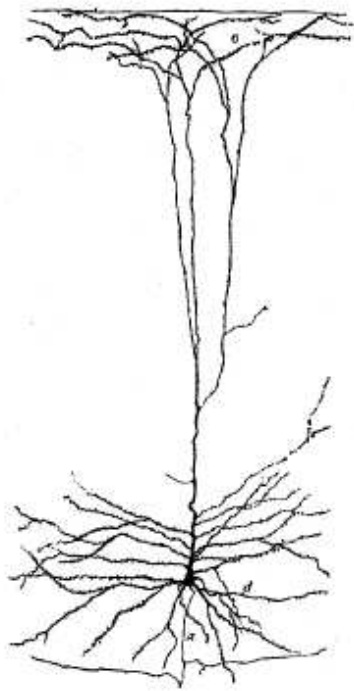


Figure 7- Cellule pyramidale géante. Coloration de Golgi, (a) axone, (c) collatérales, (d) dendrites basales, (e) bouquet dendritique terminal (d'après Ramón y Cajal).

Les neurones pyramidaux possèdent aussi des caractéristiques électrophysiologiques permettant de les identifier. Mountcastle et ses collaborateurs furent les premiers à les enregistrer *in vivo* (Connors and Gutnick, 1990) et à les caractériser de neurones à décharges courantes (Regular Spiking, RS). Les potentiels d'action (PA) de ces neurones, se caractérisent par une durée assez longue (supérieure à la milliseconde à mi-hauteur).

Deux types de profils de décharge peuvent être observés (Connors and Gutnick, 1990; McCormick et al., 1985) (**Fig 8**) :

- Cellules à décharge régulière (Regular Spiking ou RS),
- Cellules à décharge en bouffée (Intrinsically Bursting ou IB),

Le profil de décharge le plus couramment retrouvé chez les cellules pyramidales est celui des cellules à décharge régulière, caractérisé par une adaptation de fréquence (réduction rapide et marquée de la fréquence instantanée de décharge des PA).

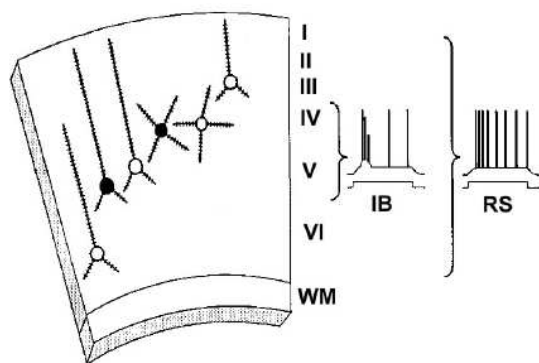


Figure 8- Représentation schématique de la localisation laminaire de deux grands types de décharge de neurones glutamatergiques. (Adaptée de Connors et Gutnick, 1990).

2.2.1.2 Les cellules étoilées épineuses

Les cellules étoilées épineuses se trouvent essentiellement dans la couche IV au niveau des aires corticales sensorielles. Ce sont des petites cellules multipolaires présentant de nombreuses épines dendritiques. Elles reçoivent des afférences directement du thalamus. Les neurones étoilés épineux transmettent ensuite les informations thalamiques aux cellules pyramidales et aux interneurons inhibiteurs. Le profil de décharge de ces cellules est un profil de décharge RS.

2.2.2 Les interneurones GABAergiques

Les interneurones ont été initialement décrits par Ramon y Cajal en 1899 comme des neurones ayant « un axone court ». On retrouve ces interneurones dans toutes les couches du cortex, y compris la couche moléculaire. Contrairement aux cellules pyramidales et cellules étoilées épineuses décrites précédemment, les interneurones du néocortex utilisent l'acide γ -aminobutyrique (GABA) comme neurotransmetteur (Houser et al., 1983). Les interneurones sont presque exclusivement impliqués dans des circuits neuronaux locaux. Cependant, plusieurs études ont démontré l'existence d'interneurones GABAergiques à projection de longues portées (Tomioka et al., 2005; Lee et al., 2014). Les interneurones inhibiteurs présentent néanmoins une grande diversité au niveau de leur morphologie, de leurs propriétés synaptiques, électrophysiologiques et moléculaires aussi bien que de leur origine embryonnaire (**Fig 9**).

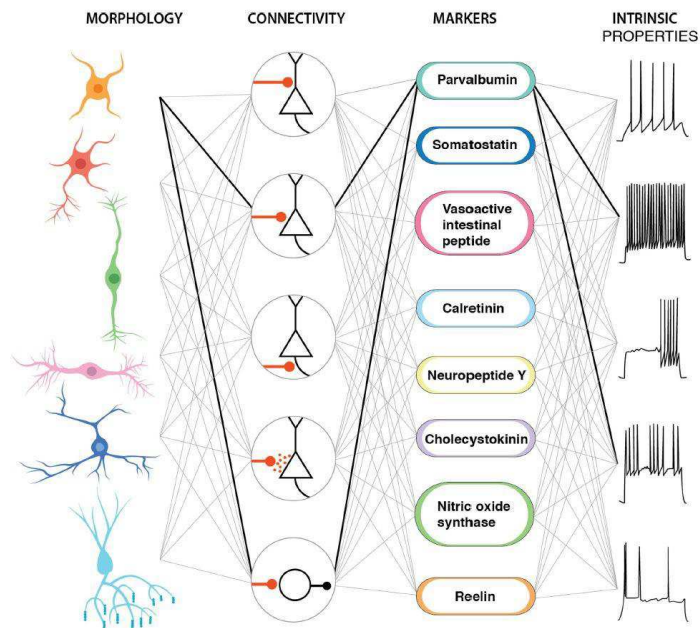


Figure 9- Diversité des interneurons corticaux. Les interneurons sont classés suivant une combinaison de critères morphologiques, de leur cible, marqueurs cellulaires et propriétés électrophysiologiques. Les traits noirs connectant les différents paramètres illustrent un interneurone exprimant la Parvalbumine et déchargeant à haute fréquence. (De Kepecs et Fishell, 2014).

C'est pourquoi différentes méthodes de classifications ont vu le jour. Historiquement, les interneurons inhibiteurs sont classés suivant un large répertoire de propriétés morphologiques, électrophysiologiques et moléculaires (Ascoli et al., 2008).

Tout d'abord, les classifications morphologiques (**Fig 10**) des interneurons corticaux se définissent selon des critères tels que l'arborisation axonale et/ ou dendritique (pour revue S Ramon y Cajal, 1995; Raghanti, 2010).

Les classifications biochimiques reposent, quant à elles, essentiellement sur l'expression de deux types de marqueurs : les protéines de liaison au calcium et les neuropeptides (Kawaguchi and Kubota, 1997). Dans les protéines de liaison au calcium, on retrouve la calbindine-D28K (CB), la parvalbumine (PV) et la calrétinine (CR). Dans les neuropeptides, on retrouve le neuropeptide Y (NPY), le peptide vasointestinal (VIP), la somatostatine (SST) et la cholecystokinine (CCK). Ces différents marqueurs ont permis, grâce à des techniques d'immunohistochimie, de mettre en évidence trois grandes classes d'interneurones (Kawaguchi and Kubota, 1997): les cellules à PV (qui expriment fréquemment la CB, de morphologie hétérogène), les cellules NPY-SST (qui expriment aussi fréquemment la CB, de morphologie hétérogène), et les cellules VIP-CCK (qui expriment fréquemment la CR, en majorité de morphologie bipolaire).

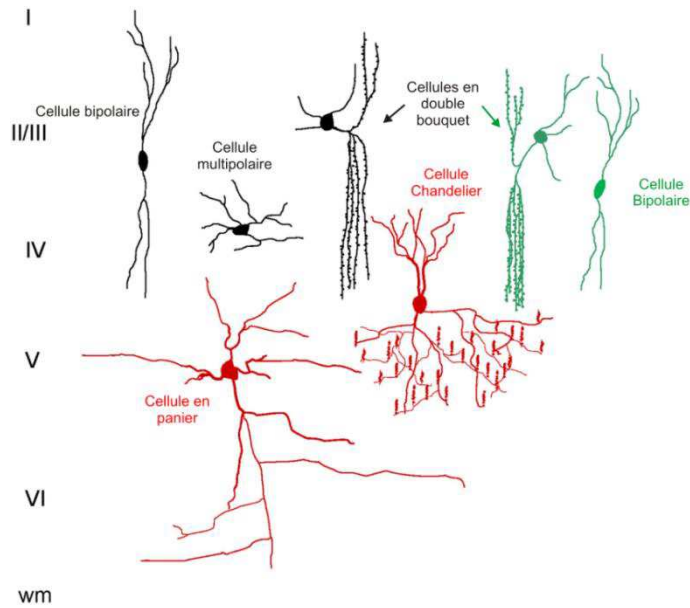


Figure 10- Exemple des différentes morphologies d'interneurones. (D'après Raghanti et al, 2010).

Enfin, le développement de la technique de patch-clamp sur tranches (Edwards et al., 1989; Stuart et al., 1993) a mis en évidence un autre aspect de la diversité de la population des interneurones corticaux. Leurs propriétés électrophysiologiques ont permis de définir, tout comme leurs diversités morphologiques et moléculaires décrites ci-dessus, des sous-populations d'interneurones. Par exemple, au cours de ma thèse je me suis focalisée sur les cellules dites à décharge rapide (Fast Spiking ou FS) qui ont notamment été les premiers comportements électrophysiologiques à avoir été décrits (Connors and Gutnick, 1990 pour revue). Ces neurones sont caractérisés par des PA émis à des fréquences élevées et soutenues pouvant atteindre plus de 500Hz chez l'adulte. D'autre part, ces PA présentent une phase d'hyperpolarisation (afterhyperpolarization ou AHP) très marquée (**Fig 11**). Les neurones Fast Spiking représentent plus du tiers des interneurones du cortex (Kawaguchi, 1995). Morphologiquement, ce sont majoritairement des cellules de types cellules en panier ou de type chandelier (Kawaguchi et al., 1993; Kawaguchi, 1995). De plus, le marqueur moléculaire révélé par immunocytochimie pour ces cellules est la PV (Kawaguchi, 1993).

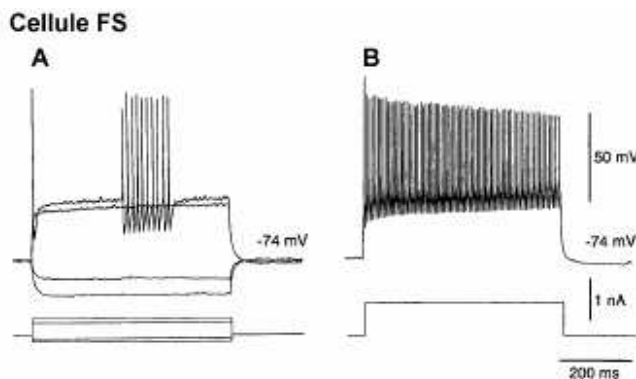


Figure 11- Profil de décharge d'une cellule de type FS. Réponses évoquées par injection de créniaux de courant. (A) Décharges de PA induites par un courant dépolarisant proche du seuil d'émission des PA (traces du haut). L'AHP est rapide et prononcée après chaque PA. (B) Décharge de PA à haute fréquence induite par un fort courant dépolarisant. (D'après Kawaguchi, 1995).

Des schémas de classifications basés sur des caractéristiques développementales ont permis de confirmer et supporter les classifications établies (McCormick et al., 1985; Kawaguchi and Kubota, 1993, 1996; Cauli et al., 1997). Notre équipe a grandement participé à la définition de catégories d'interneurones, grâce à la mise au point de la technique de la RT-PCR sur cellule unique (Lambolez et al., 1992; Bruno Cauli et al., 1997; Devienne et al., 2018) Cette technique permet d'obtenir simultanément le profil morphologique, électrophysiologique et de déterminer l'expression de marqueurs qui se sont révélés comme des critères déterminant pour la classification en différentes sous-populations.

Récemment, la technique du séquençage d'ARN d'une cellule unique a permis le développement d'une taxonomie, mise à disposition en ligne sous la forme d'une base de données accessible à tous (Tasic et al. 2016). Néanmoins, la multiplicité des méthodes de classifications augmente le nombre de classes et de sous-classes d'interneurones décrits, tendant ainsi à créer une confusion. Actuellement, la communauté scientifique continue à utiliser les grandes classes d'interneurones antérieurement établies.

2.2.3 Un mot sur les interneurones FS-PV

Au cours de ma thèse, je me suis intéressée en particulier à un type d'interneurones : les interneurones à décharge rapide exprimant la PV (Fast-Spiking Parvalbumin ou FSPV). Les cellules FS-PV sont majoritairement de morphologie type cellule en panier, signifiant qu'elles font des contacts axo-somatiques (**Fig 12**).

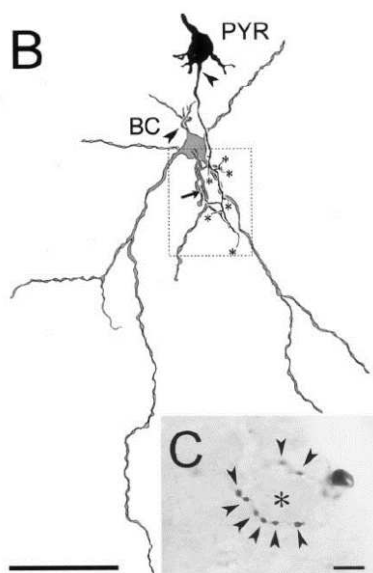


Figure 12- Morphologie d'une FSPV. L'axone de la cellule en panier FS (BC) contacte le soma de la cellule pyramidale (PYR). Les contacts entre les cellules sont identifiés sous forme de points marqués d'une flèche (en bas). D'après (Angulo et al. 1999).

Comme leur nom l'indique, les FS-PV interneurons expriment la protéine de liaison au calcium, la parvalbumine (Kawaguchi et al., 1987), qui va contrôler la libération synchrone et asynchrone du GABA (Manseau et al., 2010). La PV est une protéine de liaison au calcium qui est exprimée par 50% des interneurons inhibiteurs dans toutes les couches du cortex excepté dans la couche I (Kubota et al., 1994). Elle est essentiellement retrouvée dans les cellules en panier et les cellules en chandelier. Une classe distincte d'interneurons co-exprimant la PV et la CB a aussi été décrite (DeFelipe, 1997). Le développement d'une lignée transgénique de souris exprimant la Cre recombinase dans les neurones à PV a facilité l'étude de différents mécanismes physiologiques liés à ces neurones (Hippenmeyer et al., 2005). Grâce à cette lignée il est en effet possible de transduire spécifiquement des cellules PV grâce à l'utilisation d'AAV Cre dépendant.

Les cellules FS-PV sont issues de l'éminence ganglionnaire médiale (MGE). Le facteur de transcription Er81 (ou Etv1) a été mis en évidence (Dehorter et al., 2015) comme modulateurs des propriétés intrinsèques des interneurons FS, notamment à travers la régulation de la sous unité Kv1.1 des canaux potassiques voltage dépendant dont l'expression est nécessaire pour réguler le seuil de déclenchement des PA (Goldberg et al., 2008).

Les FS-PV interneurons tiennent leur nom de leur type de décharge, c'est-à-dire « Fast-Spiking » (décrit précédemment). Ces interneurons sont essentiels pour façonner l'activité des circuits corticaux (Bartos et al., 2002) et empêcher des emballements de l'activité excitatrices du réseau (Lau et al., 2000) grâce à leur décharge rapide (plusieurs centaines de Hz) et leur contact axosomatique leur permettant une inhibition périsomatique (Freund and Katona, 2007). Ces propriétés de décharge particulière sont sous-tendues par un ensemble de canaux ioniques et notamment les Kv3 qui dans les cellules FS matures soutiennent leur haute fréquence de décharge grâce à une cinétique qui entraîne une repolarisation rapide de la membrane après la décharge (Rudy and Mcbain, 2001).

Les FS-PV immatures sont incapables de supporter des décharges à hautes fréquences jusqu'à P10-P15. Des événements transcriptionnels post-natals, se produisent vers la troisième semaine du développement chez la souris et permettent le développement du phénotype électrophysiologique des FS-PV avec en parallèle le développement de leurs canaux Kv3 et de différents canaux sodiques à hautes cinétiques (Okaty et al., 2009). Ils expriment enfin des récepteurs AMPA à inactivation rapide et peu ou pas de récepteurs NMDA. Toutes ces caractéristiques leur permettent de libérer de façon rapide et fiable du GABA à leurs terminaisons synaptiques.

Grâce aux contacts qu'ils effectuent au niveau du soma des cellules pyramidales, ils contrôlent et synchronisent la décharge d'un grand nombre de ces cellules durant les

oscillations gamma (35Hz-100Hz) (Cardin et al., 2009; Sohal et al., 2009). Cette fréquence élevée d'oscillation a été décrite, à la suite des études sur le cortex visuel de chat, comme reliée à l'intégration perceptuelle, à la construction de représentations cohérentes et à des processus d'attention élevée (Crick and Koch, 1990). Une cellule FS-PV est aussi capable de s'inhiber elle-même en formant des autapses (Bacci et al., 2003). Il est important de noter qu'il existe une hétérogénéité au sein même des interneurons FS-PV. Notamment, Il a été décrit que les FS-PV des couches IV et V sont entourées d'une matrice extracellulaire spécialisée : le réseau périneuronal, sur lequel est basée cette thèse.

Les cellules FS-PV sont particulièrement étudiées car elles sont impliquées dans plusieurs maladies neurologiques telles que l'épilepsie et la schizophrénie (Marín, 2012). Dans la suite de ce manuscrit le rôle fonctionnel des FS-PV et leur lien avec la plasticité corticale seront abordés.

2.2.4 Connectivité interneurons FSPV et cellules pyramidales

Les interneurons FS-PV sont préférentiellement interconnectés aux cellules pyramidales qui leur sont voisines et qui leur fournissent une excitation réciproque (Yoshimura and Callaway, 2005). Ils peuvent aussi être recrutés via d'autres sources de circuits excitateurs (Roux and Buzsáki, 2015). Différentes formes de microcircuits inhibiteurs peuvent exister au sein du cortex. L'inhibition antérograde (feedforward) est activée par des connections de longues distances et joue un rôle important pour le contrôle de l'activité des cellules pyramidales dans le cortex (**Fig 13**). Dans la couche IV du cortex visuel ce type d'inhibition est particulièrement présent, les interneurons FS-PV corticaux y étant recrutés par les fibres thalamiques (Pouille and Scanziani, 2001).

Le rétrocontrôle inhibiteur (feedback) est divisé en deux groupes : l'inhibition récurrente et l'inhibition latérale. Dans ce type d'inhibition la cellule excitatrice va émettre des PA et activer des interneurons inhibiteurs qui en retour vont inhiber l'activité de cette même cellule pyramidale (inhibition récurrente) ou d'autres cellules pyramidales voisines (inhibition latérale).

L'inhibition dite directe survient quand ce sont des entrées GABAergiques de régions distantes qui dirigent l'inhibition du circuit. Enfin, la désinhibition prend place quand des neurones GABAergiques ciblent d'autres neurones GABAergiques. Ce type d'inhibition peut créer une synchronie ou une désinhibition du réseau des neurones excitateurs (Sohn et al., 2016). Un autre type d'inhibition sont les autapses réalisées par les cellules FS-PV sur elles même (Bacci et al., 2003b).

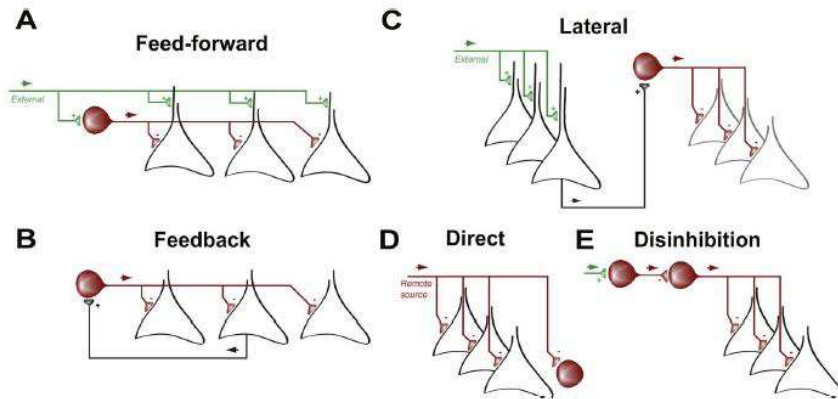


Figure 13- Différentes formes d'inhibition. (A) Inhibition feedforward, (B) Inhibition feedback, (C) Inhibition latérale, (D) Inhibition directe et (E) désinhibition. Les interneurons sont représentés en rouge, les cellules pyramidales environnantes en noir et les afférences excitatrices lointaines en vert. De (Roux et Buzsaki, 2015).

Ces différents types de connectivités entre les cellules FS-PV et pyramidales au sein d'un même microcircuit démontre la complexité des effets engendrés par la manipulation de ces différents acteurs, point que j'aborderai plus loin dans ce manuscrit.

Dans le système nerveux, deux grands types cellulaires sont retrouvés : les cellules gliales et les neurones. Parmi les neurones, deux grandes populations sont décrites : les neurones glutamatergiques excitateurs représentant environ 80% de la population neuronale et les neurones GABAergiques locaux inhibiteurs (les autres 20%).

Les neurones glutamatergiques sont principalement représentés par les cellules pyramidales. Une grande diversité d'interneurones est décrite. Ils sont souvent classés selon leur morphologie, leur marqueur, leur cible et leurs caractéristiques électrophysiologiques.

Parmi ces interneurons, les cellules FS-PV sont décrites comme des cellules à panier, faisant des contacts axo-somatiques, exprimant la PV et émettant des PA à haute fréquence. Ils sont fortement interconnectés avec les neurones glutamatergiques.

3. Plasticité dans le système nerveux central

3.1 Périodes critiques de plasticité

Les circuits neuronaux sont façonnés par l'expérience durant des périodes post-natales définies comme périodes critiques. Les périodes critiques sont définies comme un sous-ensemble des périodes dites «sensibles» (Knudsen, 2004). Les périodes sensibles sont des périodes de plasticité restreintes dans le temps où l'expérience a un effet profond sur le cerveau. Certaines compétences (sportives, musicales...) acquises précocement dans la vie reflètent l'existence de ces périodes sensibles. Les périodes critiques sont quant à elles des cas particuliers où l'expérience est absolument nécessaire à une maturation normale du cerveau (**Fig 14**).

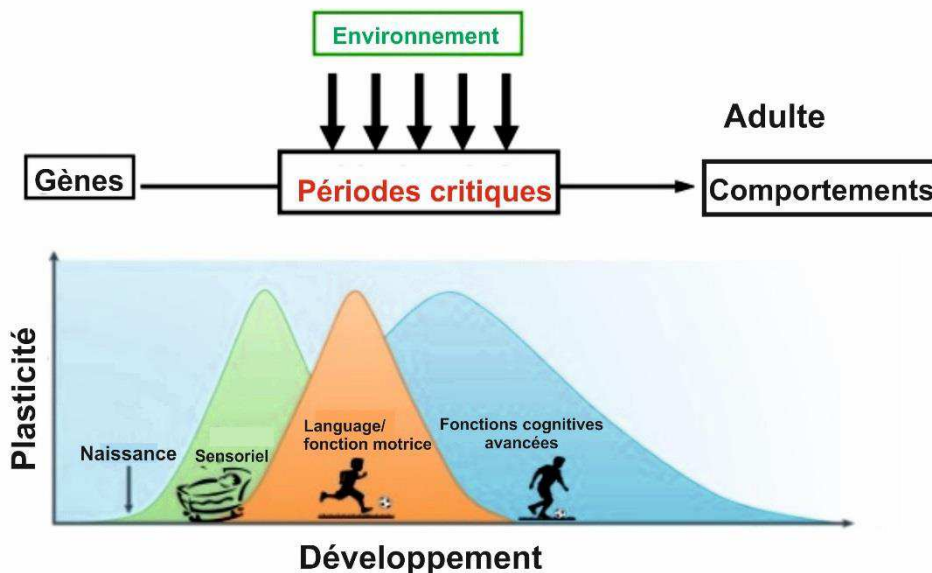


Figure 14- Périodes de plasticité dans le cerveau en développement.
(Adapté de Hensch et al. 2005).

Les périodes critiques ont été étudiées dans différentes régions du cerveau grâce à différents modèles animaux tels que le chat pour le système visuel (Wiesel and Hubel, 1963), la chouette pour le système auditif (Knudsen et al., 1984), les primates pour le cortex somatosensoriel (Jones, 1993).

De plus, le début des périodes critiques ainsi que leur durée varient suivant les régions cérébrales considérées (Hensch, 2004). La régulation de ces périodes de plasticité ne dépend pas de l'âge mais de l'expérience, comme dit précédemment. En effet, il a été montré chez le chat (Garey and Pettigrew, 1974), puis chez le rongeur (Fagiolini et al., 1994), que plonger les animaux dans l'obscurité à la naissance («Dark-rearing experiment») retarde la mise en

place de la période critique du système visuel. De même, un environnement enrichi va permettre de prolonger la plasticité (Sale et al., 2007). Les mécanismes sous-tendant la mise en place de ces périodes sont variés, par exemple l'ouverture de la période de plasticité du système visuel est dépendante de *stimuli* sensoriels et donc favorisée par l'ouverture des yeux chez la souris (Smith and Trachtenberg, 2007). Les périodes critiques sont accompagnées de changements anatomiques permanents (mobilité des épines dendritiques) permettant de distinguer ces plasticités avec la plasticité développementale de l'apprentissage adulte. Enfin, un point essentiel définissant l'existence de périodes critiques post-natales est la possibilité de les rouvrir chez l'adulte (Hensch and Bilimoria, 2012).

3.2 Le système visuel et la dominance oculaire

3.2.1 Le système visuel

Le système visuel consiste en une série de cellules et synapses qui portent l'information visuelle de l'environnement au cerveau pour l'intégrer.

Les signaux sensoriels reçus au niveau des photorécepteurs de la rétine, qui convertissent l'énergie lumineuse en un signal neuronal, vont ensuite passer par les cellules bipolaires. Ils sont transférés aux cellules ganglionnaires qui vont permettre leur intégration au niveau de la partie dorsale du Corps Genouillé Latéral (CGL) du thalamus. Il est intéressant de noter la structure inversée de la rétine (**Fig 15**), la lumière devant traverser la rétine avant de pouvoir atteindre les photorécepteurs, sensibles à la lumière. Les neurones du CGL vont ensuite faire synapse au niveau de la couche IV du cortex visuel primaire (V1).

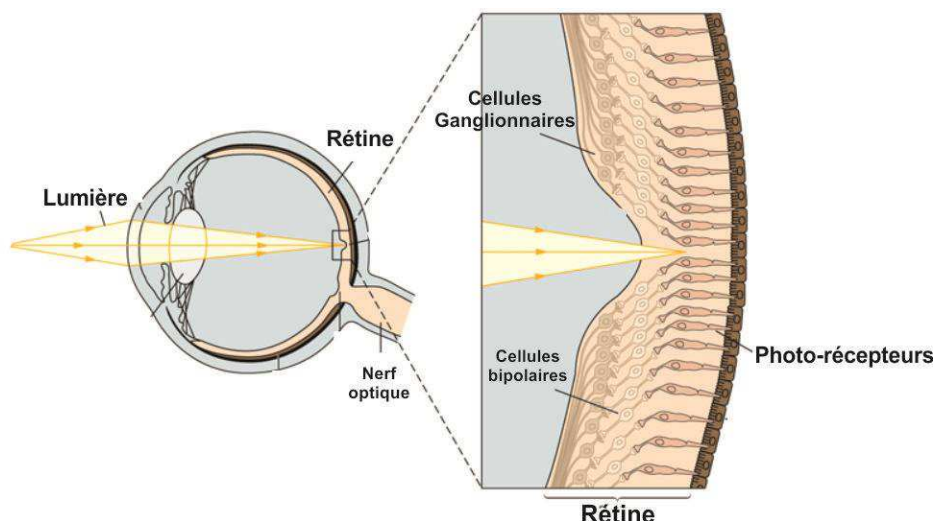


Figure 15- Structure inversée de la rétine : La lumière va traverser les différentes couches cellulaires constituant la rétine afin d'être captée par les photorécepteurs. (Adapté de Principles of neural science, fifth edition, Kandel).

Les cellules ganglionnaires de la rétine, reçoivent des entrées de nombreux photorécepteurs (cônes et bâtonnets), généralement regroupées de façon précise en « patch » que l'on appelle champs récepteurs des cellules ganglionnaires. En effet, les cellules ganglionnaires peuvent être classées en deux groupes : les cellules à centre ON et les cellules à centre OFF (**Fig 16**) : les cellules à centre ON déchargent quand leur champ récepteur est illuminé, tandis que les cellules à centre OFF sont inhibées par l'illumination de leur champ récepteur mais activées quand sa périphérie est illuminée (Kuffler, 1953). Ces champs récepteurs se recouvrent, et couvrent la surface entière de la rétine. Plusieurs cellules à centre ON et à centre OFF convergent vers la même cellule du CGL, les cellules du CGL à leur tour convergent vers la même cellule dans V1. Cette organisation est appelée organisation rétinotopique. On retrouve donc, à la fois dans le CGL et le V1, des cellules à champs récepteurs façonnées par des entrées excitatrices et inhibitrices. Le haut degré de convergence du système visuel permet aux cellules corticales de s'ajuster à la spécificité d'un stimulus : les cellules dites « simples » détectent les bords d'angles spécifiques alors que les cellules dites « complexes » détectent les bords avec une notion de direction et mouvement (Hubel and Wiesel, 1959).

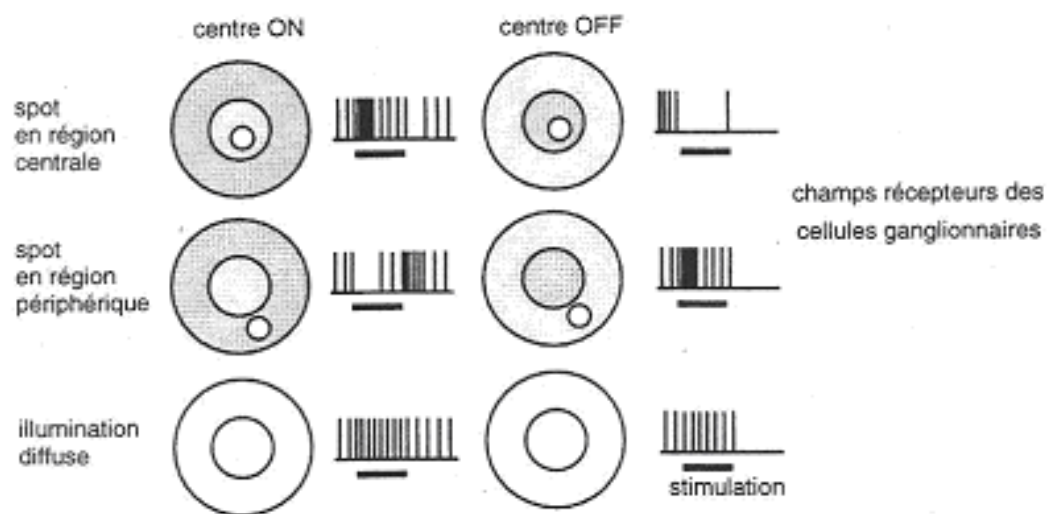


Figure 16- Champ récepteur de deux cellules ganglionnaires. Les champs sont des aires circulaires entourés d'un anneau périphérique aux propriétés différentes. La cellule à centre ON (à gauche). La cellule à centre OFF (à droite). Quand le point de lumière est focalisé dans la région centrale (champ récepteur) la décharge de la cellule augmente. Quand le point lumineux est focalisé sur la périphérie, la décharge est réduite. Quand l'illumination est diffuse, la décharge est régulière.

Chaque hémisphère du V1 va recevoir des informations provenant du champ visuel controlatéral. La plupart des cellules de la rétine projettent vers la partie dorsale controlatérale du CGL après avoir croisé la ligne médiale à travers la ligne médiale du chiasma optique.

3.2.2 La dominance oculaire

Les travaux d'Hubel et Wiesel, qui leur ont valu le prix Nobel en 1981, ont démontré dans le cortex visuel que l'expérience peut moduler les connexions neuronales. Le système visuel permet en effet un contrôle expérimental des conditions permettant d'étudier les relations entre l'expérience et le circuit neuronal. Ce n'est pas le cas d'autres systèmes, tels que le système somatosensoriel où il est difficile d'exclure un contact entre l'animal et les stimulations somesthésiques de son environnement extérieur.

De plus, la conformation des voies visuelles et notamment l'existence de colonnes de dominance oculaire dans la couche IV, due à l'arrivée des afférences du thalamus, facilite les études réalisées dans ce système. La dominance oculaire est un phénomène résultant du fait que les neurones situés au sein d'une même colonne vont répondre exclusivement à une stimulation venant soit de l'œil gauche soit de l'œil droit. Au contraire, les neurones situés dans les couches supérieures (couches II et III) ou inférieures (couches V et VI) à la couche IV intègrent les informations provenant des deux yeux.

Afin de mesurer la distribution de la dominance oculaire, des enregistrements unitaires du cortex visuel primaire sont généralement réalisés (Dräger, 1975) et permettent de calculer le score de dominance oculaire (OD score) (**Fig 17, A**). Plus récemment, des méthodes d'imagerie optique des signaux intrinsèques de l'activité corticale permettent de mesurer les réponses visuelles aux stimulations des deux yeux en donnant une estimation quantitative des réponses corticales (Cang et al., 2005). Les neurones corticaux du V1, y sont classés en 7 groupes de dominance oculaire suivant leur degré de réponse à un stimulus de l'œil ipsilatéral ou contralétéral. Les cellules classées dans le groupe 1, ne sont activées que par une stimulation de l'œil contralatéral tandis que les cellules classées dans le groupe 7 ne sont activées que par une stimulation de l'œil ipsilatéral. Le groupe 4, regroupe quant à lui, les neurones dits binoculaires (qui répondent de la même façon aux stimulations de l'un ou de l'autre œil).

C'est grâce à l'existence de cette distribution de dominance oculaire, que Hubel et Wiesel ont mis au point un modèle montrant l'importance de la période critique sur l'établissement de la distribution de la dominance oculaire dans le V1. La suture d'une courte durée (en général 3 jours chez la souris) d'une paupière, et donc l'occlusion d'un œil chez l'animal jeune, que l'on caractérise de privation monoculaire (Monocular Deprivation ou MD en anglais) provoque un décalage de la dominance oculaire et l'animal jeune va développer une amblyopie (différence d'acuité visuelle entre les deux yeux qui n'est pas due à une lésion ou un traumatisme) qui n'est pas retrouvé chez l'animal adulte. Des études réalisées chez le chat ont démontré que cette suture d'un œil, pendant la période critique de plasticité va induire

une réorganisation de la réponse des neurones corticaux en faveur de l'œil resté ouvert. Les cellules normalement activées par l'œil maintenant suturé vont répondre aux entrées sensorielles venant de l'œil non suturé (Wiesel and Hubel, 1963) (**Fig 17 B et C**). Depuis ce modèle de privation monoculaire est devenu un système classique pour étudier les périodes critiques de plasticité (Daw et al., 1992; Hensch and Fagiolini, 2000; Hensch, 2005). La privation binoculaire (suture des deux paupières) réalisée chez la souris pendant la période critique ne diminue quant à elle pas les réponses corticales (Gordon and Stryker, 1996). Cette plasticité dépend donc bien de la compétition entre les deux yeux. Ce mécanisme est observé chez l'animal jeune, toujours durant la période critique et est limité chez l'adulte (Hubel and Wiesel, 1970; Olson and Freeman, 1980).

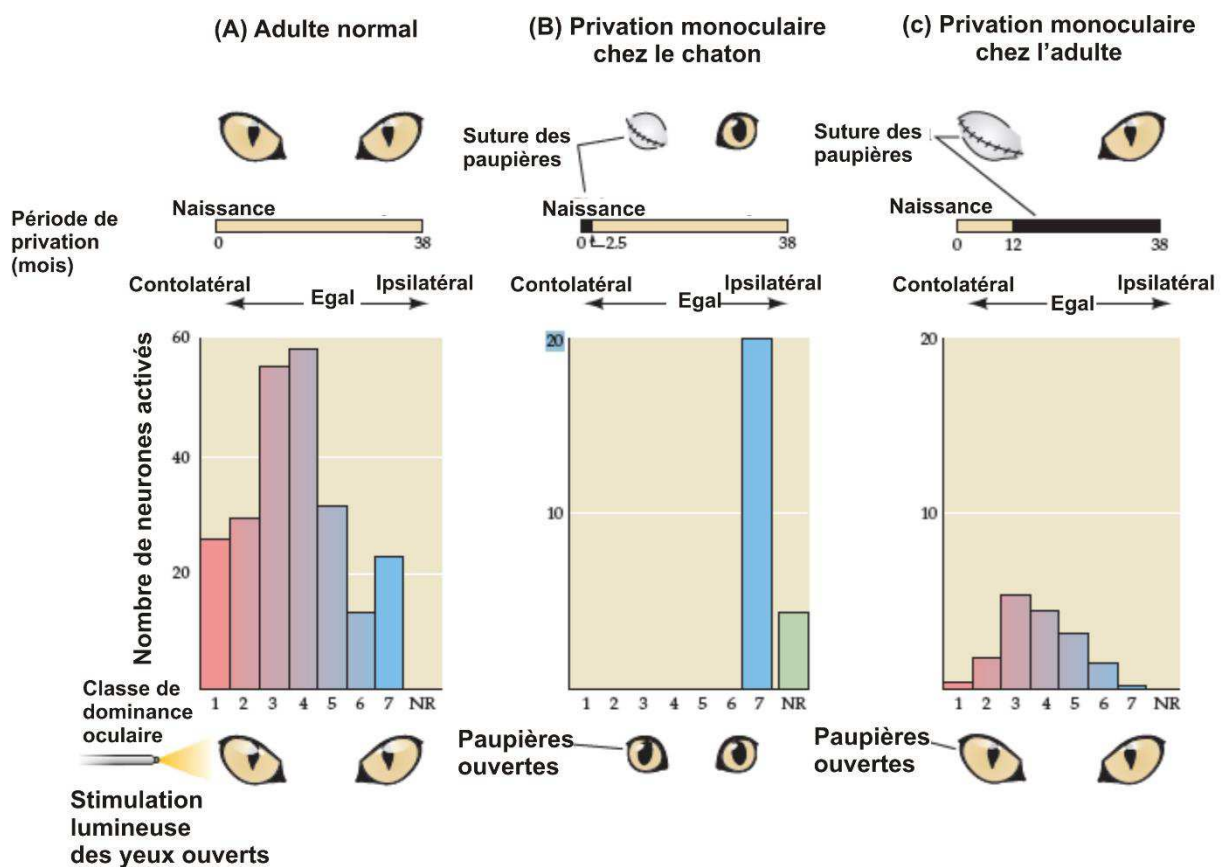


Figure 17- Score de dominance oculaire et effet de la privation monoculaire chez le chat. (A) Distribution de la dominance oculaire chez un chat adulte normal. (B) Après la suture brève d'une paupière, chez le chaton, on observe un décalage de la dominance oculaire en faveur de l'œil non suturé (ipsilatéral). (C) Après suture longue d'une paupière, chez le chat adulte, on observe une absence d'effet sur la dominance oculaire. (D'après Neurosciences, 5^{ème} édition, Purves et al.).

L'effet de la MD est supporté par des remodelages au niveau des circuits corticaux (Trachtenberg and Stryker, 2001). Des changements structuraux rapides ont par exemple été observés au niveau des épines dendritiques (Oray et al., 2004).

Les travaux portant sur le système visuel et les méthodes utilisées, telles que la suture d'un œil, ont permis de mieux comprendre et étudier la plasticité corticale. Néanmoins, les mécanismes impliqués restent encore ambigus. Je vais aborder par la suite, comment l'activité des neurones corticaux, et en particulier l'inhibition GABAergique jouent un rôle dans la mise en place de cette plasticité.

3.3 Lien entre période critique et inhibition

La balance excitation/ inhibition est importante pour la plasticité et le développement normal du cerveau. Plusieurs études réalisées dans le cortex visuel ont montré que l'inhibition GABAergique joue un rôle dans le déroulement de la période critique pour la plasticité de la dominance oculaire (Hensch, 2005). En contrôlant la transmission inhibitrice, il est possible d'altérer la mise en place et la maturation de la période critique. Les souris déficientes en enzyme de synthèse du GABA, GAD65 (Acide Glutamique Décarboxylase) n'ont pas de période critique de la dominance oculaire (Hensch et al., 1998) ou ni de perte de leurs épines dendritiques (Mataga et al., 2004) à la suite d'une privation monoculaire. Il est possible de rétablir ces phénotypes (période critique et perte des épines dendritiques) en renforçant la transmission GABAergique à l'aide de benzodiazépines (agonistes des récepteurs GABA_A). De même, chez le rat, la réduction de la transmission GABAergique en utilisant un inhibiteur de la synthèse de la GAD réactive la plasticité de dominance oculaire en réponse à une privation monoculaire (Harauzov et al., 2010). Comme dit précédemment, une expérience sensorielle est nécessaire pour lancer le début des périodes critiques. Les expériences de mise dans le noir à la naissance (Dark rearing experiment) retardent la mise en place de la période critique mais aussi la maturation de l'inhibition corticale (Fagiolini et al., 1994; Iwai et al., 2003; Katagiri et al., 2007). A l'inverse, les benzodiazépines entraînent une mise en place prématurée des périodes de plasticité chez les souris juvéniles juste après l'ouverture des yeux (environs P13) (Hensch and Fagiolini, 2000b). La mise en place de la période critique repose donc sur deux phénomènes : les stimuli sensoriels extérieurs et le développement du réseau d'inhibition GABAergique.

Les cellules PV, qui mûrissent en parallèle de la période critique, sont considérées comme les cellules GABAergiques permettant la régulation de cette plasticité post-natale dépendante de l'expérience. L'utilisation des benzodiazépines pour stimuler la plasticité semble suggérer que celle-ci passe par la signalisation des récepteurs GABA_A. Ces récepteurs sont retrouvés de façon importante au niveau des synapses somatiques faites par les cellules en panier à PV avec les cellules pyramidales. Contrairement aux autres types d'interneurones, les cellules PV sont matures un peu plus tard lors de la période post-natale comme pour anticiper la mise en place du début de la période critique (del Rio et al., 1994). De plus, une surexpression du facteur neurotrophique issu du cerveau (ou Brain-Derived Neurotrophic

Factor, BDNF) accélère à la fois le développement des cellules PV et la période critique (Hanover et al., 1999; Huang et al., 1999).

Un autre point qui lie les cellules PV à la maturation de la période critique au niveau du cortex visuel est le facteur de transcription OTX2 (Orthodendricle Homeobox 2). La protéine OTX2 est synthétisée dans les plexus choroïde (Spatazza et al., 2013), qui la sécrète dans le fluide cébrospinal. OTX2 va ensuite être capté par les cellules PV et être internalisé, de manière concomitante avec le développement des cellules PV, le début de la période critique et l'accumulation d'une matrice extracellulaire autour de ces cellules PV (Sugiyama et al., 2009; Beurdeley et al., 2012). Il est intéressant de noter que la maturation des cellules PV avec l'entrée d'OTX2 dans ces cellules est accompli via un mécanisme qui n'est pas cellule-autonome. En délivrant dans le cortex de souris de l'OTX2 avant la période critique, on voit une accélération de la mise en place de celle-ci alors que le blocage d'OTX2 en extracellulaire va retarder le début de la période critique (Sugiyama et al., 2008) (**Fig 18**).

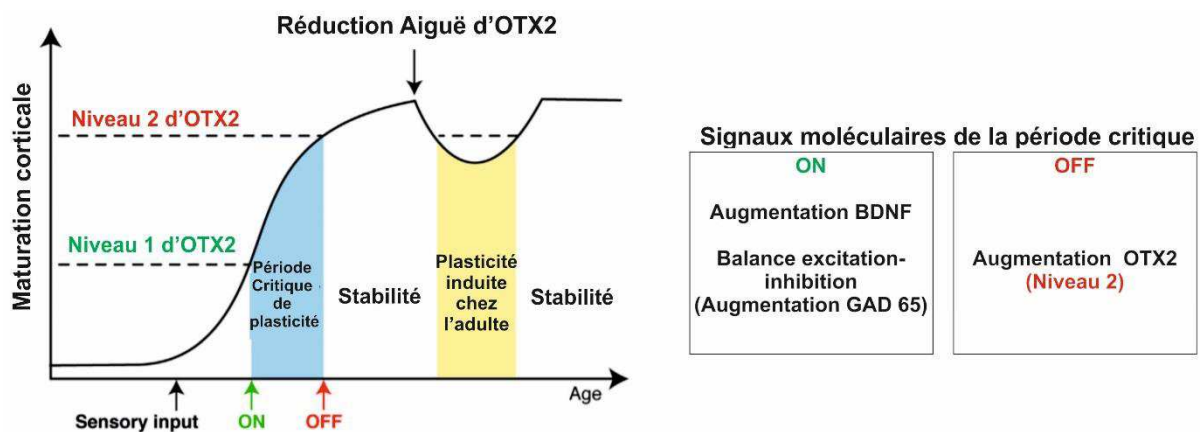


Figure 18- Niveau d'OTX2 et importance de l'inhibition pour le déclenchement de la période critique. La période critique est favorisée par l'augmentation de la transmission GABAergique. Cette augmentation peut être promue par une augmentation de BDNF dans les interneurons. Une première augmentation d'OTX2 (Niveau 1) va ouvrir la période critique. Une deuxième augmentation (Niveau 2) va permettre la fermeture de la période critique. (Adapté de Prochiantz et Dinardo, 2015).

Il est clair que les cellules PV sont impliquées dans le contrôle de la période critique mais les mécanismes utilisés pour cette régulation ne sont pas encore complètement mis en évidence. Récemment, une étude a montré le rôle des interneurons FS-PV dans la réouverture d'une période de plasticité des cartes corticales du système visuel chez la souris adulte (Kuhlman et al., 2013). En effet, l'utilisation combinée d'outils chimogénétiques et de la lignée de souris PV-Cre permet le contrôle spécifique et temporel des cellules à PV. Une inhibition transitoire d'une journée de l'activité des FS-PV suffit dans cette étude à étendre la

période critique pour la dominance oculaire et à entraîner un décalage de la dominance oculaire après la suture d'un œil chez la souris adulte. Cet article a été le point de départ de notre étude et nous reviendrons dessus dans la partie «Problématique et objectifs des travaux de thèse». L'article Kuhlman et al. (Kuhlman et al., 2013) indique que la MD résulte d'une réponse neuronale en deux temps avec dans un premier temps une diminution de la réponse neuronale excitatrice à la suite de la MD qui va dans un second temps retourner à un niveau normal. Ce retour à la normale semble être dû à une réduction rapide et transitoire de l'effet inhibiteur des FS-PV, diminuant ainsi leur inhibition sur les cellules pyramidales. La question pouvant-être posée à ce niveau est : Cette observation est-elle due à l'inhibition des PV ou à une désinhibition du réseau consécutive à l'inhibition des neurones PV ? Ce point est important et j'y reviendrai dans la suite de ce manuscrit.

Il a été montré que la plasticité liée à la MD pendant la période critique est accompagnée de mécanismes de dépression synaptique à long terme (une réduction durable de l'efficacité de la transmission synaptique, LTD) de type Hebbienne (Toyoizumi et al., 2014) (dépendant de l'activité de la synapse, et de la corrélation entre les activités des éléments pré et post synaptiques) à cause de sa dépendance aux entrées calciques via les récepteurs N-méthyl-D-aspartate (NMDA) agissant sur la calmoduline kinase II (Taha et al., 2002). Ce mécanisme permet l'affaiblissement de la réponse de l'œil fermé de façon rapide après 3 jours de MD.

Des changements au niveau structurel accompagnent le décalage de dominance oculaire suivant une privation monoculaire. Par exemple, après 3 jours de MD, un remodelage de synapses thalamocorticales dans le V1 est observé (Coleman et al., 2010). Au niveau des dendrites, une augmentation de la mobilité des épines des cellules pyramidales de la couche V a été décrite (Majewska and Sur, 2003).

Enfin, une théorie permettant d'expliquer le rôle de l'inhibition sur l'initiation de la période critique dans V1 a été émise. L'inhibition permettrait de supprimer préférentiellement les réponses aux activités spontanées au profit d'activité due aux entrées visuelles. Rendant ainsi les signaux d'apprentissage plus sensibles aux sources externes (signaux visuels) qu'aux sources internes (activités spontanées).

En conclusion, l'inhibition, et en particulier celle médiée par les interneurons FS-PV, joue un rôle essentiel dans la mise en place et le déroulement de la période critique en permettant son ouverture et sa fermeture. Dans la suite de ce chapitre, je vais présenter plus précisément comment la plasticité chez l'adulte peut être manipulée et quels mécanismes interviennent dans les réouvertures de cette plasticité.

3.4 Plasticité chez l'adulte

La plasticité dans le cortex, n'est cependant pas seulement restreinte aux périodes critiques et donc à une période développementale. Le cerveau adulte présente aussi de la plasticité même si celle-ci est différente de celle rencontrée lors des périodes critiques. Dans le système visuel de la souris adulte, différentes études ont démontré l'existence de formes de plasticité. Les mécanismes d'ajustement d'orientation notamment sont connus pour ne pas dépendre d'une expérience visuelle au préalable (Wiesel and Hubel, 1963) bien qu'une expérience à la période juvénile puisse modifier la préférence d'orientation de certains neurones (Stryker et al., 1978). Chez le chat adulte, des expériences réalisées avant et après adaptation de changement d'orientation de stimuli visuel montrent que les neurones du V1 effectuent un décalage dans leur préférence d'orientation démontrant l'existence, chez l'adulte, d'une plasticité à la suite d'une adaptation (Dragoi et al., 2000).

La plasticité de dominance oculaire, décrite précédemment existe aussi sous une certaine forme chez l'adulte. Il a, en effet, été montré que la privation monoculaire réalisée chez la souris adulte (P60-P90) entraînait un décalage de dominance oculaire. Néanmoins le temps de privation nécessaire pour induire ce décalage doit être augmenté par rapport aux mêmes expériences réalisées chez la souris juvénile, passant de 3 à 5 jours de privation sensorielle (Sawtell et al., 2003). Une privation de 3 jours n'étant pas suffisante pour entraîner de la plasticité chez l'adulte (Gordon and Stryker, 1996; Sawtell et al., 2003). Ces résultats ont également été démontrés chez le rat (Hofer Sonja B et al., 2006). De plus, l'amplitude du décalage, mesuré sous la forme de score de dominance oculaire, en réponse à une MD est plus petite chez l'adulte que celle observée chez la souris durant la période critique (Pham et al., 2004; Sato and Stryker, 2008). Il est aussi important de noter que le cerveau adulte est plus sensible à ces expériences induisant de la plasticité s'il y a déjà été confronté auparavant (Hofer et al., 2006, 2009). Enfin, une privation sensorielle visuelle (telle que la mise dans le noir de l'animal) précédée d'une suture d'un œil réactive le décalage rapide dominance oculaire comme observée chez la souris jeune (He, 2006).

En addition à ces différences de synchronisation et d'effet, les mécanismes de plasticité en réponse à une MD ne sont pas similaires chez la souris adulte en comparaison à la souris juvénile. La réponse physiologique à la suture d'un œil chez la souris jeune s'effectue en deux étapes, avec tout d'abord une perte rapide des réponses neuronales dépendante de l'œil suturé suivie d'une augmentation de la force de réponse en faveur de l'œil ouvert (Bear, 2004; Sato and Stryker, 2008). Chez l'adulte, la dominance oculaire subit une réorganisation qui est réversible et qui se reflète par une augmentation de la réponse de l'œil ouvert, la perte rapide des réponses neuronales dépendante de l'œil suturé n'est quant à elle pas observée (Sawtell et al., 2003; Pham et al., 2004; Sato and Stryker, 2008).

Au niveau structural, chez l'adulte, il a été reporté que la MD n'induit pas de changement du nombre de protrusions dendritiques dans les couches II/III (Mataga et al., 2004) et entraîne une très légère diminution de la mobilité des épines dendritiques dans la couche V (Oray et al., 2004) contrairement aux effets structuraux observés durant la période critique (Zuo et al., 2005).

Bien que cette plasticité adulte existe, elle reste limitée et restreinte. En effet, la maturation du réseau cortical, va entraîner l'apparition de « freins moléculaires » qui vont freiner la plasticité corticale (Bavelier et al., 2010). Ces molécules peuvent agir structurellement, comme la matrice extracellulaire ou la myéline mais aussi fonctionnellement comme certains facteurs de transcriptions tel que le BDNF ou récepteurs. Elles vont soit empêcher de façon physique l'interaction entre les neurones ou agir en régulant les mécanismes de neurotransmission. De nombreuses études ont montré que manipuler ces molécules permet d'agir sur le développement temporel des périodes critiques soit en les décalant soit en entraînant une réouverture de période de plasticité chez l'adulte (Nabel and Morishita, 2013; Takesian and Hensch, 2013) (**Fig 19**).

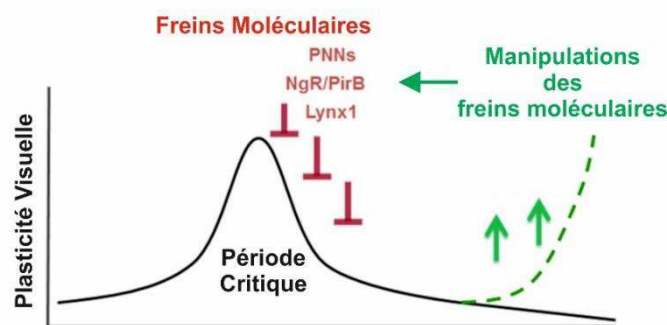


Figure 19- Période critique du cortex visuel. Plusieurs molécules endogènes, les "freins moléculaires" (en rouge) vont aider à la fermeture de la période critique. Une manipulation de ces molécules agit sur le développement de la période critique. (Adapté de Nabel et Morishita, 2013).

Tout d'abord, comme dit dans la partie précédente (cf 3.3 Lien entre période critique et inhibition) interférer avec le système GABAergique entraîne une augmentation de la plasticité chez l'adulte. Une augmentation de la plasticité de dominance oculaire est induite après infusion de picrotoxine (PTX, antagoniste des récepteurs GABA_A) ou d'inhibiteur de la synthèse du GABA (Harauzov et al., 2010). La combinaison des transmissions cholinergiques et noradrénergique est aussi nécessaire pour la plasticité de dominance oculaire après MD (Bear and Singer, 1986). Le Knock-out (KO) de la protéine endogène Lynx 1, qui entraîne la réduction de la transmission cholinergique chez l'adulte, permet une potentialisation de la plasticité de dominance oculaire chez l'adulte, et cette augmentation est abolie par l'utilisation d'antagoniste des récepteurs nicotiques de l'acétylcholine (nAChR) (Morishita et al., 2010). L'utilisation de l'antidépresseur fluoxétine (inhibiteur de la recapture de la sérotonine et noradrénaline) augmente aussi la plasticité de dominance oculaire chez le rat (Vetencourt et

al., 2008). La réduction de la neuromodulation entraîne donc chez l'adulte une augmentation de la plasticité de dominance oculaire après MD. Enfin, des modifications de facteurs structuraux prévenant le remodelage des circuits vont agir sur la fermeture de la période critique. La maturation de la myéline par exemple, va contribuer à diminuer la plasticité chez l'adulte. En effet la myélinisation du SNC augmente dans les différentes couches de V1 de façon concomitante à la fermeture des périodes critiques de plasticité (McGee et al., 2005). Des souris adultes KO du récepteur Nogo (NgR) vont voir leur myélinisation altérée et avoir une plasticité liée à la dominance oculaire intensifiée (Atwal et al., 2008; McGee et al., 2005; Syken et al., 2006). Un autre frein moléculaire structural est particulièrement intéressant pour la compréhension de la plasticité du V1. Les matrices extracellulaires et plus précisément le réseau périneuronale (Perineuronal Net ou PNN) ont montré un lien avec la fermeture de la période critique. Dégrader le PNN chez l'adulte, rouvre la période critique (Pizzorusso et al., 2002). Néanmoins les mécanismes moléculaires de ces observations sont encore peu détaillés. Mieux comprendre le rôle du PNN et comment il intervient dans les mécanismes de plasticité dépendante de l'expérience semblent être inévitable pour mieux comprendre les circuits corticaux.

En résumé, des périodes post-natales de plasticité dépendantes de l'expérience ont été décrites dans différentes parties du cortex. Ces périodes sont communément appelées périodes critiques.

Dans le cortex visuel, des expériences de privation monoculaire (MD) ont permis d'étudier la plasticité avant, pendant et après ces périodes critiques. Des MD de courtes périodes réalisées pendant la période critique chez le rongeur résulte d'un décalage de la dominance oculaire qui n'est pas retrouvé de la même façon l'adulte. La plasticité de dominance oculaire existe chez l'adulte mais différente de celle trouvée pendant la période critique et nécessite une MD plus longue en résultant un décalage de la réponse neuronale moins important.

Enfin, un point intéressant est le lien entre l'inhibition GABAergique et la plasticité. Altérer l'inhibition corticale permet de rouvrir des périodes de forte plasticité chez l'adulte.

4. Le réseau périneuronal: Une matrice extracellulaire spécialisée

En 1898, Camillo Golgi, éminent pathologiste italien, publie un article sur la structure des cellules nerveuses. Il y évoque alors la présence d'une structure entourant le soma des neurones ainsi que la partie proximale de leurs dendrites. La même année, un autre chercheur italien, Arturo Donaggio, observe aussi cette structure, communément appelée réseau périneuronal («**Perineuronal Net**» ou «**PNN**» en anglais), et remarque des ouvertures dans lesquelles les axones des neurones voisins venaient faire des synapses (**Fig 20**).

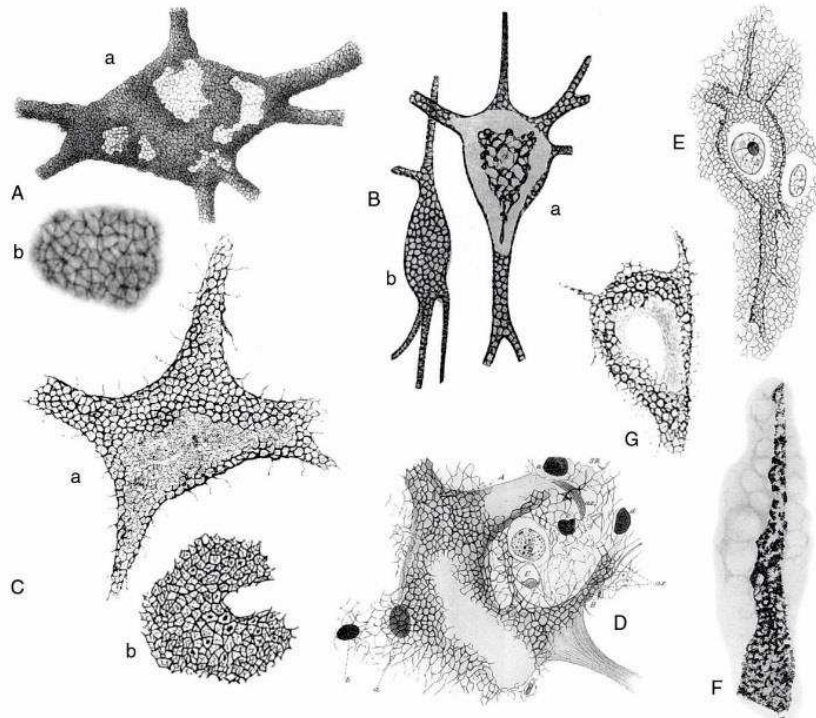


Figure 20- Différentes représentations du réseau périneuronal au cours du dernier siècle. (De Celio et al. 1998)

A la suite de cette découverte, le PNN a été peu étudié par la communauté scientifique. En particulier après que Santiago Ramon y Cajal, rival de Golgi, l'ait caractérisé d'artefact histologique. Ce n'est que dans les années 1970, grâce à l'amélioration des techniques des marquages histologiques et le développement de l'immunohistochimie, que les chercheurs (Celio et al., 1998), ont confirmé l'existence du PNN autour de certains neurones dans le système nerveux central et périphérique de plusieurs vertébrés, incluant l'Homme. Etant donné ses liens avec la plasticité cérébrale, le PNN attire de plus en plus l'attention de la communauté scientifique, qui cherche à mieux en comprendre le rôle.

Le PNN immature a plusieurs fonctions, incluant l'ancrage du cytosquelette à son environnement, la capture de facteurs trophiques et un contrôle de la synaptogénèse. Avec la

maturation du système nerveux, la complexité du PNN augmente, se développant finement autour de certains neurones (Faissner et al., 2010) et créant ainsi une barrière physique à la formation de nouveaux contacts synaptiques. Plusieurs études ont montré un lien entre la maturation du PNN et la plasticité, notamment la concomitance de l'accumulation du PNN autour des cellules FS-PV avec la fermeture de périodes critiques de plasticité. Dans le V1, la fin de la période critique est aussi accompagnée par l'accumulation du facteur de transcription, OTX2 (Orthodenticle Homeobox 2) dans ces cellules FS-PV qui se voient entourés de PNN durant cette période. Enfin le PNN mature semble limiter la mobilité des récepteurs au niveau des membranes cellulaires (Frischknecht et al., 2009).

Le PNN est distribué dans différentes régions du cerveau et de la moelle épinière (Seeger et al., 1994). Il est à noter que des défauts de formation du PNN sont impliqués dans différentes maladies telles que la schizophrénie, l'épilepsie ou la maladie d'Alzheimer (Sorg et al., 2016).

4.1 Structure et composition

Le PNN est une matrice extracellulaire spécialisée avec une structure en forme de maillage qui entoure le soma et les dendrites, et, dans certains cas, le segment initial de l'axone de neurones du système nerveux central. Dans le néocortex, le PNN enveloppe majoritairement les interneurones FS-PV mais aussi un faible pourcentage de cellules pyramidales.

Le PNN est composé de molécules de la matrice extracellulaire (MEC), sa structure étant similaire à celle du cartilage (**Fig 21**). Ses principaux constituants sont les protéoglycanes chondroïtine sulfate (CSPGs), l'acide hyaluronique (HA), des protéines de liaison et la ténascine R (Carulli et al., 2006; Kwok et al., 2011). Le PNN trouvé dans le cerveau et dans la moelle épinière ont la même composition moléculaire. Dans l'espace extracellulaire, les CSPGs (de la famille des lecticans: aggrecan, versican, neurocan et brevican) interagissent via leur domaine N-terminal avec les chaînes polymérisées d'acide hyaluronique à la surface des cellules. Les protéines de liaisons (HAPLN1 et HAPLN2) stabilisent cette interaction. Ensuite, la liaison du domaine C-terminal des CSPGs avec la ténascine R, une protéine trimérique, permet la formation de la structure hautement organisée du PNN.

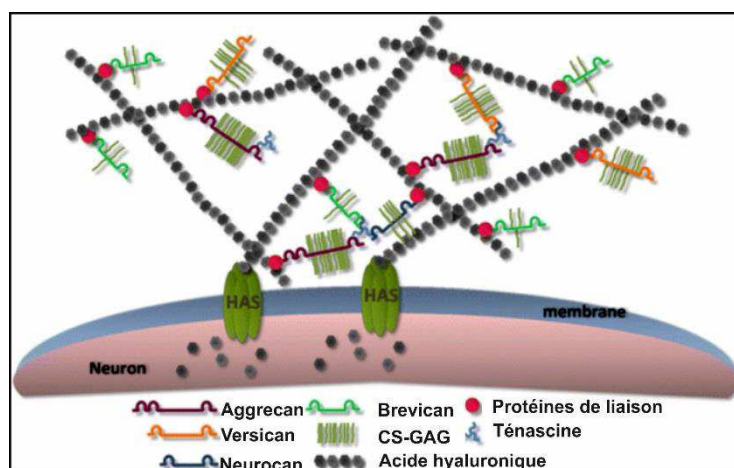


Figure 21- Structure du réseau périneuronal. Le PNN est principalement composé de CSPGs de la famille des lecticans (aggrecan, versican, brevican et neurocan), d'acide hyaluronique (HA), de protéines de liaison et de ténascine-R (Tn-R). (De Kwok et al. 2011).

Le moyen de rattachement du PNN à la surface des cellules est controversé. Les récepteurs à tyrosine phosphate (PTPRr, PTPRz1) semblent être de bons candidats à l'attache du PNN aux cellules, mais ce rôle n'a pas pu être démontré par immunohistochimie (Kwok et al., 2011). En outre, il a été montré dans des cultures *in vitro* que l'enzyme permettant la synthèse de l'acide hyaluronique (HAS : Hyaluronan Acid Synthase) est trouvée à la surface de la membrane des cellules et permet l'ancrage des chaînes d'acide hyaluronique à la surface neuronal ainsi que l'agrégation et maturation du PNN (Kwok et al., 2010). La digestion des protéines de liaison, de l'acide hyaluronique ou des CSPGs entraîne la perte complète du PNN, soulignant l'importance de chacun des constituants pour le maintien de sa structure.

Depuis les dernières décennies, la composition moléculaire, la structure anatomique, le développement et le rôle du PNN au niveau de la plasticité ont été très étudiés. Différentes méthodes ont été développées pour visualiser le PNN, notamment l'utilisation de lectines végétales telles que la *Wisteria Floribunda Agglutinin* (WFA) (Fig 22), la *Vicia Villosa Agglutinin* (VVA) ou encore la *Soy Bean Agglutinin* (SBA) (Guerrero-Tarragó et al., 1999; Seeger et al., 1994). Ces lectines lient sélectivement et avec une haute affinité la partie alpha et/ou beta terminale des résidus N-acétogalactosamine des lecticans. Les protéoglycanes étant des protéines glycoconjuguées sulfatées, ils peuvent aussi être détectés via l'utilisation de fer colloïdal anionique ou cationique (Murakami et al., 1993). Enfin, des anticorps ciblant certains constituants du PNN peuvent être utilisés mais présentent certaines difficultés pour l'étude de cette structure. En effet, l'anticorps CAT-315 permet la détection de l'aggrecan chez la souris adulte mais dans les périodes post natales de développement il va également cibler

une glycoforme du récepteur à protéine tyrosine phosphate beta (RPTP β), rendant cet anticorps non spécifique pour la détection de l'aggrecan.

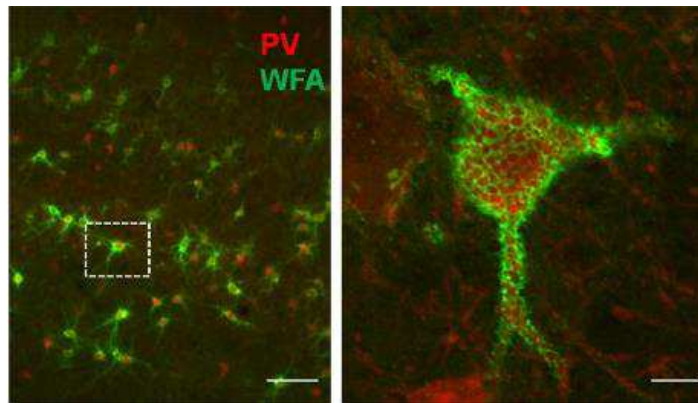


Figure 22- Marquage WFA du PNN d'une cellule FSPV du cortex visuel. (A) Echelle 25 μ m. (B) 10 μ m (De Lensjo et al, 2017).

4.2 Mise en place du réseau périneuronal

La complexité de la structure du PNN crée un environnement stable autour des neurones du système nerveux central adulte. Les constituants de la matrice extracellulaire, dont les CSPGs, la ténascine R et l'acide hyaluronique sont synthétisés par les neurones et la glie. L'expression de ces molécules est régulée de façon dynamique durant le développement du cerveau en condition physiologique, façonnant à la fois les fonctions neuronales et gliales suivant de multiples mécanismes moléculaires.

La composition de la matrice extracellulaire évolue au cours du développement (**Fig 23**). Certains constituants du PNN tels que les CSPGs, l'acide hyaluronique et la ténascine sont détectés dans le système nerveux avant même le début de sa formation (Wang and Fawcett, 2012). Chez la souris, la forme post-natale de la matrice contient principalement du neurocan et du versican 1 (Milev et al., 1998). Tandis que chez la souris adulte, ce sont d'autres protéoglycans de la famille des lecticans, l'aggrecan, le versican 2 et le brevican que l'on retrouve majoritairement (Zimmermann and Dours-Zimmermann, 2008). Il a été montré chez le rat que l'augmentation d'HAPLN1 (CTRL1) coïncide avec le début de la mise en place du PNN. De plus, le niveau d'expression de plusieurs des constituants du PNN atteint un pic durant son développement et diminue chez le rat adulte, impliquant que des quantités plus importantes de protéines sont nécessaires pour la formation du PNN comparé à son maintien (Carulli et al., 2010). Enfin certains composants sont essentiels à la formation et à l'intégrité du PNN, comme l'ont démontré la réalisation de KO chez la souris. Des KO de la ténascine R, présentent un PNN désorganisé avec un marquage ponctuel et absent au niveau des dendrites. Une perte de CSPGs est aussi observée. La ténascine R, synthétisée par la glie est donc un élément essentiel au maintien structurel du réseau périneuronal (Weber et al., 1999).

Un KO d'aggrecan réalisé chez la souris abolit, quant à lui, le marquage WFA ce qui indique donc une perte du PNN (Giamanco et al., 2010).

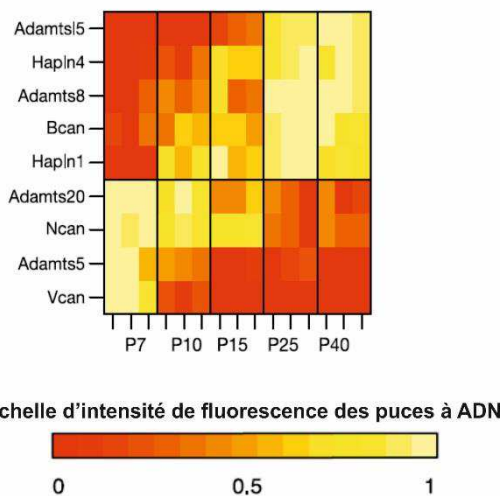


Figure 23- Régulation d'expression de gènes en relation avec le PNN au cours du développement. Le cadran supérieur représente des gènes qui sont sur-régulés positivement après P15. Le cadran inférieur représente des gènes qui sont sous-régulés après P15. (Adapté d'Okaty et al. 2009).

L'activité neuronale est importante pendant les périodes post natales pour un développement physiologique et anatomique normal. La manipulation de ces activités durant le développement modifie l'état du PNN. La dépolarisation des neurones par une élévation du potassium extracellulaire favorise la formation du PNN (Grosche and Bruckner, 2001). De la même manière, bloquer les potentiels d'action par ajout de tétrodothine (TTX) diminue la formation du PNN dans des cultures dissociées de neurones (Dityatev et al., 2007) ainsi que dans des tranches organotypiques de cortex visuel primaire de souris (Reimers et al., 2007). L'influx de Ca^{2+} via les récepteurs AMPA et canaux de type L est nécessaire pour le développement normal du PNN (Dityatev et al., 2007).

Le déroulement temporel de la formation du PNN corrèle avec la fin des périodes critiques de plasticité (Nowicka et al., 2009; Pizzorusso et al., 2002). Dans le cortex visuel primaire (V1), la mise en place du PNN coïncide avec l'ouverture des yeux vers P12. Le PNN est entièrement mature dans ce cortex vers P42 (Ye and Miao, 2013) (**Fig 24**), en synchronie avec la fermeture de la période critique de V1. De plus, des expériences de privation sensorielle, telles que l'élevage à l'obscurité («Dark rearing experiment») à la naissance retarde l'apparition du PNN (Ye and Miao, 2013), dans l'aire V1, alors qu'un environnement enrichi accélère sa maturation (Slaker et al., 2015). De même, des expériences de privation sensorielle avec retrait des vibrisses chez la souris juvénile, entraîne une diminution du marquage CAT 315 (anticorps anti aggrecan) et donc une diminution d'aggrecan (McRae et al., 2007). Une autre expérience, où une unique vibrisse est laissée montre une augmentation de PNN et de PV au niveau des

barils correspondant à cette vibrisse (Nowicka et al., 2009). Il y a donc un lien fort entre la mise en place du PNN et les stimuli sensoriels.

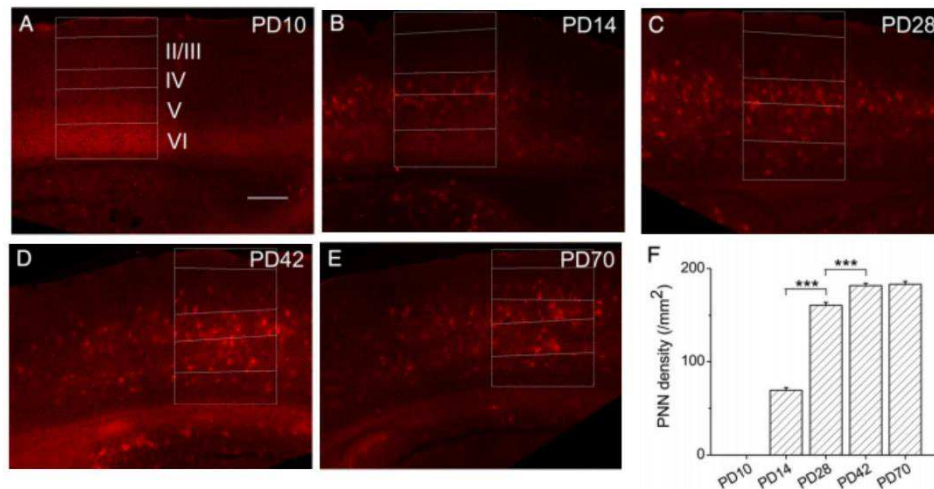


Figure 24- Développement du PNN dans V1. (A-E) Marquage fluorescent WFA (en rouge) des cellules du cortex visuel de souris à différents âges postnatals : 10, 14, 28, 42 et 70. Barre d'échelle : 200 μ m. (F) Changement développemental de la densité (moyenne \pm SEM) des cellules marquées à la WFA dans toute l'aire corticale V1.

La sulfatation des CSPGs est aussi nécessaire pour la formation du PNN. L'augmentation des sulfatations en positions 4 et 6, après une expérience de stimuli visuels, permet un développement correct de cette matrice (Song and Dityatev, 2018).

4.3 Rôle du réseau périneuronale dans la plasticité

De nombreuses fonctions de régulation sont attribuées au PNN. Il a été noté que les macromolécules le constituant peuvent modifier la plasticité neuronale. En effet durant le développement du système nerveux central les plasticités structurelles et synaptiques est nécessaire pour la maturation des circuits neuronaux. C'est à ce niveau que le rôle du PNN a été mis en évidence in vivo dans le contexte de la plasticité de la dominance oculaire (Pizzorusso et al., 2002). Plusieurs équipes ont en effet montré que la formation du PNN coïncide avec la fermeture des périodes critiques pendant le développement du cerveau. Plus récemment, de nouveaux indices suggèrent que le PNN est remodelé en fonction de l'activité. Au niveau structural, le PNN agit comme une barrière qui restreint la maturation des neurites et le développement des synapses. Au niveau synaptique le PNN va restreindre la mobilité des récepteurs (Frischknecht et al., 2009), donnant un support à la plasticité synaptique et à la stabilisation des synapses. Empêcher la mobilité des récepteurs AMPA conduit en effet à une diminution de la plasticité à court terme chez des neurones primaires de rat, démontrant plusieurs rôles du PNN pour la formation de la mémoire. Certains composants du PNN ont

aussi démontré leur rôle individuellement. Par exemple des souris déficientes en ténacine R montrent une LTP (Long Term Potentiation) anormale, et une augmentation de la transmission synaptique basale (Bukalo et al., 2001; Freitag et al., 2003; Saghatelian et al., 2001). Les souris manquant de l'enzyme de synthèse CsGalNact1, permettant la synthèse de l'aggrecan, voient l'initiation de la plasticité de dominance oculaire altérée (Hou et al., 2017). Les souris déficientes en brevican ont une LTP altérée dans le CA1 de l'hippocampe.

4.3.1 Induction de la plasticité des cartes corticales par dégradation du PNN

La maturation du PNN est concomitante avec la maturation des cellules FS-PV ainsi qu'avec la fermeture des périodes critiques de plasticité. A la suite de ces constatations, étudier le rôle du PNN en lien avec la plasticité des cartes corticales est devenu nécessaire.

Une méthode efficace pour étudier le rôle du PNN a été d'utiliser l'enzyme bactérienne chondroïtinase ABC (ChABC), dégradant les chaînes GAG des CSPGs, plus précisément la chondroïtine-6-sulfate et l'acide hyaluronique, sans altérer ni le cœur protéique de la MEC ni montrer une perte des neurones ou une altération de leur structure (Brückner et al., 1998) (**Fig 25**). Cette dégradation augmente la plasticité neuronale chez l'adulte : l'utilisation de la chondroïtinase restaure la plasticité du cortex visuel (Pizzorusso et al., 2002) et permet la récupération de l'amblyopie après privation monoculaire chez l'adulte, ce qui n'est normalement le cas que chez le jeune. On a donc une restauration de la dominance oculaire dans ce cas (Pizzorusso et al., 2006).

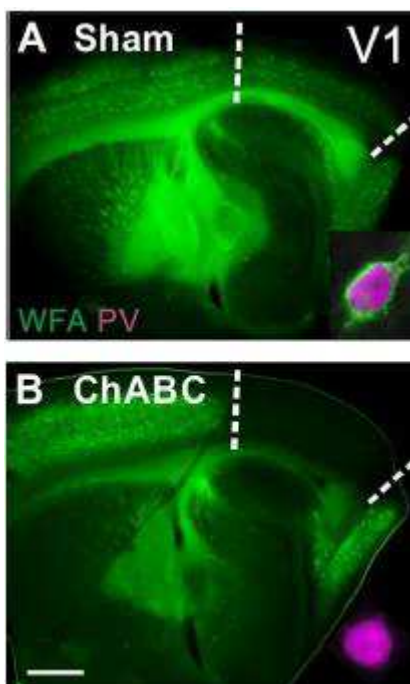


Figure 25- Dégradation du PNN par la chondroïtinase dans le cortex V1 chez la souris adulte. En vert, marquage WFA. En magenta, marquage PV. (A) Coupe sagittale de cerveau de souris (350 μ m) d'un animal contrôlé où du PBS a été injecté (zone entre traits pointillés) dans le cortex visuel (Sham). (B) Idem que (A), mais les souris ont été traitées à la chondroïtinase (ChABC). On observe une perte du marquage WFA (D'après Faini et al. 2018).

4.3.2 Molécules associées au PNN et plasticité neuronale

Le PNN est important dans la médiation des signaux moléculaires entre les neurones et les astrocytes. Au sein de la communauté scientifique, la notion de synapses tétrapartites (**Fig 26**) est d'ailleurs de plus en plus évoquée (Ferrer-Ferrer and Dityatev, 2018). Ces dernières comptent : les éléments neuronaux pré-synaptique et post-synaptique, la glie et la matrice extracellulaire. Le PNN intervient donc dans la plasticité synaptique et la consolidation des synapses.

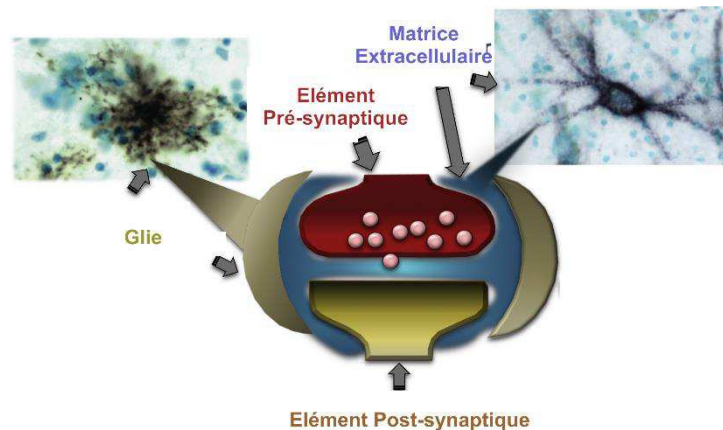


Figure 26- Représentation schématique de la synapse tétrapartite. On y retrouve les éléments pré- et post-synaptiques, des prolongements astrocytaires les entourant et une condensation de matrice extracellulaire qui s'interpose entre ces différents éléments. (Adapté de Chelini et al. 2018).

Un nombre non négligeable de ligands interagit avec les CSPGs, dont les sémaphorines, particulièrement importantes. Notamment, la sémaphorine 3A, synthétisée à la fois par les neurones et les astrocytes, permet par son action chémorépulse la restriction de la croissance axonale (Winter et al., 2016).

OTX2 est une homéoprotéine impliquée dans la réouverture des périodes critiques dans le cortex visuel chez la souris atteinte d'amblyopie. En effet, l'infusion prématurée d'OTX2 accélère la période critique (Sugiyama et al., 2008). La sulfatation est importante pour l'interaction entre les CSPGs et l'homéoprotéine OTX2. OTX2, pendant la période critique, se lie spécifiquement aux chondroïtines sulfatées du PNN entourant les interneurones FS-PV corticaux. Ces interneurones internalisent ensuite OTX2, permettant ainsi leur propre maturation et, de façon sous-jacente, la fermeture de la période critique. Il a été montré qu'interférer dans la relation entre le PNN et OTX2 rouvre une plasticité corticale chez l'adulte (Bernard and Prochiantz, 2016).

4.3.3 Rôle controversé du PNN dans la plasticité synaptique

L'efficacité de la transmission synaptique varie d'une façon dépendante de l'activité : c'est la plasticité synaptique. On peut la trouver sous différentes formes, une augmentation de

la fréquence des potentiels d'action présynaptique conduisant à une augmentation temporaire de la libération de neurotransmetteurs par exemple. On trouve aussi associés à cette plasticité les mécanismes de potentialisation à court terme (Short term potentiation ou STP en anglais) caractérisant une augmentation transitoire de l'efficacité synaptique. Dans plusieurs synapses on ne trouve pas uniquement des événements de potentialisation synaptique à court terme, mais des événements pouvant durer plusieurs heures, jours ou même mois. On appelle ce phénomène plasticité synaptique à long terme qui augmentent l'efficacité synaptique dans le cas des mécanismes de potentialisation (Long terme potentiation ou LTP en anglais) ou diminuent cette efficacité (Long terme depression ou LTD en anglais) dans le cas de mécanisme de dépression.

Bien que plusieurs études aient analysé l'effet de la digestion du PNN sur la plasticité synaptique, celles-ci ne sont pas toujours en accord. Le rôle de la TnR et du brevican en faveur de la LTP a été démontré grâce à l'utilisation de modèles de souris déficientes pour ces protéines (Bukalo et al., 2001; Brakebusch et al., 2002; pour revue Dityatev and Schachner, 2003). Certaines études ont cherché à montrer le rôle de la matrice extracellulaire sur l'excitabilité neuronale, cependant les résultats ne semblent pas tous aller dans la même direction. Tout d'abord des résultats obtenus à l'aide d'incubation de cultures primaires d'hippocampe de souris dans de la chondroïtinase montrent une augmentation de l'excitabilité des interneurons (Dityatev et al., 2007). L'application de chondroïtinase sur des tranches corticales de souris à quant à elle pour effet de diminuer la fréquence de décharge des interneurons FS-PV (Balmer, 2016). De plus, la digestion du PNN altère aussi la transmission synaptique en diminuant les transmissions inhibitrices sur les neurones excitateurs dans le cortex visuel (Liu et al., 2013). Récemment, des études avec des injections locales de chondroïtinase *in vivo* ont été réalisées. Premièrement, une étude suggère que le retrait du PNN restaure une plasticité corticale chez l'adulte avec une potentialisation de l'activité gamma et réduction de l'activité inhibitrice (Lensjø et al., 2017). Contrairement aux résultats trouvés *in vitro* sur tranche ou sur culture primaire de neurones, une étude réalisée *in vivo* chez la souris dans le cortex visuel montre une absence d'altération de la transmission synaptique inhibitrice unitaire et de l'excitabilité neuronale. Néanmoins la dégradation du PNN dans cette étude induit une augmentation de la neurotransmission thalamique au niveau des neurones de la couche IV du cortex visuel (Faini et al., 2018). Finalement, une dernière étude *in vivo* sur le CA2 de l'hippocampe a démontré qu'après 7 jours d'un traitement de chondroïtinase, une altération de l'excitabilité des interneurons FS-PV et des cellules pyramidales est observée. Dans ce cas, l'excitabilité des interneurons FS-PV est augmentée ainsi que les interactions inhibitrices entre FS-PV, une réduction d'entrées excitatrices sur ces cellules sont aussi décrites (Hayani et al., 2018).

En conclusion, le PNN tend à restreindre la plasticité. Il peut réduire cette plasticité de trois façons résumées dans la **figure 27**: en formant une barrière physique contre la formation de nouvelles synapses, en formant un filet captant les molécules inhibitrices de la croissance axonale et en diminuant la mobilité latérale des récepteurs impliqués dans la plasticité synaptique.

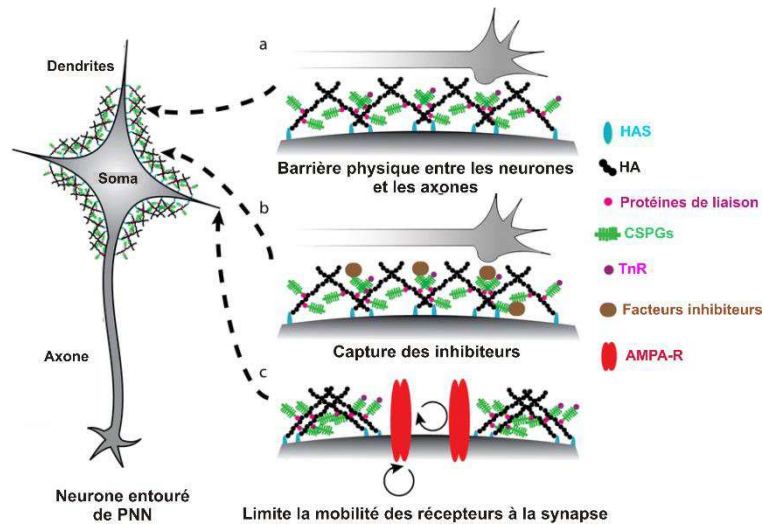


Figure 27- Trois façons possibles utilisées par le PNN pour restreindre la plasticité. (a) Formation d'une barrière contre la formation de nouvelles synapses. (b) Formation d'un filet qui peut capturer des molécules inhibitrices de la formation de nouvelles synapses. (c) Restriction de la mobilité des récepteurs. HAS : Hyaluronan Synthase ; HA : acide hyaluronique ; CSPGs : Protéoglycanes chondroïtines sulfatées ; Tn-R : Ténascine R ; AMPA-R : Récepteur AMPA. (De Wang et Fawcett, 2012).

Ces différentes études soulignent le rôle important joué par le PNN au niveau de la régulation synaptique ainsi qu'au niveau des microcircuits impliquant les interneurons à FS-PV.

4.3.4 PNN et régulation de l'homéostasie ionique

La nature polyanionique du PNN en fait un élément important dans la régulation de l'excitabilité neuronale. Il agit effectivement comme un tampon des cations extracellulaires et de maintenir ainsi le pH extracellulaire. Au sein de la synapse tétrapartite, les astrocytes vont capturer les ions K^+ et les neurotransmetteurs de l'espace extracellulaire. Le PNN, quant à lui, tamponne les cations se trouvant à proximité de la membrane des interneurons, facilitant ainsi la décharge rapide et soutenue des PAs.

De plus, la composition hautement hydratée de certains composants du PNN est nécessaire au maintien de l'espace extracellulaire, notamment des KO de l'enzyme de synthèse de l'acide hyaluronique (HAS) ont conduit à une réduction drastique de l'espace extracellulaire et à des activités épileptiformes (Arranz et al., 2014).

4.4 Protéases et dégradation de réseau périneuronal

La protéolyse au niveau des synapses a été reconnue comme jouant un rôle important pour la plasticité synaptique. Ceci inclut, la régulation de la structure des synapses et en particulier la régulation de la matrice extracellulaire. Plusieurs protéases ont été mises en évidence comme potentiellement régulatrices de la formation et de l'organisation du PNN. Notamment les métalloprotéases de matrice (MMPs), les métalloprotéases de la famille ADAMTS («A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin Motifs») et ADAM, des sérines protéases telles que la neurotrypsine, ou encore une peptidase la néprilysine (Pour revue voir Ferrer-Ferrer and Dityatev, 2018).

Les MMPs sont synthétisées et sécrétées par les neurones et la glie. Cette famille compte 25 types de MMPs. La majorité est synthétisée et sécrétée sous la forme de zymogènes, forme inactives, plus tard converties en enzyme actives (Sternlicht and Werb, 2007). Le rôle de MMP-9 a particulièrement été étudié au cours des dernières années (Ethell, 2011). Le lien entre un KO de MMP-9 chez la souris et l'altération de la LTP (Nagy, 2006) montre l'importance de cette MMP dans la plasticité synaptique. Étonnamment, le Brevican est clivé par les MMP-1, -2, -3, -7, -8, -10 et -13, mais pas par MMP-9 (Nakamura et al., 2000). Dans des souris *Frm1* KO (gène pour le retard mental lié au X fragile, un retard de développement du PNN et des cellules à PV a été observé dans le cortex auditif. Dans ce cas une réduction génétique de MMP-9 permet la restauration du PNN autour des cellules à PV suggérant que les MMP-9 participent à la régulation du PNN au cours du développement post natal (Wen et al., 2017).

Les ADAMTS sont également synthétisées sous la forme de pré-pro-enzymes. Parmi les ADAMTS exprimées dans le cerveau, ADAMTS-1, -4, -5, -8, -9 et -15 ont la faculté de dégrader les lecticans (Stanton et al., 2011). Cependant les lecticans ne sont pas leurs seuls substrats puisqu'ils peuvent aussi dégrader le phosphacan (Tauchi et al., 2012). Les ADAMTS sont produits par les neurones, la glie et la microglie (Lemarchant et al., 2013). Certaines ADAMTS semblent être spécifiquement produites par les FS-PV, c'est le cas d'ADAMTS-8 et -15 (Rossier et al., 2015). Au cours de leur développement les FS-PV expriment différemment certaines de ces ADAMTS. ADAMTSL-5 et TS-8 semblent être exprimées avant P15 tandis qu'ADAMTS-20 et -5 semblent s'exprimer à partir de P20. Dans le même temps les différents protéoglycans (essentiellement l'aggreacan, le neurocan et le brevican) sont synthétisés dans les FS-PV au cours du développement (Okaty et al., 2009). Ces expressions différentielles lors du développement des protéoglycans et de leurs enzymes de dégradation laissent supposer que la plasticité n'est pas régulée identiquement selon l'âge.

ADAMTS-4, aussi appelée Aggrecanase-1, est capable de cliver l'aggrecan (d'où son nom) mais également le Brevican (Nakamura et al., 2000). Cet ADAMTS serait associée à une réduction de la densité synaptique après clivage du Brevican. Enfin, en accord avec ces résultats, il a été montré in vitro qu'ADAMTS-4 permettrait l'élongation des neurites (Hamel et al., 2008). La majorité des études sur les ADAMTS indiquent qu'elles sont surexprimées en réponse à une lésion du système nerveux central ou de maladies, et qu'elles sont liées à l'activation de mécanismes de plasticité.

Le PNN est une matrice extracellulaire spécialisée qui entoure majoritairement les interneurons FS-PV dans le cortex. Cette matrice est composée de CSPGs principalement les lecticans et est marquée par une lectine la WFA. La mise en place de cette structure est liée à la maturation des FS-PV et de la fermeture des périodes critiques de plasticité. La dégradation du PNN chez l'adulte par l'utilisation de la chondroïtinase ABC dans le système visuel a pu démontrer le rôle de celui-ci dans la limitation de la plasticité de dominance oculaire.

PROBLEMATIQUE ET OBJECTIF DU TRAVAIL DE THESE

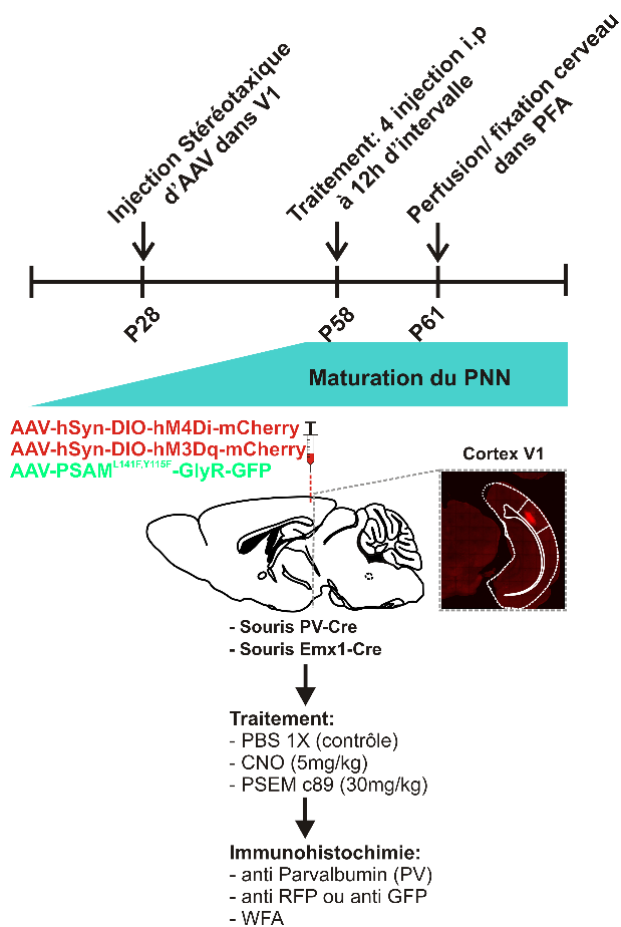
Chez l'animal adulte, la dégradation du PNN par l'utilisation de la chondroïtinase dans le cortex visuel primaire permet la réouverture de la plasticité structurale, qui témoigne de la réouverture d'une période de forte plasticité des cartes corticales définie comme période critique (Pizzorusso et al., 2002). Le PNN apparaît donc comme un facteur limitant de la plasticité au sein des microcircuits corticaux chez l'adulte. A ce jour, les mécanismes cellulaires expliquant le rôle et la régulation du PNN vis à vis de la plasticité corticale chez l'adulte restent mal connus.

L'implication des interneurons FS-PV, qui concentrent une part prépondérante du PNN néocortical, dans la plasticité dépendante de l'expérience est aussi un facteur crucial à prendre en compte. La maturation des cellules GABAergiques du cortex semblent être essentielle à la fermeture de la période critique dans le cortex visuel primaire. Réduire la transmission GABAergique chez l'adulte, dans le V1 permet la réactivation de la plasticité de dominance oculaire. De façon intéressante, chez l'adulte, l'inhibition spécifique des interneurons FS-PV pendant une journée par activation d'outils chemogénétiques, les DREADD (Design Receptor Exclusively Activated by a Design Drug), via un traitement avec leur agoniste exogène, la clozapine-N-Oxide (CNO), permet également la réouverture de la plasticité des cartes corticales dans l'aire V1 (Kuhlman et al., 2013). Une diminution des CSPGs est observée dans le V1 de souris ayant subi une MD après l'induction d'une réduction de la transmission GABAergique de façon concomitante à une réactivation de la plasticité visuelle (Harauzov et al., 2010). Cependant la corrélation entre inhibition spécifique des FS-PV et réduction du PNN n'a pas été démontrée. La mise en évidence de ce lien permettrait de mieux comprendre comment le PNN est régulé et d'obtenir de nouvelles connaissances sur la maturation des FS-PV au sein du cortex et sur leur rôle dans la plasticité corticale.

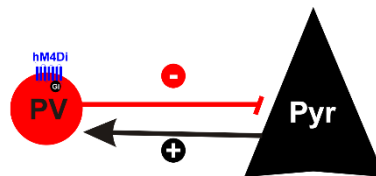
L'objectif principal de ma thèse est donc de démontrer que la modulation de l'activité des interneurons FS-PV *in vivo* permet de réguler la densité de PNN chez l'adulte. En prenant comme point de départ le protocole de réouverture de plasticité des cartes corticales chez la souris adulte dans le V1 décrit dans l'article Kuhlman et al. (2013), j'ai utilisé différents outils chemogénétiques afin de moduler l'activité des interneurons FS-PV.

De plus, les interneurons FS-PV étant fortement interconnectés avec les cellules pyramidales environnantes (Méndez and Bacci, 2011), j'ai également exprimé ces outils dans les cellules pyramidales pour moduler leur activité et donc les entrées excitatrices sur les interneurons FS-PV. Les effets de l'inhibition ou l'excitation *in vivo* de ces types cellulaires sur la densité du PNN ont été étudiés à l'âge adulte (~P60, soit une fois le PNN pleinement

mature) par immunohistochimie en regardant les changements de densité du PNN par quantification de l'intensité de fluorescence de la WFA (marqueur du PNN) (**Fig 28**).



L'utilisation du DREADD inhibiteur exprimé dans les FSPV peut avoir deux effets *i)* une inhibition avec réduction de l'activité de la cellule FSPV où il est exprimé ou *ii)* par désinhibition, une sur-activation du compartiment somatodendritique de la cellule FSPV où il est exprimé (**Fig 29**).



1- Inhibition électrique des interneurons FS-PV?

2- Désinhibition du réseau?

Figure 29- Schéma des effets possibles du DREADD inhibiteur hM4Di exprimé dans une FS-PV lors de son activation par le CNO

C'est pourquoi, j'ai réalisé en parallèle des enregistrements électrophysiologiques *ex vivo* sur tranches corticales de souris pour étudier les effets du CNO sur les propriétés

intrinsèques des cellules FS-PV exprimant le DREADD inhibiteur et des cellules pyramidales exprimant le DREADD excitateur. L'effet de l'activation du DREADD hM4Di dans les FS-PV a ensuite été confirmé par des enregistrements des activités électroencéphalogramme (EEG) réalisés *in vivo*.

Dans un second temps, j'ai voulu comprendre quels sont les acteurs cellulaires impliqués dans la synthèse et la dégradation du PNN, ce qui semble essentiel à la caractérisation des effets possiblement observés sur le PNN avec mes protocoles de modifications d'activité cellulaire. Afin d'établir une liste de gènes liés au PNN pertinents à étudier, une extraction de données a été effectuée avec l'aide du Pr Jean Rossier dans la base du Allen Institute (Tasic et al., 2016). J'ai ensuite réalisé des RT-PCR sur cellule unique afin de tester l'expression des gènes pertinents dans trois types cellulaires décrits comme étant impliqués dans la mise en place du PNN : les interneurons à FS-PV, les cellules pyramidales et les astrocytes.

MATERIELS ET METHODES

Le matériel et méthode détaillé de mes travaux de thèse est présenté dans le manuscrit de l'article: Devienne et al. 2019 «Control of perineuronal net by the activity of cortical fast-spiking interneurons ». Je présente dans cette partie une introduction sur les outils chemogénétiques ainsi qu'une introduction du papier Devienne et al. (2018) (Devienne et al., 2018) inclus en annexe.

1. Les outils chemogénétiques: Contrôle de l'activité d'une population cellulaire

Crick (1979) a été le premier à souligner l'importance d'obtenir des outils permettant de contrôler spécifiquement un neurone ou une population neuronale. C'est pourquoi une des avancées majeures en neurosciences a été le développement de méthodes qui permettent aux chercheurs de manipuler sélectivement des neurones chez des animaux vigiles. Deux méthodes clés ont vu le jour: l'optogénétique et la chemogénétique. Ces deux approches permettent la manipulation des réseaux neuronaux sous-tendant des comportements complexes chez l'animal sain ou dans le cas d'une pathologie. Les méthodes chemogénétiques nécessitent l'expression de récepteurs ayant subi une ingénierie moléculaire dans des régions spécifiques du cerveau. Les ligands synthétiques de ces récepteurs sont supposés être inertes exceptés pour la liaison et l'action spécifique à ces récepteurs. La liaison de ces agonistes à leur cible initie des changements dans une cascade de signalisation intracellulaire ou une ouverture de pores de canaux ioniques, permettant ainsi de contrôler l'activation ou l'inhibition de l'activité neuronale, en fonction de la voie de signalisation ou du canal ionique impliqué. De même, l'optogénétique permet la modulation de l'activité neuronale via l'expression de canaux ioniques photosensibles. Cependant, l'activation ou l'inhibition de l'activité neuronale est initiée par une fibre optique implantée dans la région d'intérêt plutôt que par un ligand. Au cours de ma thèse, j'ai utilisé la chemogénétique pour moduler de façon aigüe l'activité de certaines populations neuronales. Ces outils chemogénétiques sont en effet moins invasifs que l'optogénétique.

Tout d'abord, l'implantation d'une fibre optique est une technique invasive contrairement à l'apport d'un ligand qui peut se faire via des méthodes très peu invasives telles qu'une infusion locale, une injection intrapéritonéale ou l'ingestion via l'eau de boisson (Sternson and Roth, 2014). De plus, l'utilisation d'une fibre optique peut endommager le tissu par un dégagement de chaleur ou lors de sa mise en place. Une autre difficulté rencontrée avec les outils optogénétiques est l'accès à certaines parties du cerveau, qui peuvent être parfois trop profondes et rencontrer des problèmes de dispersion et d'atténuation de la lumière dans les tissus. Il peut alors devenir difficile d'avoir une bonne résolution spatiale même si certaines

équipes développent des outils permettant d'avoir un meilleur contrôle in vivo (Cuttoli et al., 2018; Kramer et al., 2013; Pégard et al., 2017). Enfin, le contrôle temporel des outils chemogénétiques et optogénétiques est différent. Une limitation majeure de l'utilisation de la chemogénétique est que son effet sur la modulation neuronale est de l'ordre de la minute, alors que l'optogénétique permet un contrôle à l'échelle de la milliseconde.

Comme dit précédemment, les outils chemogénétiques sont des récepteurs génétiquement modifiés couplés à une voie de second messager intracellulaire ou à un canal ionique. Parmi ces récepteurs, les plus connus et utilisés sont les DREADDs (Designer Drug Exclusively activated by a Designer Drug) (Armbruster et al., 2007; Armbruster and Roth, 2005) Ce sont des récepteurs muscariniques ou κ -opioïdes mutés pour ne plus être sensible à leur agonistes endogènes (acétylcholine, opioïdes) mais à un ligand exogène. Ce sont des récepteurs couplés aux protéines G (GPCRs). Ces GPCRs mutés, vont lier à la surface extracellulaire leur agoniste et prendre avantage du système de signalisation Gq, Gs ou Gi intracellulaire pour activer la production de seconds messagers et ainsi moduler l'activité neuronale (**Fig 30**).

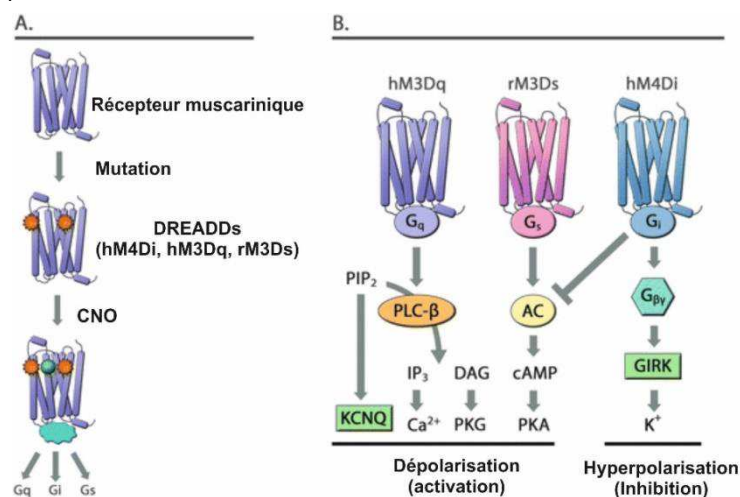


Figure 30- Outils Chemogénétiques : les DREADDs. (A) Un récepteur muscarinique muté va pouvoir lier le CNO et activer différentes signalisations suivant la protéine G auxquels il est lié (Gq pour hM3Dq, Gi pour hM4Di et Gs pour rM3Ds). (B) Les différentes protéines G vont activer des cascades de seconds messagers pour conduire à une dépolarisation et donc une activation neuronale (Gq et Gs) ou une hyperpolarisation et donc une inhibition neuronale (Gi). (Adapté de Michaelides M., Hurd Y., 2015).

Le DREADD hM3Dq est utilisé pour augmenter l'activité neuronale (Alexander et al. 2009). hM3Dq est activé par la clozapine-N-oxide (CNO), molécule pharmacologiquement inerte, qui est un métabolite d'un médicament antipsychotique, la clozapine (Armbruster et al., 2007). Le CNO passe facilement la barrière hématoencéphalique (Bender et al., 1994). Après injection péritonéale, le CNO est retrouvé dans le cerveau pendant au moins 60 minutes et ses effets in vivo sur l'activation de hM3Dq sont robustes et prolongés (Alexander et al., 2009). Récemment, une étude a soulevé un point intéressant quant au fonctionnement du CNO sur

les DREADDs. Les DREADDs ne seraient pas exclusivement activés par le CNO mais par la clozapine qui est rétrométabolisée (Gomez et al., 2017). Des contrôles, tels que des tests de traitements CNO dans des animaux n'exprimant pas le virus sont donc importants à réaliser à chaque utilisation du CNO et des DREADDs.

Le DREADD hM4Di est utilisé pour inhiber l'activité neuronale via deux mécanismes: (i) induction d'une hyperpolarisation par des courants potassiques rectifiant activés par les protéines G (les GIRKs: «G-protein activated Inwardly Rectifying K⁺ current») (Armbruster et al., 2007), (ii) inhibition de la libération présynaptique de neurotransmetteur (Stachniak et al., 2014). Contrairement à l'optogénétique où le neurone est inhibé via une forte hyperpolarisation et en quelques millisecondes, hM4Di semble induire une hyperpolarisation modeste et une inhibition de la libération axonale de neurotransmetteurs dans un temps de plusieurs minutes.

Une approche plus récente de manipulation chemogénétique de l'activité électrique des neurones est basée sur des récepteurs ionotropiques chimériques qui ont été développés en utilisant des techniques de génétique moléculaire et de chimie pour obtenir une interaction sélective entre un récepteur-canal et une molécule agoniste exogène. La stratégie employée pour designer ces canaux est basée sur la capacité qu'a le domaine extracellulaire de liaison au ligand du récepteur $\alpha 7$ nicotinique à l'acétylcholine («Pharmacologically Selective Actuator Modules» ou PSAM) à se comporter comme un module indépendant qui peut être implanté sur le pore ionique d'un autre membre de la grande famille des récepteurs canaux à boucle-cystéine (Magnus et al. 2011). En fonction du pore ionique utilisé, la liaison de l'agoniste (« Pharmacologically Selective Effector Molecule » ou PSEM) peut conduire à une excitation ou une inhibition neuronale (Fig. 34).

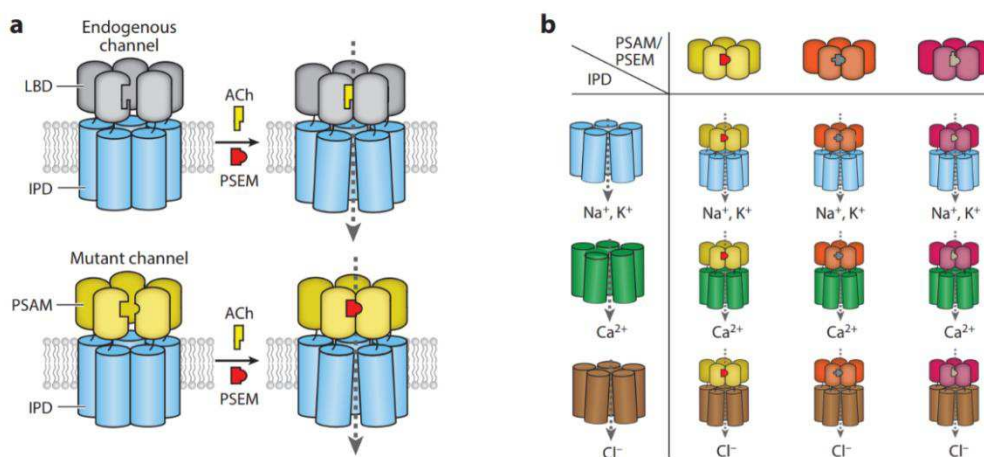


Figure 31- Récepteurs canaux chimériques. (a) Schéma du design d'un récepteur canal chimérique composé d'un module de liaison et d'un pore ionique. Le domaine de liaison muté (PSAM) va lier sélectivement le PSEM (en rouge) mais pas l'acétylcholine endogène (en jaune). Le PSEM ne lie pas le domaine de liaison non modifié. (b) Différentes combinaisons de canaux récepteurs avec différentes propriétés de conductance ionique peuvent être créés en mélangeant le PSAM à des pores ioniques différents (Sternson et Roth, 2014).

2. Technique de RT-PCR sur cellule unique: présentation de l'article Devienne et al. 2018

Voir en Annexe l'article : Devienne et al. 2018 (Devienne et al., 2018a)

Dans cet article, nous avons décrit le protocole de la technique de la RT-PCR multiplexe sur cellule unique, qui permet après des enregistrements en configuration patch-clamp de détecter la présence ou l'absence de plusieurs dizaines de gènes d'intérêt au sein d'une cellule unique. Cette technique permet de détecter, parmi les gènes choisis, lesquels sont exprimés au sein de différents types cellulaires de façon rapide et sélective. Différentes étapes importantes pour la fiabilité de cette technique y sont décrites, ainsi que les précautions nécessaires pour éviter des contaminations. Cet article est également accompagné d'une vidéo descriptive qui peut être visionnée sur le site de l'éditeur JOVE.

<https://www.jove.com/video/57627/single-cell-multiplex-reverse-transcription-polymerase-chain-reaction>

RESULTATS

Résumé de l'article: «Regulation of Perineuronal Nets in the adult cortex by the electrical activity of parvalbumin interneurons” by Devienne et al.

1. L'inhibition ciblée des interneurones à parvalbumine par le DREADD inhibiteur hM4Di induit une régression du PNN dans le cortex visuel chez la souris adulte

Nous avons tout d'abord examiné la transduction virale du DREADD inhibiteur hM4Di dans les cellules PV 4 semaines après injection stéréotaxique dans un héli-cortex visuel primaire V1 de l'AAV portant hM4DI et la protéine fluorescente mCherry dans des souris PV Cre. La spécificité d'expression a été vérifiée par immunohistochimie en utilisant des anticorps anti-mCherry et anti-PV. Nous observons une excellente co-localisation des deux anticorps confirmant l'efficacité de notre protocole d'injection et de la transduction des cellules PV par le virus (Kuhlman et al., 2013). Notre analyse s'est ensuite portée sur le PNN, marqué par la WFA, dans les couches IV et V du cortex où il est le plus abondant (Faini et al., 2018; Ye and Miao, 2014). Après différents tests, nous avons trouvé que deux jours d'inhibition, correspondant à quatre injections intrapéritonéale de CNO espacées de 12 h, sont suffisants pour induire une diminution importante (~60% de réduction) de l'intensité du marquage WFA comparé à l'hémisphère controlatéral à l'injection. Cette diminution n'est pas retrouvée dans des souris traitées suivant le même protocole avec du PBS. L'activation du DREADD hM4di dans les cellules PV induit donc une régression du PNN dans le cortex visuel chez la souris adulte.

L'utilisation du DREADD hM4Di est connue pour induire une inhibition des cellules où il est exprimé via des effets somatodendritiques modérés, mais également via une diminution de la libération de neurotransmetteurs par les terminaisons axonales (Alexander et al., 2009; Armbruster et al., 2007; Stachniak et al., 2014). Dans notre cas, hM4Di peut donc avoir deux effets opposés: (i) une réduction d'activité des PV, ou (ii) une excitation somatodendritique des PV via une désinhibition des neurones excitateurs. Nous avons voulu vérifier l'effet inhibiteur de hM4di sur les interneurones PV en caractérisant les effets aigus du CNO sur les propriétés électrophysiologiques de ces neurones.

2. Le traitement CNO induit une inhibition modérée des interneurones PV exprimant hM4Di

Nous avons ensuite étudié par patch clamp en tranches de cortex visuel de souris l'effet d'une application en bain de CNO sur les cellules PV transduites. L'application de CNO induit une hyperpolarisation ainsi qu'une diminution de la résistance d'entrée. Ces résultats sont cohérents avec utilisation du DREADD hM4Di qui entraîne l'activation de courants potassiques

rectifiant via les protéines G (Armbruster et al., 2007). La rhéobase, représentant le courant nécessaire à injecter pour déclencher l'émission de PA, est également augmentée. Ces résultats indiquent que l'activation de hM4Di par le CNO entraîne une diminution d'excitabilité somatodendritique des neurones PV.

Nous avons ensuite étudié les effets aigus du CNO sur l'activité du réseau cortical grâce à des enregistrements EEG de souris éveillées exprimant hM4Di dans un hémicortex. Il est important de noter que nous n'avons pas observé d'augmentation de l'amplitude des oscillations ou de trace d'activité épileptiforme dans les enregistrements. En revanche, nos résultats montrent une diminution de l'amplitude des oscillations dans les fréquences de gamma élevées (de 55- à 95-Hz et de 100- à 150-Hz) ainsi que dans la bande de fréquence theta (6- à 10-Hz). Ces résultats sont cohérents avec le rôle important joué par les interneurones à parvalbumine dans la synchronisation du réseau cortical, notamment aux fréquences gamma (Cardin et al., 2009; Sohal et al., 2009).

Ce corpus de résultats démontre que l'utilisation du DREADD hM4di induit une diminution de l'activité des interneurones PV où il est exprimé et semble exclure l'implication d'une désinhibition marquée du réseau cortical.

3. L'excitation ciblée des neurones glutamatergiques ou des interneurones PV par le DREADD excitateur hM3Dq n'induit pas de régression du PNN dans le cortex visuel de la souris adulte

Nous avons voulu confirmer que l'effet de régression du PNN observé n'était pas dû à une désinhibition. Pour cela, le DREADD hM3Dq a été injecté dans des souris Emx1-Cre ou PV-Cre. L'effet de l'application de CNO sur tranche de cortex de souris exprimant hM3Dq par patch-clamp dans les cellules pyramidales a tout d'abord été vérifié. Comme décrit (Armbruster et al., 2007), nous observons une augmentation de l'excitabilité des cellules transduites qui se traduit par une dépolarisation du potentiel de membrane, une augmentation de la résistance d'entrée et une diminution de la rhéobase.

J'ai ensuite testé l'effet de l'activation des cellules pyramidales d'un hémicortex V1 in vivo sur le PNN des couches VI et V des cellules exprimant la PV. Dans ce cas, le traitement CNO et PBS n'induit pas d'effet sur l'intensité du marquage WFA. De façon similaire, nous avons testé l'effet de l'activation des interneurones PV d'un hémicortex V1 in vivo sur la densité de leur PNN. Nos résultats indiquent qu'il n'y a pas d'effet des traitements CNO et PBS dans ces souris.

Ces résultats démontrent qu'une excitation du réseau n'est pas un déclencheur de la régression du PNN chez la souris adulte

4. L'inhibition électrique des interneurons PV déclenche la régression du PNN dans le cortex visuel chez la souris adulte

Le DREADD inhibiteur hM4Di est un récepteur muscarinique muté, et est couplé à une protéine Gi. Les conséquences de l'activation de ce récepteur peuvent donc être dues à ses effets métabotropiques ou électrophysiologiques. Nous avons voulu exclure les effets métabotropiques comme cause de la régression du PNN. Pour cela, nous avons utilisé un autre outil chimogénétique, le PSAM GlyR (Magnus et al., 2011; Sternson and Roth, 2014) pour inhiber les interneurons PV via un canal chlorure muté activé par son ligand exogène le PSEM89S. Le protocole utilisé dans ces expériences est le même que celui utilisé pour l'inhibition des interneurons PV par hM4Di. Nos résultats montrent une réduction de l'intensité de WFA dans les souris traitées par le PSEM89S comparées aux souris traitées avec du PBS. Ces résultats confirment que la régression du PNN dans le cortex visuel chez la souris adulte est liée à une inhibition de l'activité électrique des interneurons PV.

Les interneurons PV étant fortement interconnectés avec les neurones excitateurs dans le cortex (Yoshimura and Callaway, 2005), une inhibition des cellules PV peut donc être réalisée en diminuant les entrées excitatrices qu'elles reçoivent. Pour cela, nous avons exprimé le DREADD inhibiteur hM4Di dans des souris Emx1-Cre afin de réaliser une transduction des neurones glutamatergiques dans un hémicortex visuel. Nous observons une réduction de la densité du PNN autour des cellules PV dans les souris traitées avec du CNO comparées à des souris traitées avec du PBS. Une diminution des entrées excitatrices sur les interneurons PV induit donc une régression du PNN dans le cortex visuel chez la souris adulte.

L'ensemble de nos résultats suggèrent que la densité de PNN est régulée de façon dynamique chez l'adulte suivant le niveau d'activité des cellules PV.

5. Le PNN peut être régulé de façon cellule autonome par le niveau d'activité de chaque interneurone PV

Lors de l'analyse de la densité du PNN dans les souris exprimant hM4Di dans les cellules PV, nous avons remarqué que les cellules exprimant hM4Di ont très peu de PNN comparées aux cellules PV voisines n'exprimant pas hM4Di. Ce phénomène semble suggérer que chaque cellule PV est capable de réguler son propre PNN.

Nous avons donc voulu vérifier que les interneurons PV sont équipés pour la synthèse et la dégradation de leur PNN. Nous avons réalisé des expériences de RT-PCR sur cellule unique après patch-clamp (sc RT-PCR) afin de déterminer l'expression de gènes d'intérêt dans trois types cellulaires (interneurons PV, cellules pyramidales et astrocytes. Une caractérisation électrophysiologique et morphologique a été effectuée pour chaque cellule

et a permis de confirmer leur classification. Le protocole de sc RT-PCR a été mis en place afin de détecter l'expression des ARNs messagers codant pour des marqueurs de type cellulaire, des lecticans, des protéines d'ancrage à la membrane et de réticulation du PNN et des protéases. Nous avons observé que les interneurons PV expriment le machinerie nécessaire à la synthèse et à la dégradation du PNN. Les pyramides et astrocytes montrent une occurrence beaucoup moins importante de l'expression des ARNm des protéases, en particulier des protéases sécrétées ADAMTS. Nos résultats sont cohérents avec ceux d'autres études (Okaty et al., 2009; Rossier et al., 2015; Tasic et al., 2016) et confirment que les PV expriment des gènes clés permettant le contrôle de l'accumulation et de la dégradation de leur PNN.

Article: Regulation of Perineuronal Nets in the adult cortex by the electrical activity of parvalbumin interneurons

Gabrielle Devienne, Sandrine Picaud, Ivan Cohen, Juliette Piquet, Ludovic Tricoire, Damien Testa, Ariel A. Di Nardo, Jean Rossier, Bruno Cauli, Bertrand Lambolez

Affiliation:

1- Sorbonne Universités, INSERM, CNRS, Neuroscience Paris Seine - Institut de Biologie Paris Seine (NPS - IBPS), 75005 Paris, France

2- CIRB

Corresponding author: Bertrand Lambolez (bertrand.lambolez@upmc.fr), Sorbonne Universités, UMR8246, Neuroscience Paris Seine, 9 quai St Bernard case 16, 75005 Paris France. Phone: +33 1 44 27 38 72, Fax: +33 1 44 27 25 84

Manuscript: 25 pages, 3 tables and 10 figures. Number of words: abstract 250, introduction 480, discussion 1326

Acknowledgements: We thank Dr. Chris Magnus for the kind gift of chemogenetic PSAM-PSEM tools, Drs. Maria Cecilia Angulo and Alberto Bacci for help in the conduct of this study, and Bernadette Hanesse and the Cell Imaging and Animal Facilities of the IBPS for their valuable help.

Funding: Agence Nationale de la Recherche, Grant/Award Number: ANR-15-CE16-0010. The funder had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

ABSTRACT (250 words)

Perineuronal nets (PNNs) accumulate around neocortical parvalbumin-expressing inhibitory interneurons at the end of critical periods of high plasticity, and critically limit plasticity in the adult cortex. Alteration of inhibitory transmission can induce PNN regression and restore high cortical plasticity, suggesting that the PNN is dynamically regulated in the adult. We used targeted chemogenetic approaches to examine the physiological factors regulating PNN density in the adult mouse visual cortex. We found that transient inhibition of parvalbumin interneurons using a metabotropic chemogenetic tool, a paradigm known to reinstate cortical plasticity, induced PNN regression. This effect was mimicked by inhibition of parvalbumin interneurons using an ionotropic chemogenetic tool. Inhibition of parvalbumin interneurons acutely reduced cortical electroencephalographic gamma oscillations, consistent with silencing of these interneurons, but did not elicit unbalanced network excitation. Likewise, neither targeted excitation of glutamatergic neurons nor of parvalbumin interneurons reduced the PNN, thus ruling out network disinhibition as a cause of PNN regression. In contrast, inhibition of glutamatergic neurons elicited a decrease of the PNN. We also observed that the PNN surrounding chemogenetically inhibited parvalbumin interneurons was reduced compared to the PNN of their untransduced neighbors, and confirmed that single parvalbumin interneurons express multiple genes enabling control of their own PNN density. Our results indicate that silencing of parvalbumin interneurons, directly or through reduced synaptic excitation, triggers PNN regression in the adult cortex. They further suggest that individual parvalbumin neurons act as sensors of local microcircuit activities to regulate their own PNN cell-autonomously, with likely consequences on local circuit plasticity.

INTRODUCTION (480 words)

During the post-natal development of the cerebral cortex, the closure of the highly plastic period, called critical period, is concomitant with the accumulation of a specialized extracellular matrix, the perineuronal net (PNN), around fast-spiking parvalbumin (PV) inhibitory interneurons (Hensch 2005). The PNN is made of lecticans, it is reticulated and attached to the membrane via hyaluronan and proteoglycan link proteins, tenascin R, and protein tyrosine phosphatase receptors, and it can be degraded by various membrane bound or secreted proteases (Deepa et al. 2006, Dityatev et al. 2010, Bozzelli et al. 2018, Ferrer-Ferrer and Dityatev 2018). The PNN attracts in part the homeoprotein transcription factor OTX2 from cerebrospinal fluid to accumulate within PV cells, which in turn enhances PNN accumulation (Sugiyama et al. 2008). Destroying the PNN by enzymatic digestion reinstates high circuit plasticity in the adult (Pizzorusso et al. 2002). Reopening of juvenile plasticity in the adult is also obtained by modulating the inhibitory tone or by antagonizing OTX2 import by FS-PV cells (Hensch et al. 1998, Fagiolini et al. 2004, Beurdeley et al. 2012). A decrease of the PNN accompanies the reopening of high circuit plasticity, whatever the paradigm used (Harauzov et al. 2010, Sale et al. 2010, Beurdeley et al. 2012). Conversely, PNN stability is linked to memory resilience, and PNN deficits are thought to contribute to circuit dysfunctions in several CNS pathologies.

Alteration of GABAergic transmission can induce PNN regression and reinstate high cortical plasticity, indicating that the PNN is dynamically regulated in the adult (Hensch 2005, Sale et al. 2010). PV interneurons dominate cortical inhibition via strong interconnection with excitatory pyramidal neurons, express multiple genes involved in PNN synthesis and degradation, and their functional and transcriptional maturation parallels that of their PNN (Angulo et al. 1999, Ascoli et al. 2008, Okaty et al. 2009, Rossier et al. 2015, Tasic et al. 2016). This suggests that PV cells are key actors in the physiological regulation of the PNN. Likewise, transient and targeted inhibition of FS-PV cells using chemogenetics *in vivo* is sufficient to restore visual plasticity in the mouse cortex after closure of the critical period, but consequences on the PNN have not been reported (Kuhlman et al. 2013). We hypothesize that this chemogenetic paradigm induces PNN reduction, making the network permissive to circuit plasticity.

In the present study, we combined targeted chemogenetic *in vivo* approaches with histochemical analyses to test this hypothesis and examine the physiological factors that govern PNN remodeling in the adult mouse visual cortex, independently of circuit plasticity. We also assessed the electrophysiological effects of chemogenetic paradigms in brain slices and *in vivo*, and probed expression of PNN-related genes in identified cell-types using single RT-PCR after patch-clamp (scPCR) in visual cortical slices. We found that silencing of PV interneurons, directly or through inhibition of excitatory neurons, induced PNN regression, and obtained evidence for cell-autonomous regulation of its own PNN by each PV cell.

MATERIALS AND METHODS

Animals, Viruses and Surgery

All experiments were carried out in accordance with the guidelines published in the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/062). Our animal Protocol has been approved by the local ethics committee (Ce5/ 2012/062). Transgenic mice lines were from Jackson laboratories: PV-Cre (# 008069, Pvalb^{tm1(cre)Arbr}, Hippenmeyer et al. 2005), Emx1-Cre (# 005628, Emx1^{tm1(cre)Krtj}, Gorski et al. 2002), and GAD67-GFP (G42 line) with fluorescent labeling of the PV-expressing subset of GABAergic neurons (# 007677, Tg(Gad1-EGFP)G42Zjh, Chattopadhyaya et al. 2004). Genotyping was done by PCR with the following primers:

- PV-Cre, wild-type forward CAGAGCAGGCATGGTGACTA, wild-type reverse AGTACCAAGCAGGCAGGAGA, mutant forward, GCGGTCTGGCAGTAAAACTATC, mutant reverse GTGAAACAGCATTGCTGTCACCTT (wild-type: 500 bp, mutant: 100 bp).
- Emx1 Cre, wild-type forward AAGGTGTGGTTCCAGAATCG, wild-type reverse CTCTCCACCAGAAGGCTGAG, mutant forward GCGGTCTGGCAGTAAAACTATC, mutant reverse GTGAAACAGCATTGCTGTCACCTT (wild-type: 102 bp, mutant: 378 bp).
- G42 line, transgene forward ACACCCTGGTGAACCGCATCGAG, transgene reverse GCGCTTCTCGTTGGGGTCTTTGC (296 bp).

The pseudovirions AAV2/5-hSyn-DIO-hM4Di-mCherry (titer: 5.2×10^{12} gc/ml) and AAV2/5-hSyn-DIO-hM3Dq-mCherry (7.8×10^{12} gc/ml) were produced from Addgene plasmids #44362 and #44361 at the vector core facility of Nantes University (UMR 1089, France). AAV2/5-hsyn-FLEX:rev-PSAM^{L141F,Y115F}-GlyR-IRES-GFP (3.6×10^{12} , diluted at 1×10^{12} gc/ml) was generously provided by Dr. C.J. Magnus (Sternson Lab, Janelia Research Campus, USA, Magnus et al. 2011).

For viral transduction, 25- to 28-day-old PV-Cre or Emx1-Cre mice were deeply anesthetized using a mix of ketamine and xylazine (100 and 10 mg/kg body weight, respectively) delivered intraperitoneally. A dose of lidocaine (5mg/kg) was administrated locally at the skin incision site. Mice were restrained in a neonatal stereotaxic adaptor (David Kopf instrument, Phymep, France) and the skull was exposed under aseptic conditions. A small burr hole was drilled in the skull above the right visual cortex at coordinates AP= 0.05 mm and ML=2 mm from lambda to target the V1 area. Viral suspension (0.5 μ l for hM3Dq and hM4Di, 1 μ l for PSAM-GlyR) was injected with a glass capillary (1 μ m tip size, Drummond, USA) at a depth of 500 μ m from the pial surface and a speed of 100 nl/min. Ten minutes after the end of the injection, the capillary was slowly pulled out and the skull skin was sutured. Animals were then housed in a BL-2 animal facility for at least 4 weeks with free access to food and water.

Chemogenetic treatment and histological processing

Four weeks after viral injection, DREADD (hM4Di or hM3Dq) expressing mice were treated with 4 intraperitoneal injections of the DREADD agonist Clozapine-N-oxide (CNO, 1mg/kg;

from HelloBio, Bristol, UK) or of phosphate buffered saline (PBS: Na phosphate 10 mM, NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, pH 7.4, 100 μ l) at 12 hours interval, and PSAM GlyR expressing mice with 4 intraperitoneal injections of the PSAM agonist PSEM^{89S} (10 mg/kg, kind gift of Dr. C.J. Magnus, Magnus et al. 2011) or PBS at 12 hours interval.

One day after the last intraperitoneal injection, mice were deeply anesthetized using a lethal mix of ketamine and xylazine (200 and 20 mg/kg body weight, respectively) and perfused transcardially with a PBS solution containing 4% paraformaldehyde. Brains were extracted and incubated 2 h at 4°C in the same fixative. Brains were then kept in PBS at 4°C until processing. Brains were then sectioned in 50 μ m coronal slices using a vibratome (VT1000S, Leica). Free-floating sections were blocked for 1.5 h at room temperature in PBS/0.25% Triton X-100/ 0.2% gelatin solution (PBS-GT) before being incubated overnight at 4°C with primary antibodies against PV and against mCherry (DREADD) or GFP (PSAM-GlyR), diluted in PBS-GT. Slices were then washed with PBS and incubated for 1.5 h at room temperature with relevant secondary antibodies diluted in PBS-GT. Then, after washing in PBS, slices were incubated in biotinylated Wisteria Floribunda Agglutinin (WFA, 10 mg/ml, CliniSciences, France) for PNN labeling. Finally, slices were washed and incubated with streptavidin-AMCA (1:1000, Vector Laboratories). After extensive washing in PBS, slices were mounted on gelatin-coated slides in Fluoromount-G (Southernbiotech, Birmingham, AL, USA). Antibodies were used at following dilutions: mice IgG1 anti-PV (1:1000, Sigma), rat anti-RFP (1:500, ChromoTek), chicken anti-GFP (1:1000, Aves Labs), goat anti-mouse Alexafluor488 (1:500, Invitrogen), goat anti-mouse Alexafluor555 (1:500, Invitrogen) goat anti-rat Alexafluor555 (1:500, Invitrogen), donkey anti-chicken Alexafluor488 (1:400; Jackson Immunoresearch).

Fluorescence images were acquired using either wide-field or confocal microscopy. We used an epifluorescence macro-apotome (Axiozoomer, Zeiss, Germany) equipped with filters DAPI, GFP and CY3 to acquire images of entire sections and an epifluorescence microscope (DMR, Leica, Germany) equipped with filters (A4, GFP and CY3) to analyze PNN density (see below). Fluorescence images were also acquired with a laser scanning confocal microscope (SP5, Leica) using 20x and 63x objectives, and 405, 488, and 561 nm lasers. Images were obtained from z-stacks processed using ImageJ.

PNN density analyses

PNN density was analyzed by quantifying WFA fluorescent staining intensity around PV immunoreactive cells in the V1 area of both ipsilateral (virally transduced) and contralateral (uninjected) visual cortices. Coronal sections were examined and images acquired with an epifluorescence microscope (Leica, see above). Only brains showing extended viral transduction in V1 were kept for further analysis of bilateral PNN density. In the case of targeted transduction of PV interneurons, only mCherry-positive (i.e. expressing hm3Dq or hm4Di) or GFP-positive (expressing PSAM-GlyR) were analyzed among ipsilateral PV immunoreactive cells. The region analyzed in V1 was selected using a 20X objective based on the conspicuously low WFA staining in the V2 area (Figure 1), as reported (Ueno et al. 2018), and according to the delineation by Paxinos and Franklin (2004). Images were acquired using a 63X objective,

starting from the V2/V1 border and progressing laterally into V1 (Figure 1). Acquisition was performed in layers IV-V through contiguous acquisition fields. In each field, all PV+ (or ipsilateral PV+/mCherry+ or PV+/GFP+) cells were selected for PNN density analysis. Images used for PNN analysis were acquired with no adjustment of brightness and contrast, only exposure time was adjusted. PNNs were delineated manually based on WFA staining intensity, and ring-shaped regions of interest (ROIs) were determined using the XOR function of the FIJI software (ImageJ; U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA; <http://rsbweb.nih.gov/ij/>). The area and mean WFA fluorescence intensity were measured for each ROI. Mean intensity values of each ROI were then normalized for exposure time. Then, for each animal, the average fluorescence intensity of all contralateral ROIs (i.e. from uninjected hemicortex) was used to normalize fluorescence intensity of each ipsi- and contralateral ROI. For each animal, 3-4 bilateral sections were used for this analysis.

Results are given as mean \pm standard error of the mean (SEM). Data obtained in different mice for a given condition were compared using a Kruskal-Wallis nonparametric test. Since no significant difference were observed between mice for a given condition in this study, data were pooled. Between-group comparisons were performed using Mann-Whitney nonparametric test which does not assume equal standard deviations. A p value below 0.05 was considered statistically significant.

Electrophysiological recordings of CNO/DREADD effects in cortical slices

Four to ten weeks after injection of AAV2/5 hM4Di-mCherry or AAV2/5 hM3Dq-mCherry, mice were deeply anesthetized using a lethal mix of ketamine and xylazine (200 and 20 mg/kg body weight, respectively), and perfused transcardially with ice-cold high sucrose artificial cerebrospinal fluid (ACSF) containing (in mM): sucrose, 75; glucose, 25; NaCl, 126; KCl, 2.5; NaHCO₃, 26; NaH₂PO₄, 1.25; MgCl₂, 6.5; CaCl₂, 0.2. Brains were quickly removed and 250 μ m-thick coronal slices of V1 visual cortex were cut in sucrose ACSF using a vibratome (VT1000S; Leica). Composition of sucrose ACSF was (in mM): sucrose, 15; glucose, 10; NaCl, 126; KCl, 2.5; NaHCO₃, 26; NaH₂PO₄, 1.25; MgCl₂, 1; CaCl₂, 2; and kynurenic acid, 1. Slices were transferred to a holding chamber filled with standard ACSF bubbled with 95% O₂ and 5%CO₂. The composition of standard ACSF was (in mM): sucrose, 15; glucose, 10; NaCl, 126; KCl, 2.5; NaHCO₃, 26; NaH₂PO₄, 1.25; MgCl₂, 1; CaCl₂, 2. Slices were allowed to recover 30 minutes at 37°C and were then incubated at room temperature (20–25°C) until recording.

Individual slices were transferred to a recording chamber and continuously perfused at 2ml/min with oxygenated standard ACSF at room temperature. Patch pipettes (3-5 M Ω) were pulled from borosilicate glass (Harvard Apparatus LTD, Kent, UK) on a micropipette puller (Model PP-83, Narishige, Tokyo, Japan) and filled with an intracellular solution containing (in mM): K-gluconate, 144; MgCl₂, 3; HEPES, 10; EGTA, 0.5 and 2 mg/ml biocytine, pH= 7.2, 295mOsm. Whole-cell patch-clamp recordings were obtained from mCherry-positive layers IV-V PV interneurons or layer V pyramidal cells selected under epifluorescence illumination with a 535-nm LED (CoolLed) and an RFP filter set (Semrock). Recordings were performed at room temperature (20–25°C) using a patch-clamp amplifier (Multiclamp 700B, Molecular

Devices) connected to a Digidata 1440A interface board (Molecular Devices). Signals were amplified and collected using the data acquisition software pClamp 10.2. Resting membrane potential was measured just after passing into whole-cell configuration, and only cells with a resting membrane potential more hyperpolarized than -50 mV were selected. Membrane potentials were not corrected for junction potential. Cells were set at -60 mV at the beginning of the recording by continuous current injection and submitted to series of hyperpolarizing and depolarizing current pulses (800 ms, from -100 pA to 380 pA with 25 pA increments). Electrophysiological parameters were measured in control conditions and 2 minutes after the beginning of CNO bath application (500 nM). Each parameter was computed from three series of pulses in control or in CNO conditions. Resting membrane potential was computed as mean of the sweeps where no current was injected. Input resistance was determined on responses to hyperpolarizing current pulses eliciting voltage shifts of 10 - 15 mV negative to rest. Rheobase was calculated as the minimal depolarizing current step triggering an action potential. Results are given as mean \pm standard error of the mean (SEM). Between-group comparisons were performed using paired Wilcoxon nonparametric test. A p-value below 0.05 was considered statistically significant.

After recordings, slices were fixed overnight at 4°C in 4% paraformaldehyde/ PBS and then washed in PBS. Slices were processed for anti-PV and anti-RFP immunocytochemistry as described above, and biocytin simultaneously revealed using Alexafluor 405-conjugated streptavidin ($1:500$, Invitrogen). After extensive washing in PBS, slices were mounted on gelatin-coated slides in Fluoromount-G for confocal microscopy as described above.

Electrophysiological recordings of CNO/DREADD effects *in vivo*

The electrodes we used are made of bundles of insulated tungsten wires. Electrodes were implanted with stereotaxic-positioning micromotion and anchored one after the other. An epidural screw placed above the olfactory bulb was used as ground. One electrode placed above the cerebellum was used as reference. Cortical electrodes for recordings comprised three electrodes implanted in the primary visual cortex and primary somatosensory cortex: V1 AP= 0.05 mm, ML= ± 2 mm, DV= -0.5 mm relative to lambda; S1 AP= -2 mm, ML= 2 mm, DV= -0.5 mm in mm relative to bregma.

Four weeks after viral injection AAV hM4Di- injected mice underwent surgical craniotomy. Anesthesia was induced with 2% isoflurane and maintained by ketamine/xylazine ($100/10$ mg per kg body weight), while body temperature was maintained at 36.5°C with a heating blanket (Bioseb). A sagittal skin incision was performed across the posterior part of the head to expose the skull. Electrodes were implanted stereotaxically and sealed in place with acrylic resin (GC Unifast TRAD). The surgical procedure typically took 2 h. Animals recovered quickly, and after a conservative 1-week resting period, data acquisition was performed. In order to connect the EEG electrodes before a recording session, mice underwent short anesthesia for 10 min with 2% isoflurane. Animals were allowed to recover for 30 min before the recording.

The protocol recording was: one hour of baseline recording following by an intraperitoneal injection of PBS. One hour after, CNO (1 mg/ kg) was injected and recording was performed

for another one hour. Intracranial electrode signals were fed through high input impedance, DC-cut at 1 Hz, gain of 1,000, 16-channel amplifier and digitized at 20 kHz (Xcell, Dipsi). Custom-made software based on Labview (National Instruments) simultaneously acquired video from a camera pointed at the recording stage. A large-bandwidth amplifier was used to record local field potentials (LFPs, 0.1–200 Hz). Custom-made software based on Labview (National Instruments) was used for the analysis. Half an hour recording was extracted for baseline, PBS and CNO conditions. EEG signal was filtered with a 1- to 4-Hz, 6- to 10-Hz, 30- to 50-Hz, 55- to 95-Hz and 100- to 150-Hz pass-band respectively for delta, theta, gamma low, gamma mid and gamma high frequency. The mean power value was extracted for each V1-expressing hM4Di power band. Then, mean power values were normalized to the baseline for PBS and CNO.

Results are given as mean \pm standard error of the mean (SEM). Data obtained in different mice for a given condition were compared using a t-test. A p value below 0.05 was considered statistically significant.

Single cell RT-PCR after patch-clamp

Mice (P21-P28) of the G42 line expressing GFP in PV interneurons were deeply anesthetized with isoflurane, and killed by decapitation. In the case of astrocyte recordings, mice were subjected to intraperitoneal injection of sulforhodamine 101 (0.1 mg/kg body weight, from Sigma-Aldrich) 30 minutes before anesthesia. Brains were quickly removed and 300 μ m-thick coronal slices of V1 visual cortex were cut as described above. Slices were then allowed to recover for at least 1 h at room temperature (20–25°C) before being transferred to a recording chamber and continuously perfused at 2ml/min with oxygenated standard ACSF at room temperature. Patch pipettes (3-5 M Ω for neurons, 6-8 M Ω for astrocytes) were prepared as described above and whole-cell recordings were obtained as follows. GFP-positive layers IV-V PV interneurons or sulforhodamine 101-labelled astrocytes were selected under epifluorescence illumination with a 465 or 535 nm LED (CoolLed), and GFP or RFP filter sets (Semrock), respectively. Layer V pyramidal cells were selected under infrared videomicroscopy with Nomarski optics. Electrophysiological properties were determined in voltage-clamp mode for astrocytes (Lecrux et al., 2011) and current-clamp mode for neurons (Karagiannis et al., 2009). Membrane potential values were not corrected for liquid junction potential. Input resistance of astrocytes was determined by plotting a voltage/current curve of the current response at steady state. This resistance was corrected for series resistance determined by plotting a voltage/current curve of the capacitive transients (Lecrux et al., 2011). Resting membrane potential of astrocytes was determined by calculating the intercept of the voltage/current curve with the 0 pA value. Resting membrane potential of neurons was measured just after passing in whole-cell configuration. Only neurons with a resting membrane potential more negative than -50 mV were analyzed further. Nine electrophysiological properties chosen to describe the electrophysiological diversity of cortical neurons (Ascoli et al., 2008) were determined as previously described (Karagiannis et al., 2009).

At the end of the whole cell recording, the cell cytoplasm was aspirated into the recording pipette while maintaining a tight seal. The content of the pipette was expelled into a test tube, and reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) was performed essentially as described (Lambolez et al. 1992, Cauli et al. 1997). The cDNAs present in 10 μ l of the RT reaction first were amplified simultaneously using the primer pairs described in Table 1 (for each primer pair the sense and antisense primers were positioned on two different exons). Second rounds of PCR were performed using 2 μ l of the first PCR product as template. In this second round, each cDNA was amplified individually with a second set of primer pairs internal to the first PCR primer pair (nested primers) and positioned on two different exons. Then 10 μ l of each individual PCR was run on a 2 % agarose gel in parallel with a molecular weight marker and stained with ethidium bromide. The RT-PCR protocol was tested on 1 ng of total RNA purified from mouse whole brain, and all the transcripts were detected. Sizes of the PCR-generated fragments were as predicted by the mRNA sequences (Table 1). A control for mRNA contamination from surrounding tissue was performed by placing a patch pipette into the slice without establishing a seal. Positive pressure was then interrupted and, following the removal of the pipette, its content was processed as described. No PCR product was obtained using this protocol (n = 10).

RESULTS

Targeted inhibition of PV interneurons by DREADD hM4Di induces PNN regression in the adult visual cortex

The PNN accumulates during postnatal development to reach adult density at P50 in the V1 area of the mouse visual cortex (Pizzorusso et al. 2002, Ye and Miao 2013, Lensjø et al. 2017a). In order to test the hypothesis that selective chemogenetic inhibition of PV interneurons alters adult PNN density, we thus adapted the protocol known to reinstate visual plasticity at P35 (Kuhlman et al. 2013) to measure PNN changes between P58 and P61 (see Methods and Figure 1). Hemilateral injection of Cre-dependent pseudovirions encoding the inhibitory DREADD hM4Di fused to the fluorescent protein mCherry was performed in the V1 area of the visual cortex of PV-Cre mice (Figure 2A). Four weeks after viral injection, mice were treated with the DREADD agonist Clozapine-N-oxide (CNO) or with phosphate buffered saline (PBS), and their cortices were processed for histochemistry one day after the end of the treatment (see Methods). This protocol resulted in robust expression of hM4Di-mCherry in V1 of the injected hemicortex, with 100 % of mCherry positive cells being PV immunoreactive (n=208 out of 208 cells, Figure 2A-B), consistent with efficient transduction of PV interneurons. PNNs are most abundant in layer IV and upper layer V, in correspondence with a peak in the cross-laminar distribution of PV interneurons (Ye and Miao 2013, Lensjø et al. 2017a, Xu et al. 2010, Kubota et al. 2011, Rudy et al. 2011). We thus quantified PNN density in these layers using histochemical labeling with wisteria floribunda agglutinin (WFA, see Methods and Figure 1). We found that following CNO treatment, the density of the PNN surrounding hM4Di-mCherry-expressing cells in layers IV-V was strongly decreased as compared to the PNN surrounding PV immunoreactive cells in the same area of the uninjected contralateral hemicortex (39.7 ± 4.4 % of contralateral PNN density, n=70 mCherry⁺ cells and n=72 contralateral cells from 3 animals, p<0.05, Figure 2D-E, Table 2). Conversely, no significant change of the PNN of hM4Di-mCherry-expressing cells was observed as compared to contralateral PNN of PV immunoreactive cells in PBS treated animals (101.1 ± 8.5 % of contralateral PNN density, n=85 mCherry⁺ cells and n=87 contralateral cells from 3 animals, p=0.3, Figure 2C,E, Table 2). The significantly lower PNN density of hM4Di-expressing cells from CNO-treated animals compared to hM4Di-expressing cells from PBS-treated animals (see Table 2) is illustrated in Figure 2C-D. These results indicate that activation by CNO of hM4Di expressed in PV interneurons locally induces PNN regression in the adult visual cortex.

The hM4Di inhibitory DREADD reportedly has moderate somatodendritic effects, but can also presynaptically inhibit transmitter release from axon terminals (Alexander et al. 2009, Stachniak et al. 2014). Hence, in vivo activation of hM4Di in PV interneurons may result either in decreased somatodendritic excitation of these neurons, or in paradoxical increase of their somatodendritic excitation due to disinhibition of their target pyramidal cells. To discriminate between these possibilities, we characterized acute electrophysiological effects of CNO treatment in mice expressing hM4Di in PV cells.

CNO treatment results in moderate silencing of hM4Di-expressing PV interneurons

We first investigated the effect of bath application of CNO (0.5 μ M, Alexander et al. 2009) on the excitability of hM4Di-expressing PV interneurons using patch-clamp recordings in acute slices of visual cortex. Cells were recorded in current-clamp mode and subjected to series of hyperpolarizing and depolarizing current pulses (see Methods). We found that CNO application elicited a hyperpolarization (from -66.8 ± 0.5 mV in control to -71.6 ± 0.5 mV in CNO, $p < 0.05$) and a decrease in membrane resistance from 152.9 ± 13.6 M Ω in control to 128.6 ± 10.7 M Ω in CNO, $p < 0.05$, Figure 3) of hM4Di-expressing PV interneurons ($n=8$), as expected from the opening of somatodendritic potassium channels (Alexander et al. 2009). This effect of CNO was associated with an increase in action potential rheobase (from 138.6 ± 13.5 pA in control to 185.9 ± 20.0 pA in CNO, $p < 0.05$, Figure 3). These results indicate that expression of hM4Di did not conspicuously alter electrophysiological properties of PV interneurons (Kawaguchi 1995, Cauli et al. 1997, Ascoli et al. 2008), and that activation of hM4Di by CNO decreased the excitability of these neurons via a somatodendritic effect.

We next investigated the acute effects of CNO on network activities in V1 using EEG recordings in the hemicortex of awake mice expressing hM4Di in PV interneurons (see Methods). After 1 h baseline recording in control conditions, a first intraperitoneal injection of PBS was performed, followed 1 h later by intraperitoneal injection of CNO. We found no evidence for CNO-induced unbalanced excitation of the network indicative of marked disinhibition (Figure 4). Nonetheless, CNO injection induced a strong decrease of network oscillations in the gamma frequency band (from 95.3 ± 5.6 % of baseline in PBS to 44.1 ± 11.7 % of baseline in CNO for the 55-95 Hz range, and from 83.4 ± 1.5 % of baseline in PBS to 27.8 ± 8.2 % of baseline in CNO for the 100-150 Hz range, $n=3$ mice, $p < 0.05$, Figure 4). We also observed a marked decrease of oscillations in the theta band (from 114.2 ± 12.0 % of baseline in PBS to 48.0 ± 9.1 % of baseline in CNO, $p < 0.05$, Figure 4). In contrast, no change was observed in lower frequency gamma oscillations or in delta oscillations. These observations are consistent with inhibition of PV interneurons in CNO, in agreement with the decreased responsiveness to visual stimuli previously observed in hM4Di-expressing PV cells upon CNO treatment (Kuhlman 2013). Indeed, these interneurons play a key role in the synchronization of cortical neuronal populations, and are notably essential to high frequency gamma oscillations of the network (Cardin et al. 2009).

These results suggest that hM4Di activation by CNO induces a moderate silencing of PV cells in vivo, which could be the trigger of the observed PNN reduction.

Targeted excitation of glutamatergic neurons or PV interneurons by DREADD hM3Dq does not induce PNN regression in the adult visual cortex

In order to rule out disinhibition-induced network excitation as a cause of PNN regression, we selectively expressed the excitatory DREADD hM3Dq fused to mCherry in either glutamatergic neurons or PV interneurons of the V1 cortex using the same paradigm as above in Emx1-Cre or PV-Cre mice, respectively (see Methods, and Figures 6A and 7A-B). We first verified that CNO enhanced the excitability of hM3Dq-expressing neurons using

patch-clamp recordings of mCherry-positive layer V pyramidal cells in slices of visual cortex. Bath application CNO (0.5 μ M) elicited a depolarization (from -66.1 ± 0.9 mV in control to -63.9 ± 1.4 mV in CNO, $p < 0.05$) and an increase in membrane resistance from 139.8 ± 12.5 M Ω in control to 173.2 ± 10.6 M Ω in CNO, $p < 0.05$, Figure 5) of hM3Dq-expressing pyramidal neurons ($n=8$). This effect of CNO was associated with a decrease in action potential rheobase (from 69.7 ± 7.8 pA in control to 44.8 ± 7.7 pA in CNO, $p < 0.05$). These results indicate that activation of hM3Dq by CNO enhanced the excitability of hM3Dq-expressing neurons.

We next probed the effect of *in vivo* activation of hM3Dq-expressing glutamatergic neurons in V1 on the PNN surrounding PV interneurons in layers IV-V of the same area. CNO treatment did not significantly change the density of the PNN of PV-immunopositive cells in the ipsilateral hM3Dq-expressing hemicortex as compared to the uninjected contralateral hemicortex (94.9 ± 6.0 % of contralateral PNN density, $n=101$ ipsilateral and $n=101$ contralateral PV+ cells from 3 animals, $p=0.6$, Figure 6B-C, Table 2). PBS treatment similarly had no significant effect on PNN density (95.0 ± 4.3 % of contralateral PNN density, $n=92$ ipsilateral and $n=92$ contralateral PV+ cells from 3 animals, $p=0.7$, Figure 6B-C, Table 2).

Finally, we tested the effect of *in vivo* activation of hM3Dq-expressing PV interneurons in V1 on their surrounding PNN. Neither CNO, nor PBS treatment significantly changed the density of the PNN around mCherry-positive cells as compared to the PNN of PV-positive cells in the uninjected contralateral hemicortex (CNO: 108.5 ± 8.7 % of contralateral PNN density, $n=86$ ipsilateral and $n=90$ contralateral PV+ cells from 3 animals, $p=0.6$; PBS: 111.4 ± 7.9 % of contralateral PNN density, $n=101$ ipsilateral and $n=100$ contralateral PV+ cells from 3 animals, $p=0.7$; Figure 7C-E, Table 2).

These results show that cortical network excitation is not a trigger of PNN regression in the adult. Hence, the observed PNN regression elicited by activation of the inhibitory DREADD hM4Di in PV interneurons did not result from cortical network disinhibition.

Electrical silencing of PV interneurons triggers PNN regression in the adult visual cortex

The inhibitory DREADD hM4Di is coupled to G_i intracellular signaling and thus results in both electrophysiological and metabotropic effects. In order to assess electrical silencing of PV interneurons as a cause of PNN decrease, and rule out involvement of other G_i -dependent metabotropic effects, we used an alternative chemogenetic tool, the chloride channel PSAM-GlyR exclusively activated by the agonist PSEM^{89S} (Magnus et al. 2011), to inhibit PV interneurons. Hemilateral co-expression of PSAM-GlyR and GFP in PV interneurons of the V1 cortex, treatment with PSEM^{89S} or PBS, and histochemical analyses were performed essentially as above for DREADD-CNO experiments (see Methods). We found that 82 % of GFP positive cells were PV immunoreactive ($n=75$ out of 92, Figure 8A), consistent with efficient expression of PSAM-GlyR in PV interneurons. Following PSEM^{89S} treatment, the density of the PNN surrounding PSAM-GlyR/GFP-expressing cells in layers IV-V was largely decreased as compared to the PNN of PV-positive cells in the same area of the uninjected contralateral hemicortex (51.0 ± 4.6 % of contralateral PNN density, $n=110$ GFP⁺ cells and $n=119$ contralateral cells from 3 animals, $p < 0.05$, Figure 8C-D, Table 2). Conversely, no significant

change of the PNN surrounding PSAM-GlyR/GFP-expressing cells was observed as compared to contralateral PNN in PBS treated animals (105.1 ± 7.2 % of contralateral PNN density, $n=110$ GFP⁺ cells and $n=107$ contralateral cells from 3 animals, $p=0.7$, Figure 8B,D, Table 2). These results confirm that electrical silencing of PV interneurons induces PNN regression in the adult visual cortex.

We next reasoned that PV interneuron silencing can, in principle, be also achieved by decreasing their synaptic excitation. We thus targeted expression of hM4Di to inhibit excitatory neurons in V1 (Figure 9A). CNO treatment significantly reduced the PNN of PV-immunopositive cells in the ipsilateral hM4Di-expressing hemicortex as compared to the uninjected contralateral hemicortex (68.9 ± 4.9 % of contralateral PNN density, $n=122$ ipsilateral and $n=130$ contralateral PV⁺ cells from 4 animals, $p<0.05$, Figure 9C-D, Table 2). PBS treatment had no significant effect on PNN density (102.7 ± 6.1 % of contralateral PNN density, $n=93$ ipsilateral and $n=92$ contralateral PV⁺ cells from 3 animals, $p=0.9$, Figure 9B,D, Table 2). These data indicate that a decrease of PV interneuron synaptic excitation induces PNN regression in the adult visual cortex.

Our results collectively suggest that PNN density is dynamically regulated in the adult depending on the activity level of PV interneurons.

The PNN may be regulated cell-autonomously by the activity level of each PV interneuron

During the course of histochemical analyses of CNO treated mice, we noticed that hM4Di-negative PV interneurons had dense PNNs, whereas the PNN of neighboring hM4Di-positive cells was reduced (see examples in Figure 10A). This suggests that each PV interneuron is able to regulate its own PNN.

We thus searched through published databases of single cortical cell analyses for the expression of genes that may enable PV interneurons to regulate their PNN cell-autonomously. We found that PV interneurons express a rich repertoire of genes involved in the synthesis and degradation of the PNN (Okaty et al. 2009, Tasic et al. 2016). However, these data stem primarily from dissociated cells. We thus used single cell RT-PCR (scPCR) after patch-clamp to assess expression of selected PNN-related genes in identified cell-types in acute slices of visual cortex from P21-P28 mice of the G42 line expressing GFP in PV interneurons (see Methods and Table 1). GFP-positive interneurons ($n=14$) and sulforhodamine 101-labelled astrocytes ($n=10$) were selected under epifluorescence illumination, and layer V pyramidal cells ($n=14$) were selected according to the shape of their soma and proximal dendrites, as seen with infrared video microscopy (see Methods). We analyzed nine electrophysiological parameters for each neuron, and four electrophysiological parameters for astrocytes (see Methods and Table 3) prior to cytoplasm harvesting for scPCR analyses. Electrophysiological properties significantly differed between cell groups and confirmed cell-type identity (Table 3). Notably, PV interneurons exhibited thin spikes, fast afterhyperpolarizing potentials (AHP) of large amplitude, and high rheobase value; pyramidal cells had a slow membrane time-constant and long-duration action potentials; and astrocytes exhibited hyperpolarized resting potential, low input resistance, fast membrane time-constant and high membrane capacitance; as described

(Cauli et al. 1997, Ascoli et al. 2008, Andjelic et al. 2009, Lacroix et al. 2015). Following electrophysiological recordings, the cellular content was harvested in the patch pipette for scPCR analysis. The scPCR protocol was designed to detect the expression of mRNAs encoding cell-type markers (vesicular glutamate transporter VGluT1, glutamic acid decarboxylases GAD 65 and GAD 67, PV, S100 β), as well as PNN constituents (lecticans: Acan, Bcan, Ncan), PNN linkers (Hapln1, Hapln4, Ptprr, Ptpz1, Tnr), and proteases (membrane: Adam10, Adam11, Adam22, Mme; secreted: Adamts1, Adamts8, Adamts15, AdamtsL5). An example of this analysis performed on a single PV interneuron is shown in Figure 10B. Expression of markers confirmed cell-type identification: expression of PV and GAD (65 and/or 67) was detected in all PV interneurons, expression of VGluT1 and absence of GAD was found in all pyramidal cells, and expression of S100 β and absence of GAD was observed in all astrocytes (Figure 10B). The expression profiles of PNN-related genes markedly differed between cell-types, with the largest array of genes expressed by PV interneurons. Expression of lecticans was found in all cell types (Figure 10B), with Acan being specifically detected in PV interneurons as reported (Rossier et al. 2015), albeit at low occurrence (n=2 out of 14) consistent its low mRNA abundance (Tasic et al. 2016). In agreement with earlier reports (Dzyubenko et al. 2016, Tasic et al. 2016), Ncan was found in all cell types with high occurrence in pyramids (n=13 out of 14), whereas Bcan was detected in PV cells and astrocytes, but not in pyramids. PNN linkers were detected in all cell types (Figure 10B), with frequent occurrence of Ptpz1 in astrocytes as described (Maurel et al. 1994), and with the exception of Tnr selectively expressed by oligodendrocyte progenitor cells (Saghatelian et al. 2004, Tasic et al. 2016). PV interneurons strikingly differed from pyramids and astrocytes in expressing all tested proteases (Figure 10B), notably secreted proteases, which were virtually undetected in other cell-types consistent with earlier observations (Rossier et al. 2015, Tasic et al. 2016).

These results confirm that PV interneurons express a large array of key genes enabling control of the accumulation and degradation of their own PNN.

DISCUSSION (1326 words)

We tested the effects of targeted chemogenetic modulation of the activity of PV interneurons or excitatory neurons on the density of the PNN surrounding PV interneurons in the adult visual cortex. Targeted inhibition of PV interneurons using the Gi-coupled DREADD hM4Di or the chloride channel PSAM-GlyR induced PNN regression. Targeted inhibition of glutamatergic neurons also elicited a decrease of the PNN. EEG recordings revealed that targeted inhibition of PV interneurons reduced cortical oscillations but did not elicit unbalanced excitation of the network. Likewise, targeted excitation of glutamatergic neurons or of PV interneurons did not alter PNN density, thereby ruling out network disinhibition as a cause of PNN regression. We also observed that PNN density surrounding hM4Di-inhibited PV cells was reduced compared to the PNN of neighboring hM4Di-negative PV cells. Finally, scPCR analyses confirmed that PV interneurons express numerous genes enabling the control of their own PNN density. Our results indicate that silencing of PV interneurons, directly or through reduced synaptic excitation, triggers PNN regression in the adult cortex, and suggest that each PV cell regulates its own PNN cell-autonomously depending on its activity level.

Targeted chemogenetic modulation of PV interneurons or excitatory neurons

Cre-dependent viral transduction in PV-Cre and Emx1-Cre mice resulted in robust and selective expression of chemogenetic actuators, consistent with original description of these tools (Gorsky 2002, Hippenmeyer 2005, Alexander 2009, Krashes 2011, Magnus 2011) and their validation in multiple subsequent reports. In the present study, cell-type-specific targeting in PV-Cre mice was assessed by co-localization of mCherry/GFP and PV immunoreactivity, and by patch-clamp recordings of transduced neurons from PV-Cre and Emx1-Cre mice, which all exhibited electrophysiological properties typical of PV interneurons (fast-spiking) and glutamatergic neurons (regular-spiking), respectively (Connors and Gutnick 1990, Kawaguchi 1995, Cauli 1997).

Although a recent report points to DREADD-independent side effects of CNO (Gomez 2017), our results clearly rule out the possibility that such non-specific effects can be the cause of the observed PNN changes. Indeed, (i) CNO was ineffective upon injection in hM3Dq expressing mice, (ii) CNO induced PNN regression in the hM4Di-expressing hemicortex but not contralaterally, whereas PBS was ineffective, (iii) CNO and PSEM treatments were both effective at inducing PNN regression selectively around PV interneurons expressing their cognate chemogenetic actuator. Furthermore, our patch-clamp recordings of acute CNO effects neurons of cortical slices confirm its efficacy at inducing somatodendritic excitability increase or decrease depending on hM3Dq or hM4Di expression, respectively, in agreement with original reports (Alexander 2009, Krashes 2011), but at odds with some recent observations (Stachniak 2014, Gomez 2017).

Hence, our results show that PNN changes observed in the present study stem from specific chemogenetic ligand/actuator interactions eliciting a decrease in excitability of selectively targeted cell-types.

PNN regression is triggered by electrical silencing of PV interneurons, but not by network disinhibition

We found that targeted inhibition of PV interneurons using hM4Di induced PNN regression, consistent with our working hypothesis based on its reported effect on visual plasticity (Kuhlman et al. 2013). However, inhibition of PV interneurons likely enhances cortical network excitation via a disinhibitory effect, and hM4Di coupling with Gi-dependent signaling can inhibit presynaptic GABA release from PV interneurons (Kruglikov and Rudy 2008, Stachniak 2014) and elicit multiple intracellular metabotropic effects. We thus examined several mechanisms through which hM4Di actions in PV cells can trigger PNN regression.

Electrophysiological recordings confirmed inhibition of PV cells upon hM4Di activation *in vitro* as well as *in vivo*, as evidenced by the reduction in cortical gamma oscillations that critically rely on these interneurons (Cardin 2009, Sohal 2009), and in agreement with the reported decrease of their calcium responses to visual stimuli when subjected to the same chemogenetic paradigm (Kuhlman et al. 2013). EEG recordings additionally showed a decrease of theta oscillations, also indicative of reduced network synchrony, but no evidence for unbalanced excitation of the network (e.g. epileptiform activities). Likewise, targeted excitation of glutamatergic neurons or of PV interneurons using hM3Dq did not alter PNN density, thereby ruling out network disinhibition as a cause of PNN regression. Regarding the possible role of Gi-dependent signaling, it is ruled out by the effectiveness of the chloride channel PSAM-GlyR-mediated inhibition of PV interneurons at inducing PNN regression. The above results indicate that electrical silencing of PV interneurons is a key trigger of PNN regression in the adult, independently of the activity of other network components. This interpretation is further supported by the observation that both targeted inhibition of PV interneurons (which silences PV cells but disinhibits excitatory cells), and targeted inhibition of excitatory neurons (which silences both excitatory and PV cells), result in PNN regression.

Hence, our results indicate that PNN remodeling in the adult relies primarily on the ability of PV interneurons to sense their own activity level, which reflects the activity of their cognate microcircuit. The unique connectivity pattern of PV interneurons makes ideally suited to act as sensors of thalamocortical, cortico-cortical and of their activities. Indeed, PV interneurons receive strong excitation from sensory thalamic nuclei, are densely interconnected with excitatory neurons, and receive direct feedback on their own GABAergic activity through powerful autapses (Bacci et al. 2003, Gabernet et al. 2005, Bacci and Huguenard 2006, Kloc and Maffei 2014, Faini et al. 2018). Among the candidate signals that may link neuronal activity of PV cells to PNN degradation, changes in post-synaptic calcium entry [e.g. through calcium permeable AMPA receptors prominent in PV interneurons (Jonas et al. 1995, Angulo et al. 1997)] are unlikely to be involved since PNN regression occurred independently of the activity of excitatory neurons. Conversely, a change in Otx2 import appears as a more promising candidate signal. Indeed, Otx2 accumulation in PV interneurons is activity-dependent, Otx2 induces changes in the transcriptional program of these neurons, and the block of Otx2 import induces PNN regression in the adult (Sugiyama et al. 2008, Beurdeley et al. 2012, Apulei et al. 2018).

PV interneurons may regulate their PNN cell-autonomously

The present study indicates that PNN regression depends primarily on the activity of PV interneurons, and also provides evidence for cell-autonomous regulation of the PNN by each PV cell independent of its neighbors. This possibility is substantiated by the expression of a large array of genes enabling PV cells to control the accumulation and degradation of their own PNN (Rossier et al. 2015, Tasic et al. 2016). Our single cell RT-PCR experiments confirm expression in these genes in PV neurons from slices of visual cortex.

The PNN regression observed in the present study can theoretically result from enhanced proteolysis or from reduced synthesis associated with tonic proteolysis. Lecticans are the building blocks of the PNN (Yamaguchi 2000, Deepa et al. 2006, Kwok et al. 2012), and their reduced expression or secretion by a given PV cells is expected to reduce its PNN. Similarly, reduced expression, secretion, or membrane targeting of PNN linkers by individual PV cells is likely to induce PNN regression cell-autonomously. Although unlikely to play a role in PNN regression in adult, it is noteworthy that oligodendrocyte precursor cells, which are the main source of the PNN linker tenascin R in the neocortex (Saghatelian et al. 2004, Tasic et al. 2016), are likely to be instructed by PV interneurons during postnatal development for PNN reticulation (Orduz et al. 2015). Finally, the pattern of membrane and secreted proteases characteristically found in PV interneurons is indicative of a tonic level of PNN proteolysis, which may be upregulated at the level of gene expression, secretion or proteolytic activity upon PV interneuron silencing. Hence, the expression pattern of PNN genes observed in PV interneurons indicates that these cells are able to reduce their PNN cell-autonomously.

Multiple earlier studies indicate that PNN removal renders adult cortical network permissive for high circuit plasticity (Pizzorusso et al. 2002, de Vivo et al. 2013, Lensjø et al. 2017b). The chemogenetic paradigm used in the present study is known to reinstate visual plasticity after closure of the critical period (Kuhlman et al. 2013). Our results thus suggest that each PV cell is able to regulate the plasticity of its microcircuit based on the local sensing of neuronal activities, thereby contributing to point-by-point tuning of cortical network properties in the adult.

REFERENCES

- Alexander GM, Rogan SC, Abbas AI, Armbruster BN, Pei Y, Allen JA, Nonneman RJ, Hartmann J, Moy SS, Nicoletis MA, McNamara JO, Roth BL. Remote control of neuronal activity in transgenic mice expressing evolved G protein-coupled receptors. *Neuron*. 2009 Jul 16;63(1):27-39.
- Andjelic S, Gallopin T, Cauli B, Hill EL, Roux L, Badr S, Hu E, Tamás G, Lambolez B. Glutamatergic nonpyramidal neurons from neocortical layer VI and their comparison with pyramidal and spiny stellate neurons. *J Neurophysiol*. 2009 Feb;101(2):641-54.
- Angulo MC, Lambolez B, Audinat E, Hestrin S, Rossier J. Subunit composition, kinetic, and permeation properties of AMPA receptors in single neocortical nonpyramidal cells. *J Neurosci*. 1997 Sep 1;17(17):6685-96.
- Angulo MC, Staiger JF, Rossier J, Audinat E. Developmental synaptic changes increase the range of integrative capabilities of an identified excitatory neocortical connection. *J Neurosci*. 1999 Mar 1;19(5):1566-76.
- Apulei J, Kim N, Testa D, Ribot J, Morizet D, Bernard C, Jourden L, Blugeon C, Di Nardo AA, Prochiantz A. Non-cell Autonomous OTX2 Homeoprotein Regulates Visual Cortex Plasticity Through Gadd45b/g. *Cereb Cortex*. 2018 May 16. doi:10.1093/cercor/bhy108.
- Ascoli GA, Alonso-Nanclares L, Anderson SA, Barrionuevo G, Benavides-Piccione R, Burkhalter A, Buzsáki G, Cauli B, Defelipe J, Fairén A, et al. 2008. Petilla terminology: nomenclature of features of GABAergic interneurons of the cerebral cortex. *Nat Rev Neurosci*. 9:557–568.
- Bacci A, Huguenard JR, Prince DA. Functional autaptic neurotransmission in fast-spiking interneurons: a novel form of feedback inhibition in the neocortex. *J Neurosci*. 2003 Feb 1;23(3):859-66.
- Bacci A, Huguenard JR. Enhancement of spike-timing precision by autaptic transmission in neocortical inhibitory interneurons. *Neuron*. 2006 Jan 5;49(1):119-30.
- Beurdeley M, Spatazza J, Lee HH, Sugiyama S, Bernard C, Di Nardo AA, Hensch TK, Prochiantz A. Otx2 binding to perineuronal nets persistently regulates plasticity in the mature visual cortex. *J Neurosci*. 2012;32:9429-37.
- Bozzelli Lorenzo P, Alaiyed S, Kim E, Villapol S, Conant K. Proteolytic Remodeling of Perineuronal Nets: Effects on Synaptic Plasticity and Neuronal Population Dynamics. *Neural Plast*. 2018 Feb 4;2018:5735789.
- Cardin JA, Carlén M, Meletis K, Knoblich U, Zhang F, Deisseroth K, Tsai LH, Moore CI. Driving fastspiking cells induces gamma rhythm and controls sensory responses. *Nature*. 2009;459(7247):663-7.
- Cauli B, Audinat E, Lambolez B, Angulo MC, Ropert N, Tsuzuki K, Hestrin S, Rossier J. 1997. Molecular and physiological diversity of cortical nonpyramidal cells. *J Neurosci*. 17:3894–3906.

Chattopadhyaya B; Di Cristo G; Higashiyama H; Knott GW; Kuhlman SJ; Welker E; Huang ZJ. 2004. Experience and activity-dependent maturation of perisomatic GABAergic innervation in primary visual cortex during a postnatal critical period. *J Neurosci* 24(43):9598-611

Connors BW, Gutnick MJ. Intrinsic firing patterns of diverse neocortical neurons. *Trends Neurosci* 13: 99–104, 1990.

Deepa SS, Carulli D, Galtrey C, Rhodes K, Fukuda J, Mikami T, Sugahara K, Fawcett JW. Composition of perineuronal net extracellular matrix in rat brain: a different disaccharide composition for the net-associated proteoglycans. *J Biol Chem*. 2006 Jun 30;281(26):17789-800. Epub 2006 Apr 27.

de Vivo L, Landi S, Panniello M, Baroncelli L, Chierzi S, Mariotti L, Spolidoro M, Pizzorusso T, Maffei L, Ratto GM. Extracellular matrix inhibits structural and functional plasticity of dendritic spines in the adult visual cortex. *Nat Commun*. 2013;4:1484.

Dityatev A, Seidenbecher CI, Schachner M. Compartmentalization from the outside: the extracellular matrix and functional microdomains in the brain. *Trends Neurosci*. 2010;33(11):503-12.

Dzyubenko E, Gottschling C, Faissner A. Neuron-Glia Interactions in Neural Plasticity: Contributions of Neural Extracellular Matrix and Perineuronal Nets. *Neural Plast*. 2016;2016:5214961.

Fagiolini M, Fritschy JM, Löw K, Möhler H, Rudolph U, Hensch TK. Specific GABA_A circuits for visual cortical plasticity. *Science*. 2004 Mar 12;303(5664):1681-3.

Faini G, Aguirre A, Landi S, Lamers D, Pizzorusso T, Ratto GM, Deleuze C, Bacci A. Perineuronal nets control visual input via thalamic recruitment of cortical PV interneurons. *Elife*. 2018 Dec 18;7. pii: e41520.

Ferrer-Ferrer M, Dityatev A. Shaping Synapses by the Neural Extracellular Matrix. *Front Neuroanat*. 2018 May 15;12:40. doi: 10.3389/fnana.2018.00040. eCollection 2018. Review.

Gabernet L, Jadhav SP, Feldman DE, Carandini M, Scanziani M. 2005. Somatosensory integration controlled by dynamic thalamocortical feed-forward inhibition. *Neuron*. 48:315–327.

Geiger JR, Melcher T, Koh DS, Sakmann B, Seeburg PH, Jonas P, Monyer H. Relative abundance of subunit mRNAs determines gating and Ca²⁺ permeability of AMPA receptors in principal neurons and interneurons in rat CNS. *Neuron*. 1995 Jul;15(1):193-204.

Gomez JL, Bonaventura J, Lesniak W, Mathews WB, Sysa-Shah P, Rodriguez LA, Ellis RJ, Richie CT, Harvey BK, Dannals RF, Pomper MG, Bonci A, Michaelides M. Chemogenetics revealed: DREADD occupancy and activation via converted clozapine. *Science*. 2017 Aug 4;357(6350):503-507.

Gorski JA; Talley T; Qiu M; Puelles L; Rubenstein JL; Jones KR. 2002. Cortical excitatory neurons and glia, but not GABAergic neurons, are produced in the Emx1-expressing lineage. *J Neurosci* 22(15):6309-14

Harauzov A, Spolidoro M, DiCristo G, De Pasquale R, Cancedda L, Pizzorusso T, Viegi A, Berardi N, Maffei L. Reducing intracortical inhibition in the adult visual cortex promotes ocular dominance plasticity. *J Neurosci*. 2010 Jan 6;30(1):361-71.

Hensch TK, Fagiolini M, Mataga N, Stryker MP, Baekkeskov S, Kash SF. Local GABA circuit control of experience-dependent plasticity in developing visual cortex. *Science*. 1998 Nov 20;282(5393):1504-8.

Hensch TK. Critical period plasticity in local cortical circuits. *Nat Rev Neurosci*. 2005 Nov;6(11):877-88.

Hippenmeyer S; Vrieseling E; Sigrist M; Portmann T; Laengle C; Ladle DR; Arber S. 2005. A developmental switch in the response of DRG neurons to ETS transcription factor signaling. *PLoS Biol* 3(5):e159

Karagiannis A, Gallopin T, Dávid C, Battaglia D, Geoffroy H, Rossier J, Hillman EM, Staiger JF, Cauli B. Classification of NPY-expressing neocortical interneurons. *J Neurosci*. 2009 Mar 18;29(11):3642-59.

Kawaguchi Y. 1995. Physiological subgroups of nonpyramidal cells with specific morphological characteristics in layer II/ III of rat frontal cortex. *J Neurosci*. 15:2638–2655.

Kloc M, Maffei A. Target-specific properties of thalamocortical synapses onto layer 4 of mouse primary visual cortex. *J Neurosci*. 2014 Nov 12;34(46):15455-65.

Krashes MJ, Koda S, Ye C, Rogan SC, Adams AC, Cusher DS, Maratos-Flier E, Roth BL, Lowell BB. Rapid, reversible activation of AgRP neurons drives feeding behavior in mice. *J Clin Invest*. 2011 Apr;121(4):1424-8.

Kruglikov I, Rudy B. Perisomatic GABA release and thalamocortical integration onto neocortical excitatory cells are regulated by neuromodulators. *Neuron*. 2008 Jun 26;58(6):911-24.

Kubota Y, Shigematsu N, Karube F, Sekigawa A, Kato S, Yamaguchi N, Hirai Y, Morishima M, Kawaguchi Y. Selective coexpression of multiple chemical markers defines discrete populations of neocortical GABAergic neurons. *Cereb Cortex*. 2011 Aug;21(8):1803-17.

Kuhlman SJ, Olivas ND, Tring E, Ikrar T, Xu X, Trachtenberg JT. A disinhibitory microcircuit initiates critical period plasticity in the visual cortex. *Nature*. 2013;501:543-6.

Kwok JC, Warren P, Fawcett JW. Chondroitin sulfate: a key molecule in the brain matrix. *Int J Biochem Cell Biol*. 2012 Apr;44(4):582-6.

Lacroix A, Toussay X, Anenberg E, Lecrux C, Ferreirós N, Karagiannis A, Plaisier F, Chausson P, Jarlier F, Burgess SA, Hillman EM, Tegeder I, Murphy TH, Hamel E, Cauli B. COX-2-Derived Prostaglandin E2 Produced by Pyramidal Neurons Contributes to Neurovascular Coupling in the Rodent Cerebral Cortex. *J Neurosci*. 2015 Aug 26;35(34):11791-810.

Lensjø KK, Christensen AC, Tennøe S, Fyhn M, Hafting T. Differential Expression and Cell-Type Specificity of Perineuronal Nets in Hippocampus, Medial Entorhinal Cortex, and Visual

Cortex Examined in the Rat and Mouse. *eNeuro*. 2017a Jun 7;4(3). pii: ENEURO.0379-16.2017.

Lensjø KK, Lepperød ME, Dick G, Hafting T, Fyhn M. Removal of Perineuronal Nets Unlocks Juvenile Plasticity Through Network Mechanisms of Decreased Inhibition and Increased Gamma Activity. *J Neurosci*. 2017b Feb 1;37(5):1269-1283.

Magnus CJ, Lee PH, Atasoy D, Su HH, Looger LL, Sternson SM. Chemical and genetic engineering of selective ion channel-ligand interactions. *Science*. 2011 333:1292-1296.

Maurel P, Rauch U, Flad M, Margolis RK, Margolis RU. Phosphacan, a chondroitin sulfate proteoglycan of brain that interacts with neurons and neural cell-adhesion molecules, is an extracellular variant of a receptor-type protein tyrosine phosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Mar 29;91(7):2512-6.

Okaty BW, Miller MN, Sugino K, Hempel CM, Nelson SB. Transcriptional and electrophysiological maturation of neocortical fast-spiking GABAergic interneurons. *J Neurosci*. 2009 May 27;29(21):7040-52.

Orduz D, Maldonado PP, Balia M, Vélez-Fort M, de Sars V, Yanagawa Y, Emiliani V, Angulo MC. Interneurons and oligodendrocyte progenitors form a structured synaptic network in the developing neocortex. *Elife*. 2015 Apr 22;4.

Paxinos G, Franklin KBJ. 2004. The mouse brain in stereotaxic coordinates. London, UK: Academic Press.

Pizzorusso T, Medini P, Berardi N, Chierzi S, Fawcett JW, Maffei L. Reactivation of ocular dominance plasticity in the adult visual cortex. *Science*. 2002 Nov 8;298(5596):1248-51.

Rossier J, Bernard A, Cabungcal JH, Perrenoud Q, Savoye A, Gallopin T, Hawrylycz M, Cuénod M, Do K, Urban A, Lein ES. Cortical fast-spiking parvalbumin interneurons enwrapped in the perineuronal net express the metallopeptidases Adamts8, Adamts15 and Neprilysin. *Mol Psychiatry*. 2015 Feb;20(2):154-61.

Rudy B, Fishell G, Lee S, Hjerling-Leffler J. Three groups of interneurons account for nearly 100% of neocortical GABAergic neurons. *Dev Neurobiol*. 2011 Jan 1;71(1):45-61.

Saghatelian A, de Chevigny A, Schachner M, Lledo PM. Tenascin-R mediates activity-dependent recruitment of neuroblasts in the adult mouse forebrain. *Nat Neurosci*. 2004 Apr;7(4):347-56.

Sale A, Berardi N, Spolidoro M, Baroncelli L, Maffei L. GABAergic inhibition in visual cortical plasticity. *Front Cell Neurosci*. 2010 Mar 31;4:10.

Sohal VS, Zhang F, Yizhar O, Deisseroth K. Parvalbumin neurons and gamma rhythms enhance cortical circuit performance. *Nature*. 2009 Jun 4;459(7247):698-702.

Stachniak TJ, Ghosh A, Sternson SM. Chemogenetic synaptic silencing of neural circuits localizes a hypothalamus→midbrain pathway for feeding behavior. *Neuron*. 2014;82:797-808.

- Sugiyama S, Di Nardo AA, Aizawa S, Matsuo I, Volovitch M, Prochiantz A, Hensch TK. Experience-dependent transfer of Otx2 homeoprotein into the visual cortex activates postnatal plasticity. *Cell*. 2008 Aug 8;134(3):508-20.
- Ueno H, Takao K, Suemitsu S, Murakami S, Kitamura N, Wani K, Okamoto M, Aoki S, Ishihara T. Age-dependent and region-specific alteration of parvalbumin neurons and perineuronal nets in the mouse cerebral cortex. *Neurochem Int*. 2018 Jan;112:59-70.
- Tasic B, Menon V, Nguyen TN, Kim TK, Jarsky T, Yao Z, Levi B, Gray LT, Sorensen SA, Dolbeare T, Bertagnolli D, Goldy J, Shapovalova N, Parry S, Lee C, Smith K, Bernard A, Madisen L, Sunkin SM, Hawrylycz M, Koch C, Zeng H. Adult mouse cortical cell taxonomy revealed by single cell transcriptomics. *Nat Neurosci*. 2016 Feb;19(2):335-46.
- Tricoire L, Pelkey KA, Erkkila BE, Jeffries BW, Yuan X, McBain CJ. A blueprint for the spatiotemporal origins of mouse hippocampal interneuron diversity. *J Neurosci*. 2011 Jul 27;31(30):10948-70.
- Xu X, Roby KD, Callaway EM. Immunochemical characterization of inhibitory mouse cortical neurons: three chemically distinct classes of inhibitory cells. *J Comp Neurol*. 2010 Feb 1;518(3):389-404.
- Yamaguchi Y. Lecticans: organizers of the brain extracellular matrix. *Cell Mol Life Sci*. 2000 Feb;57(2):276-89.
- Ye Q, Miao QL. Experience-dependent development of perineuronal nets and chondroitin sulfate proteoglycan receptors in mouse visual cortex. *Matrix Biol*. 2013 Aug 8;32(6):352-63.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Analysis of PNN density in the V1 visual cortex using WFA fluorescence staining. (A) Macrotome fluorescence negative picture of a coronal section of mouse brain at the level of the visual cortex showing PNN staining with WFA. The superimposed section of the mouse brain atlas delineates the densely stained V1 area flanked by V2L and V2ML areas exhibiting faint PNN labeling. Throughout this study, analyses of PNN density were performed in layers IV-V of the V1 area as indicated by the red rectangle. (B) PNN density analyses were performed around PV immunopositive cells, or around cells showing expression of both PV and the chemogenetic tool, as exemplified here for the hM4Di-mCherry fusion protein. (C) In order to quantify PNN density, whole-field fluorescence pictures were acquired (*left panel*), background-subtracted using the Subtract Background function of the ImageJ software (*middle panel*), and PNNs were delineated manually around the soma based on WFA staining intensity (red lines in *right panel*), to create ring-shaped ROIs using the XOR function of ImageJ. Scale bar for B-C: 20 μm .

Figure 2. Targeted inhibition of PV interneurons using DREADD hM4Di induces PNN regression. (A) Stereotaxic injection of Cre-dependent AAV encoding hM4Di fused to mCherry in the visual cortex of PV-Cre mice. Macrotome fluorescence picture showing expression of hM4Di-mCherry revealed by anti-RFP immunohistochemistry 5 weeks after injection. The superimposed section of the mouse brain atlas delineates the V1 area. (B-D) Confocal fluorescence images acquired in the V1 cortex. (B) Dual immunostaining showing hM4Di-mCherry expression in PV-positive cells. Scale bar: 100 μm . (C-D) Illustration of the PNN (WFA) surrounding hM4Di-expressing cells in layers IV-V after PBS or CNO treatment of the mice. Note the low PNN density around hM4Di+ cells after CNO treatment, as exemplified in high magnification images. Scale bars: 100 μm (left), 10 μm (right). (E) Summary of PNN density around PV+ (contralateral uninjected hemicortex) and hM4Di+/PV+ (ipsilateral injected) cells in the V1 cortex normalized for each mouse to mean density in contralateral hemicortex. Data stem from the indicated number of cells analyzed in 3 CNO-treated and 3 PBS-treated mice. * Significantly different from other conditions.

Figure 3. CNO decreases the excitability of hM4Di-expressing PV interneurons in cortical slices. (A) Responses of an hM4Di-expressing interneuron to depolarizing current steps in control conditions and upon bath application of CNO (0.5 μM). CNO application elicited a hyperpolarization of the membrane potential and an increase in the current needed to induce action potential firing. (B) Electrophysiological parameters measured in control and CNO conditions in hM4Di-expressing interneurons (n=8). Note in (A) the large amplitude of the fast afterhyperpolarizing potentials (AHP), the quiescent periods separating trains of action potentials, and in (B) the modest input resistance and high rheobase value typical of fast-spiking PV interneurons. * Significant differences.

Figure 4. CNO treatment reduces cortical gamma oscillations in mice expressing hM4Di in PV interneurons. (A) Example of EEG recording of the local field potential in the hM4Di-expressing visual hemicortex of an awake PV-Cre mouse following consecutive i.p. injections of PBS and CNO. Traces from left to right show EEG power in the delta, theta, gamma low, gamma mid and gamma high frequency ranges. (B) Mean power of the EEG normalized to control baseline obtained in 3 mice treated with PBS and CNO. * Significant differences.

Figure 5. CNO enhances the excitability of pyramidal neurons expressing the DREADD hM3Dq in cortical slices. (A) Responses of an hM3Dq-expressing layer V pyramidal neuron to depolarizing current steps in control conditions and upon bath application of CNO (0.5 μ M). CNO application elicited a depolarization of the membrane potential and a decrease of the current needed to induce action potential firing. (B) Electrophysiological parameters measured in control and CNO conditions in hM4Di-expressing interneurons (n=8). * Significant differences.

Figure 6. Targeted excitation of glutamatergic neurons using hM3Dq does not alter PNN density. (A) Stereotaxic injection of Cre-dependent AAV encoding hM3Dq fused to mCherry in the visual cortex of Emx1-Cre mice. Macrotome fluorescence picture showing expression of hM3Dq-mCherry revealed by anti-RFP immunohistochemistry 5 weeks after injection. The superimposed section of the mouse brain atlas delineates the V1 area. (B-C) Confocal fluorescence images acquired after triple labeling of sections of the V1 cortex to reveal the PNN (WFA), and expression of PV and hM3Dq-mCherry. For better visualization, **B1-C1** panels show WFA and anti-PV labelling separately from hM3Dq-mCherry positive excitatory neurons visible on merged pictures (**B2-C2**). Scale bar: 100 μ m. (D) PNN density around PV+ cells ipsi- and contralateral to hM3Dq expression in the V1 cortex normalized for each mouse to mean density in contralateral hemicortex. Data stem from the indicated number of cells analyzed in 3 CNO-treated and 3 PBS-treated mice.

Figure 7. Targeted excitation of PV interneurons using hM3Dq does not alter PNN density. (A) Stereotaxic injection of Cre-dependent AAV encoding hM3Dq fused to mCherry in the visual cortex of PV-Cre mice. Macrotome fluorescence picture showing expression of hM3Dq-mCherry in the V1 area 5 weeks after injection. (B-D) Confocal fluorescence images acquired in the V1 cortex. Scale bars: 100 μ m. (B) Dual immunostaining showing hM3Dq-mCherry expression in PV-positive cells. (C-D) Dual labelling showing the PNN (WFA) surrounding hM3Dq-expressing cells in layers IV-V after PBS or CNO treatment of the mice. (E) PNN density around PV+ (contralateral uninjected hemicortex) and hM3Dq+/PV+ (ipsilateral injected) cells in the V1 cortex normalized for each mouse to mean density in contralateral hemicortex. Data stem from the indicated number of cells analyzed in 3 CNO-treated and 3 PBS-treated mice.

Figure 8. Targeted chemogenetic inhibition of PV interneurons using PSAM-GlyR induces PNN regression. All pictures are confocal fluorescence images acquired in the V1 cortex. **(A)** Dual immunostaining showing PSAM-GlyR expression in PV-positive cells 5 weeks after injection of Cre-dependent AAV encoding PSAM-GlyR-ires-GFP in the visual cortex of PV-Cre mice. Scale bar: 100 μ m. **(B-C)** Illustration of the PNN (WFA) surrounding PSAM-GlyR+ cells in layers IV-V after mice treatment with PBS or with the PSAM-GlyR agonist PSEM^{89S}. Note the low PNN density around PSAM-GlyR+ cells after PSEM treatment, as exemplified in high magnification images. Scale bars: 100 μ m (left), 10 μ m (right). **(D)** PNN density around PV+ (contralateral uninjected hemicortex) and PSAM-GlyR+/PV+ (ipsilateral injected) cells in the V1 cortex normalized for each mouse to mean density in contralateral hemicortex. Data stem from the indicated number of cells analyzed in 3 CNO-treated and 3 PBS-treated mice. * Significantly different from other conditions.

Figure 9. Targeted inhibition of excitatory neurons by hM4Di induces PNN regression. **(A)** Stereotaxic injection of Cre-dependent AAV encoding hM4Di-mCherry in the visual cortex of Emx1-Cre mice. Macrotome fluorescence picture showing expression of hM3Dq-mCherry in the V1 area 5 weeks after injection. **(B-C)** Confocal fluorescence images illustrating the PNN (WFA) surrounding PV+ cells in the vicinity of hM3Dq-expressing excitatory neurons in layers IV-V of the V1 cortex of mice treated with PBS or CNO. Note the low PNN density around PV+ cells after CNO treatment, as exemplified in high magnification images. Scale bars: 100 μ m (left), 10 μ m (right). **(D)** PNN density around PV+ cells ipsi- and contralateral to hM3Dq expression in the V1 cortex normalized for each mouse to mean density in contralateral hemicortex. Data stem from the indicated number of cells analyzed in 4 CNO-treated and 3 PBS-treated mice. * Significantly different from other conditions.

Figure 10. PV interneurons may regulate their PNN cell-autonomously. **(A)** Examples of the high PNN density (arrows) observed around hM4Di-negative, or weakly hM4Di-positive PV interneurons, as compared to the low PNN density (arrowheads) observed around their PV+ neighbors robustly expressing hM4Di in the V1 cortex of a CNO treated mouse. Scale bars: 20 μ m **(B)** Expression of PNN-related genes in single cells analyzed by scPCR after patch-clamp in acute slices of visual cortex. **B1:** agarose gel electrophoresis of scPCR products obtained from an individual PV interneuron (molecular weight marker, Φ X HaeIII, the bar indicates the 603 bp fragment), as assessed by detection of PV, GAD65 and GAD67 mRNAs. **B2-4:** Summary of scPCR results. Note the different expression profiles obtained in the three cell types analyzed, and the rich repertoire of PNN related genes expressed by PV interneurons. Acan, aggrecan; Bcan, brevican; Ncan, neurocan; Hapln, hyaluronan and proteoglycan link protein; Ptprr and Ptprrz1, Protein Tyrosine Phosphatase Receptor types R and Z1; Tnr, tenascin R; ADAM, A Disintegrin And Metalloprotease; ADAMTS, A Disintegrin And Metalloprotease with Thrombospondin motif; Mme, Membrane metalloendopeptidase (neprilysin).

Table 1- PCR Primers

Genes accession #.	First PCR primers	Size bp	Second PCR nested primers	Size bp
VGluT1* NM_182993.2	Sense, 597: CCCTTAGAACGGAGTCGGCT Antisense, 1169: TATCCGACCACCAGCAGCAG	592	Sense, 621: ACGACAGCCTTTTGCGGTTCC Antisense, 968: CAAAGTAGGCGGGCTGAGAG	366
GAD65* NM_008078.2	Sense, 99: CCAAAAGTTCACGGGCGG Antisense, 454: TCCTCCAGATTTTGCGGTTG	373	Sense, 219: CACCTGCGACCAAAAACCCCT Antisense, 447: GATTTTGCGGTTGGTCTGCC	247
GAD67* NM_008077.4	Sense, 83: ATGATACTTGGTGTGGCGTAGC Antisense, 314: GTTTGCTCCTCCCCGTTCTTAG	253	Sense, 159: CAATAGCCTGGAAGAGAAGAGTCG Antisense, 314: GTTTGCTCCTCCCCGTTCTTAG	178
PV* NM_013645.3	Sense, 104: GCCTGAAGAAAAAGAACCCG Antisense, 275: AATCTTGCCGTCCTCCATCCT	191	Sense, 122: CGGATGAGGTGAAGAAGGTGT Antisense, 265: TCCCCATCCTTGCTCCAGC	163
S100beta NM_009115.3	Sense, 57: CGGGCGAGAGGGTGACAA Antisense, 172: TCTTCGTCCAGCGTCTCCAT	133	Sense, 57: CGGGCGAGAGGGTGACAA Antisense, 133: TGTCACCACTTCTGCTCC	93
Acan NM_007424.2	Sense, 265: GTCTTCCCTCACCATCCCCT Antisense, 616: AGTCCAGGGTGTAGCGTGTG	371	Sense, 336: CCCTCACCCCAAGAATCAAG Antisense, 610: CAGGGTGTAGCGTGTGGAAATA	293
Bcan NM_007529	Sense, 1205: CGCTATCCCATCATCACACC Antisense, 1518: CTCTGCTGGGTCTTCTGGGG	333	Sense, 1262: ACCCTCTTCTCTTTCCCAA Antisense, 1491: TCCTCCTCCCCATCTTCTG	249
Ncan NM_007789	Sense, 159: TGCTGCTGTGGCTGCTTCTC Antisense, 521: CAGCGATACAGCCAGAGTC	381	Sense, 193: TCAGGACACACAGGACACCA Antisense, 483: CAGCAGAAGGGTAGCATTGG	309
Hapln1 NM_013500	Sense, 722: TGTGAGGTGATTGAAGGGCTAG Antisense, 1105: ATCGTAGGTGAGTTTGGTGGGG	405	Sense, 755: GCTGTGGTGGCATTGGAGTTAC Antisense, 1028: ATCTGCTTTTATCCTTGTTCCCA	296
Hapln4 NM_177900	Sense, 413: CTCCCTGGTCCTCCGAAATG Antisense, 796: ATCGTAGCGTTCCTCAGCGT	402	Sense, 545: CGGAGGTCGCTACAAGATGA Antisense, 728: CCAGTGCTCCCAGTCCCCG	202
Ptpr NM_011217	Sense, 543: AAGAAGAGCCTGGACATCGC Antisense, 903: TGCCTTTCTCCTGGTTTCCG	380	Sense, 582: AACTACCACTCCCCTTCCGAAG Antisense, 774: AGATCCGAAGCAGGGTTATGTT	213
PTPRZ1 NM_001081306	Sense, 421: TGTTGAAGAGATTGGCTGGTCC Antisense, 806: CCTCAAACTGGAAAATCTGTC	406	Sense, 447: CAGGAGCACTAAATCAAAAAA Antisense, 794: AAAATCTGTCCGCATCAAAGCA	368
Tnr NM_022312	Sense, 1033: GAGATGCTGGAGAGGGAGGTGT Antisense, 1338: ATTCCCCATCCACACAGAGC	327	Sense, 962: TCAACCTCCCCAAAAAAGCC Antisense, 1273: CATCTCCGCTGTATTCACTGTC	331
Adam10 NM_007399	Sense, 584: TCATCAAGACTCGTGGTGGC Antisense, 844: CTTTCAGCCAGAGTTGTGCG	280	Sense, 605: CGTTTTACATTGAGCCAGCAGA Antisense, 835: CCAGAGTTGTGCGTTTTTTCCT	251
Adam11 NM_001110778	Sense, 505: ACCATCACCTCCTGTCCCTCG Antisense, 854: GACCTGCCTTTTCTTCTTAGC	369	Sense, 549: CGGGAGGGAACAAGACAACA Antisense, 805: AGGGACAGCAAACAGGCAGC	275
Adam22 NM_001007220	Sense, 297: CTGAAAGGACTGGAGAGGGG Antisense, 631: AGGGCAACAAATGAGACAGGGT	354	Sense, 307: TGGAGAGGGGGAAAGAAAAC Antisense, 568: GTTCTCCACGACCTTGCCTC	281
Adamts1 NM_009621	Sense, 1123: GGGAAAGCCATCAGGACCAG Antisense, 1311: ATCTTACCACCACCAGGCTAA	208	Sens, 1151: AGGAAGAAGCGATTTGTGTCC Antisense, 1311: ATCTTACCACCACCAGGCTAA	181
Adamts15 NM_001024139	Sense, 1862: CAACGGTGGAAAATACTGCG Antisense, 2153: TGCCTTGGACACAGACCGAG	310	Sense, 1877: CTGCGAGGGAGTAAGAGTGAAA Antisense, 2138: GACCGAGGTGGAGTCAGGAGTA	282
Adamts8 NM_013906	Sense, 806: CTGGAGTGGGAGGTGGAGAT Antisense, 1083: GTTCTGATGCTCGGGTGCT	298	Sense, 871: GAAGCAGGACAAGGAGGGGT Antisense, 1067: TGCTTGTAGATTGCGGCTGC	215
Adamts15 NM_001285435	Sense, 1362: TGTGGCAGCGACTTTGTGTT Antisense, 1599: CGAGCATAGCCAGCGTGAGG	256	Sense, 1368: AGCGACTTTGTGTTCCAGGC Antisense, 1589: CAGCGTGAGGCAGCAGTAGC	240
Mme NM_001289462	Sense, 500: CCAAAGCCAAAGAAGAAACAGC Antisense, 899: TGTCCGCCTCTGCTATCAAT	421	Sense, 543: GCCTCTCTGTGCTTGTCTTGCT Antisense, 821: TATGTCTTCAGTTTGGGTTCTTG	299

* Tricoire et al. 2011

Table 2- Summary of chemogenetic experiments

Mouse line	Virus	Drug		PBS	
		ipsi	contra	ipsi	contra
PV Cre	hM4Di	0.397 ± 0.044 (n=70)	1.000 ± 0.080 (n=72)	1.011 ± 0.085 (n=85)	1.000 ± 0.110 (n=87)
		<i>Drug-ipsi < Drug-contra, p < 0.05; Drug-ipsi < PBS-ipsi, p < 0.05; PBS-ipsi vs. PBS-contra, p= 0.326</i>			
PV Cre	PSAM GlyR	0.510 ± 0.046 (n=110)	1.000 ± 0.050 (n=119)	1.051 ± 0.072 (n=110)	1.000 ± 0.054 (n=107)
		<i>Drug-ipsi < Drug-contra, p < 0.05; Drug-ipsi < PBS-ipsi, p < 0.05; PBS-ipsi vs. PBS-contra, p= 0.726</i>			
Emx1 Cre	hM4Di	0.689 ± 0.049 (n=122)	1.000 ± 0.049 (n=130)	1.027 ± 0.061 (n=93)	1.000 ± 0.056 (n=92)
		<i>Drug-ipsi < Drug-contra, p < 0.05; Drug-ipsi < PBS-ipsi, p < 0.05; PBS-ipsi vs. PBS-contra, p= 0.888</i>			
Emx1 Cre	hM3Dq	0.949 ± 0.060 (n=101)	1.000 ± 0.059 (n=101)	0.950 ± 0.043 (n=92)	1.000 ± 0.058 (n=92)
		<i>Drug-ipsi vs. Drug-contra, p= 0.602 ; Drug-ipsi vs. PBS-ipsi, p= 0.820; PBS-ipsi vs. PBS-contra, p= 0.667</i>			
PV Cre	hM3Dq	1.085 ± 0.087 (n=86)	1.000 ± 0.074 (n=90)	1.114 ± 0.079 (n=101)	1.000 ± 0.061 (n=100)
		<i>Drug-ipsi vs. Drug-contra, p= 0.600; Drug-ipsi vs. PBS-ipsi, p= 0.873; PBS-ipsi vs. PBS-contra, p= 0.719</i>			

n refers to number of cells counted in each condition

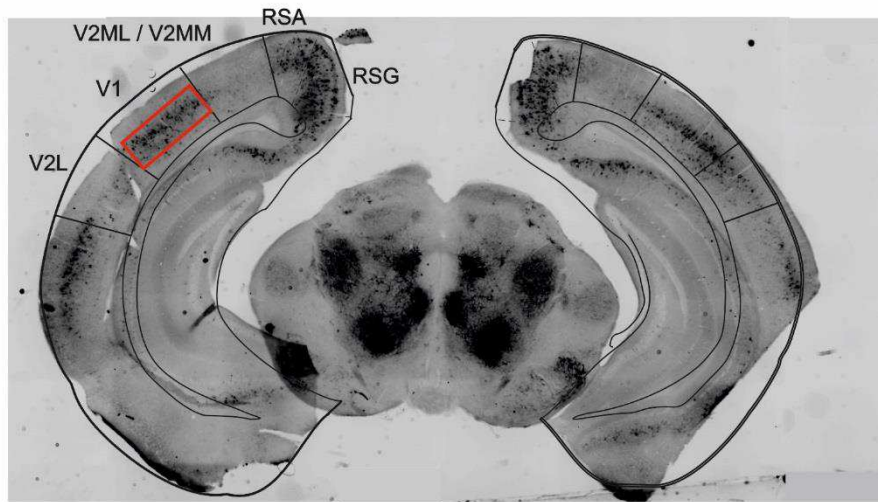
Table 3- Electrophysiological properties of cells collected for sc PCR

	Pyramidal cells (n=14)	PV int. (n=14)	Astrocytes (n=10)
Resting potential (mV)	-55.0 ± 9.3	-56.7 ± 4.9	-79.4 ± 2.5
		<i>Astr. << Pyr., PV</i>	
Input Resistance (MΩ)	247.4 ± 108.8	153.8 ± 68.5	1.1 ± 0.7
		<i>Astr. << PV < Pyr.</i>	
Time constant (ms)	40.7 ± 17.9	14.1 ± 4.9	0.7 ± 0.1
		<i>Astr. << PV << Pyr.</i>	
Membrane capacitance (pF)	170.3 ± 53.1	102.2 ± 37.8	495.1 ± 196.2
		<i>PV << Pyr. << Astro.</i>	
Rheobase (pA)	54.0 ± 40.5	84.6 ± 41.0	
		<i>Pyr. < PV</i>	
AHP amplitude (mV)	-14.3 ± 1.8	-23.7 ± 4.2	
		<i>PV <<< Pyr.</i>	
Time to peak AHP (ms)	44.6 ± 16.7	2.3 ± 0.4	
		<i>PV <<< Pyr.</i>	
1st spike amplitude (mV)	89.2 ± 5.6	73.1 ± 8.2	
		<i>PV <<< Pyr.</i>	
1st spike duration 1/2 amplitude (ms)	1.6 ± 0.2	0.6 ± 0.1	
		<i>PV <<< Pyr.</i>	

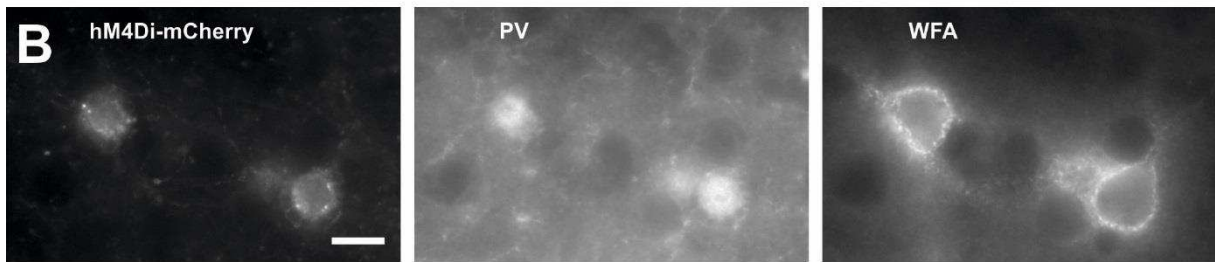
< significantly smaller with $P < 0.05$; << significantly smaller with $P < 0.01$; <<< significantly smaller with $P < 0.001$; <<<< significantly smaller with $p < 0.0001$; <<<<< significantly smaller with $p < 0.00001$

Figure 1

A



B



C

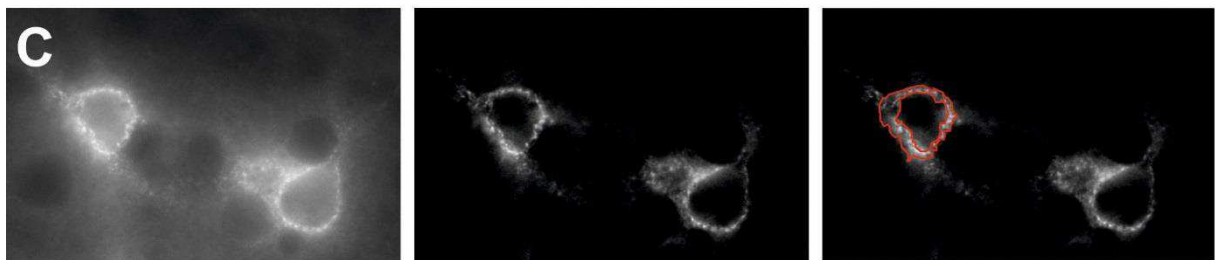


Figure 2

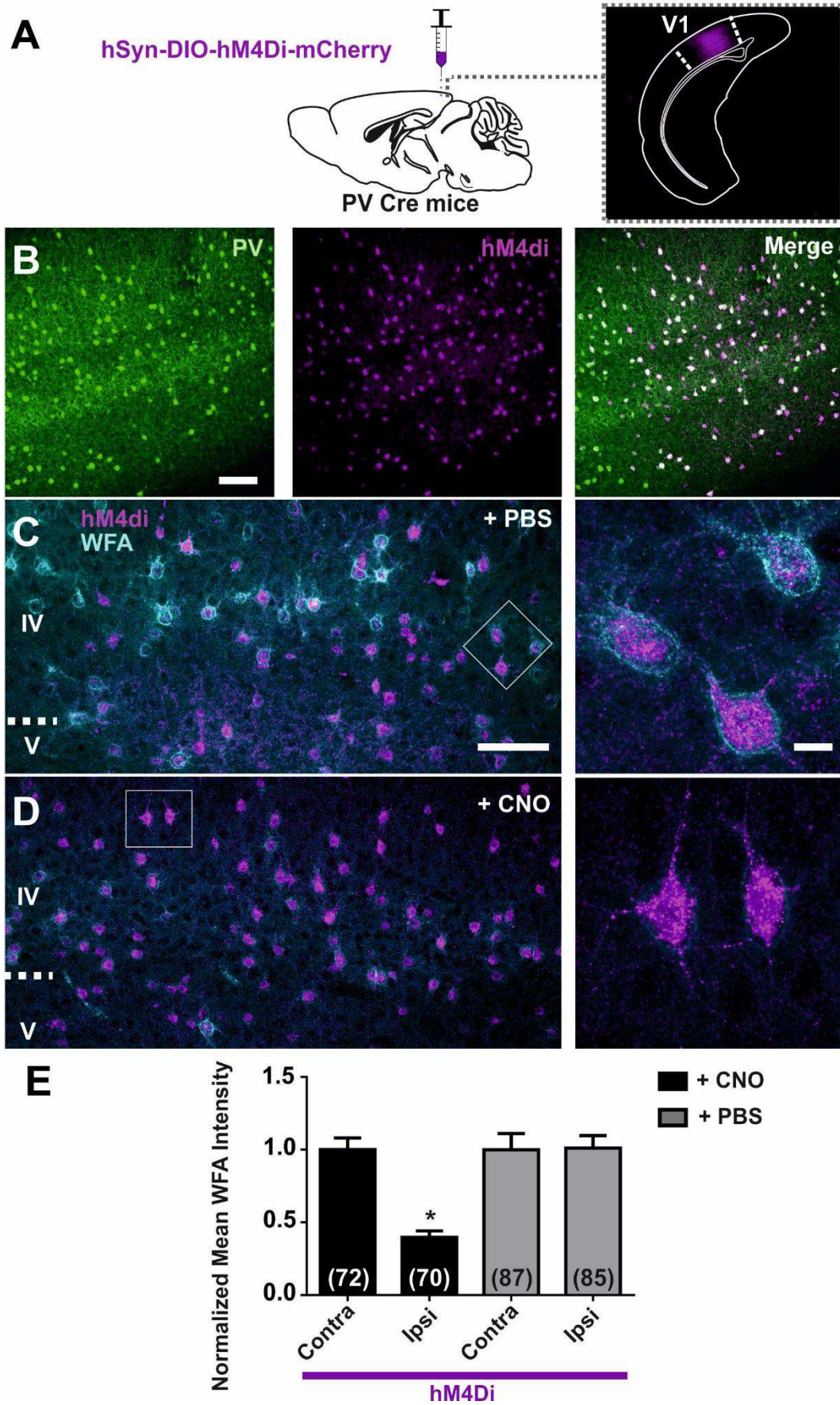


Figure 3

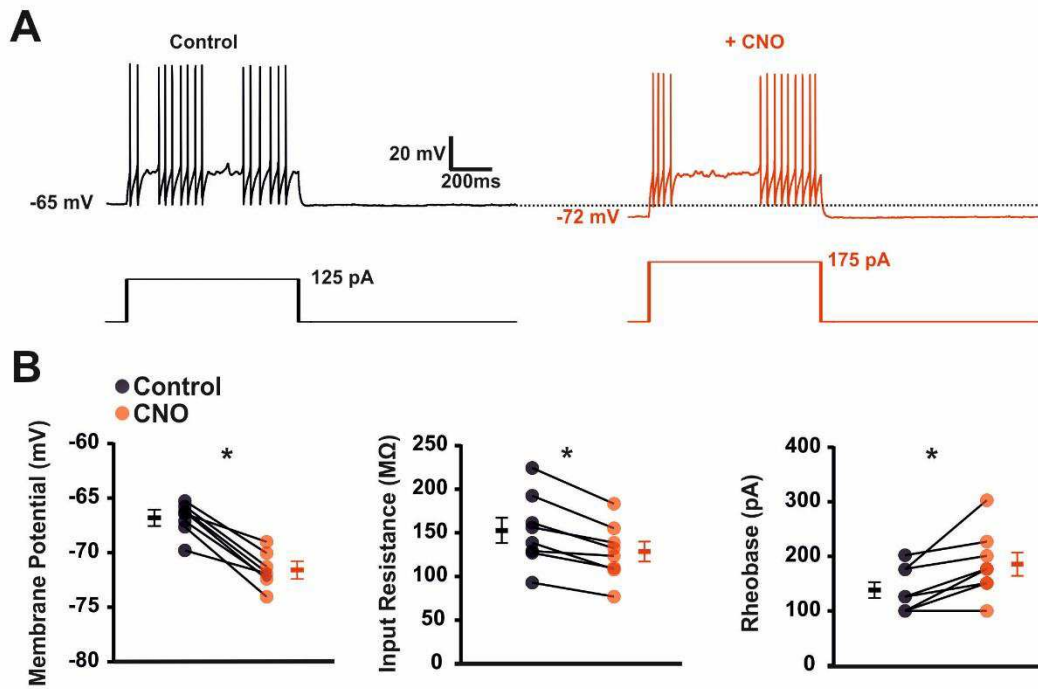


Figure 4

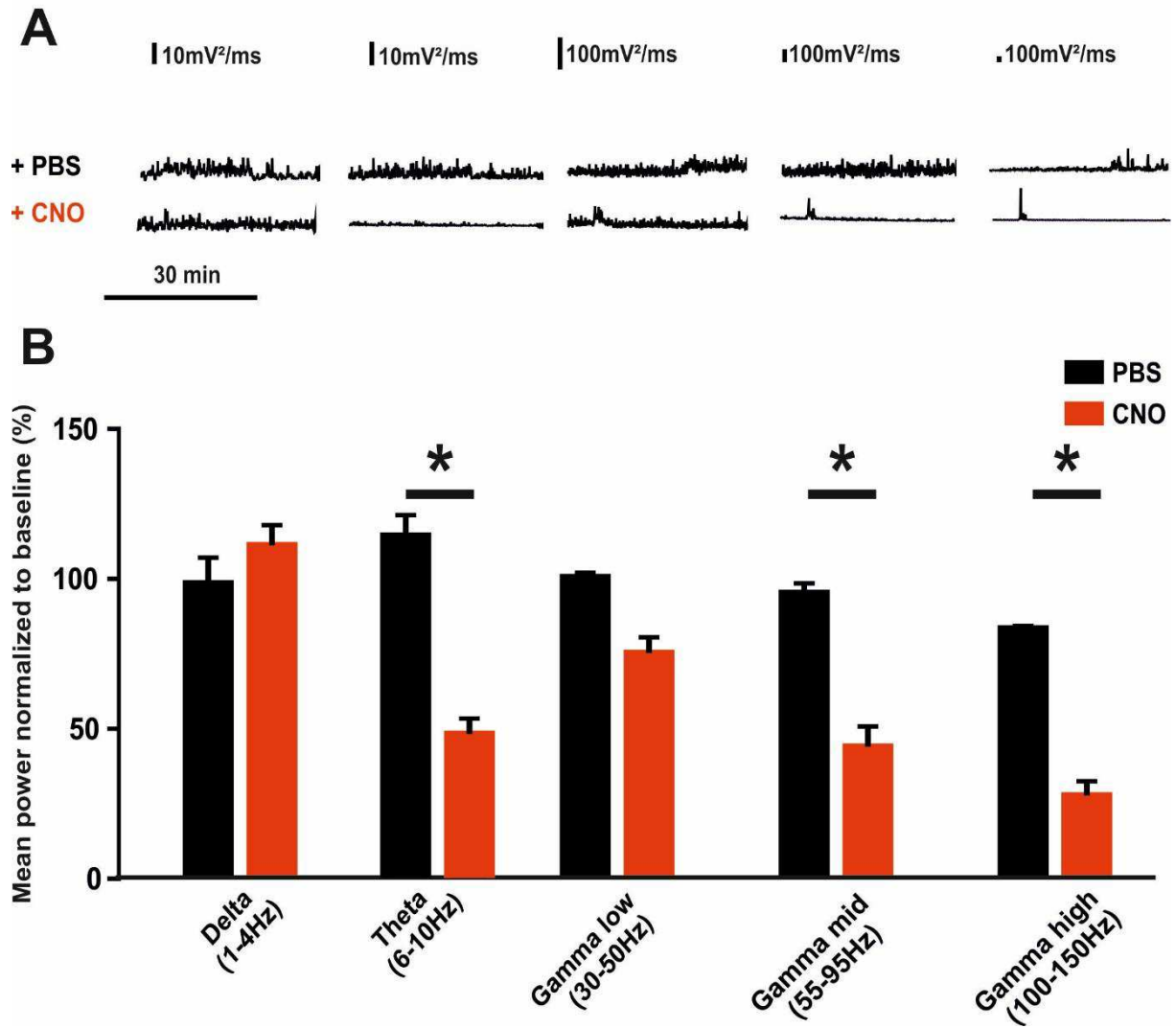


Figure 5

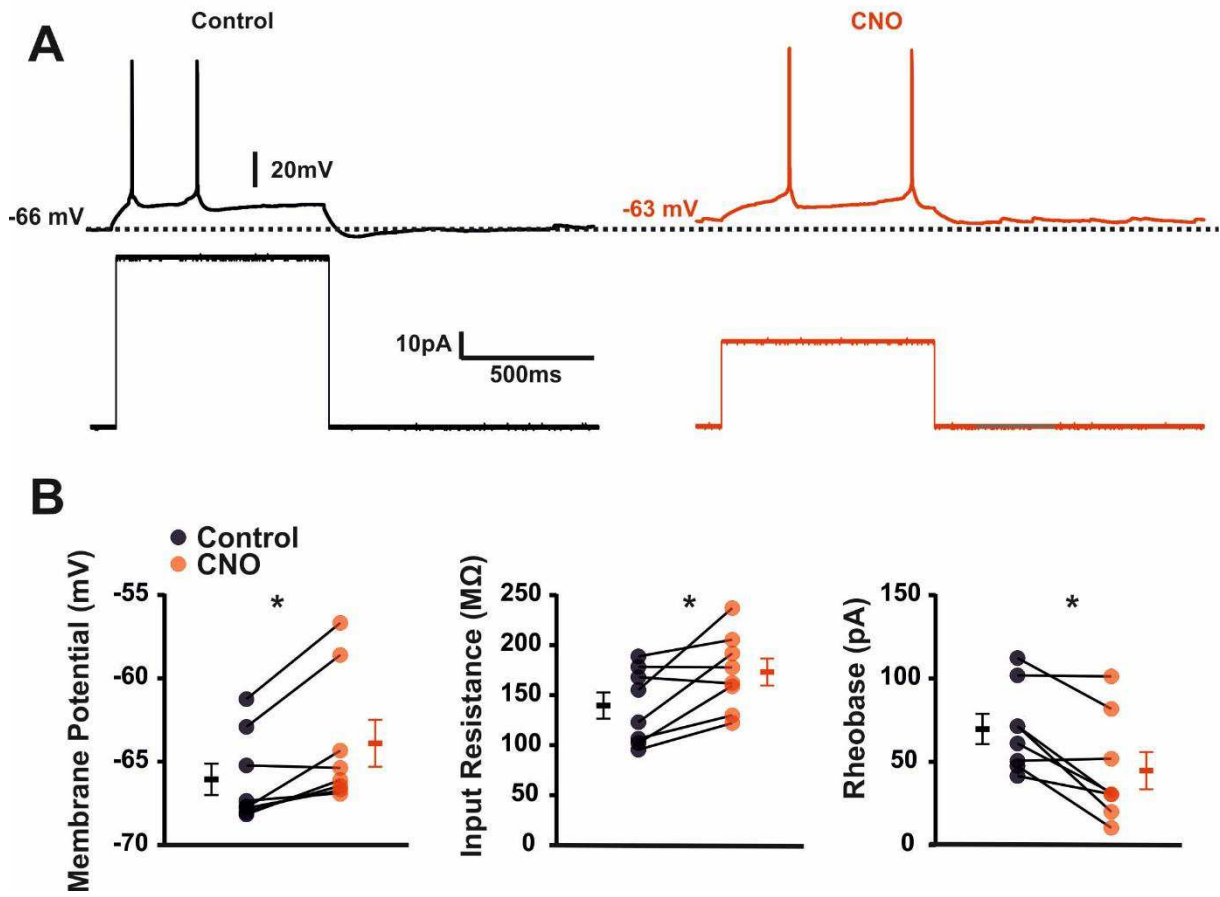


Figure 6

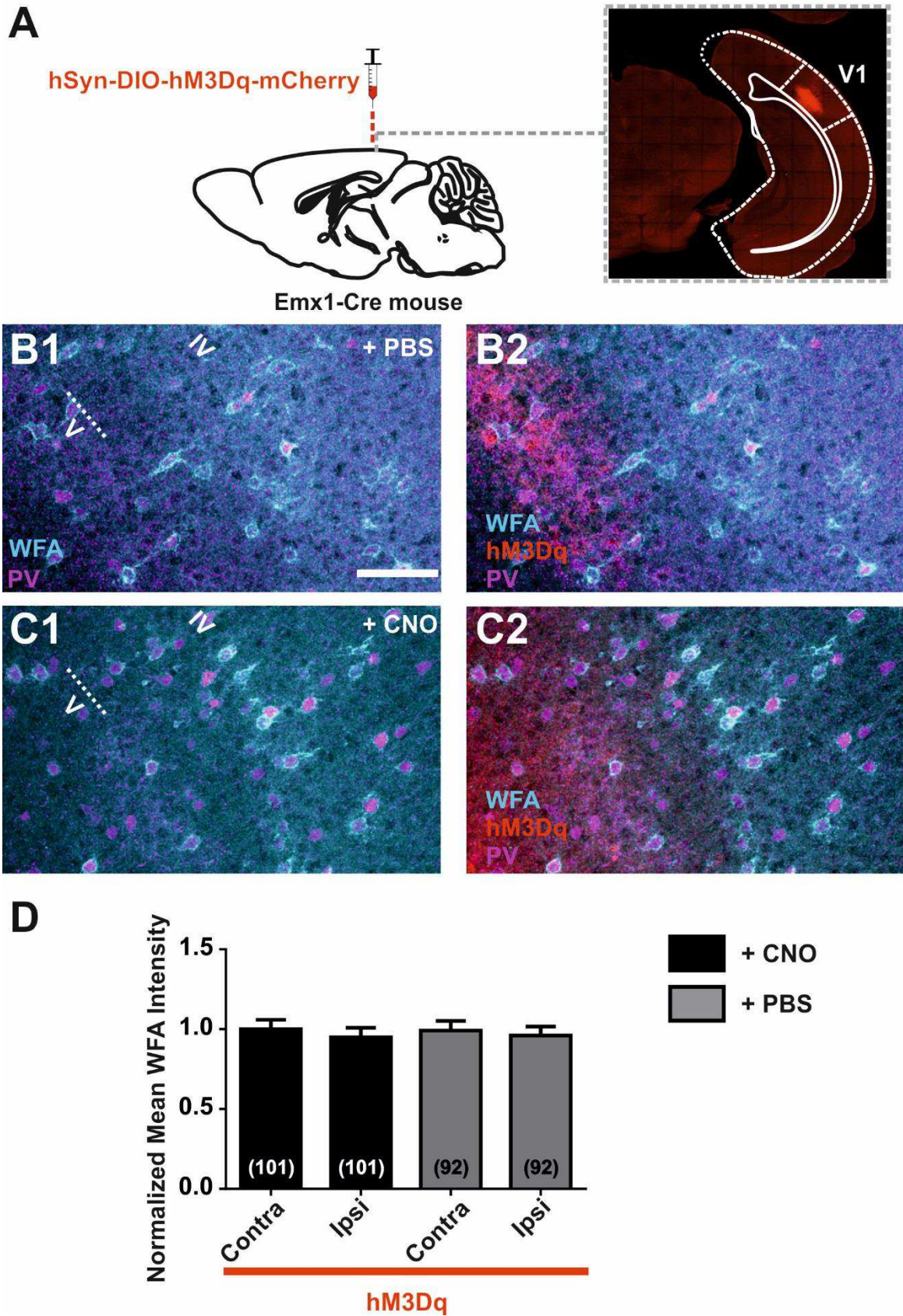


Figure 7

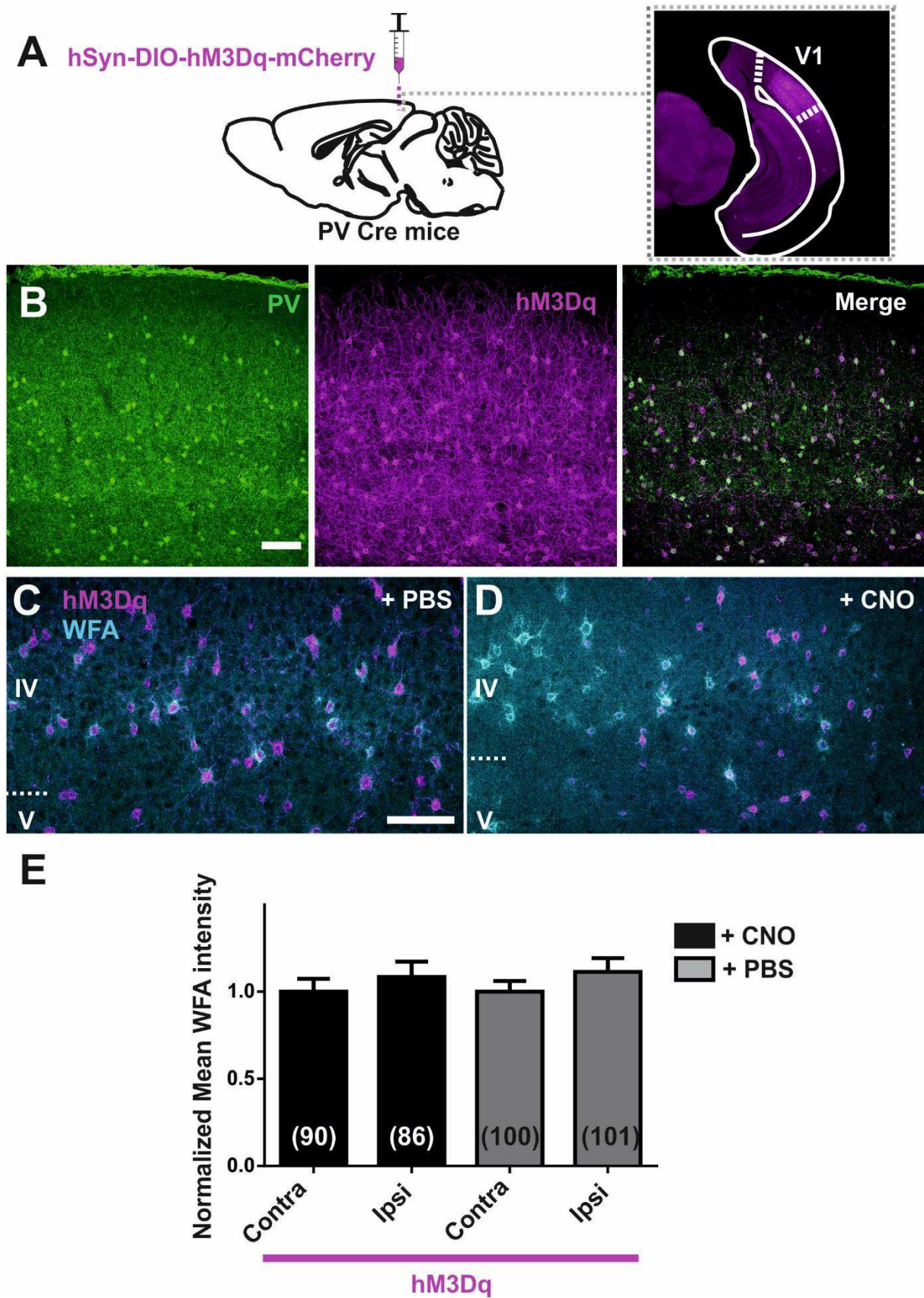


Figure 8

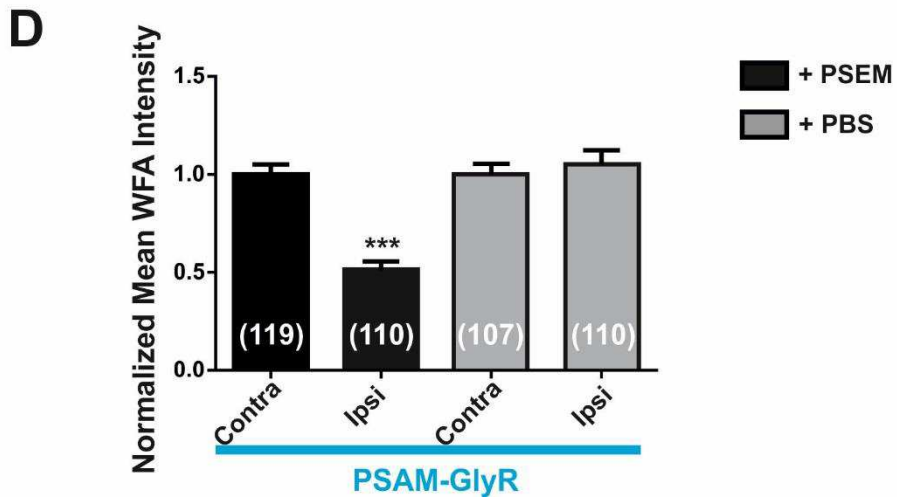
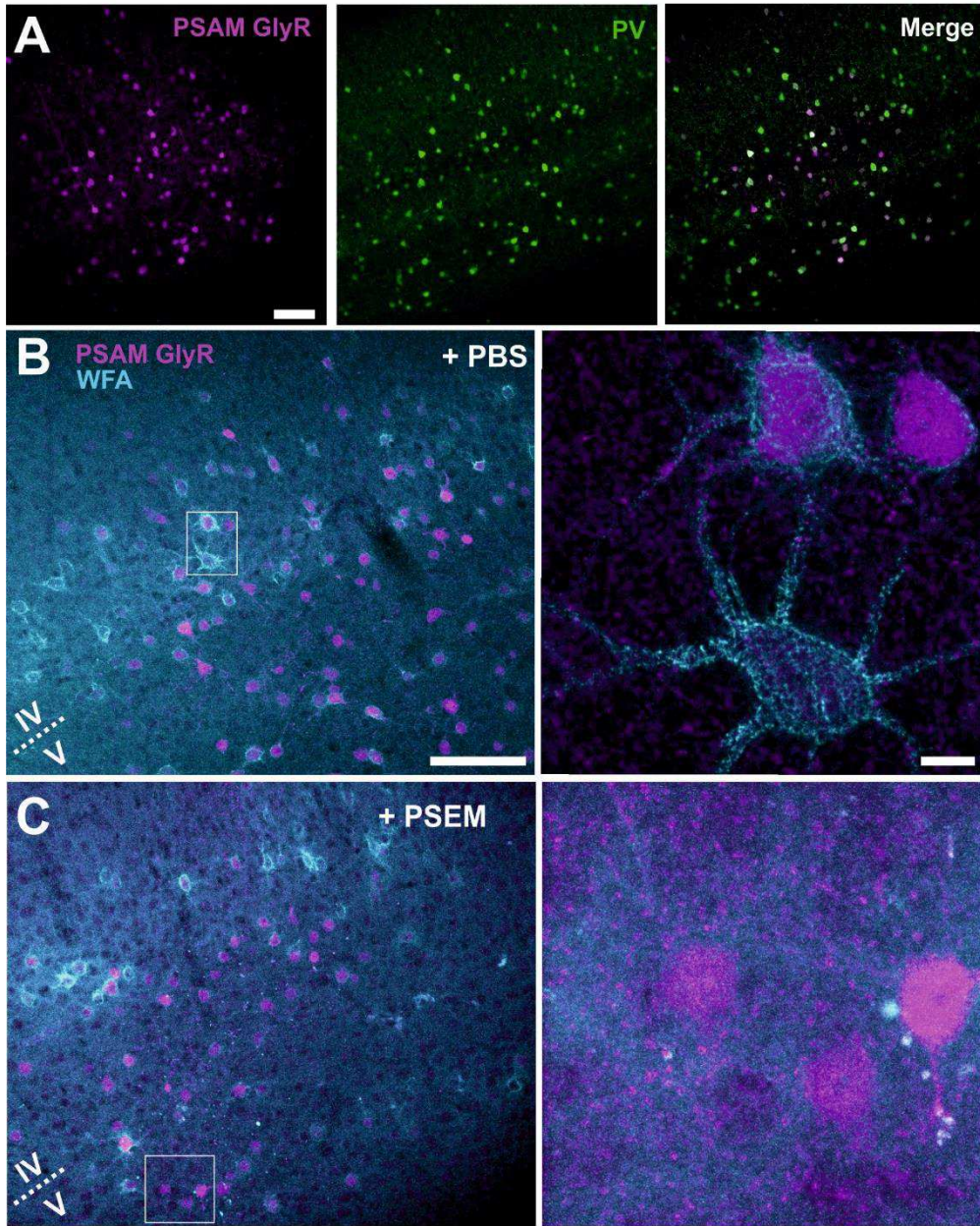


Figure 9

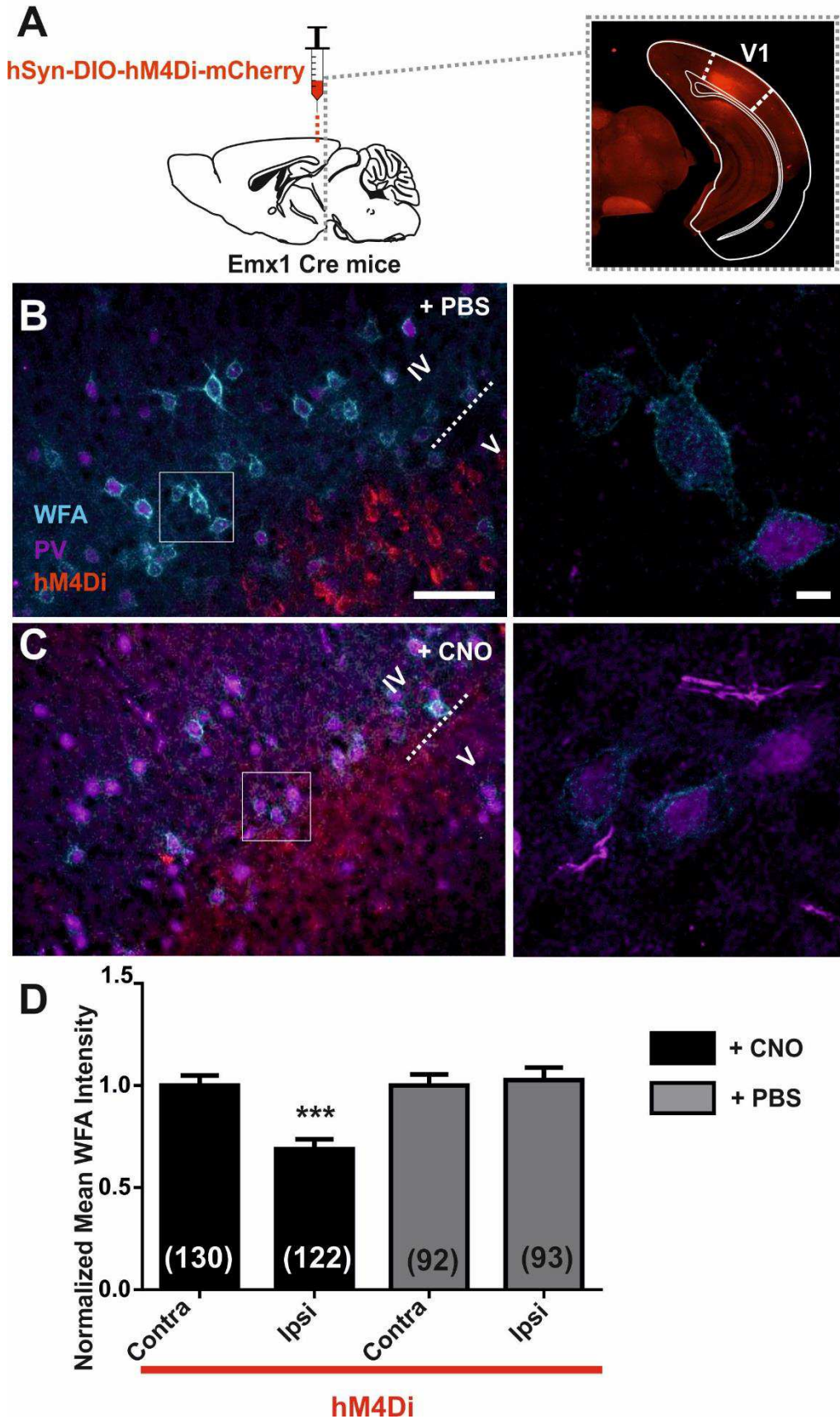
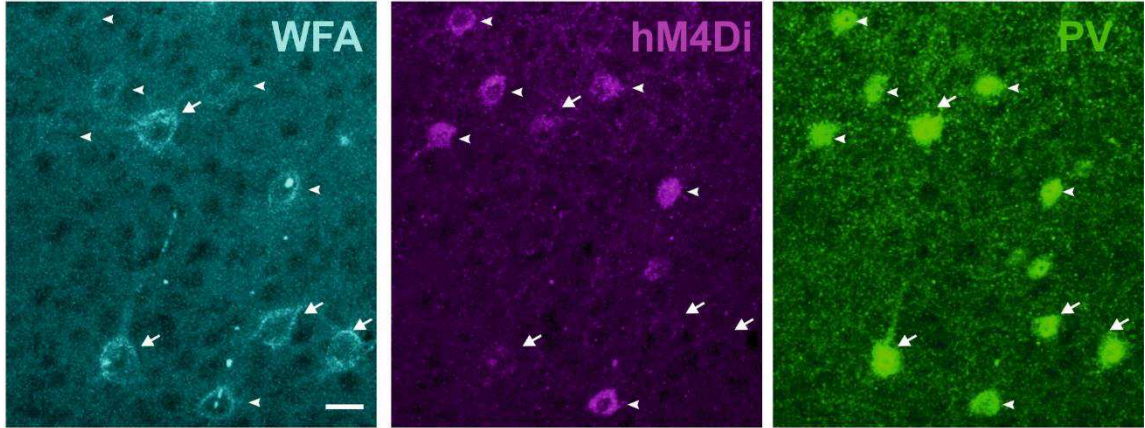


Figure 10

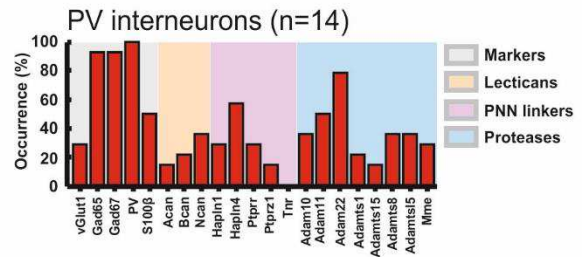
A



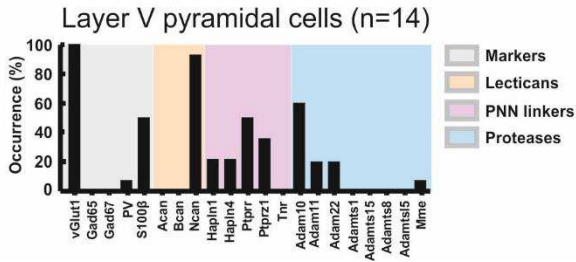
B1



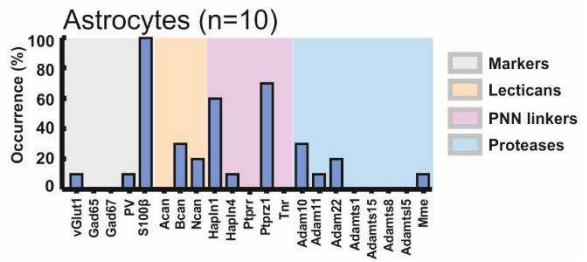
B2



B3



B4



DISCUSSION

Les principaux résultats obtenus durant ma thèse indiquent que l'inhibition de l'activité électrique des interneurones FS-PV, directement ou via la réduction de leurs entrées excitatrices, entraîne une réduction de la densité de leur PNN dans le cortex visuel adulte. Ces résultats sont novateurs et permettent de mettre en évidence un mécanisme de régulation du PNN par les interneurones FS-PV chez l'adulte.

Nous avons testé les effets de l'altération de l'activité des FS-PV sur la densité de PNN grâce à l'utilisation d'outils chimogénétiques. L'activation du DREADD hM4Di ou du récepteur ionique muté PSAM GlyR dans les interneurones PV permet leur inhibition et induit une régression de leur PNN chez l'adulte. Le même résultat est observé en exprimant le DREADD hM4Di dans les cellules pyramidales. L'expression du DREADD excitateur dans les cellules pyramidales ou dans les interneurones FS-PV n'entraîne pas de changements visibles de la densité de PNN. De plus les enregistrements EEG réalisés lors de l'activation de hM4Di dans les FS-PV chez la souris éveillée montrent une diminution de certaines oscillations (gamma et thêta) mais pas de surexcitation du réseau (par exemple pas d'augmentation de l'amplitude des oscillations ou d'activité de type épileptiforme). Ces résultats excluent la désinhibition comme source de diminution du PNN. Enfin, les résultats obtenus par RT-PCR sur cellules uniques dans les différents types cellulaires confirment que les interneurones FS-PV possèdent un ensemble de gènes permettant aussi bien la synthèse que la dégradation de leur propre PNN.

Nos résultats montrent que l'utilisation du DREADD hM4Di dans les FS-PV induit la régression du PNN chez l'adulte. L'activation d'hM4Di par le CNO dans les cellules FS-PV a pour résultante une inhibition somatodendritique modérée, en accord avec la littérature (Alexander et al., 2009; Perova et al., 2015). De plus, il a été montré que l'activation de hM4Di entraîne une diminution de la libération présynaptique (Stachniak et al., 2014). Le DREADD inhibiteur entraîne donc une diminution de l'excitabilité de la cellule où il est exprimé qui est probablement liée à une réduction de la libération de neurotransmetteur. Nous avons ensuite observé *in vivo* que l'activation de hM4Di dans les cellules FS-PV entraîne une diminution des oscillations gamma de hautes fréquences. Ces dernières ont été décrites comme dépendantes de la synchronisation du réseau par les cellules FS-PV (Cardin et al., 2009; Sohal et al., 2009; Buzsáki and Wang, 2012). Nous avons également observé une diminution de l'activité dans la bande thêta. Ces résultats sont cohérents: il semble que les oscillations gamma de hautes fréquences soient modulées par les oscillations thêta (Canolty et al., 2006). De plus, l'inhibition des interneurones FS-PV par l'activation d'un autre outil chimogénétique, le canal chlorure PSAM GlyR, induit également la régression du PNN. Ce résultat permet d'exclure un effet intracellulaire du DREADD hM4Di via la signalisation Gi et nous permet de conclure qu'une inhibition de l'activité électrique des FS-PV est un déclencheur de la régression du

PNN. Enfin, nous avons également utilisé le DREADD inhibiteur hM4Di dans les cellules glutamatergiques afin d'observer l'effet de son activation sur le PNN. Les cellules excitatrices et les interneurons sont fortement interconnectés (Bartos et al., 2002): une diminution de l'activité des neurones excitateurs conduit à la réduction des entrées excitatrices sur les interneurons FS-PV, diminuant logiquement leur activité. Dans ce cas, nous observons également une diminution du PNN. De plus, nos résultats d'activation des neurones glutamatergiques ou des FS-PV par hM3Dq permettent d'exclure l'implication d'une désinhibition comme cause de régression du PNN chez l'adulte. Cet ensemble de résultats nous permet de conclure que l'inhibition électrique ciblée ou via les cellules excitatrices environnantes des interneurons FS-PV entraîne la réduction de la densité du réseau périneuronal.

Des résultats similaires ont été observés sur culture dissociée de neurones. Un blocage des potentiels d'action, du relargage de neurotransmetteurs ou des entrées calciques dans des neurones FS-PV induit une diminution de l'accumulation extracellulaire des constituants du PNN (Dityatev et al., 2007). Ceci est cohérent avec le fait que notre protocole d'inhibition a été décrit comme induisant une diminution des signaux calciques intracellulaires des interneurons FS-PV en réponse aux stimuli visuels (Kuhlman et al., 2013).

Nos résultats mettent en évidence un mécanisme de régulation du PNN chez l'adulte: chaque interneurone FS-PV peut dégrader son propre PNN de façon activité-dépendante. Le PNN étant une structure dynamique, sa régression induite par diminution de l'activité électrique des FS-PV peut impliquer en aval deux mécanismes altérant la balance synthèse/dégradation du PNN: (i) une augmentation phasique de l'activité protéolytique, (ii) une diminution de la synthèse du PNN combinée à une activité protéolytique tonique. L'activation de hM4Di par injection intrapéritonéale de CNO induit une diminution du ratio calcique dans les FS-PV (Kuhlman et al., 2013). Les mécanismes de dégradation impliquant les protéases, et particulièrement les aggrecanases ADAMTS, nécessitent leur sécrétion (Dunn et al., 2006). Le calcium est généralement nécessaire aux mécanismes de sécrétion par les neurones (Yu et al., 2003), une diminution de calcium aurait donc pour conséquence une diminution d'activité de ces mécanismes de dégradation par la cellule. Le calcium n'est donc probablement pas le signal déclencheur de cette dégradation. L'hypothèse expliquant la régression du PNN serait en faveur d'un arrêt de synthèse de ces constituants même si l'hypothèse de la dégradation n'est pas à exclure. La synthèse du PNN chez l'adulte est très lente, comme en témoignent les études réalisées après l'utilisation de la chondroïtinase (Brückner et al., 1998). OTX2 semble être un bon candidat comme signal déclencheur de la régression, l'import d'OTX2 étant dépendant de l'activité de FS-PV (Sugiyama et al., 2009). Enfin, un récent papier de modélisation de l'interaction entre la matrice extracellulaire et le

réseau neuronal se base sur deux hypothèses que mes travaux de thèse appuient : (i) la synthèse des molécules constituant la matrice et des enzymes permettant de la dégrader est contrôlée par l'activité neuronale, (ii) les changements du niveau de densité de la matrice peut en retour permettre la modulation de cette activité neuronale (Lanzarevich, I. et al., 2018). Nos résultats expérimentaux sont en accord avec les résultats de cette étude théorique dans le sens où les FS-PV agiraient comme senseurs de l'activité neuronal dotés de la capacité à réguler leur propre PNN.

L'inhibition de la transmission GABAergique et en particulier celle des FS-PV permet de rouvrir la période critique (Fagiolini et al., 1994; Hensch, 2005; Harauzov et al., 2010; Kuhlman et al., 2013). L'inhibition des FS-PV par l'activation de hM4Di pendant une journée est suffisante pour rouvrir la période critique chez l'adulte (Kuhlman et al., 2013). Nos résultats indiquent néanmoins que deux jours sont nécessaires pour induire une régression du PNN chez l'adulte. Il faut cependant noter que nos expériences ont été réalisées à P55-P60, âge auquel le PNN a atteint sa densité adulte, alors que les expériences de Kuhlman et al. (2013) ont été menées à P35, soit juste à la fermeture de la période critique. De plus les protocoles de MD réalisés pour observer les changements de plasticité ont eux-mêmes un effet sur le réseau (Gordon and Stryker, 1996; He, 2006; Sawtell et al., 2003). En conclusion, notre étude permet de mieux comprendre les mécanismes de régulation du PNN chez l'adulte. Ces résultats apportent de nouvelles connaissances sur la régulation physiologique de ce réseau périneuronal chez l'adulte et sur l'importance des interneurons FS-PV pour la modulation de l'activité des microcircuits corticaux.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Pour conclure, les résultats principaux de ma thèse indiquent que l'inhibition des FS-PV chez l'adulte entraîne une régression de leur PNN et que cet effet n'est pas dû à une désinhibition par le réseau. Ces résultats soulignent aussi le fait que les mécanismes de dégradation du PNN seraient activité-dépendants et propres à chaque cellule FS-PV. Nous proposons le postulat suivant : les interneurons FS-PV agissent comme senseurs de l'activité au sein de leur microcircuit et peuvent réguler leur propre PNN en fonction de leur activité. D'un point de vue expérimental, nous avons adapté un protocole simple qui permet de caractériser le rôle des FS-PV dans la plasticité corticale. Quelques perspectives de mon travail de thèse sont discutées brièvement dans la suite de cette partie selon deux axes.

Mettre en évidence l'effet cellule autonome du PNN observé avec l'activation du hM4Di dans les cellules FS-PV: En pratique, toutes les cellules PV expriment hM4Di au sein de l'aire injectée avec le virus hM4Di. Nous avons remarqué en marge de la zone transduite que les cellules PV exprimant hM4Di ont une réduction de leur PNN contrairement aux cellules PV voisines n'exprimant hM4Di. Cette observation indique que la régulation du PNN serait cellule-autonome et que chaque cellule PV régule son propre PNN. Cette possibilité est étayée par l'expression de gènes clés à la synthèse et à la dégradation du PNN dans les FS-PV (Okaty et al., 2009; Rossier et al., 2015; Tasic et al., 2016). Obtenir une transduction plus mosaïque et déterminer une méthode de corrélation entre l'intensité de fluorescence de WFA et l'intensité de fluorescence liée à l'expression du virus au sein d'une même cellule permettraient d'avoir une mesure quantitative de notre observation.

Accélérer la maturation du PNN pendant la période critique: Notre protocole d'utilisation d'outils chimogénétiques pour altérer l'activité d'un type cellulaire dans le cortex visuel devrait nous permettre de tester le rôle de l'activité des interneurons FS-PV dans la maturation de leur PNN. La contribution des FS-PV dans la synthèse du PNN est connue mais il n'y a pas pour l'instant de corrélation directe entre leur niveau d'activité et la synthèse du PNN. La période critique pour le cortex visuel primaire chez la souris commence à peu près à l'ouverture des yeux (P12) et connaît son pic un mois après la naissance. Il est cependant possible de jouer sur cet intervalle en augmentant ou réduisant la fonction GABAergique (Hensch, 2005). La mise en place du PNN est concomitante avec la fin de la période critique. De plus, le PNN étant considéré comme le facteur permissif clé qui permet l'établissement de la plasticité de dominance oculaire pendant la période critique (Galtrey and Fawcett, 2007), nous émettons l'hypothèse qu'augmenter l'activité des cellules FS-PV pendant la période critique accélère la maturation du PNN. Réaliser une injection stéréotaxique à P0 et observer les effets de l'activation du DREADD excitateur hM3Dq dans les FS-PV à P20 via notre méthode d'analyse nous permettraient de mieux comprendre le rôle des FS-PV et de leur PNN dans la mise en place de la période critique.

REFERENCES

- Alexander GM, Rogan SC, Abbas AI, Armbruster BN, Pei Y, Allen JA, Nonneman RJ, Hartmann J, Moy SS, Nicolelis MA, Mcnamara JO. 2009. Neurotechnique Remote Control of Neuronal Activity in Transgenic Mice Expressing Evolved G Protein-Coupled Receptors. *Neuron* **63**:27–39. doi:10.1016/j.neuron.2009.06.014
- Araque A, Parpura V, Sanzgiri RP, Haydon PG. 1999. Tripartite Synapse Haydon 1999 **22**.
- Armbruster BN, Li X, Pausch MH, Herlitz S, Roth BL. 2007. Evolving the lock to fit the key to create a family of G protein-coupled receptors potentially activated by an inert ligand **104**.
- Armbruster BN, Roth BL. 2005. Mining the receptorome. *J Biol Chem* **280**:5129–5132. doi:10.1074/jbc.R400030200
- Arranz AM, Perkins KL, Irie F, Lewis DP, Hrabe J, Xiao F, Itano N, Kimata K, Hrabetova S, Yamaguchi Y. 2014. Hyaluronan Deficiency Due to Has3 Knock-Out Causes Altered Neuronal Activity and Seizures via Reduction in Brain Extracellular Space. *J Neurosci* **34**:6164–6176. doi:10.1523/JNEUROSCI.3458-13.2014
- Ascoli GA, Alonso-Nanclares L, Anderson SA, Barrionuevo G, Benavides-Piccione R, Burkhalter A, Buzsáki G, Cauli B, DeFelipe J, Fairén A, Feldmeyer D, Fishell G, Fregnac Y, Freund TF, Gardner D, Gardner EP, Goldberg JH, Helmstaedter M, Hestrin S, Karube F, Kisvárdy ZF, Lambolez B, Lewis DA, Marin O, Markram H, Muñoz A, Packer A, Petersen CCH, Rockland KS, Rossier J, Rudy B, Somogyi P, West JDC, Yuste R. 2008. Petilla terminology: nomenclature of features of GABAergic interneurons of the cerebral cortex. *Nat Rev Neurosci*. doi:10.1038/nrn2402
- Atwal JK, Pinkston-Gosse J, Syken J, Stawicki S, Wu Y, Shatz C, Tessier-Lavigne M. 2008. PirB is a functional receptor for myelin inhibitors of axonal regeneration. *Science (80-)* **322**:967–970. doi:10.1126/science.1161151
- Bacci A, Rudolph U, Huguenard JR, Prince DA, Zhang X. 2003a. Major differences in inhibitory synaptic transmission onto two neocortical interneuron subclasses. *J Neurosci* **23**:9664–74. doi:23/29/9664 [pii]
- Bacci A, Rudolph U, Huguenard JR, Prince DA, Zhang X. 2003b. Major differences in inhibitory synaptic transmission onto two neocortical interneuron subclasses. *J Neurosci* **23**:9664–74. doi:23/29/9664 [pii]
- Balmer TS. 2016. Perineuronal Nets Enhance the Excitability of Fast-Spiking Neurons. *eNeuro* **3**. doi:10.1523/ENEURO.0112-16.2016
- Bartos M, Vida I, Frotscher M, Meyer A, Monyer H, Geiger RP, Jonas P. 2002. Fast synaptic inhibition promotes synchronized gamma oscillations in hippocampal interneuron networks **99**:1–6.
- Bavelier D, Levi DM, Li RW, Dan Y, Hensch TK. 2010. Removing Brakes on Adult Brain Plasticity:

- From Molecular to Behavioral Interventions. *J Neurosci* **30**:14964–14971.
doi:10.1523/JNEUROSCI.4812-10.2010
- Bear F et. 2004. How monocular deprivation shifts ocular dominance in visual cortex of young mice **44**:917–923.
- Bear M, Singer W. 1986. Modulation of visual cortical plasticity by acetylcholine and noradrenaline. *Nature*. doi:10.1038/320129a0
- Bélanger M, Allaman I, Magistretti PJ. 2011. Brain energy metabolism: Focus on Astrocyte-neuron metabolic cooperation. *Cell Metab* **14**:724–738. doi:10.1016/j.cmet.2011.08.016
- Bernard C, Prochiantz A. 2016. Otx2-PNN Interaction to Regulate Cortical Plasticity. *Neural Plast* **2016**. doi:10.1155/2016/7931693
- Beurdeley M, Spatazza J, Lee HHC, Sugiyama S, Bernard C, Di Nardo AA, Hensch TK, Prochiantz A. 2012. Otx2 Binding to Perineuronal Nets Persistently Regulates Plasticity in the Mature Visual Cortex. *J Neurosci* **32**:9429–9437. doi:10.1523/JNEUROSCI.0394-12.2012
- Brakebusch C, Seidenbecher CI, Asztely F, Rauch U, Matthies H, Meyer H, Krug M, Bo TM, Zhou X, Kreutz MR, Montag D, Gundelfinger ED, Fa R. 2002. Brevican-Deficient Mice Display Impaired Hippocampal CA1 Long-Term Potentiation but Show No Obvious Deficits in Learning and Memory Downloaded from <http://mcb.asm.org/> on June 2 , 2018 by The University of British Columbia Library **22**:7417–7427. doi:10.1128/MCB.22.21.7417
- 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. *Exp Brain Res* **121**:300–310.
doi:10.1007/s002210050463
- Bruno Cauli, Etienne Audinat, Bertrand Lambolez, Maria Cecilia Angulo, Nicole Ropert, Keisuke Tsuzuki, Shaul Hestrin, and Jean Rossier. 1997. Molecular and Physiological Diversity of Cortical Nonpyramidal Cells. *J Neurosci* **17**:3894 –3906.
- 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**:359–369. doi:10.1016/S0306-4522(01)00082-3
- Buzsáki G, Wang X-J. 2012. Mechanisms of Gamma Oscillations. *Annu Rev Neurosci* **35**:203–225.
doi:10.1146/annurev-neuro-062111-150444
- Cang J, Kalatsky VA, Löwel S, Stryker MP. 2005. Optical imaging of the intrinsic signal as a measure of cortical plasticity in the mouse. *Vis Neurosci* **22**:685–691. doi:10.1017/S0952523805225178
- Canolty R, Edwards E, Dalal S, Soltani M, Nagarajan S, et al. 2006. High gamma power is phase-locked to theta oscillations in human neocortex. *Science (80-)* **1626**.
doi:10.1126/science.1128115

- Cardin JA, Carlén M, Meletis K, Knoblich U, Zhang F, Deisseroth K, Tsai LH, Moore CI. 2009. Driving fast-spiking cells induces gamma rhythm and controls sensory responses. *Nature* **459**:663–667. doi:10.1038/nature08002
- Carulli D, Pizzorusso T, Kwok JCF, Putignano E, Poli A, Forostyak S, Andrews MR, Deepa SS, Glant TT, Fawcett JW. 2010. perineuronal nets and persistent plasticity. doi:10.1093/brain/awq145
- Carulli D, Rhodes KE, Brown DJ, Bonnert TP, Pollack SJ, Oliver K, Strata P, Fawcett JW. 2006. Composition of perineuronal nets in the adult rat cerebellum and the cellular origin of their components. *J Comp Neurol* **494**:559–577. doi:10.1002/cne.20822
- Celio MR, Spreafico R, Biasi S De, Vitellaro-zuccarello L, Vitellaro- L. 1998. Perineuronal nets : past and present **2236**.
- Coleman JE, Nahmani M, Gavornik JP, Haslinger R, Heynen AJ, Erisir A, Bear MF. 2010. Rapid Structural Remodeling of Thalamocortical Synapses Parallels Experience-Dependent Functional Plasticity in Mouse Primary Visual Cortex. *J Neurosci* **30**:9670–9682. doi:10.1523/JNEUROSCI.1248-10.2010
- Connors BW, Gutnick M. 1990. Intrinsic firing patterns of diverse neocortical neurons. *Trend in Neurosciences*. doi:doi: 10.1016/0166-2236(90)90185-d
- Crick W, Koch C. 1990. Towards a neurobiological theory of consciousness. *Semin Neurosci* **2**:263–275. doi:10.3828/sj.2016.25.2.9
- Cuttoli RD, Mondoloni S, Marti F, Lemoine D, Maskos U, Trauner D, Kramer RH, Faure P, Mourot A. 2018. Manipulating midbrain dopamine neurons and reward-related behaviors with light-controllable nicotinic acetylcholine receptors 1–23.
- Daw NW, Fox K, Sato H, D. C. 1992. Critical period for monocular deprivation in the cat visual cortex. *J Neurophysiol* **67**:1–6.
- DeFelipe J. 1997. Types of neurons, synaptic connections and chemical characteristics of cells immunoreactive for calbindin-D28K, parvalbumin and calretinin in the neocortex. *J Chem Neuroanat* **14**:1–19. doi:10.1016/S0891-0618(97)10013-8
- Dehorter N, Marin O, Ciceri G, Bartolini G, Lim L, del Pino I, Marin O. 2015. Tuning of fast-spiking interneuron properties by an activity-dependent transcriptional switch. *Science (80-)* **349**:1216–1220. doi:10.1126/science.aab3415
- del Rio JA, Lecea L de, Ferrer I, Soriano E. 1994. The development of parvalbumin-immunoreactivity in the neocortex of the mouse. *Dev Brain Res*. doi:10.1016/0165-3806(94)90311-5
- Devienne G, Gac B Le, Piquet J, Cauli B. 2018a. Single Cell Multiplex Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction After 1–12. doi:10.3791/57627
- Devienne G, Le Gac B, Piquet J, Cauli B. 2018b. Single Cell Multiplex Reverse Transcription

- Polymerase Chain Reaction After Patch-clamp. *J Vis Exp*. doi:10.3791/57627
- Dityatev A, Brückner 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*. doi:10.1002/dneu.22087
- Dityatev A, Schachner M. 2003. Extracellular matrix molecules and synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci*. doi:10.1016/S0006-3495(81)84838-2
- Dräger UC. 1975. Receptive fields of single cells and topography in mouse visual cortex. *J Comp Neurol*.
- Dragoi V, Sharma J, Sur M. 2000. Adaptation-Induced Plasticity of Orientation Tuning in Adult Visual Cortex These phenomena raise the question of whether orientation selectivity in adult V1 can undergo. *Neuron* **28**:287–298. doi:10.1016/S0896-6273(00)00103-3
- Dunn JR, Reed JE, Plessis DG, Shaw EJ, Reeves P, Gee AL, Warnke P, Walker C. 2006. Expression of ADAMTS-8 , a secreted protease with antiangiogenic properties , is downregulated in brain tumours 1186–1193. doi:10.1038/sj.bjc.6603006
- Edwards FA, Konnerth A, Sakmann B, Takahashi T. 1989. A thin slice preparation for patch clamp recordings from neurones of the mammalian central nervous system. *Pflügers Arch Eur J Physiol* **414**:600–612. doi:10.1007/BF00580998
- Ethell E and. 2011. Matrix Metalloproteinases in Brain Development and Remodeling: Synaptic Functions and Targets. *J Neurosci Res* **18**:369–376. doi:10.1002/jnr
- 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 Res* **34**:709–720. doi:10.1016/0042-6989(94)90210-0
- Faini G, Aguirre A, Landi S, Lamers D, Pizzorusso T, Ratto GM, Deleuze C, Bacci A. 2018. Perineuronal nets control visual input via thalamic recruitment of cortical PV interneurons. *Elife* 1–21. doi:10.7554/eLife.41520
- Faissner A, Pyka M, Geissler M, Sobik T, Frischknecht R, Gundelfinger ED, Seidenbecher C. 2010. Contributions of astrocytes to synapse formation and maturation - Potential functions of the perisynaptic extracellular matrix. *Brain Res Rev* **63**:26–38. doi:10.1016/j.brainresrev.2010.01.001
- Ferrer-Ferrer M, Dityatev A. 2018. Shaping Synapses by the Neural Extracellular Matrix. *Front Neuroanat* **12**:1–16. doi:10.3389/fnana.2018.00040
- Freitag S, Schachner M, Morellini F. 2003. Behavioral alterations in mice deficient for the extracellular matrix glycoprotein tenascin-R. *Behav Brain Res* **145**:189–207. doi:10.1016/S0166-4328(03)00109-8
- Freund TF, Katona I. 2007. Perisomatic Inhibition. *Neuron* **56**:33–42.

doi:10.1016/j.neuron.2007.09.012

- Frischknecht R, Heine M, Perrais D, Seidenbecher CI, Choquet D, Gundelfinger ED. 2009. Brain extracellular matrix affects AMPA receptor lateral mobility and short-term synaptic plasticity. *Nat Neurosci* **12**:897–904. doi:10.1038/nn.2338
- Garey LJ, Pettigrew JD. 1974. Ultrastructural changes in kitten visual cortex after environmental modification. *Brain Res* **66**:165–172. doi:10.1016/0006-8993(74)90086-9
- Giamanco KA, Morawski M, Matthews RT. 2010. Perineuronal net formation and structure in aggrecan knockout mice. *Neuroscience* **170**:1314–1327. doi:10.1016/j.neuroscience.2010.08.032
- Goldberg EM, Clark BD, Zagha E, Nahmani M, Erisir A, Rudy B. 2008. K⁺ Channels at the Axon Initial Segment Dampen Near-Threshold Excitability of Neocortical Fast-Spiking GABAergic Interneurons. *Neuron* **58**:387–400. doi:10.1016/j.neuron.2008.03.003
- Gordon JA, Stryker MP. 1996. Experience-Dependent Plasticity of Binocular Responses in the Primary Visual Cortex of the Mouse. *J Neurosci*. doi:0270-6474/96/163274-13\$05.00/0
- Grosche J, Bruckner G. 2001. Perineuronal nets show intrinsic patterns of extracellular matrix differentiation in organotypic slice cultures. *Exp Brain Res* **137**:83–93. doi:10.1007/s002210000617
- Guerrero-Tarragó M, Yuste VJ, Iglesias M, Pérez J, Comella JX. 1999. Binding patterns of lectins with GalNAc specificity in the mouse dorsal root ganglia and spinal cord. *J Neurocytol* **28**:75–84. doi:10.1023/A:1007019902494
- Hamel MG, Ajmo JM, Leonardo CC, Zuo F, Sandy JD, Gottschall PE. 2008. Multimodal signaling by the ADAMTSs (a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs) promotes neurite extension. *Exp Neurol* **210**:428–440. doi:10.1016/j.expneurol.2007.11.014
- Hanover JL, Huang ZJ, Tonegawa S, Stryker MP. 1999. Brain-derived neurotrophic factor overexpression induces precocious critical period in mouse visual cortex. *J Neurosci* **19**:RC40. doi:10.1016/j.bbi.2008.05.010
- Harauzov A, Spolidoro M, DiCristo G, De Pasquale R, Cancedda L, Pizzorusso T, Viegi A, Berardi N, Maffei L. 2010. Reducing Intracortical Inhibition in the Adult Visual Cortex Promotes Ocular Dominance Plasticity. *J Neurosci* **30**:361–371. doi:10.1523/JNEUROSCI.2233-09.2010
- Hayani H, Song I, Dityatev A. 2018. Increased Excitability and Reduced Excitatory Synaptic Input Into Fast-Spiking CA2 Interneurons After Enzymatic Attenuation of Extracellular Matrix. *Front Cell Neurosci* **12**:1–13. doi:10.3389/fncel.2018.00149
- He H-Y. 2006. Visual Deprivation Reactivates Rapid Ocular Dominance Plasticity in Adult Visual Cortex. *J Neurosci* **26**:2951–2955. doi:10.1523/JNEUROSCI.5554-05.2006
- Hensch TK. 2005. Critical period plasticity in local cortical circuits. *Nat Rev Neurosci* **6**:877–888.

doi:10.1038/nrn1787

Hensch TK. 2004. CRITICAL PERIOD REGULATION. *Annu Rev Neurosci*.

doi:10.1146/annurev.neuro.27.070203.144327

Hensch TK, Bilimoria PM. 2012. Re-opening Windows: Manipulating Critical Periods for Brain Development. *Cerebrum* 1–11. doi:10.1007/s00216-011-4710-3

Hensch TK, Fagiolini M. 2000a. Inhibitory threshold for critical-period activation in primary visual cortex. *Nature* **404**:183–186. doi:10.1038/35004582

Hensch TK, Fagiolini M. 2000b. Inhibitory threshold for critical-period activation in primary visual cortex. *Nature* **404**:183–186. doi:10.1038/35004582

Hensch TK, Fagiolini M, Mataga N, Stryker MP, Baekkeskov S, Kash SF. 1998. Local GABA Circuit Control of Experience-Dependent Plasticity in Developing Visual Cortex. *Science* (80-).

doi:10.1038/098448b0

Hippenmeyer S, Vrieseling E, Sigrist M, Portmann T, Laengle C, Ladle DR, Arber S. 2005. PLoS BIOLOGY A Developmental Switch in the Response of DRG Neurons to ETS Transcription Factor Signaling **3**. doi:10.1371/journal.pbio.0030159

Hofer SB, Mrsic-Flogel TD, Bonhoeffer T, Hübener M. 2009. Experience leaves a lasting structural trace in cortical circuits. *Nature* **457**:313–317. doi:10.1038/nature07487

Hofer SB, Mrsic-Flogel TD, Bonhoeffer T, Hübener M. 2006. Prior experience enhances plasticity in adult visual cortex. *Nat Neurosci* **9**:127–132. doi:10.1038/nn1610

Hofer Sonja B, Mrsic-Flogel TD, Bonhoeffer T, Hübener M. 2006. Prior experience enhances plasticity in adult visual cortex. *Nat Neurosci* **81**:121–8. doi:10.1152/jn.1999.81.1.121

Hou X, Yoshioka N, Tsukano H, Sakai A, Miyata S, Watanabe Y, Yanagawa Y, Sakimura K, Takeuchi K, Kitagawa H, Hensch TK, Shibuki K, Igarashi M, Sugiyama S. 2017. Chondroitin Sulfate Is Required for Onset and Offset of Critical Period Plasticity in Visual Cortex. *Sci Rep* **7**:1–17. doi:10.1038/s41598-017-04007-x

Houser CR, Hendry SHC, Jones EG, Vaughn JE. 1983. Morphological diversity of immunocytochemically identified GABA neurons in the monkey sensory-motor cortex. *J Neurocytol* **12**:617–638. doi:10.1007/BF01181527

Huang ZJ, Kirkwood A, Pizzorusso T, Porciatti V, Morales B, Bear MF, Maffei L, Tonegawa S. 1999. BDNF Regulates the Maturation of Inhibition and the Critical Period of Plasticity in Mouse Visual Cortex **98**:739–755.

Hubel DH, Wiesel TN. 1974. Sequence regularity and geometry of orientation columns in the monkey striate cortex. *J Comp Neurol* **158**:267–293. doi:10.1002/cne.901580304

Hubel DH, Wiesel TN. 1970. The period of susceptibility to the physiological effects of unilateral eye

- closure in kittens. *J Neurosci*.
- Hubel DH, Wiesel TN. 1959. Receptive fields of single neurones in the cat's striate cortex. *J Physiol* **148**:574–591. doi:10.1113/jphysiol.1959.sp006308
- Iwai Y, Fagiolini M, Obata K, Hensch TK. 2003. Rapid critical period induction by tonic inhibition in visual cortex. *J Neurosci* **23**:6695–702. doi:23/17/6695 [pii]
- Jones EG. 1993. Gabaergic neurons and their role in cortical plasticity in primates. *Cereb Cortex* **3**:361–372. doi:10.1093/cercor/3.5.361-a
- Katagiri H, Fagiolini M, Hensch TK. 2007. Optimization of Somatic Inhibition at Critical Period Onset in Mouse Visual Cortex. *Neuron* **53**:805–812. doi:10.1016/j.neuron.2007.02.026
- Kawaguchi Y. 1995. Physiological subgroups of nonpyramidal cells with specific morphological characteristics in layer II/III of rat frontal cortex. *J Neurosci* **15**:2638–2655. doi:10.1523/JNEUROSCI.15-04-02638.1995
- Kawaguchi Y. 1993. Physiological, morphological, and histochemical characterization of three classes of interneurons in rat neostriatum. *J Neurosci* **13**:4908–23. doi:10.1523/jneurosci.5027-04.2005
- Kawaguchi Y, Katsumaru H, Kosaka T, Heizmann CW, Hama K. 1987. Fast spiking cells in rat hippocampus (CA1 region) contain the calcium-binding protein parvalbumin. *Brain Res* **416**:369–374. doi:10.1016/0006-8993(87)90921-8
- Kawaguchi Y, Kubota Y. 1997. GABAergic cell subtypes and their synaptic connections in neocortex. *Neurosci Res* **25**:S11. doi:10.1016/0168-0102(96)88582-8
- Knudsen EI. 2004. Sensitive Periods in the Development of the Brain and Behavior,” *Journal of Cognitive Neuroscience*, 16(8): 1412-1425, 2004 1412–1425.
- Knudsen F, Knudsen P., Esterly SD. 1984. A critical localization occlusion. *J Neurosci* **4**:1012–1020.
- Kramer RH, Mourof A, Adesnik H. 2013. Optogenetic pharmacology for control of native neuronal signaling proteins. *Nat Neurosci* **16**:816–823. doi:10.1038/nn.3424
- Kubota Y, Hattori R, Yui Y. 1994. Three distinct subpopulations of GABAergic neurons in rat frontal agranular cortex. *Brain Res* **649**:159–173. doi:10.1016/0006-8993(94)91060-X
- Kuffler SW. 1953. Discharge Patterns and Functional Organization of Mammalian Retina. *J Neurophysiol* **16**:37–68. doi:10.1152/jn.1953.16.1.37
- Kuhlman SJ, Olivas ND, Tring E, Ikrar T, Xu X, Trachtenberg JT. 2013. plasticity in the visual cortex. *Nature* **501**:543–546. doi:10.1038/nature12485
- Kwok JCF, Carulli D, Fawcett JW. 2010. In vitro modeling of perineuronal nets: hyaluronan synthase and link protein are necessary for their formation and integrity. *J Neurochem*. doi:10.1111/j.1471-4159.2010.06878.x

- Kwok JCF, Dick G, Wang D, Fawcett JW. 2011. Extracellular matrix and perineuronal nets in CNS repair. *Dev Neurobiol* **71**:1073–1089. doi:10.1002/dneu.20974
- Lambolez B, Audinat E, Bochet P, Crépel F, Rossier J. 1992. AMPA receptor subunits expressed by single purkinje cells. *Neuron* **9**:247–258. doi:10.1016/0896-6273(92)90164-9
- Lanzarevich, I. A, Stasenko, S. V, Rozhnova, M. A, Pankratova, E. V, Dityatev, A. E, Kazantsev, V. B. 2018. Dynamics of the brain extracellular matrix governed by interactions with neural cells 1–7.
- Lau D, de Miera EV-S, Contreras D, Ozaita A, Harvey M, Chow A, Noebels JL, Paylor R, Morgan JI, Leonard CS, Rudy B. 2000. Impaired Fast-Spiking, Suppressed Cortical Inhibition, and Increased Susceptibility to Seizures in Mice Lacking Kv3.2 K⁺ Channel Proteins. *J Neurosci* **20**:9071–9085. doi:20/24/9071 [pii]
- Lee AT, Gee SM, Vogt D, Patel T, Rubenstein JL, Sohal VS. 2014. Pyramidal neurons in prefrontal cortex receive subtype-specific forms of excitation and inhibition. *Neuron* **81**:61–68. doi:10.1016/j.neuron.2013.10.031
- Lemarchant S, Pruvost M, Montaner J, Emery E, Vivien D, Kanninen K, Koistinaho J. 2013. ADAMTS proteoglycanases in the physiological and pathological central nervous system. *J Neuroinflammation* **10**:1–8. doi:10.1186/1742-2094-10-133
- Lensjø KK, Lepperød ME, Dick G, Hafting T, Fyhn M. 2017. Removal of Perineuronal Nets Unlocks Juvenile Plasticity Through Network Mechanisms of Decreased Inhibition and Increased Gamma Activity. *J Neurosci* **37**:1269–1283. doi:10.1523/JNEUROSCI.2504-16.2016
- Liu H, Gao P-F, Xu H-W, Liu M-M, Yu T, Yao J-P, Yin Z-Q. 2013. Perineuronal nets increase inhibitory GABAergic currents during the critical period in rats. *Int J Ophthalmol* **6**:120–5. doi:10.3980/j.issn.2222-3959.2013.02.02
- Magnus CJ, Lee PH, Atasoy D, Su HH, Looger LL, Sternson SM. 2011. Chemical and genetic engineering of selective ligand-ion channel interactions. *Science (80-)* **333**:1292–1296. doi:10.1126/science.1206606
- Majewska A, Sur M. 2003. Motility of dendritic spines in visual cortex in vivo: Changes during the critical period and effects of visual deprivation. *Proc Natl Acad Sci* **100**:16024–16029. doi:10.1073/pnas.2636949100
- Manseau F, Marinelli S, Méndez P, Schwaller B, Prince DA, Huguenard JR, Bacci A. 2010. Desynchronization of neocortical networks by asynchronous release of GABA at autaptic and synaptic contacts from fast-spiking interneurons. *PLoS Biol* **8**. doi:10.1371/journal.pbio.1000492
- Marín O. 2012. Interneuron dysfunction in psychiatric disorders. *Nat Rev Neurosci* **13**:107–120. doi:10.1038/nrn3155
- Mataga N, Mizuguchi Y, Hensch TK. 2004. Experience-dependent pruning of dendritic spines in visual cortex by tissue plasminogen activator. *Neuron* **44**:1031–1041.

doi:10.1016/j.neuron.2004.11.028

- McCormick DA, Connors BW, Lighthall JW, Prince DA. 1985. Comparative electrophysiology of pyramidal and sparsely spiny stellate neurons of the neocortex. *J Neurophysiol* **54**:782–806. doi:10.1152/jn.1985.54.4.782
- McGee A, Yang Y, Fischer Q, Daw NW, Strittmatter SM. 2005. Experience-Driven Plasticity of Visual Cortex Limited by Myelin and Nogo Receptor. *Science (80-)* **309**:2222–2226. doi:10.1126/science.1114362.Experience-Driven
- McRae PA, Rocco MM, Kelly G, Brumberg JC, Matthews RT. 2007. Sensory Deprivation Alters Aggrecan and Perineuronal Net Expression in the Mouse Barrel Cortex. *J Neurosci* **27**:5405–5413. doi:10.1523/JNEUROSCI.5425-06.2007
- Méndez P, Bacci A. 2011. Assortment of GABAergic plasticity in the cortical interneuron melting pot. *Neural Plast* **2011**. doi:10.1155/2011/976856
- Milev P, Maurel P, Chiba A, Mevissen M, Popp S, Yamaguchi Y, Margolis K, Margolis RU. 1998. Differential Regulation of Expression of Hyaluronan- Binding Proteoglycans in Developing Brain : *Biochem Biophys Res Commun* **212**:207–212.
- Morishita H, Miwa JM, Heintz N, Hensch TK. 2010. Lynx1, a cholinergic brake limits plasticity in adult visual cortex. *Science (80-)*. doi:10.1016/j.neuroimage.2013.08.045.The
- Mountcastle VB. 1997. The columnar organization of the neocortex. *Brain* **120**:701–722. doi:10.1093/brain/120.4.701
- Murakami T, Taguchi T, Ohtsuka A, Kikuta A. 1993. Neurons with strongly negative-charged surface-coats in adult rat brain as detected by staining with cationic iron colloid. *Arch Histol Cytol* **56**:13–21. doi:10.1679/aohc.56.13
- Nabel EM, Morishita H. 2013. Regulating critical period plasticity: Insight from the visual system to fear circuitry for therapeutic interventions. *Front Psychiatry* **4**:1–8. doi:10.3389/fpsy.2013.00146
- Nagy V. 2006. Matrix Metalloproteinase-9 Is Required for Hippocampal Late-Phase Long-Term Potentiation and Memory. *J Neurosci* **26**:1923–1934. doi:10.1523/JNEUROSCI.4359-05.2006
- Nakamura H, Fujii Y, Inoki I, Sugimoto K, Tanzawa K, Matsuki H, Miura R, Yamaguchi Y, Okada Y. 2000. Brevican Is Degraded by Matrix Metalloproteinases and Aggrecanase-1 (ADAMTS4) at Different Sites * **275**:38885–38890. doi:10.1074/jbc.M003875200
- Nowicka D, Soulsby S, Skangiel-Kramska J, Glazewski S. 2009. Parvalbumin-containing neurons, perineuronal nets and experience-dependent plasticity in murine barrel cortex. *Eur J Neurosci* **30**:2053–2063. doi:10.1111/j.1460-9568.2009.06996.x
- Okaty BW, Miller MN, Sugino K, Hempel CM, Nelson SB. 2009. Transcriptional and Electrophysiological Maturation of Neocortical Fast-Spiking GABAergic Interneurons **29**:7040–

7052. doi:10.1523/JNEUROSCI.0105-09.2009

Olson CR, Freeman RD. 1980. Profile of the sensitive period for monocular deprivation in kittens. *Exp Brain Res* **39**.

Oray S, Majewska A, Sur M. 2004. Dendritic {Spine} {Dynamics} {Are} {Regulated} by {Monocular} {Deprivation} and {Extracellular} {Matrix} {Degradation}. *Neuron* **44**:1021–1030.
doi:10.1016/j.neuron.2004.12.001

Pégard NC, Mardinly AR, Oldenburg IA, Sridharan S, Waller L, Adesnik H. 2017. Three-dimensional scanless holographic optogenetics with temporal focusing (3D-SHOT). *Nat Commun* **8**:1–14.
doi:10.1038/s41467-017-01031-3

Pellerin et al. 2007. Activity-Dependent Regulation of Energy Metabolism by Astrocytes: An Update. *Glia*. doi:10.1002/glia

Pellerin L, Magistretti PJ. 1994. Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. *Proc Natl Acad Sci* **91**:10625–10629.
doi:10.1073/pnas.91.22.10625

Perova Z, Delevich K, Li B. 2015. Depression of Excitatory Synapses onto Parvalbumin Interneurons in the Medial Prefrontal Cortex in Susceptibility to Stress. *J Neurosci* **35**:3201–3206.
doi:10.1523/JNEUROSCI.2670-14.2015

Perry Hugh V. JARN and CH. 2010. Microglia in neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurol*.
doi:10.1038/nrneurol.2010.17

Pham TA, Graham SJ, Suzuki S, Barco A, Kandel ER, Gordon B, Lickey ME. 2004. A semi-persistent adult ocular dominance plasticity in visual cortex is stabilized by activated CREB. *Learn Mem* **11**:738–747. doi:10.1101/lm.75304

Pizzorusso T, Medini P, Berardi N, Chierzi S, Fawcett JW, Maffei L. 2002. Reactivation of ocular dominance plasticity in the adult visual cortex. *Science (80-)* **298**:1248–1251.
doi:10.1126/science.1072699

Pizzorusso T, Medini P, Landi S, Baldini S, Berardi N, Maffei L. 2006. Structural and functional recovery from early monocular deprivation in adult rats. *PNAS*.
doi:10.1002/apmc.1993.052090101

Pouille F, Scanziani M. 2001. Enforcement of Temporal Fidelity in Pyramidal Cells by Somatic Feed-Forward Inhibition. *Clin Orthod Res*. doi:10.1016/j.cub.2015.10.018

Raghanti MA. 2010. A comparative perspective on minicolumns and inhibitory GABAergic interneurons in the neocortex. *Front Neuroanat* **4**:1–10. doi:10.3389/neuro.05.003.2010

Reimers S, Hartlage-Rübsamen M, Brückner G, Roßner S. 2007. Formation of perineuronal nets in organotypic mouse brain slice cultures is independent of neuronal glutamatergic activity. *Eur J*

- Neurosci* **25**:2640–2648. doi:10.1111/j.1460-9568.2007.05514.x
- Rossier J, Bernard A, Cabungcal J, Perrenoud Q, Savoye A, Gallopin T, Hawrylycz M, Cuénod M, Do K, Urban A. 2015. Cortical fast-spiking parvalbumin interneurons enwrapped in the perineuronal net express the metallopeptidases Adamts8 , Adamts15 and Nephilysin 154–161. doi:10.1038/mp.2014.162
- Roux L, Buzsáki G. 2015. Tasks for inhibitory interneurons in intact brain circuits. *Neuropharmacology* **88**:10–23. doi:10.1016/j.neuropharm.2014.09.011
- Rudy B, McBain CJ. 2001. Kv3 channels: voltage-gated K⁺ channels designed for high-frequency repetitive firing. *TRENDS Neurosci* **24**:1–10. doi:10.1016/S0166-2236(00)01892-0
- S Ramon y Cajal. 1995. *Histology of the Nervous System*, trans. Swanson, N. & Swanson, LW. *Oxford Univ Press Oxford*.
- Saghatelian AK, Dityatev A, Schmidt S, Schuster T, Bartsch U, Schachner M. 2001. Reduced perisomatic inhibition, increased excitatory transmission, and impaired long-term potentiation in mice deficient for the extracellular matrix glycoprotein tenascin-R. *Mol Cell Neurosci* **17**:226–240. doi:10.1006/mcne.2000.0922
- Sale A, Vetencourt FM, Medini P, Cenni MC, Baroncelli L, Pasquale R De, Maffei L. 2007. Environmental enrichment in adulthood promotes amblyopia recovery through a reduction of intracortical inhibition. *Nat Neurosci* **6**:679–681. doi:10.1038/nn1899
- Sato M, Stryker MP. 2008a. Distinctive Features of Adult Ocular Dominance Plasticity. *J Neurosci* **28**:10278–10286. doi:10.1523/JNEUROSCI.2451-08.2008
- Sato M, Stryker MP. 2008b. Distinctive Features of Adult Ocular Dominance Plasticity. *J Neurosci* **28**:10278–10286. doi:10.1523/JNEUROSCI.2451-08.2008
- Sawtell NB, Frenkel MY, Philpot BD, Nakazawa K, Tonegawa S, Bear MF. 2003. NMDA-Receptor-Dependent-Ocular-Dominance-Plasticity-in-Adult-Visual-Cortex_2003_Neuron **38**:977–985.
- Seeger G, Brauer K, Härtig W, Brückner G. 1994. Mapping of perineuronal nets in the rat brain stained by colloidal iron hydroxide histochemistry and lectin cytochemistry. *Neuroscience* **58**:371–388. doi:10.1016/0306-4522(94)90044-2
- Slaker M, Churchill L, Todd RP, Blacktop JM, Zuloaga DG, Raber J, Darling RA, Brown TE, Sorg BA. 2015. Removal of Perineuronal Nets in the Medial Prefrontal Cortex Impairs the Acquisition and Reconsolidation of a Cocaine-Induced Conditioned Place Preference Memory. *J Neurosci* **35**:4190–4202. doi:10.1523/JNEUROSCI.3592-14.2015
- Smith SL, Trachtenberg JT. 2007. Experience-dependent binocular competition in the visual cortex begins at eye opening. *Nat Neurosci* **10**:370–375. doi:10.1038/nn1844
- Sohal VS, Zhang F, Yizhar O, Deisseroth K. 2009. Parvalbumin neurons and gamma rhythms

- enhance cortical circuit performance. *Nature* **459**:698–702. doi:10.1038/nature07991
- Sohn J, Okamoto S, Kataoka N, Kaneko T, Nakamura K, Hioki H. 2016. Differential Inputs to the Perisomatic and Distal-Dendritic Compartments of VIP-Positive Neurons in Layer 2/3 of the Mouse Barrel Cortex. *Front Neuroanat* **10**:1–18. doi:10.3389/fnana.2016.00124
- Song I, Dityatev A. 2018. Crosstalk between glia, extracellular matrix and neurons. *Brain Res Bull* **136**:101–108. doi:10.1016/j.brainresbull.2017.03.003
- Sorg BA, Berretta S, Blacktop JM, Fawcett JW, Kitagawa H, Kwok JCF, Miquel M. 2016. Casting a Wide Net: Role of Perineuronal Nets in Neural Plasticity. *J Neurosci* **36**:11459–11468. doi:10.1523/JNEUROSCI.2351-16.2016
- Spatazza J, Lee HHC, DiNardo AA, Tibaldi L, Joliot A, Hensch TK, Prochiantz A. 2013. Choroid-Plexus-Derived Otx2 Homeoprotein Constrains Adult Cortical Plasticity. *Cell Rep* **3**:1815–1823. doi:10.1016/j.celrep.2013.05.014
- Stachniak TJ, Ghosh A, Sternson SM. 2014. Chemogenetic Synaptic Silencing of Neural Circuits Localizes a Hypothalamus→Midbrain Pathway for Feeding Behavior. *Neuron* **82**:797–808. doi:10.1016/j.neuron.2014.04.008
- Stanton H, Melrose J, Little CB, Fosang AJ. 2011. Biochimica et Biophysica Acta Proteoglycan degradation by the ADAMTS family of proteinases. *BBA - Mol Basis Dis* **1812**:1616–1629. doi:10.1016/j.bbadis.2011.08.009
- Sternlicht MD, Werb Z. 2007. H O w M Atrix M Etalloproteinases. *Annu Rev Cell Dev Biol* 463–516.
- Sternson SM, Roth BL. 2014. Chemogenetic Tools to Interrogate Brain Functions. *Annu Rev Neurosci* **37**. doi:10.1146/annurev-neuro-071013-014048
- Storm-Mathisen J, Leknes AK, Bore AT, Vaaland JL, Edminson P, Haug F-MŠ, Ottersen OP. 1983. © 1983 Nature Publishing Group. *Nature* **301**:517–520. doi:10.1038/301517a0
- Stryker MP, Sherk H, Leventhal AG, Hirsch H V. 1978. Physiological consequences for the cat's visual cortex of effectively restricting early visual experience with oriented contours. *J Neurophysiol* **41**:896–909. doi:10.1152/jn.1978.41.4.896
- Stuart G, Dodt H, Sakmann B. 1993. Patch-clamp recordings from the soma and dendrites of neurons in brain slices using infrared video microscopy. *Pflügers Arch Eur J Physiol* **423**:511–518. doi:10.1007/BF00374949
- Sugiyama S, Nardo AAD, Aizawa S, Matsuo I, Volovitch M, Prochiantz A, K.Hensch T. 2008. Experience-Dependent Transfer of Otx2 Homeoprotein into the Visual Cortex Activates Postnatal Plasticity. *Cell*. doi:10.1016/j.cell.2008.05.054
- Sugiyama S, Prochiantz A, Hensch TK. 2009. From brain formation to plasticity: Insights on Otx2 homeoprotein. *Dev Growth Differ* **51**:369–377. doi:10.1111/j.1440-169X.2009.01093.x

- Syken J, GrandPre T, Kanold PO, Shatz CJ. 2006. PirB restricts ocular-dominance plasticity in visual cortex. *Science (80-)* **313**:1795–1800. doi:10.1126/science.1128232
- Taha S, Hanover JL, Silva AJ, Stryker MP. 2002. Autophosphorylation of α CaMKII Is required for ocular dominance plasticity. *Neuron* **36**:483–491. doi:10.1016/S0896-6273(02)00966-2
- Takesian AE, Hensch TK. 2013. Balancing plasticity/stability across brain development, 1st ed, Progress in Brain Research. Elsevier B.V. doi:10.1016/B978-0-444-63327-9.00001-1
- Tasic B, Menon V, Nguyen TN, Kim TK, Jarsky T, Yao Z, Levi B, Gray LT, Sorensen SA, Dolbeare T, Bertagnolli D, Goldy J, Shapovalova N, Parry S, Lee C, Smith K, Bernard A, Madisen L, Sunkin SM, Hawrylycz M, Koch C, Zeng H. 2016. Adult mouse cortical cell taxonomy revealed by single cell transcriptomics. doi:10.1038/nn.4216
- Tauchi R, Imagama S, Natori T, Ohgomori T, Muramoto A, Shinjo R, Matsuyama Y, Ishiguro N. 2012. The endogenous proteoglycan-degrading enzyme ADAMTS-4 promotes functional recovery after spinal cord injury. *J Neuroinflammation* **53**.
- Tomioka R, Okamoto K, Furuta T, Fujiyama F, Iwasato T, Yanagawa Y, Obata K, Kaneko T, Tamamaki N. 2005. Demonstration of long-range GABAergic connections distributed throughout the mouse neocortex. *Eur J Neurosci* **21**:1587–1600. doi:10.1111/j.1460-9568.2005.03989.x
- Toyoizumi T, Kaneko M, Stryker MP, Miller KD. 2014. Modeling the Dynamic Interaction of Hebbian and Homeostatic Plasticity. *Neuron* **84**:497–510. doi:10.1016/j.neuron.2014.09.036
- Trachtenberg JT, Stryker MP. 2001. Rapid Anatomical Plasticity of Horizontal Connections in the Developing Visual Cortex. *J Neurosci* **21**:3476–3482. doi:10.1523/JNEUROSCI.21-10-03476.2001
- Vetencourt JFM, Sale A, Viegi A, Baroncelli L, Pasquale R De, O’Leary OF, Castrén E, Maffei L. 2008. The Antidepressant Fluoxetine Restores Plasticity in the Adult Visual Cortex. *Science (80-)* **319**:1490–1492. doi:10.1126/science.1150516
- Wang D, Fawcett J. 2012. The perineuronal net and the control of CNS plasticity 147–160. doi:10.1007/s00441-012-1375-y
- Weber P, Bartsch U, Rasband MN, Czaniera R, Lang Y, Bluethmann H, Margolis RU, Levinson SR, Shrager P, Montag D, Schachner M. 1999. Mice deficient for tenascin-R display alterations of the extracellular matrix and decreased axonal conduction velocities in the CNS. *J Neurosci* **19**:4245–62. doi:10.1523/JNEUROSCI.19-11-04245.1999
- Wen TH, Afroz S, Reinhard SM, Palacios AR, Tapia K, Binder DK, Razak KA, Ethell IM. 2017. Genetic Reduction of Matrix Metalloproteinase-9 Promotes Formation of Perineuronal Nets Around Parvalbumin-Expressing Interneurons and Normalizes Auditory Cortex Responses in Developing Fmr1 Knock-Out Mice. *Cereb Cortex* **1–14**. doi:10.1093/cercor/bhx258
- Wiesel TN, Hubel DH. 1963. Responses in Striate Deprived of Vision Cortex of One Eye. *J*

Neurophysiol **26**:1003–1017. doi:10.1152/jn.1963.26.6.1003

Winter F De, Kwok JCF, Fawcett JW, Vo TT, Carulli D, Verhaagen J. 2016. The Chemorepulsive Protein Semaphorin 3A and Perineuronal Net-Mediated Plasticity **2016**.

Ye Q, Miao Q. 2014. Experience-dependent Development of Perineuronal Nets and Chondroitin Sulfate Proteoglycan Receptors in ... *Matrix Biol* **32**:352–363. doi:10.1016/j.matbio.2013.04.001

Ye Q, Miao Q. 2013. Experience-dependent development of perineuronal nets and chondroitin sulfate proteoglycan receptors in mouse visual cortex. *Matrix Biol* **32**:352–363. doi:10.1016/j.matbio.2013.04.001

Yoshimura Y, Callaway EM. 2005. Fine-scale specificity of cortical networks depends on inhibitory cell type and connectivity. *Nat Neurosci* **8**:1552–1559. doi:10.1038/nn1565

Yu X, Duan K, Shang C, Yu H, Zhou Z. 2003. Calcium influx through hyperpolarization-activated cation channels (I h channels) contributes to activity-evoked neuronal secretion.

Zimmermann DR, Dours-Zimmermann MT. 2008. Extracellular matrix of the central nervous system: From neglect to challenge. *Histochem Cell Biol* **130**:635–653. doi:10.1007/s00418-008-0485-9

Zuo Y, Lin A, Chang P, Gan WB. 2005. Development of long-term dendritic spine stability in diverse regions of cerebral cortex. *Neuron* **46**:181–189. doi:10.1016/j.neuron.2005.04.001

ANNEXES

Video Article

Single Cell Multiplex Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction After Patch-clamp

Gabrielle Devienne^{*1}, Benjamin Le Gac^{*1}, Juliette Piquet^{*1}, Bruno Cauli¹

¹UPMC Univ Paris 06, INSERM, CNRS, Neuroscience Paris Seine - Institut de Biologie Paris Seine (NPS - IBPS), Sorbonne Université

*These authors contributed equally

Correspondence to: Bruno Cauli at bruno.cauli@upmc.fr

URL: <https://www.jove.com/video/57627>

DOI: [doi:10.3791/57627](https://doi.org/10.3791/57627)

Keywords: Neuroscience, Issue 136, Gene expression profile, neurons, astrocytes, brain slices, whole-cell configuration, nested polymerase chain reaction (PCR)

Date Published: 6/20/2018

Citation: Devienne, G., Le Gac, B., Piquet, J., Cauli, B. Single Cell Multiplex Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction After Patch-clamp. *J. Vis. Exp.* (136), e57627, doi:10.3791/57627 (2018).

Abstract

The cerebral cortex is composed of numerous cell types exhibiting various morphological, physiological, and molecular features. This diversity hampers easy identification and characterization of these cell types, prerequisites to study their specific functions. This article describes the multiplex single cell reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) protocol, which allows, after patch-clamp recording in slices, to detect simultaneously the expression of tens of genes in a single cell. This simple method can be implemented with morphological characterization and is widely applicable to determine the phenotypic traits of various cell types and their particular cellular environment, such as in the vicinity of blood vessels. The principle of this protocol is to record a cell with the patch-clamp technique, to harvest and reverse transcribe its cytoplasmic content, and to detect qualitatively the expression of a predefined set of genes by multiplex PCR. It requires a careful design of PCR primers and intracellular patch-clamp solution compatible with RT-PCR. To ensure a selective and reliable transcript detection, this technique also requires appropriate controls from cytoplasm harvesting to amplification steps. Although precautions discussed here must be strictly followed, virtually any electrophysiological laboratory can use the multiplex single cell RT-PCR technique.

Video Link

The video component of this article can be found at <https://www.jove.com/video/57627/>

Introduction

The cerebral cortex comprises numerous cell types involved in various physiological processes. Their identification and characterization, a prerequisite to the understanding of their specific functions, can be very challenging given the large morphological, physiological, and molecular diversity that characterizes cortical cell types^{1,2,3,4}.

Single-cell multiplex RT-PCR is based on the combination of patch-clamp and RT-PCR techniques. It can probe simultaneously the expression of more than 30 predefined genes in electrophysiologically identified cells⁵. The inclusion of a neuronal tracer in the recording pipette further allows the morphological characterization of the recorded cells after histochemical revelation^{6,7,8,9,10}. It is a very useful technique for the classification of neuronal types based on multivariate analysis of their phenotypic traits^{5,9,10,11,12,13,14}. Single cell multiplex RT-PCR is also suited to the characterization of non-neuronal cells such as astrocytes^{15,16,17}, and can be virtually applied to every brain structure^{18,19,20,21,22,23} and cell type, assuming they can be recorded in whole-cell configuration.

This technique is very convenient for the identification of cellular sources and/or targets of transmission systems^{7,8,15,16,20,21,24,25,26,27,28}, especially when specific antibodies are lacking. It relies on patch-clamp recordings from visually identified cells²⁹, and thus also allows the targeting of cells in a specific cellular environment^{8,15,16}. Furthermore since the cytoarchitecture of brain tissue is preserved in brain slices, this approach also enables study of the anatomical relationships of the characterized cells with neuronal and non-neuronal elements^{7,8,18}.

Since this technique is limited by the amount of harvested cytoplasm and by the efficiency of the RT, the detection of mRNA expressed at low copy number can be difficult. Although other approaches based on RNaseq technology allow to analyze the whole transcriptome of single cells^{3,4,30,31}, they need high-throughput expensive sequencers not necessarily available to every laboratory. Since the single cell multiplex RT-PCR technique uses end-point PCR, it only requires widely available thermocyclers. It can be easily developed in laboratories equipped with electrophysiological set-ups and does not require expensive equipment. It can provide, within one day, a qualitative analysis of the expression of a predefined set of genes. Thus, this approach offers an easy access to the molecular characterization of single cells in a rapid manner.

Protocol

All experimental procedures using animals were performed in strict accordance with French regulations (Code Rural R214/87 to R214/130) and conformed to the ethical guidelines of both the European Economic Community (86/609/EEC) and the French National Charter on the ethics of animal experimentation. All protocols were approved by the Charles Darwin ethics committee and submitted to the French Ministry of Education and Research (Approval 2015 061011367540). The IBPS animal facility is accredited by the French authorities (A75-05-24).

1. Preliminary Considerations

Note: To avoid contaminations, conform to the following recommendations before undertaking single cell RT-PCR after patch-clamp.

1. Do not use plasmids containing genes of interest in the laboratory as they are a potential source of contamination.
2. Reserve a lab bench away from the gel electrophoresis room to prepare PCRs.
3. Dedicate a set of pipettes and aerosol resistant filter tips to manipulate DNA and RNA at concentrations lower than 1 ng/ μ L. Never use these to analyze PCR products.
4. Always use RNase- and DNase-free products and wear gloves.
5. Use dedicated chemicals for preparing internal patch-clamp solutions. Never use a spatula but rather weighing paper to weigh powders.
6. Use a dedicated pH electrode and pH standard solutions, as they can be a source of contamination (e.g., RNase).
7. Store borosilicate glass capillaries; 20 μ L long, fine and flexible tips; a 20 μ L micropipette; a home-made expeller (patch-clamp pipette holder attached to a 10 mL syringe); 500 μ L PCR tubes; 10 μ L aerosol resistant filter tips; and thin permanent markers in a dedicated box (**Figure 1**).

2. Primer Design

Note: Multiplex RT-PCR relies on two amplification steps. During the first PCR, all the genes of interest are co-amplified by mixing together all PCR primers. To detect reliably transcripts from single cells, it is essential to design efficient and selective PCR primers. The use of nested (internal) primers for the second rounds of PCR improves both the specificity and the efficiency of the amplification.

1. Retrieve the curated mRNA sequences of the genes of interest in NCBI Reference Sequence Database³² as well as those of their related family (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/>).
 1. Enter the name of the gene(s) and the species of interest as a query and click on the retrieved relevant sequence.
 2. To restrict the analysis to the coding sequence of the gene(s), click on **Send to** (upper right corner), and select **Coding sequences** and **FASTA Nucleotide** as format. Then click on **Create File** and save the FASTA sequence using a ".nt" file extension.
2. Use MACAW software³³ (Multiple Alignment Construction & Analysis Workbench) or any other multiple alignment software to determine the regions of homology.
 1. Click on **File | New Project...** and select **DNA** as the sequence type. To import the gene sequences, select **Sequence | Import Sequence...** and load a ".nt" file. Repeat the procedure for all related sequences.
 2. Click and drag all sequences in the **Schematic** window to select the entire sequences.
 3. Search the regions of homology by selecting **Alignment | Search for Blocks...** (CTRL+S). Select **Segment pair overlap** in **Search Method**. Adjust the **Pairwise score cutoff** to a relatively high value (e.g., 1,000) and the **Min. seqs. per block** to the total number of sequences to align and click on **Begin**.
 4. In the appearing **Search Result** window, select the result(s) with the highest MP-score and click on **Link**. If no result is found, decrease the **Pairwise score cutoff** and/or the **Min. seqs. per block**.
 5. To facilitate the visualization of homologous regions, select **Alignment | Shading | Mean score**.
 6. Select unlinked parts of the sequences and repeat the steps 2.2.3–2.2.4 to potentially determine other regions of homology with a lower MP-score.
 7. To obtain the most specific primers, select the regions with the least sequence homology.
3. Fetch the sequences of all splice variants and repeat steps 2.2.1–2.2.6. Select their common regions for an overall detection. Consider alternative cassettes for dedicated splice variants analyses^{20,34,35,36}.
4. Align the mRNA sequences on the animal model genome using BLAST³⁷ genomes (Basic Local Alignment Search Tool) to determine the intron-exon structure of the genes (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).
 1. Select the BLAST mouse genome by clicking on **Mouse** and upload the retrieved FASTA sequence in the **Enter Query Sequence** section. In the **Program Selection**, select **Optimize for Highly similar sequences (megablast)**, then click on the **BLAST** button.
 2. In the **Descriptions** section, select the alignment with the highest Identity (up to 100%). Make sure that it corresponds to the gene of interest as indicated in **features** of the **Alignments** section.
 3. Sort the alignment by **Query start position** in the same section to obtain the exons succession of the coding sequence. Note the start and end positions of all hits which roughly correspond to the position of the introns on the query sequence (**Figure 2A**).
5. Select two different exons for the sense and antisense primers to differentiate easily cDNA from genomic DNA (gDNA) amplification based on a size criterion (**Figure 2**).

Note: The amplification of gDNA can occur at a low frequency when the nucleus is harvested with the cytoplasm. Thus, it is essential to design intron overspanning primer pairs (**Figure 2A**). In case of intron-less genes, the collection of the nucleus is problematic as it can lead to potentially confounding results. To address this issue, include a set of primers aimed at amplifying an intronic sequence to probe for the presence of gDNA²⁵. If the genomic control is positive, the results for all intron-less genes must be discarded.

6. To achieve an efficient amplification, select primers generating amplicons with a length ideally comprised between 200 and 400 base pairs (**Figure 2**).
7. To amplify simultaneously various cDNAs during the multiplex PCR step, design primers with a length between 18 and 24 nucleotides and a melting temperature (T_m) between 55 and 60 °C.
8. To minimize the formation of secondary structures, which reduce the amplification yield, select sense and anti-sense primers with minimal hairpin and duplex lengths (**Figure 2B**).
9. Design internal primers using the same criteria (steps 2.5–2.8).
10. Verify the specificity of the PCR primers by aligning the primers on the Reference RNA Sequence Database of the organism of interest using a nucleotide BLAST.
 1. In BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), click on **nucleotide BLAST**. Paste the sequence of a primer in the **Enter Query Sequence**.
 2. In the **Choose Search Set** section, click on **Others (nr etc.)**, select **Reference RNA sequences (refseq_rna)** in the **Database** option and specify the organism (e.g., *Mus musculus* (taxid:10090)) to restrict the analysis to the desired species.
 3. In **Program Selection** select **Optimize for Somewhat similar sequences (blastn)**. In the **Algorithm parameters** section reduce the **word size** down to 7 to increase the chance to obtain hits.
11. To design selective primers, keep only those whose sequence has at least 3 mismatches with undesired cDNAs when possible.
12. Order desalted primers at a relatively high concentration (e.g., 200 μM) to ensure that all external primers can be mixed together at a final concentration of 1 μM .

3. Preparation of RT Reagents

1. 5x RT-mix: Prepare in RNase-free water 400 μL of working RT mix solution (5x) containing random primers at 25 μM and dNTPs at 2.5 mM each. Store this working mix as 20 μL aliquots in 500 μL tubes.
2. 20x Dithiothreitol (DTT): Prepare 1 mL of 0.2 M DTT in RNase-free water and store it as 50 μL aliquots.
3. Store 2,500 U of RNase inhibitor (40 U/ μL) and 10,000 U of reverse transcriptase (RTase, 200 U/ μL) as 5 μL aliquots.
4. To ensure an optimal quality of the RT reagents, store the aliquots at -80 °C. Use them for up to 10 cells and only for one day.

4. PCR Validation

1. Prepare cDNAs by doing a reverse transcription on a relatively large amount of total RNA (typically 1 μg) extracted³⁸ from the structure of interest.
 1. Do not use the pipettes dedicated to single cell RT-PCR for these preliminary steps but use the RNase-free pipettes. Dilute total RNA down to 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.
 2. In a 500 μL PCR tube, add 1 μL of diluted total RNA and 8 μL of RNase-free water. Denature at 95 °C for 1 min and cool down the tube on ice.
 3. Add 4 μL of RT 5x buffer supplied by the manufacturer, 4 μL of RT mix solution, 1 μL of RTase, 1 μL of RNase inhibitor, and 1 μL of 200 mM DTT (see Section 3).
 4. Flick the tube, spin it, and incubate overnight at 37 °C.
 5. Store the cDNAs at -80 °C for up to several years. Prepare an aliquot of cDNAs diluted to 1 ng/ μL of total RNAs equivalents.
 2. Mix and dilute each primer pair at 1 μM with the pipettes dedicated to single cell RT-PCR. Use 20 μL of each primer mix for 100 μL PCRs.
 3. On ice, prepare for each primer pair a premix containing: water (q.s., 80 μL), 10 μL of 10X buffer, 1 μL of 100x dNTPs (50 μM each), 500–1,000 pg of cDNA diluted at 1 ng/ μL , and 0.5 μL (2.5 U, 5 U/ μL) of Taq polymerase.
 4. Use PCR tubes that tightly fit the wells of the PCR machine for an optimal temperature control. Add 2 drops (~100 μL) of mineral oil to the premix without touching the wall or the cap of the PCR tube.
 5. To minimize the formation of primer-dimers, perform a hot start by placing the PCR tubes in the thermocycler pre-heated at 95 °C. After 30 s, quickly expel 20 μL of the primer mix on top of the oil.
 6. After 3 min at 95 °C, run 40 cycles (95 °C, 30 s; 60 °C, 30 s; 72 °C, 35 s) followed by a final elongation step at 72 °C for 5 min.
 7. Analyze 10 μL of each PCR products by agarose gel electrophoresis (2%, weight/volume)³⁹. If some PCR products do not have the expected size, re-design other primers (see Section 2).
- Caution: Ethidium bromide is an intercalating chemical that can induce DNA mutations. Consult the local safety office before using it. Always wear gloves when manipulating it. Use a commercially available solution of ethidium bromide (10 mg/mL) solution instead of powder to minimize the risk of inhalation. Similarly, UV light can be harmful, so make sure to wear UV protection safety glasses or a mask. Withdraw soiled gels, tips, gloves, and buffer in containers dedicated to ethidium waste.
8. Once all primer pairs have been individually validated, test the multiplex protocol (**Figure 3**).
 1. Mix and dilute all external primers together at 1 μM . Store the multiplex primers mix at -20 °C for up to several weeks.
 2. On ice, prepare a premix containing: water (q.s., 80 μL), 10 μL of 10X buffer, 1 μL of 100x dNTPs (50 μM of each), 500–1,000 pg of cDNAs diluted at 1 ng/ μL , and 0.5 μL (2.5 U, 5 U/ μL) of Taq polymerase.
 3. Flick the PCR tube, spin it, and add two drops (~100 μL) of mineral oil.
 4. Perform a hot start as described in step 4.5 with 20 μL of multiplex primer mix. After 3 min at 95 °C, run 20 PCR cycles identical to those of step 4.6.
 5. Prepare a number of PCR tubes identical to the number of genes to analyze. Prepare a premix as in step 4.8.2, but using 1 μL of the first PCR product per gene as template. Adjust all the volumes according to the number of genes to analyze and consider using 10% of extra volume to compensate for pipetting errors.
 6. Shake gently, spin the tube, dispatch 80 μL of premix in each PCR tube, and add two drops (~100 μL) of mineral oil per tube without touching the wall or the cap of the tubes.
 7. Perform a hot start (see step 4.5) by expelling 20 μL of internal primer mix prepared in step 4.2. Run 35 PCR cycles identical to step 4.6.

- Analyze the second PCR products by agarose gel electrophoresis. Make sure that every second PCR generates an amplicon of the expected size. In case of inefficient or nonspecific amplifications, re-design new primers (steps 2.5–2.12) and validate them (steps 4.2–4.8).

5. Preparation and Validation of Intracellular Patch-clamp Solution

Note: The following protocol describes the preparation and validation of a K⁺/gluconate based internal solution, but virtually any type of patch-clamp solution can be used as long as it does not hamper the efficiency of the RT-PCR. Wearing gloves is mandatory to obtain an RNase-free internal solution.

- For 60 mL of internal patch-clamp recording solution, prepare extemporaneously 10 mL of 0.1 M KOH.
- Dissolve 11.4 mg of EGTA (0.5 mM final) in 0.9 mL of 0.1 M KOH.
- Add 40 mL RNase-free water and dissolve 2.02 g of K-gluconate (144 mM final), 143 mg of HEPES (10 mM final), and 180 μ L of 1 M MgCl₂ (3 mM final).
- Adjust the pH to 7.2 by adding ~6 mL of 0.1 M KOH.
- Adjust the osmolarity to 295 mOsm with ~13 mL of RNase-free water.
- Since the internal solution is also used as a buffer for the reverse transcription, carefully control Mg²⁺ concentration. Compensate for a lower Mg²⁺ concentration in the internal solution by adding MgCl₂ afterwards to reach a final concentration of 2 mM in the RT reaction.
- To label the harvested cell after patch-clamp recording, add 2–5 mg/mL of RNase-free biocytin to the internal solution described above (steps 5.1–5.5).
- Filter (0.22 μ m pore size) the internal solution and store it at -80 °C as 100–250 μ L aliquots.
- To validate the use of the internal solution for single-cell RT-PCR, add 0.5 μ L of total RNAs diluted at 1 ng/ μ L to 6 μ L of patch-clamp solution and leave it on the bench for about 30 min.
- With a 2 μ L micropipette, add 2 μ L of 5x RT-mix, 0.5 μ L of 20x DDT, 0.5 μ L RNase inhibitor, and 0.5 μ L RTase, and incubate overnight at 37 °C.
- Spin the tube. On ice add water (*q.s.*, 80 μ L), 10 μ L of 10X buffer, and 0.5 μ L (2.5 U, 5 U/ μ L) of Taq polymerase.
- Perform 40 cycles of PCR using a set of validated primers (steps 4.4–4.6).
- Analyze the PCR products by agarose gel electrophoresis (see step 4.7) and verify that they have the expected size.
Note: Omitting the 0.5 μ L of total RNA and replacing it with 0.5 μ L RNase-free water will ensure that the internal solution is free of RNA and/or DNA contaminations.

6. Acute Slice Preparation

Note: This protocol describes the slicing procedure for juvenile (*i.e.*, less than 28 postnatal days) male and female mice. Other cutting solutions, such as sucrose-based artificial cerebrospinal fluid (aCSF) are also usable⁴⁰.

- Prepare 2 L of aCSF containing (in mM) 125 NaCl, 2.5 KCl, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 1.25 NaH₂PO₄, 26 NaHCO₃, 10 Glucose, and 15 Sucrose. To reduce glutamatergic activity during slice preparation, prepare a cutting solution by adding 1 mM of kynurenic acid.
- Before slicing, prepare a dissection kit containing surgical scissors, fine iris scissors, two spatulas, forceps, a disc of paper filter, and cyanoacrylate glue.
- Use ice-cold cutting solution saturated with O₂/CO₂ (95%/5%) and cool down the cutting chamber at -20 °C.
- Anesthetize the mouse with a small paper towel soaked with isoflurane. After ~2 min, make sure that the mouse is under deep anesthesia by verifying the absence of response to paw pinch.
- Quickly decapitate the mouse. Remove the scalp and open the skull. Extract the brain carefully and place it into a small beaker filled with ice cold (~4 °C) cutting solution oxygenated with O₂/CO₂.
- Remove the cutting chamber from -20 °C conditions and remove moisture with a paper towel.
- Carefully dissect the brain to isolate the region of interest, glue it on the cutting chamber, and add ice-cold cutting solution oxygenated with O₂/CO₂.
- Cut 300 μ m thick slices using a vibratome. Transfer them at room temperature in a resting chamber filled with oxygenated cutting solution and allow them to recover for at least 0.5 h.

7. Single Cell RT-PCR after Patch-clamp Recording

- Clean the perfusion system regularly with ~100 mL of 30% H₂O₂ solution and rinse extensively with ~500 mL of distilled water to avoid bacteria growth, as it is an overlooked source of RNase contamination.
- Chlorinate the filament with a patch pipette filled with concentrated bleach every harvesting day. Do not use a micropipette to fill the patch pipette but rather a 20 μ L long, fine, flexible tip attached to a 1 mL syringe. Then, rinse it extensively with RNase free water and dry it with a gas duster.
- Prepare a small box of ice containing 5x RT-mix and 20x DTT aliquots. Store the RTase and RNase inhibitor aliquots at -20 °C in a benchtop cooler.
- Transfer a slice into the recording chamber perfused at 1–2 mL/min with oxygenated aCSF.
- Pull patch pipettes (1–2 μ m open tip diameter, 3–5 M Ω) from borosilicate glass while wearing gloves and fill one of them with 8 μ L of internal solution. Keep in mind that the knobs of the pipette puller are a source of RNase contamination.
- Place the pipette in the pipette holder while wearing new gloves and not touching the filament with fingers.
- Approach the patch pipette with a positive pressure and perform whole-cell recording to characterize the targeted cell (**Figure 4**).
- In order to preserve the mRNAs, limit the time in whole-cell configuration to 20 min⁴¹.
- At the end of the recording, prepare a 500 μ L PCR tube filled with 2 μ L of 5x RT Mix and 0.5 μ L of 20x DTT, spin it, and store it on ice.

10. Harvest the cell cytoplasm by applying a gentle negative pressure (**Figure 4**). Visually control that the cell's content comes inside the pipette while maintaining a tight seal.
 1. Avoid as much as possible collecting the nucleus if some intron-less genes are considered. In such a case always include a set of primers aimed at amplifying gDNA to probe for genomic contamination.
 2. If the nucleus is coming close to the tip of the pipette, release the negative pressure and move the pipette away from the nucleus. Ensure that the tight seal is preserved and restart to collect the cytoplasm at the new pipette location.
11. Stop the harvesting when no more material is coming and/or before losing the tight seal.
12. Withdraw the pipette gently to form an outside-out patch to limit contamination by the extracellular debris (**Figure 4**) and to favor the closure of the cell membrane for subsequent histochemical analysis.
13. Keep in mind that knobs, micromanipulators, computer keyboard, or computer mouse are potential sources of RNase contamination. If they have been touched during the recording, change gloves.
14. Attach the pipette to the expeller and expel its content into the PCR tube by applying a positive pressure (**Figure 1**).
15. Break the tip of the pipette into the PCR tube to help the collection of its content.
16. Briefly centrifuge the tube, add 0.5 μ L of RNase inhibitor and 0.5 μ L of RTase, mix gently, centrifuge again, and incubate overnight at 37 $^{\circ}$ C.
17. Spin the tube and store it at -80 $^{\circ}$ C for up to several months until PCR analysis.
18. Perform the first amplification step directly in the tube containing the \sim 10 μ L of RT products by adding water (*q.s.*, 80 μ L), 10 μ L of 10x buffer, and 0.5 μ L (2.5 U) of Taq polymerase. Then, follow the instructions described in steps 4.8.2–4.8.8.

8. Histochemical Staining of the Recorded Cell (Optional)

1. Following the electrophysiological recordings, maintain the slice for 20 min in oxygenated aCSF to allow the diffusion of biocytin in the axonal and dendritic tree.
2. Place the slice in a well of a 24-well plate and fix it overnight at 4 $^{\circ}$ C with 1 mL of 4% paraformaldehyde in 0.1 M Phosphate Buffer.
3. Wash the slices 4 times, 5 min each, with 1 mL Phosphate Buffered Saline (PBS).
4. In the same well, permeabilize and saturate the slice during 1 h at room temperature with 1 mL of PBS supplemented with 0.25% Triton X-100 and 0.2% gelatin from cold water fish skin (PBS-GT).
5. Incubate overnight with a fluorescently labeled avidin diluted at 1/400 in 250–500 μ L of PBS-GT.
6. Wash 5 times, 5 min each, with 1 mL of PBS and mount the slices.

Representative Results

A representative validation of multiplex RT-PCR is shown in **Figure 3**. The protocol was designed to probe simultaneously the expression of 12 different genes. The vesicular glutamate transporter vGluT1 was taken as a positive control for glutamatergic neurons⁴². The GABA synthesizing enzymes (GAD65 and GAD 67), Neuropeptide Y (NPY), and Somatostatin (SOM) were used as markers of GABAergic interneurons^{3,5,11}. The cyclooxygenase-2 enzyme (COX-2) was used as a marker of the pyramidal cell sub-population^{3,16}.

The ATP1 α 1-3 subunits of the Na⁺/K⁺ ATPase and the Kir6.2 and SUR1 subunits of the ATP-sensitive K⁺ channels were chosen to evaluate the relationship between neuronal activity and metabolic states⁴³. Since Kir6.2 is an intron-less gene, the SOM intron was included as a genomic control. The protocol has been tested on 1 ng of reverse transcribed total RNA extracted from mouse whole brain, which corresponds approximately to the transcripts of 20 cells⁴⁴. The multiplex PCR produced 12 amplicons of the expected size (**Figure 3** and **Table 1**) demonstrating the sensitivity and efficiency of the protocol. The negative control performed without RNA produced no amplicon (data not shown).

A layer V pyramidal neuron was visually identified by its large soma and a prominent apical dendrite (**Figure 5A**, inset). Whole cell recording revealed typical electrophysiological properties of layer V regular spiking neurons^{5,45,46} with, notably, a low input resistance, long-lasting action potentials, and pronounced spike frequency adaptation (**Figure 5A**). The molecular analysis of this neuron revealed the expression of vGluT1 (**Figure 5B**), confirming its glutamatergic phenotype^{42,46}. This neuron also expressed SOM, ATP1 α 1, and 3 subunits of the Na⁺/K⁺ ATPase. Biocytin labeling of the recorded neurons confirmed a pyramidal morphology (**Figure 5D**).

As expected from glutamatergic neurons, the molecular analysis of 26 layer V pyramidal cells revealed expression of vGluT1, but neither of the two GADs (**Figure 5C**). Markers of interneurons were rarely observed^{5,42,46}. COX-2, chiefly expressed by layer II-III pyramidal cells^{3,16}, was not detected in layer V pyramidal cells. The ATP1 α 1 and 3 subunits were more frequently observed than the ATP1 α 2 subunit³. The Kir6.2 and SUR1 subunits were rarely detected in layer V pyramidal neurons, which is consistent with their preferential expression in upper layers^{3,43}. Care was taken not to harvest the nuclei, resulting in a rare detection of SOM introns (3 out of 26 cells, *i.e.*, 12%).

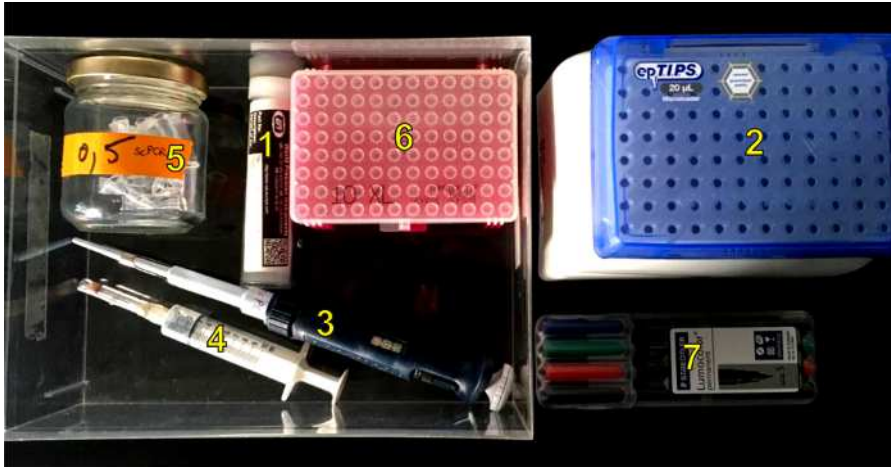


Figure 1: Dedicated box for single cell RT-PCR. List of materials reserved for RT-PCR after patch-clamp. (1) Borosilicate glass capillaries, (2) 20 µL long, fine, flexible tips, (3) 20 µL micropipette, (4) home-made expeller, (5) 500 µL PCR tubes, (6) 10 µL aerosol resistant filter tips, and (7) permanent markers. [Please click here to view a larger version of this figure.](#)

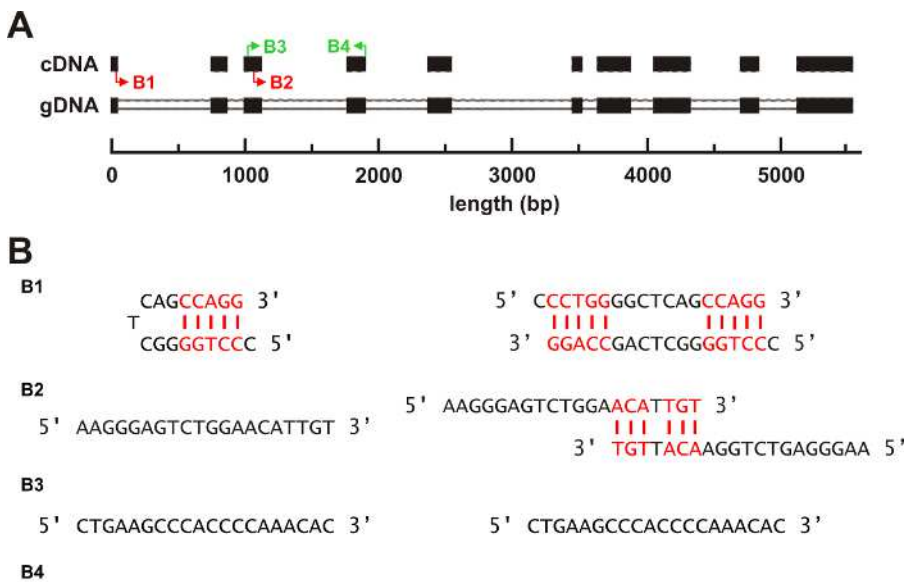


Figure 2: PCR primer design strategy. (A) Schematic representation of the coding sequence of COX 2 cDNA aligned to the mouse chromosome 2 sequence containing the COX 2 gene. Exons are represented by black boxes and introns on gDNA by white boxes. Note the gaps in the cDNA corresponding to the intronic sequences on gDNA. Representative examples of bad and good oligonucleotides represented as red and green arrows, respectively. Right and left arrows denote forward and reverse primers. (B) Sequences and secondary structures of the oligonucleotides shown in (A). Left and right panels indicate hairpin self-complementarity and self-dimer formation, respectively. The **B1** oligonucleotide displays both a strong hairpin self-complementarity and dimer formation whereas the **B2** oligonucleotide only shows dimer formation. Both **B3** and **B4** oligonucleotides have no hairpin self-complementarity and no dimer formation; they are intron overspanning (A) and have been selected as potential PCR primers (see **Table 1**). [Please click here to view a larger version of this figure.](#)

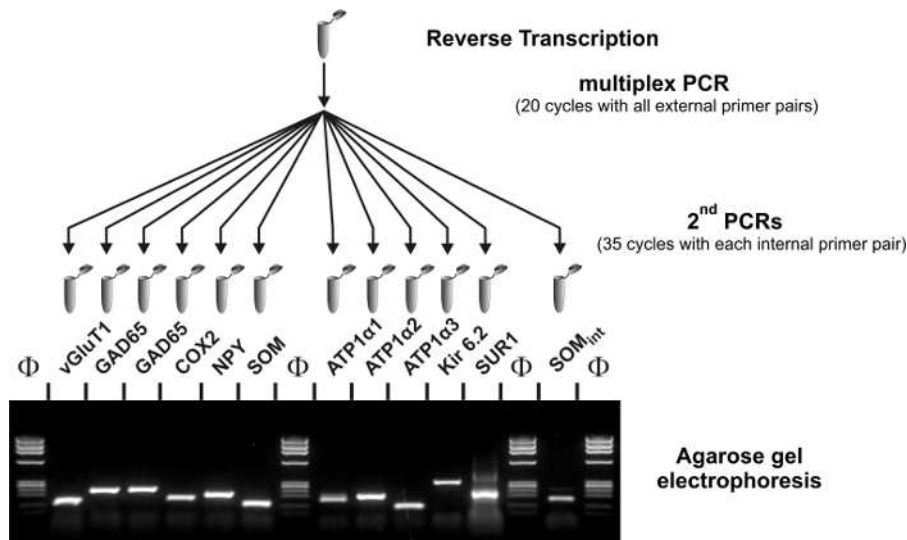


Figure 3: Validation of multiplex PCR. 1 ng of total RNA from mouse whole brain was subjected to a reverse transcription followed by two rounds of PCR amplification. The 12 PCR products were resolved in separate lanes by agarose gel electrophoresis in parallel with Φ x174 digested by *Hae*III. The second PCR products had sizes (in bp) predicted by the sequences: 153 (vGluT1), 248 (GAD65), 255 (GAD67), 181 (COX 2), 220 (NPY), 146 (SOM), 183 (ATP1a1), 213 (ATP1a2), 128 (ATP1a3), 342 (Kir6.2), 211 (SUR1), and 182 (SOM_{int}). [Please click here to view a larger version of this figure.](#)

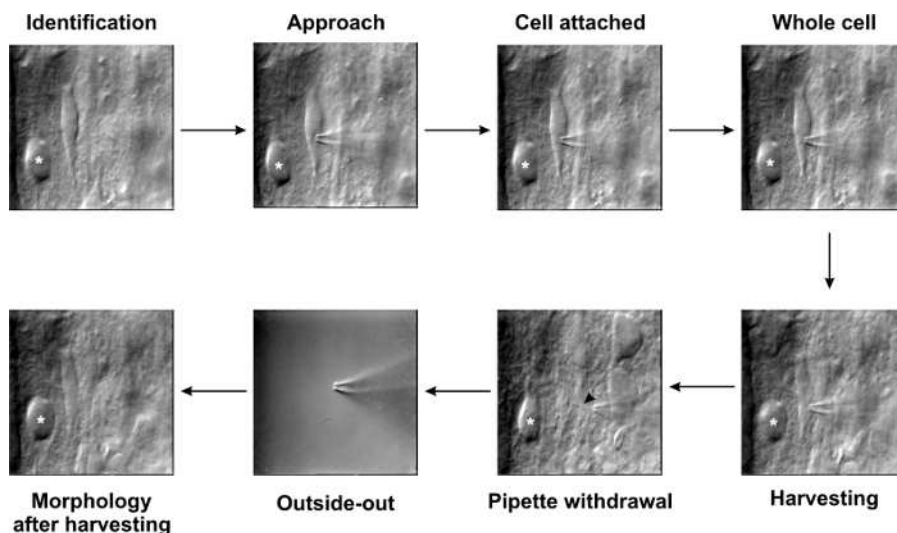


Figure 4: Patch-clamp harvesting in brain slices. Once a cell is visually identified, the recording pipette is approached with a positive pressure in order to avoid cellular debris contamination at the tip of the pipette. Note the dimple on the membrane of this neuron. Positive pressure is then interrupted in order to form a cell-attached configuration with a Gigaohm tight seal. Brief suction is applied to switch to whole-cell configuration. At the end of the recording, the cytoplasm is harvested by applying a gentle negative pressure into the pipette while maintaining the tight seal. Note the shrinkage of the cell body during the harvesting procedure. The recording pipette is then gently withdrawn to form an outside-out patch, which favors cell membrane closure for subsequent biocytin revelation, and preservation of harvested material in the patch pipette. Reproduced from Cauli and Lambolez⁴⁷ with permission from the Royal Society of Chemistry. [Please click here to view a larger version of this figure.](#)

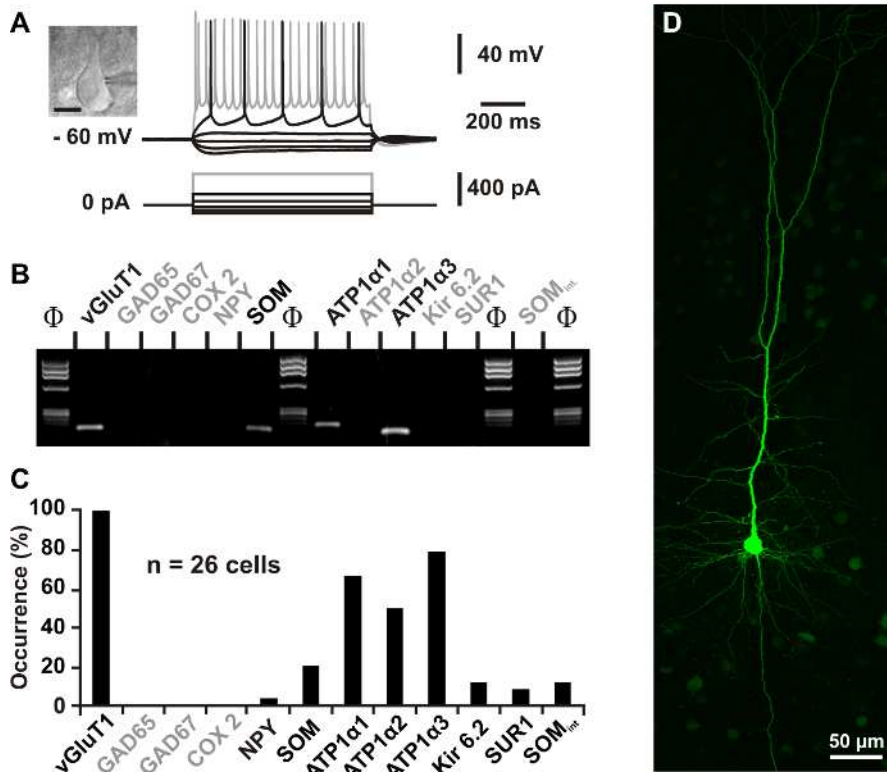


Figure 5: Characterization of layer V neocortical pyramidal cells. (A) Membrane potential response of a layer V pyramidal cell induced by current pulses of -100, -40, -10, +60, +120, and +500 pA (bottom traces). The neuron displays a weak potential deflection after the initial hyperpolarizing response (upper traces). In response to a supraliminal depolarization, the neuron discharged long-lasting action potentials with slowly developing after-hyperpolarization (upper trace). Near saturation, the neuron discharged at a low frequency and exhibited a pronounced adaptation (upper gray trace). **Inset:** infrared pictures of the recorded layer V pyramidal neuron. The pial surface is upward. Scale bar: 20 μ m. (B) Multiplex RT-PCR analysis revealing expression of vGluT1, SOM, ATP1 α 1, and ATP1 α 3. (C) Gene expression profile in a sample of 26 layer V pyramidal cells. vGluT1 was expressed in all neurons while GAD65, GAD67, and COX2 were never detected. NPY, SOM, Kir6.2, SUR1, and SOM_{int} were rarely observed. Pyramidal cells expressed ATP1 α 3, 1 subunit of the Na⁺/K⁺ ATPase, and ATP1 α 2 to a lesser extent. (D) Maximum intensity projection of confocal images showing biocytin labeling of the neuron recorded in (A). [Please click here to view a larger version of this figure.](#)

Gene / GenBank number	External primers	Size (bp)	Internal primers	Size (bp)
vGlut1 NM_182993	Sense, -113	259	Sense, -54	153
	GGCTCCTTTTTCTGGGGCTAC		ATTCGCAGCCAACAGGGTCT	
	Anti-sense, 126		Anti-sense, 79	
	CCAGCCGACTCCGTCTAAG		TGGCAAGCAGGGTATGTGAC	
GAD65 NM_008078	Sense, 99	375	Sense, 219	248
	CCAAAAGTTCACGGGCGG		CACCTGCGACCAAAAACCCT	
	Anti-sense, 454		Anti-sense, 447	
	TCCTCCAGATTTTGC GGTTG		GATTTTGC GGTTGGTCTGCC	
GAD67 NM_008077	Sense, 529	598	Sense, 801	255
	TACGGGGTTCGCACAGGTC		CCCAGAAGTGAAGACAAAAGGC	
	Anti-sense, 1109		Anti-sense, 1034	
	CCCAGGCAGCATCCACAT		AATGCTCCGTAAACAGTCGTGC	
COX 2 NM_011198	Sense, 199	268	Sense, 265	181
	CTGAAGCCCACCCAAACAC		AACAACATCCCCTTCTCTGCG	
	Anti-sense, 445		Anti-sense, 426	
	CCTTATTTCCCTTCACACCCAT		TGGGAGTTGGGCAGTCATCT	
NPY NM_023456	Sense, 16	294	Sense, 38	220
	CGAATGGGGCTGTGTGGA		CCCTCGCTCTATCTCTGCTCGT	
	Anti-sense, 286		Anti-sense, 236	
	AAGTTTCATTTCCCATCACCACAT		GCGTTTTCTGTGCTTTCCTTCA	
SOM NM_009215	Sense, 43	208	Sense, 75	146
	ATCGTCCTGGCTTTGGGC		GCCCTCGGACCCAGACT	
	Anti-sense, 231		Anti-sense, 203	
	GCCTCATCTCGTCTGCTCA		GCAAATCCTCGGGCTCCA	
ATP1α1 NM_144900	Sense, 1287	288	Sense, 1329	183
	CAGGGCAGTGTTTCAGGCTAA		TAAGCGGGCAGTAGCGGG	
	Anti-sense, 1556		Anti-sense, 1492	
	CCGTGGAGAAGGATGGAGC		AGGTGTTTGGGCTCAGATGC	
ATP1α2 NM_178405	Sense, 1392	268	Sense, 1430	213
	AGTGAGGAAGATGAGGGACAGG		AAATCCCCTTCAACTCCACCA	
	Anti-sense, 1640		Anti-sense, 1623	
	ACAGAAGCCCAGCACTCGTT		GTTCCCAAGTCTCCACAGC	
ATP1α3 NM_144921	Sense, 127	216	Sense, 158	128
	CGGAAATACAATACTGACTGCGTG		TGACACACAGTAAAGCCCAGGA	
	Anti-sense, 324		Anti-sense, 264	
	GTCATCTCCGCTCCCTGCC		CCACAGCAGGATAGAGAAGCCA	
Kir6.2 NM_010602	Sense, 306	431	Sense, 339	342
	CGGAGAGGGCACCAATGT		CATCCACTCCTTTTCATCTGCC	
	Anti-sense, 719		Anti-sense, 663	
	CACCCACGCCATTCTCCA		TCGGGGCTGGTGGTCTTG	
SUR1 NM_011510	Sense, 1867	385	Sense, 2041	211
	CAGTGTGCCCCCGAGAG		ATCATCGGAGGCTTCTTACC	
	Anti-sense, 2231		Anti-sense, 2231	
	GGTCTTCTCCCTCGCTGTCTG		GGTCTTCTCCCTCGCTGTCTG	

SOMint X51468	Sense, 8	240	Sense, 16	182
	CTGTCCCCCTTACGAATCCC		CTTACGAATCCCCAGCCTT	
	Anti-sense, 228		Anti-sense, 178	
	CCAGCACCAGGGATAGAGCC		TTGAAAGCCAGGGAGGAACT	

Table 1. Sequences of first and second PCR primers. The position of each PCR primer and their sequences are given from 5' to 3'. Except for the somatostatin intron, position 1 corresponds to the first base of the start codon of each gene.

Discussion

Single cell multiplex RT-PCR after patch-clamp can simultaneously and reliably probe the expression of more than 30 genes in electrophysiologically identified cells⁵. Analyzing gene expression at the single cell level requires highly efficient PCR primers. One of the most limiting steps is collection of the cell's content. Its efficiency depends on the diameter of the patch pipette tip, which must be as large as possible while matching the cell size. Pipettes with a 1-2 μm open tip diameter were proven to be suitable for most neuronal types. It is also essential to make sure that only the cellular content is collected, and not the surrounding tissue. This is achieved by controlling electrophysiologically the preservation of a tight seal during the harvest. The formation of an outside-out patch configuration during pipette withdrawal further protects the harvested cytoplasm from cellular debris. The success rate of the single cell multiplex RT-PCR also depends on mRNAs abundance of the investigated cell type. For instance, the yield obtained with astrocytes, which express mRNAs in relatively low amounts³, is generally lower than the one obtained with neurons and thus requires increasing sample size^{15,16}. Reverse transcription, which has a low efficiency in tubes⁴⁸, is the limiting reaction of single cell multiplex RT-PCR. It is therefore critical to use top quality reagents, to store them as aliquots at -80 °C, and to use them only for one day. Finally, the DNA polymerase activity of the RTase is often an overlooked source of primer-dimer formation. To address this issue, performing a hot start with primers is critical to increase the amplification efficiency. In addition this will reduce the inhibitory effect of RTase on the Taq DNA polymerase activity⁴⁹.

The single cell multiplex RT-PCR technique is highly versatile. It has been extensively used in rodents^{10,11,13,19,20,34,50,51,52,53,54} but can be adapted to virtually all animal models and genes assuming that tissue and gene sequences are available. Various patch-clamp solutions can be used as long as they do not interfere with the RT-PCR on cell free assays. For instance internal solutions based on K⁺ or Cs⁺ cations, Cl⁻ or gluconate have been successfully used^{6,36,41,55}.

Classical false negative results stem from RNase contamination of the patch pipette filament and/or internal patch-clamp solution. Carefully chlorinating the filament and validating the internal solution generally solve this problem. False negative results can also occur when a gene is expressed at a low single cell level, since only a proportion of the cytoplasm is harvested. The harvesting quality can be increased by using larger pipettes and/or by reducing the time of the whole-cell recording. Harvesting quality can be assessed by including a gene known to be expressed at a low level in single cells²⁰. False positive results can occur with bad tissue quality, in which the amount of contaminating cellular debris is high. Testing the presence of debris is done by inserting a patch pipette into the slice without performing any seal and releasing the positive pressure prior to the pipette removal. The presence of amplifiable materials is then probed by multiplex RT-PCR⁴². Silanizing the patch pipette has also been used to reduce the collection of extracellular contaminants⁵⁶. Single cell PCR is a very sensitive technique that can detect as little as a single copy of double stranded DNA⁵⁷. In the case of intron-less genes, the gDNA contained in the nucleus can also produce false positives. Avoiding the collection of gDNA by placing the pipette away from the nucleus during the harvesting helps to solve this issue. The presence of gDNA can be reliably probed by amplifying an intronic sequence²⁵.

The detection of mRNA molecules by RT-PCR becomes unreliable at 10 copies⁴⁴, presumably because of the low efficiency of the RTase⁴⁸, and can lead to an under detection of low-abundance transcripts^{26,42}. This can be problematic in the case of intron-less genes. Indeed, avoiding harvest of the nucleus reduces the amount of cytoplasm that can be collected and therefore the detection sensitivity. The combination of single-cell RT-PCR after patch-clamp with biocytin labeling requires that the shape of the cell is maintained as much as possible (**Figure 3**). Unavoidably, this reduces the amount of material that can be collected, thereby reducing the success rate. A compromise between cytoplasm collection and preservation of cell morphology is mandatory.

Multiplex single-cell RT-PCR data are not quantitative as they only give information on whether cDNAs are present or absent in the collected material. However, because of the detection limits described above, the occurrence of detection at the population level can reflect the abundance of genes at the single cell level. Alternative approaches allow the generation of more quantitative data, but the technical constraints imposed by their specific amplification strategies (*i.e.*, relative quantification of homologous genes or RT-qPCR) largely restrict the number of genes that can be simultaneously analyzed^{41,53,55,58,59,60,61,62,63,64,65,66}. The recent combination of patch-clamp recordings and single cell RNaseq, referred to as Patch-seq^{30,31}, allows quantitative transcriptomic analysis of electrophysiologically-characterized cells. It is a new and promising approach, yet it requires access to high-throughput sequencers and the data generated require time consuming analysis.

Disclosures

The authors have nothing to disclose.

Acknowledgements

We thank Dr. Alexandre Mouro for his comments on the manuscript. This work was supported by grants from the Agence Nationale de la Recherche (ANR 2011 MALZ 003 01; ANR-15-CE16-0010 and ANR-17-CE37-0010-03), BLG is supported by fellowship from the Fondation pour la Recherche sur Alzheimer. We thank the animal facility of the IBPS (Paris, France).

References

- Ascoli, G.A. *et al.* Petilla terminology: nomenclature of features of GABAergic interneurons of the cerebral cortex. *Nat.Rev.Neurosci.* **9** (7), 557-568, (2008).
- DeFelipe, J. *et al.* New insights into the classification and nomenclature of cortical GABAergic interneurons. *Nat.Rev.Neurosci.* (2013).
- Tasic, B. *et al.* Adult mouse cortical cell taxonomy revealed by single cell transcriptomics. *Nat.Neurosci.* (2016).
- Zeisel, A. *et al.* Cell types in the mouse cortex and hippocampus revealed by single-cell RNA-seq. *Science.* (2015).
- Cauli, B. *et al.* Classification of fusiform neocortical interneurons based on unsupervised clustering. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **97** (11), 6144-6149, (2000).
- Cauli, B. *et al.* Molecular and physiological diversity of cortical nonpyramidal cells. *J.Neurosci.* **17** (10), 3894-3906, (1997).
- Férézou, I. *et al.* 5-HT₃ receptors mediate serotonergic fast synaptic excitation of neocortical vasoactive intestinal peptide/cholecystokinin interneurons. *J. Neurosci.* **22** (17), 7389-7397, (2002).
- Cauli, B. *et al.* Cortical GABA interneurons in neurovascular coupling: relays for subcortical vasoactive pathways. *J.Neurosci.* **24** (41), 8940-8949, (2004).
- Wang, Y., Gupta, A., Toledo-Rodriguez, M., Wu, C.Z., & Markram, H. Anatomical, physiological, molecular and circuit properties of nest basket cells in the developing somatosensory cortex. *Cereb.Cortex.* **12** (4), 395-410, (2002).
- Wang, Y. *et al.* Anatomical, physiological and molecular properties of Martinotti cells in the somatosensory cortex of the juvenile rat. *J.Physiol.* **561** (Pt 1), 65-90, (2004).
- Karagiannis, A. *et al.* Classification of NPY-expressing neocortical interneurons. *J.Neurosci.* **29** (11), 3642-3659, (2009).
- Battaglia, D., Karagiannis, A., Gallopin, T., Gutch, H.W., & Cauli, B. Beyond the frontiers of neuronal types. *Front Neural Circuits.* **7** 13, (2013).
- Toledo-Rodriguez, M. *et al.* Correlation maps allow neuronal electrical properties to be predicted from single-cell gene expression profiles in rat neocortex. *Cereb.Cortex.* **14** (12), 1310-1327, (2004).
- Toledo-Rodriguez, M., Goodman, P., Illic, M., Wu, C., & Markram, H. Neuropeptide and calcium binding protein gene expression profiles predict neuronal anatomical type in the juvenile rat. *J.Physiol.* (2005).
- Leclux, C. *et al.* Pyramidal neurons are "neurogenic hubs" in the neurovascular coupling response to whisker stimulation. *J.Neurosci.* **31** (27), 9836-9847, (2011).
- Lacroix, A. *et al.* COX-2-derived prostaglandin E₂ produced by pyramidal neurons contributes to neurovascular coupling in the rodent cerebral cortex. *J.Neurosci.* **35** (34), 11791-11810, (2015).
- Mathias, K. *et al.* Segregated expression of AMPA-type glutamate receptors and glutamate transporters defines distinct astrocyte populations in the mouse hippocampus. *J.Neurosci.* **23** (5), 1750-1758, (2003).
- Rancillac, A. *et al.* Glutamatergic control of microvascular tone by distinct gaba neurons in the cerebellum. *J.Neurosci.* **26** (26), 6997-7006, (2006).
- Miki, T. *et al.* ATP-sensitive K⁺ channels in the hypothalamus are essential for the maintenance of glucose homeostasis. *Nat.Neurosci.* **4** (5), 507-512, (2001).
- Liss, B., Bruns, R., & Roeper, J. Alternative sulfonylurea receptor expression defines metabolic sensitivity of K-ATP channels in dopaminergic midbrain neurons. *EMBO J.* **18** (4), 833-846, (1999).
- Gallopin, T. *et al.* Identification of sleep-promoting neurons in vitro. *Nature.* **404** (6781), 992-995, (2000).
- Gallopin, T. *et al.* The endogenous somnogen adenosine excites a subset of sleep-promoting neurons via A_{2A} receptors in the ventrolateral preoptic nucleus. *Neuroscience.* **134** (4), 1377-1390, (2005).
- Fernandez, S.P. *et al.* Multiscale single-cell analysis reveals unique phenotypes of raphe 5-HT neurons projecting to the forebrain. *Brain Struct.Funct.* (2015).
- Porter, J.T. *et al.* Selective excitation of subtypes of neocortical interneurons by nicotinic receptors. *J.Neurosci.* **19** (13), 5228-5235, (1999).
- Hill, E.L. *et al.* Functional CB₁ receptors are broadly expressed in neocortical GABAergic and glutamatergic neurons. *J.Neurophysiol.* **97** (4), 2580-2589, (2007).
- Férézou, I. *et al.* Extensive overlap of mu-opioid and nicotinic sensitivity in cortical interneurons. *Cereb.Cortex.* **17** (8), 1948-1957, (2007).
- Hu, E. *et al.* VIP, CRF, and PACAP act at distinct receptors to elicit different cAMP/PKA dynamics in the neocortex. *Cereb.Cortex.* **21** (3), 708-718, (2011).
- Louessard, M. *et al.* Tissue plasminogen activator expression is restricted to subsets of excitatory pyramidal glutamatergic neurons. *Mol.Neurobiol.* (2015).
- Stuart, G.J., Dodt, H.U., & Sakmann, B. Patch-clamp recordings from the soma and dendrites of neurons in brain slices using infrared video microscopy. *Pflugers Arch.* **423** (5-6), 511-8, (1993).
- Cadwell, C.R. *et al.* Electrophysiological, transcriptomic and morphologic profiling of single neurons using Patch-seq. *Nat.Biotechnol.* **34** (2), 199-203, (2016).
- Fuzik, J. *et al.* Integration of electrophysiological recordings with single-cell RNA-seq data identifies neuronal subtypes. *Nat.Biotechnol.* **34** (2), 175-183, (2016).
- O'Leary, N.A. *et al.* Reference sequence (RefSeq) database at NCBI: current status, taxonomic expansion, and functional annotation. *Nucleic Acids Res.* **44** (D1), D733-D745, (2016).
- Schuler, G.D., Altschul, S.F., & Lipman, D.J. A workbench for multiple alignment construction and analysis. *Proteins.* **9** (3), 180-190, (1991).
- Ruano, D., Lambolez, B., Rossier, J., Paternain, A.V., & Lerma, J. Kainate receptor subunits expressed in single cultured hippocampal neurons: molecular and functional variants by RNA editing. *Neuron.* **14** (5), 1009-1017, (1995).
- Porter, J.T. *et al.* Properties of bipolar VIPergic interneurons and their excitation by pyramidal neurons in the rat neocortex. *Eur.J.Neurosci.* **10** (12), 3617-3628, (1998).
- Ruano, D., Perrais, D., Rossier, J., & Ropert, N. Expression of GABA(A) receptor subunit mRNAs by layer V pyramidal cells of the rat primary visual cortex. *Eur.J.Neurosci.* **9** (4), 857-862, (1997).
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., & Lipman, D.J. Basic local alignment search tool. *J.Mol.Biol.* **215** (3), 403-410, (1990).

38. Chomczynski, P., & Sacchi, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate- phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* **162** (1), 156-9, (1987).
39. Lee, P.Y., Costumbrado, J., Hsu, C.Y., & Kim, Y.H. Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *J. Vis. Exp.* (62), (2012).
40. Liss, B. *et al.* K-ATP channels promote the differential degeneration of dopaminergic midbrain neurons. *Nat. Neurosci.* **8** (12), 1742-1751, (2005).
41. Lambolez, B., Audinat, E., Bochet, P., Crepel, F., & Rossier, J. AMPA receptor subunits expressed by single Purkinje cells. *Neuron.* **9** (2), 247-258, (1992).
42. Gallopin, T., Geoffroy, H., Rossier, J., & Lambolez, B. Cortical sources of CRF, NKB, and CCK and their effects on pyramidal cells in the neocortex. *Cereb. Cortex.* **16** (10), 1440-1452, (2006).
43. Cunningham, M.O. *et al.* Neuronal metabolism governs cortical network response state. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103** (14), 5597-5601, (2006).
44. Tsuzuki, K., Lambolez, B., Rossier, J., & Ozawa, S. Absolute quantification of AMPA receptor subunit mRNAs in single hippocampal neurons. *J. Neurochem.* **77** (6), 1650-1659, (2001).
45. McCormick, D.A., Connors, B.W., Lighthall, J.W., & Prince, D.A. Comparative electrophysiology of pyramidal and sparsely spiny stellate neurons of the neocortex. *Journal of Neurophysiology.* **54** (4), 782-806, (1985).
46. Andjelic, S. *et al.* Glutamatergic nonpyramidal neurons from neocortical layer VI and their comparison with pyramidal and spiny stellate neurons. *J. Neurophysiol.* **101** (2), 641-654, (2009).
47. Cauli, B., & Lambolez, B. In: *Unravelling Single Cell Genomics: Micro and Nanotools.* RSC Nanoscience and Nanotechnology. Bontoux, N., & Potier, M.C. eds., Ch. 9, RSC publishing, Cambridge, 81-92 (2010).
48. Bontoux, N. *et al.* Integrating whole transcriptome assays on a lab-on-a-chip for single cell gene profiling. *Lab Chip.* **8** (3), 443-450 (2008).
49. Sellner, L.N., Coelen, R.J., & Mackenzie, J.S. Reverse transcriptase inhibits Taq polymerase activity. *Nucleic Acids Res.* **20** (7), 1487-1490, (1992).
50. Perrenoud, Q., Rossier, J., Geoffroy, H., Vitalis, T., & Gallopin, T. Diversity of GABAergic interneurons in layer VIa and VIb of mouse barrel cortex. *Cereb. Cortex.* (2012).
51. Tricoire, L. *et al.* Common origins of hippocampal ivy and nitric oxide synthase expressing neurogliaform cells. *J. Neurosci.* **30** (6), 2165-2176, (2010).
52. Cea-del Rio, C.A. *et al.* M3 muscarinic acetylcholine receptor expression confers differential cholinergic modulation to neurochemically distinct hippocampal basket cell subtypes. *J. Neurosci.* **30** (17), 6011-6024 [doi] (2010).
53. Tricoire, L. *et al.* A blueprint for the spatiotemporal origins of mouse hippocampal interneuron diversity. *J. Neurosci.* **31** (30), 10948-10970 [doi] (2011).
54. Franz, O., Liss, B., Neu, A., & Roeper, J. Single-cell mRNA expression of HCN1 correlates with a fast gating phenotype of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated ion channels (Ih) in central neurons. *Eur. J. Neurosci.* **12** (8), 2685-2693, (2000).
55. Szabo, A. *et al.* Calcium-permeable AMPA receptors provide a common mechanism for LTP in glutamatergic synapses of distinct hippocampal interneuron types. *J. Neurosci.* **32** (19), 6511-6516 [doi] (2012).
56. Hodne, K., & Weltzien, F.A. Single-Cell Isolation and Gene Analysis: Pitfalls and Possibilities. *Int. J. Mol. Sci.* **16** (11), 26832-26849, (2015).
57. Li, H.H. *et al.* Amplification and analysis of DNA sequences in single human sperm and diploid cells. *Nature.* **335** (6189), 414-417, (1988).
58. Bochet, P. *et al.* Subunit composition at the single-cell level explains functional properties of a glutamate-gated channel. *Neuron.* **12** (2), 383-388, (1994).
59. Audinat, E., Lambolez, B., Rossier, J., & Crepel, F. Activity-dependent regulation of N-methyl-D-aspartate receptor subunit expression in rat cerebellar granule cells. *Eur. J. Neurosci.* **6** (12), 1792-1800, (1994).
60. Jonas, P., Racca, C., Sakmann, B., Seeburg, P.H., & Monyer, H. Differences in Ca²⁺ permeability of AMPA-type glutamate receptor channels in neocortical neurons caused by differential GluR-B subunit expression. *Neuron.* **12** (6), 1281-1289, (1994).
61. Geiger, J.R. *et al.* Relative abundance of subunit mRNAs determines gating and Ca²⁺ permeability of AMPA receptors in principal neurons and interneurons in rat CNS. *Neuron.* **15** (1), 193-204, (1995).
62. Flint, A.C., Maisch, U.S., Weishaupt, J.H., Kriegstein, A.R., & Monyer, H. NR2A subunit expression shortens NMDA receptor synaptic currents in developing neocortex. *J. Neurosci.* **17** (7), 2469-2476, (1997).
63. Angulo, M.C., Lambolez, B., Audinat, E., Hestrin, S., & Rossier, J. Subunit composition, kinetic, and permeation properties of AMPA receptors in single neocortical nonpyramidal cells. *J. Neurosci.* **17** (17), 6685-6696, (1997).
64. Lambolez, B., Ropert, N., Perrais, D., Rossier, J., & Hestrin, S. Correlation between kinetics and RNA splicing of alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid receptors in neocortical neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93** (5), 1797-1802, (1996).
65. Liss, B. *et al.* Tuning pacemaker frequency of individual dopaminergic neurons by Kv4.3L and KChip3.1 transcription. *EMBO J.* **20** (20), 5715-5724, (2001).
66. Aponte, Y., Lien, C.C., Reisinger, E., & Jonas, P. Hyperpolarization-activated cation channels in fast-spiking interneurons of rat hippocampus. *J. Physiol.* **574** (Pt 1), 229-243, (2006).