HAL
open science

Dysfonctionnement de l'aire CA2 de l'hippocampe et déficits de mémoire sociale dans un modèle murin de la maladie d'Alzheimer

Christophe Rey

To cite this version:

Christophe Rey. Dysfonctionnement de l'aire CA2 de l'hippocampe et déficits de mémoire sociale dans un modèle murin de la maladie d'Alzheimer. Neurosciences [q-bio.NC]. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2020. Français. NNT : 2020TOU30091 . tel-03098470

HAL Id: tel-03098470

https://theses.hal.science/tel-03098470

Submitted on 5 Jan 2021

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

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

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par l'Université Toulouse 3 - Paul Sabatier

Présentée et soutenue par

Christophe REY

Le 26 mars 2020

Dysfonctionnement de l'aire CA2 de l'hippocampe et déficits de mémoire sociale dans un modèle murin de la maladie d'Alzheimer

---

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

Spécialité : **NEUROSCIENCES**

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

Thèse dirigée par
Claire RAMPON et Laure VERRET

Jury

Mme Stéphanie Daumas, Rapporteure
M. Guillaume Ferreira, Rapporteur
M. Santiago Rivera, Rapporteur
M. Jean-Marc Devaud, Examinateur
Mme Claire Rampon, Co-directrice de thèse
Mme Laure Verret, Co-directrice de thèse

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par l'Université Toulouse 3 - Paul Sabatier

Présentée et soutenue par

Christophe REY

Le 26 mars 2020

Dysfonctionnement de l'aire CA2 de l'hippocampe et déficits de mémoire sociale dans un modèle murin de la maladie d'Alzheimer

---

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

Spécialité : **NEUROSCIENCES**

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

Thèse dirigée par
Claire RAMPON et Laure VERRET

Jury

Mme Stéphanie Daumas, Rapporteure
M. Guillaume Ferreira, Rapporteur
M. Santiago Rivera, Rapporteur
M. Jean-Marc Devaud, Examinateur
Mme Claire Rampon, Co-directrice de thèse
Mme Laure Verret, Co-directrice de thèse

REMERCIEMENTS

Dans un premier temps, je tiens à remercier les membres du jury pour avoir accepté que je soutienne ma thèse dans ces conditions si particulières. Présenter mon travail fut un privilège et j'ai pris un réel plaisir à pouvoir en discuter et en débattre.

J'ai pu rencontrer de nombreuses personnes au sein du CRCA qui ont contribué à me développer pleinement sur le plan personnel et professionnel.

Je tiens à remercier de tout cœur Laure et Claire pour leur dévouement dans leurs tâches d'encadrement. Je le répète, je les remercie grandement. En effet, dès mes premiers jours dans le laboratoire en stage de L3, j'ai eu la chance d'avoir toute la confiance de Laure ce qui m'a permis de rapidement travailler sur ce sujet et m'épanouir totalement dans mon travail. Lors de mon arrivée en thèse, j'ai pu être également encadré par Claire, avec qui j'ai vraiment apprécié de travailler en collaboration. Je suis conscient de la chance d'avoir eu deux directrices de thèse aussi exceptionnelles. Vous êtes pour moi une source d'inspiration et de connaissance inépuisable.

Durant ma thèse, j'ai eu l'opportunité d'être dans une équipe de chercheurs toujours bienveillants et à l'écoute. Vous avez réussi à construire une équipe solide, avec une entraide formidable permettant à tout moment d'avoir une expertise dans des domaines différents. Je tiens à remercier tous les chercheurs de l'équipe : Bruno, Cédrick, Lionel (D), Lionel (M) ainsi que Bernard. J'ai pu, à leurs côtés, glaner des conseils et des informations qui m'ont grandement aidé tout le long de ma thèse. Vous avez une synergie de travail, qui j'en suis sûr, vous emmènera encore très loin.

J'ai pu pendant toutes ces années, en tant que stagiaire puis doctorant, rencontrer de nombreuses personnes que je remercie pour leurs discussions scientifiques mais surtout pour tous les moments que l'on a passés ensemble. Je parle bien sûr des nombreux doctorants, notamment Hélène, Charlotte, Petnoi, Kevin, Simon et Trinovita que j'ai rencontré pendant mes différents stages et au début de ma thèse. Je tiens à remercier les doctorants rencontrés à la fin de ma thèse, ceux de l'équipe REMEMBeR : Anna, Basile, Farès, petit Seb, Guillaume, Flora ainsi que ceux des autres équipes FloFlo (not Florian), Matthias, Louise, Louis, Ana, ou même d'autres laboratoires : Robin, Pauline et j'en passe. Je n'oublie pas les doctorants de ma génération Vanessa, Aurélie, Violette, Hugo ainsi que Ben mon coloc de bureau pour qui j'ai pu assister et préparer chaque pot de thèse avec grand plaisir. J'ai passé des moments magnifiques et mémorables dans ce laboratoire, à l'UPSI et en soirée. Je vous remercie tous pour tout le soutien moral et pour les liens professionnels et d'amitiés qui se sont créés.

Je remercie aussi grand Seb, Camille et Stella. J'ai vraiment apprécié travailler et discuter avec vous. Vous m'avez souvent aidé et presque sauvé à moult reprises.

Enfin merci à Maud, Brice et Christian qui m'ont donné les outils et les astuces afin d'avancer dans l'analyse d'image, indispensables afin de faciliter les quantifications de neurones.

Ma famille et mes amis ont été, et restent un énorme soutien durant ces trois années de thèse.

Un grand merci à mes parents et à mes grands-parents qui ont toujours été là pour me soutenir. Ils se sont intéressés, et ont toujours cherché à comprendre ce que je faisais dans la vie.

Nous avons donc officiellement deux docteurs dans la famille alors que personne ne s'y attendait. Je félicite et remercie encore ma grande sœur Nadège qui pendant ces trois années m'a soutenue.

Une énorme pensée pour mon oncle Hugues pour sa phrase fétiche '' Force et honneur '' qui a résonné tout au long de cette thèse.

Merci de tout cœur à Lia. Tu m'as soutenu pendant toutes ces années. Tu as subi toutes les journées et les nuits où je travaillais d'arrache pieds pour faire des expériences et écrire mon manuscrit. Tu es une personne remarquable avec des valeurs et une bonté à toutes épreuves. Voyager au bout du monde n'est rien sans toi et l'avenir non plus.

Merci à tous mes amis de la fac, je ne pourrai pas tous les citer, mais ils se reconnaîtront sans aucun doute. On se suit depuis la L3. Le WED nous a permis de nous rencontrer et on ne s'est plus lâché même avec la distance. Vous revoir me fait un bien fou et je suis sûr que ça continuera longtemps. Merci les copains !!!

Et les derniers remerciements sont pour mes amis d'enfance, d'adolescence et d'adulte : Tony, Edwige et d'encore plus loin Joris.

SOMMAIRE

INTRODUCTION 1
I. Le concept de mémoire sociale 3
II. La maladie d'Alzheimer 3
a. Généralité 3
b. Modifications structurales du cerveau au cours de la maladie d'Alzheimer. ... 4
Les dégénérescences neurofibrillaires 5
Les plaques amyloïdes 6
c. La cascade amyloïde 6
d. L'atrophie cérébrale 8
e. L'altération de la cognition sociale dans la maladie d'Alzheimer 8
III. Bases neurobiologiques de la cognition sociale chez les rongeurs 10
a. Le cortex préfrontal (PFC) 12
b. Le noyau paraventriculaire de l'hypothalamus 13
L'ocytocine 13
L'arginine-vasopressine (AVP) 14
c. L'hippocampe 15
IV. L'aire CA2 18
a. Implication de l'aire CA2 dans les fonctions cognitives 18
b. L'aire CA2 dans le circuit hippocampique 20
Les afférences de l'aire CA2 22
Les projections de l'aire CA2 24
c. Particularités anatomiques et fonctionnelles des neurones de l'aire CA2 ... 26
Morphologie des neurones pyramidaux de l'aire CA2 26
Profil d'expression protéique des neurones pyramidaux de l'aire CA2 28
d. Le système inhibiteur 30
V. Interneurones à parvalbumine 32
a. Implication des interneurones PV dans l'activité cérébrale 33
Les oscillations thêta 33
Perturbation des oscillations thêta dans la maladie d'Alzheimer 34
Les oscillations gamma 35
Perturbation des oscillations gamma dans la maladie d'Alzheimer 36
VI. Les réseaux périneuronaux, ou PNN 38
a. Structure des PNN 38

b. Formation des PNN 39
L'homéobox de l'orthodenticule – 2 (Otx2) 42
La voie NRG1/ErbB4 44
c. Régulation de la plasticité des interneurones PV et de leur PNN dans l'apprentissage et la mémorisation 45
d. Rôle des PNN dans l'activité des interneurones PV. 47
e. Les PNN dans la maladie d'Alzheimer. 48
VII. Une plasticité spécifique PV-dépendante dans l'aire CA2 50
a. Rôle des PNN dans la plasticité de l'aire CA2 52
OBJECTIFS 55
MÉTHODES 61
I. Modèles animaux 63
a. Souris Tg2576 63
b. Souris DORflox 63
II. Chirurgie 64
a. Anesthésie gazeuse 64
b. Injections aigües de solutions de ChABC, NRG1b ou adénovirales dans l'aire CA2 65
Généralités 65
Injections aigües de Chondroïtinase-ABC dans l'aire CA2 65
Injections aigües de NRG1b dans l'aire CA2 66
Injections adénovirales dans l'aire CA2 66
c. Implantation des électrodes subdurales 67
Procédure d'enregistrement et analyse des signaux 69
III. Tests comportementaux. 69
a. Paradigme à trois chambres 69
b. Test de mémoire sociale à 5 essais 71
c. Test de localisation d'objet 72
d. Test de discrimination olfactive 73
IV. Histologie et immunohistochimie 74
a. Perfusion et préparation des tissus 74
Perfusion intracardiaque 74
Préparation des tissus 74
b. Immunohistochimie 75
Principe de l'immunofluorescence 75

Généralités 75
Triple marquage PV/WFA/PCP4 76
Double immunofluorescence PV/GFP 77
Double immunofluorescence PV/Fos 77
c. Analyse des résultats histologiques 79
Généralités 79
Quantification du nombre d'interneurones PV et de leur PNN 81
Mesure de l'intensité de fluorescence des neurones PV 81
Mesure de l'intensité de fluorescence de la WFA dans l'aire CA2 82
RÉSULTATS 83
1. Définir le lien entre la maturation des interneurones à parvalbumine de l'aire CA2 et l'émergence de la mémoire sociale à la fin de l'adolescence. 85
1.1. Modifications anatomiques et fonctionnelles de l'aire CA2 au cours du développement post-natal. 85
1.2. Implication des PNN et des récepteurs delta opioïdes de l'aire CA2 dans la mémoire sociale. 88
1.2.1. Les PNN dans l'aire CA2 sont nécessaires à la formation de la mémoire sociale. 88
1.2.2. Les récepteurs delta opioïdes dans l'aire CA2 sont nécessaires à la formation de la mémoire sociale. 91
1.3 Conclusion. 96
2. Dysfonctionnements des interneurones à parvalbumine dans l'aire CA2 et les troubles de la mémoire sociale chez des souris modèles de la maladie d'Alzheimer. 98
2.1. Évolution du réseau PV/PNN de l'aire CA2 et des capacités de mémoire sociale en fonction du décours de la pathologie des souris Tg2576 98
2.2. Modification de la transmission inhibitrice et de la plasticité PV-dépendante dans l'aire CA2 des souris Tg2576. 103
2.3. Capacité de reconnaissance et de mémoire sociale des souris Tg2576 109
2.4. La perte des PNN dans l'aire CA2 cause-t-elle des déficits de mémoire sociale ? 112
2.5. Rétablir la présence de PNN dans l'aire CA2 des souris modèles de la MA est-il suffisant pour restaurer leur mémoire sociale ? 115
2.6. Conclusion 121
3. Activation de l'aire CA2 en réponse aux stimulations sociales 122
3.1. Influence des stimulations sociales sur l'activité des interneurones PV de l'aire CA2 122
3.2. Influence des stimulations sociales sur l'activité cérébrale. 125

3.3. Conclusion 128
CONCLUSION GÉNÉRALE 131
DISCUSSION 135
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES 149
ANNEXES 171

ABRÉVIATIONS

Aβ	bêta amyloïde
AICD	Amyloid precursor protein intracellular domain
APP	Amyloid precursor protein
AVP	Arginine-vasopressine
Avpr1b	récepteur 1b à Arginine-vasopressine
BACE-1	Beta-site APP cleaving enzyme 1
BSA	Bovin Serum Albumin
C83	βAPP C-terminal C-terminal de 83 résidus
C99	βAPP C-terminal C-terminal de 99 résidus
CA	Corne d'Ammon
CB	Calbindine
CCK	Cholecystokinine
CGL	Couche de cellules granulaires
ChABC	Chondroïtinase-ABC
Cre	Cre-recombinase
CS	Collatérales de Schaffer
CSPG	Chondroïtine sulfate protéoglycane
DG	Gyrus denté
DPDPE	[D-Pen2,5]-Enkephalin hydrate
DREADD	Designer Receptor Exclusively Activated by Designer Drugs
DOR	Delta opioid receptor
EE	Environnement enrichi
EEG	Électroencéphalogramme
EMG	Électromyogramme
EPSP	Potentiels post-synaptiques excitateurs
ErbB4	Récepteur à la tyrosine kinase erbB-4

FAD	Familial Alzheimer's Disease
FFT	Transformée de Fourier rapide
GABA	Acide γ-aminobutyrique
GAG	GlycoAminoGlycane
GalNac	N-acetylgalactosamine
GENUS	Gamma ENtrainment Using Sensory stimulus
HA	Acide hyaluronique
hAPP	human Amyloid precursor protein
HAS	Hyaluronane synthase transmembranaire
HFS	Stimulation à haute fréquence
Hz	Hertz
iLTD	Dépression à long-terme des synapses inhibitrices
IP	Injection intrapéritonéale
IPSC	Courant post-synaptique inhibiteur
IPSP	Potentiel post-synaptique inhibiteur
IRM	Imagerie par résonance magnétique
IRMf	Imagerie à résonance magnétique fonctionnelle
LCR	Liquide céphalo-rachidien
LTP	Long Term Potentiation : Potentialisation à long terme
MA	Maladie d'Alzheimer
MCI	Mild Cognitive Impairment
mEPSC	Courants post-synaptiques excitateurs miniatures
ML	Couche moléculaire
MMSE	Mini Mental State Examination
Nac	Noyau accumbens
NaCl	Chlorure de sodium

NDS	Normal donkey serum
NFT	Neurofibrillary Tangles
NMDA	Acide N-méthyl-D-aspartique
NPY	Neuropeptide Y
NRG1	Neuréguline 1
NSO	Noyau supraoptique
NTg	Non-transgénique
Otx2	Protéine 2 de l'homeobox de l'orthodenticule
Oxt	Ocytocine
Oxtr	Récepteur à l'ocytocine
PB	Phosphate buffer
PBS	Phosphate buffer saline
PBST	Phosphate buffer saline Triton
PCP4	Purkinje Cell Protein 4
PFA	Paraformadéhyde
PFC	Cortex préfrontal
PFCm	Cortex préfrontal médian
PNN	Perineuronal net
PrL	Cortex prélimbique
PSEN1	Préséniline 1
PSEN2	Préséniline 2
PV	Parvalbumine
PVN	Noyau paraventriculaire
REM	Rapid eye movement
sAPPα	APP soluble α
SL	Stratum Lucidum
SLM	Stratum lacunosum moleculare
SO	Stratum Oriens

SOM	Somatostatine
SP	Stratum Pyramidale
SR	Stratum Radiatum
SuM	Noyau supramammillaire
RGS14	Régulateur de la signalisation de la protéine G 14
Tn-R	Tenascine-R
TRITC	Tetramethylrhodamine
VIP	vasoactif intestinal peptide
Vglut1	Vesicular glutamate transporter 1
VmG	Valeur moyenne de gris
VMH	Noyau ventro-médian de l'hypothalamus
WFA	Wisteria Floribunda Agglutinine

INTRODUCTION

I. Le concept de mémoire sociale

Chez les mammifères sociaux, la capacité à reconnaitre leurs congénères est fondamentale pour développer des relations et interagir avec d'autres individus. En psychologie sociale, la cognition sociale concerne les processus mentaux impliqués dans la perception de l'état d'esprit de l'autre et dans l'aptitude à anticiper les réactions des interlocuteurs (Frith et Frith, 2005). La compréhension des informations sociales repose sur des processus cognitifs comme la perception, l'intégration, la mémorisation, le raisonnement et l'interprétation (Frith et Frith, 2008).

La perception sociale, la catégorisation ou la mémorisation, qui permettent le traitement de signaux sociaux et l'acquisition de savoirs sociaux (Frith, 2008) sont des processus dits de bas niveau. Chez les rongeurs, la perception des informations sociales se fait essentiellement par l'odorat, alors que chez les primates, cette perception sociale s'effectue principalement *via* la vision et l'ouïe pour permettre la reconnaissance faciale et/ou vocale.

L'émergence du comportement social nécessite des capacités plus élaborées, dites de haut niveau et désignées par le terme de la théorie de l'esprit. Ces capacités permettent à un individu, d'effectuer un travail introspectif pour élaborer une représentation des états mentaux de son interlocuteur (Frith, 2008). L'empathie est une des capacités impliquée dans la théorie de l'esprit.

De nombreuses études ont cherché à déterminer les bases neurobiologiques sous-tendant les processus de la cognition sociale, que ce soit pour des facultés de bas niveaux comme la perception sociale ou pour des facultés de hauts niveaux comme l'empathie ou la capacité à attribuer des états mentaux aux individus ou à soi-même.

Dans certain contexte pathologique, comme c'est le cas dans la maladie d'Alzheimer, l'altération des structures impliquées dans la cognition sociale provoque une modification de la capacité des individus à intégrer des informations sociales.

II. La maladie d'Alzheimer

a. Généralité

La maladie d'Alzheimer (MA) est une maladie neurodégénérative qui se caractérise par des altérations cérébrales et une diminution progressive des capacités cognitives (notamment la mémoire et le langage) ainsi que des troubles psycho-

comportementaux. La découverte de cette pathologie en 1906 par Aloïs Alzheimer, a été permise par la description du cas de sa patiente Auguste Deter qui présentait à 51 ans des déficits cognitifs, une désorientation, une aphasie, des idées délirantes et un comportement imprévisible. Des analyses histo-pathologiques *post-mortem* ont ensuite démontré une atrophie du cerveau, la présence d'agrégats diffus (plaques amyloïdes) entre les neurones et de faisceaux denses de neurofibrilles. Ces deux derniers éléments anatomiques sont aujourd'hui considérés comme des marqueurs typiques de cette maladie (Moller et Graeber, 1998).

Aujourd'hui on sait qu'il existe deux types de MA : la forme familiale et la forme sporadique. La forme familiale (FAD) concerne moins de 5 % des cas de MA et est caractérisée par une apparition précoce des troubles cognitifs. Tous les cas de FAD sont causés par des mutations génétiques autosomiques dominantes des gènes APP, PSEN1 ou PSEN2 (Gotz et al., 2018). Toutes ces mutations affectent des gènes impliqués dans la voie protéolytique de la protéine précurseur amyloïde (APP), ce qui entraîne une surproduction de peptides β-amyloïde (Aβ). Aujourd'hui, plus de 33 mutations associées aux FAD ont été décrites pour le gène APP. Le gène PSEN1 code la préséniline 1 et le PSEN2 la préséniline 2 qui font partie du complexe enzymatique de la gamma-secrétase, qui est également impliquée dans la production d'Aβ.

La forme sporadique de la MA concerne la grande majorité des patients atteints de MA, soit plus de 95 % des cas. Elle apparait tardivement et a une origine multifactorielle. Si l'âge est l'un des principaux facteurs de risque de cette forme sporadique, il existe un grand nombre de facteurs de risque comme les antécédents de type traumatisme cérébral, les maladies vasculaires comme l'hypercholestérolémie, l'hypertension, l'athérosclérose, les maladies coronaires, la consommation de tabac, l'obésité et le diabète (Mayeux, 2003 ; Barnes et Yaffe, 2011) ainsi que l'isolement social (Fratiglioni et al., 2000).

b. Modifications structurales du cerveau au cours de la maladie d'Alzheimer.

La progression de la pathologie est caractérisée par l'apparition et l'accumulation de lésions histologiques visibles lors d'examen *post-mortem* et par imagerie à résonance magnétique fonctionnelle (IRMf) notamment les dégénérescences neurofibrillaires, les plaques séniles et l'atrophie cérébrale (Perl 2010). Ces lésions sont toujours

considérées comme les principales signatures histo-pathologiques de la MA et sont utilisées pour confirmer le diagnostic clinique.

Les dégénérescences neurofibrillaires

Les enchevêtrements neurofibrillaires (Neurofibrillary Tangles, NFT) sont composés de protéines Tau hyperphosphorylées et constituent un facteur délétère impliqué dans la survenue des troubles cognitifs de la maladie d'Alzheimer (Brion et al., 1985 ; Cho et al., 2018). La protéine Tau est une protéine du cytosquelette neuronal et est notamment impliquée dans l'assemblage des microtubules (Hirokawa et al., 1988). La présence de protéines Tau hyperphosphorylées dans le cerveau des patients Alzheimer, provoque la formation de structures filamenteuses ou d'agrégats aberrants incapables de se lier aux microtubules. Les formes agrégées de la protéine Tau seraient cytotoxiques (Khlistunova et al., 2006) et leur présence est associée aux altérations cognitives des patients atteints de la MA (Buee et al., 2000). Les NFT apparaissent progressivement au cours de la pathologie. Initialement, les premières NFT sont visibles au niveau du cortex entorhinal et de l'hippocampe. Par la suite, les NFT se propagent dans les zones limbiques, pour enfin atteindre les zones corticales (Figure 1).

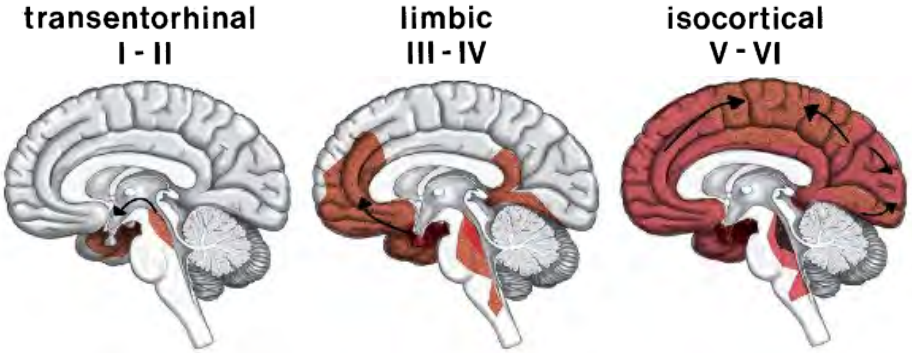


Figure 1 : Évolution de la distribution spatiale des NFT dans la maladie d'Alzheimer.
On peut dénombrer 6 stades dans la tauopathie associée à la MA (I-VI). La propagation des lésions de NFT est indiquée en rouge.
I-II : *Aux stades initiaux, les NFT sont localisés aux niveaux supérieurs du cortex transentorhinal.*
III-IV : *Aux stades intermédiaires, des atteintes sévères sont décrites dans les régions transentorhinales et entorhinales, et d'autres moins importantes dans l'hippocampe et dans plusieurs noyaux sous-corticaux.*
V-VI : *Aux stades sévères, un développement massif de la pathologie neurofibrillaire dans les zones d'association néocorticales est observé avec une augmentation des altérations dans les régions touchées au cours des stades I-IV.*
D'après Braak et Braak, 1991

Les plaques amyloïdes

Les plaques amyloïdes extracellulaires résultent de l'assemblage du peptide Aβ en fibrilles puis en plaques. Le peptide amyloïde qui compose ces plaques est majoritairement constitué de 40 acides aminés (Aβ40) ou de 42 acides aminés (Aβ42). La périphérie des plaques amyloïdes présente des couronnes de prolongements neuritiques chargées de protéines Tau entrainant une réaction inflammatoire locale et une dégénérescence (Selkoe, 1991). Les observations *post-mortem* du cerveau de patients atteints de MA sporadique ou familiale montrent une forte accumulation du peptide Aβ. Les agrégats extracellulaires Aβ sont initialement retrouvés dans les zones corticales primaires, puis avec le temps, deviennent visibles au niveau des aires corticales associatives, notamment dans l'hippocampe pour enfin se répandre sur l'ensemble des cortex notamment le cortex sensori-moteur (Figure 2). Ces observations ont conduit Hardy et Higgin en 1992 à exposer l'hypothèse dite de la cascade amyloïde selon laquelle, l'accumulation extracellulaire du peptide Aβ est à l'origine des troubles cognitifs (Hardy et Higgins, 1992).

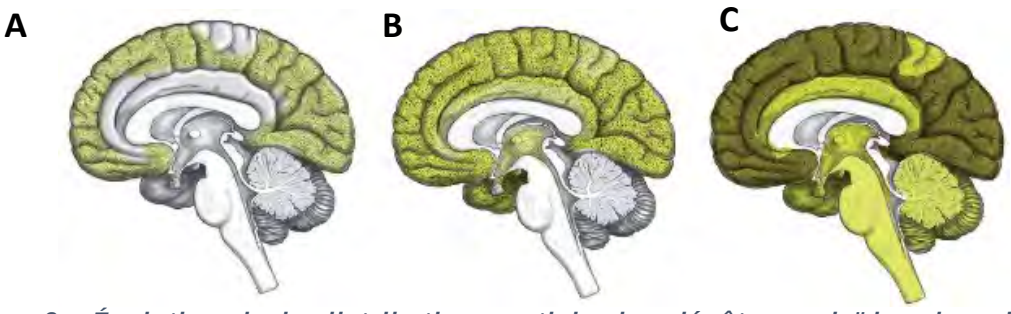


Figure 2 : Évolution de la distribution spatiale des dépôts amyloïdes dans la Maladie d'Alzheimer.
L'augmentation de la nuance de gris indique une augmentation de dépôts amyloïdes.
A : *Les dépôts amyloïdes sont d'abord localisés dans la partie basale de l'isocortex.*
B : *Pour s'étendre à toutes les aires corticales.*
C : *Au stade final, les dépôts amyloïdes sont présents sur l'ensemble de l'isocortex mais aussi au niveau des aires motrices et sensorielles. D'après Braak et Braak, 1991*

c. La cascade amyloïde

Comme vu précédemment, l'Aβ est le principal constituant des plaques amyloïdes. Cette accumulation d'Aβ dans le cerveau en condition pathologique est causée par la protéolyse excessive de l'APP. Deux voies de protéolyse de l'APP sont décrites, une voie non pathologique qui ne produit pas de peptide Aβ (non-amyloïdogène) et une voie pathologique produisant l'Aβ et qui serait impliquée dans la MA (amyloïdogène)

(Figure 3). Ces deux voies diffèrent par les enzymes impliquées dans le clivage de l'APP et par les résidus produits.

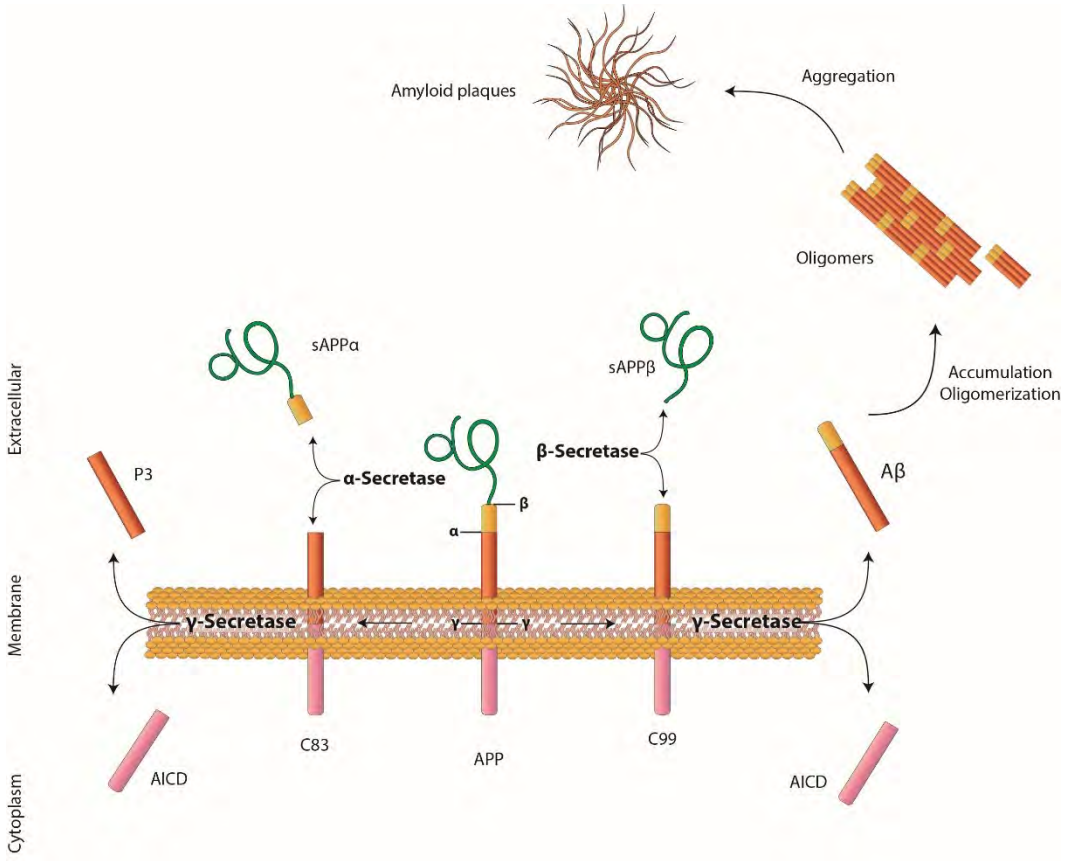


Figure 3 : Illustration schématique des voies amyloïdogènes et non-amyloïdogènes
Centre : *La protéine précurseur amyloïde-β (APP) est la cible de clivages protéolytiques en série.*
Gauche : *La α-secrétase est impliquée dans la voie non-amyloïdogène. Son clivage de l'APP génère sAPP-α et le fragment C83 (APP C-terminale à 83 résidus). La protéolyse du fragment C83 par la gamma-secrétase libère l'APP intracellulaire (AICD) et un court fragment appelé P3.*
Droite : *Dans la voie amyloïdogène, la β-secrétase clive APP pour générer sAPP-β et le fragment C99 (APP C-terminal à 99 résidus). Ensuite, le clivage de C99 par la gamma-secrétase produit le fragment Aβ et l'AICD. L'accumulation de l'Aβ conduit à son oligomérisation et plus tard à son agrégation en plaques amyloïdes. D'après Rey et al., 2019*

En condition non pathologique, l'APP est clivée par l'α-sécrétase puis par la γ-secrétase. Le premier clivage de l'APP par l'α-sécrétase produit deux fragments, la partie APP soluble (sAPPα) libérée dans le milieu extracellulaire, et le fragment C83 (APP C-terminale à 83 résidus) qui reste ancré au niveau de la membrane plasmique. Le complexe enzymatique γ-secrétase clive ensuite le fragment C83, produisant le domaine intracellulaire de l'amyloïde (AICD) et le peptide p3, dont la fonction demeure inconnue, est formé dans le milieu extracellulaire.

Pour la voie amyloïdogène, la β-sécrétase ou enzyme de clivage de l'APP du site beta-1 (BACE) clive APP, libérant la sAPPβ au niveau extracellulaire et le carboxy-terminal

de 99 résidus (C99) au niveau transmembranaire. Enfin, la γ-secrétase provoque la formation du peptide Aβ et AICD après le clivage du résidu C99 (Querfurth et La Ferla 2010). L'accumulation progressive du peptide Aβ soluble provoque la formation de fibrilles pouvant s'agréger sous forme de plaques amyloïdes (Figure 3).

d. L'atrophie cérébrale

Les altérations tissulaires observées chez les patients atteints par la MA sont associées à une atrophie cérébrale se traduisant par l'amincissement du cortex, un élargissement des ventricules et des sillons corticaux (Perl, 2010). Aujourd'hui, la mesure de l'épaisseur corticale en IRM permet de prédire la progression de la pathologie. En effet, on peut constater un amincissement cortical dès le stade précoce de la MA (Colliot et al., 2008 ; Bakkour et al., 2009). Ces atrophies sont localisées dans les régions temporo-médiales, notamment dans l'hippocampe et l'amygdale, ainsi que dans les régions préfrontales et pariétales (Singh et al., 2006). Ces régions sont notamment impliquées dans la cognition sociale et les fonctions cognitives.

e. L'altération de la cognition sociale dans la maladie d'Alzheimer

Les troubles cognitifs chez les patients atteints par la MA sont progressifs (Feldman et al., 2005). La propagation des altérations cognitives peut être déterminée à l'aide de tests neuropsychologiques permettant de tester différents types de mémoire (antérogrades/rétrogrades, épisodiques ou sémantiques). Dans les études cliniques le MMSE (Mini Mental State Examination) est souvent utilisé. Le score maximum du MMSE est de 30 : si le score est inférieur à 10, l'atteinte cognitive est jugée sévère (Sorbi et al., 2012 ; Folstein et al., 1975). Le MMSE permet de caractériser 4 stades de la pathologie, du plus précoce au plus sévère, Mild Cognitive Impairment (MCI) (MMSE : 29-26), Maladie d'Alzheimer légère (MAl) (MMSE : 26-15), Maladie d'Alzheimer modérée (MAm) (MMSE : 15-10) et Maladie d'Alzheimer sévère (MAS) (MMSE : 10-0) (Figure 4).

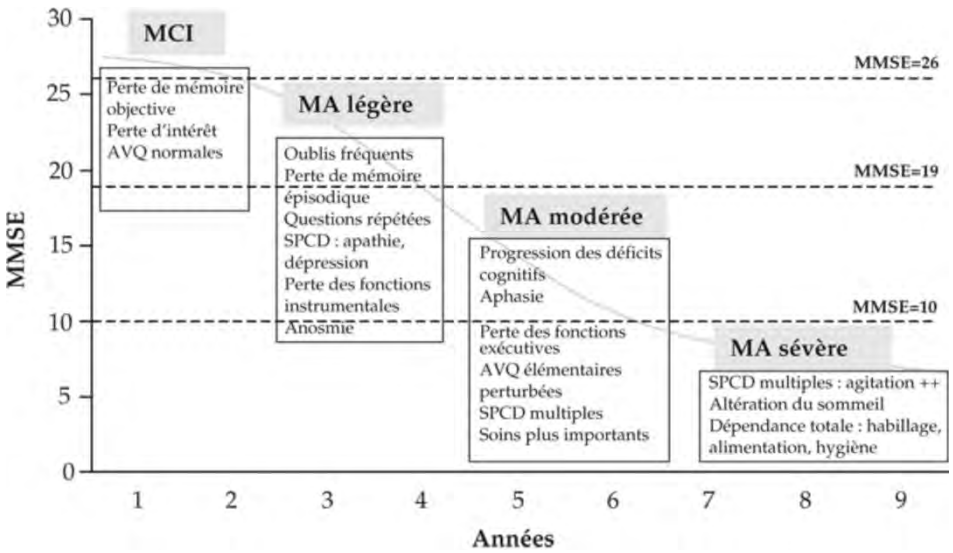


Figure 4 : Progression des symptômes de la MA et scores MMSE correspondant à chaque stade de la pathologie.
MMSE : mini examen de l'état mental, MCI mild cognitive impairment ;AVQ : Activité de la vie quotidienne ;SPCD : symptômes psychologiques et comportement. D'après Feldman et Woodward, 2005.

Cependant, ces évaluations des atteintes cognitives et psychomotrices - incluant la désorientation spatio-temporelle, troubles du langage (aphasie), des troubles du geste (apraxie) et des atteintes des fonctions exécutives - ne mesurent pas vraiment les troubles de la cognition sociale.

Pourtant, plusieurs altérations de nature sociale sont observées chez les patients atteints par la MA, notamment la reconnaissance de soi-même ou d'autrui et de l'expression émotionnelle. Les patients en stade léger de la MA, sont capables de reconnaissance émotionnelle et de discrimination des émotions faciales simples. En revanche, ils présentent des difficultés dans des tâches plus subtiles notamment celle qui consiste à relier une émotion à une situation donnée (Torres et al., 2015). Des études longitudinales ont examiné la progression des troubles de reconnaissance de l'expression faciale chez des sujets MCI et des patients MA modérés, par rapport à des sujets sains de même âge. Les sujets MCI n'ont aucun problème à reconnaitre les expressions faciales. Les patients MA modérés présentent des difficultés à reconnaitre la colère, le dégout, et la surprise alors que la capacité de reconnaissance de la joie est conservée (Bediou et al., 2009 ; Maki et al., 2013 ; Kohler et al., 2005). Cette altération de la discrimination des expressions faciales notamment aversives pourrait être causée par une altération de la région temporo-médiale et plus spécifiquement l'amygdale (Spoletini et al., 2008). Au-delà de ces troubles, les patients MA présentent

des altérations de la reconnaissance des visages. Par exemple, la reconnaissance de personnages célèbres est plus difficile chez des patients MA légers comparée à des personnes saines du même âge. Les performances sont encore plus faibles quand il est nécessaire de mettre un nom, d'identifier ou même de donner des informations complémentaires sur cette personne (Small et al., 1997 ; Hodges et al., 1993). Ces altérations sont encore plus prononcées dans les stades modérés et sévères de la pathologie (Hodges et al., 1993). Des études plus récentes démontrent que les patients MA légers mettent plus de temps à se reconnaitre ou à reconnaitre des visages familiers, et ce déficit s'accentue chez les patients modérés (Kurth et al., 2015).

Ces études démontrent que dès les premiers stades de la pathologie, les patients présentent des modifications de la reconnaissance des visages et des émotions. Ces troubles, ainsi qu'à l'incapacité des patients à se reconnaitre, augmentent avec la pathologie. L'étude de la patiente K.R de 80 ans, en stade sévère de la MA, illustre ces altérations de la cognition sociale (Hehman et al., 2005). Dans cette étude, la patiente incapable de se reconnaitre sur des photographies de 40-80 ans alors qu'elle se reconnait sur des photographies prises au cours des deux premières décennies de sa vie adulte (Hehman et al., 2005). Ces résultats suggèrent que la mise à jour de la représentation de soi et des informations sociales est altérée dans la MA. Ceci indique aussi que les patients souffrant de formes sévères de la MA sont dans l'incapacité de mémoriser de nouvelles informations sociales.

L'altération des capacités de cognition sociale dans la MA est associée à la modification des réseaux neuronaux qu'il convient d'étudier. Pour cela, l'utilisation de modèles murins s'avère pertinente pour examiner les processus et mécanismes cellulaires et fonctionnels de la cognition sociale.

III. Bases neurobiologiques de la cognition sociale chez les rongeurs

Chez le rongeur, la cognition sociale est associée à la mémoire sociale et concerne la capacité à reconnaitre et distinguer un individu connu/familier, d'un autre individu, indépendamment du contexte. La mémoire sociale est basée sur deux éléments : la motivation des rongeurs à interagir avec leurs congénères (sociabilité) et la capacité à mémoriser un individu déjà rencontré (reconnaissance et mémoire sociale). Ces éléments peuvent être quantifiés en situation expérimentale en mesurant l'attraction

innée des rongeurs pour un congénère qui est nouveau et inversement, la baisse d'intérêt pour un congénère familier (Thor et Holloway, 1982).

De nombreux tests permettent de mesurer la motivation sociale chez les rongeurs. L'un des paradigmes comportementaux les plus connus est le test à trois chambres (Cf : Méthodes III.a). Ce test consiste à évaluer la préférence des individus pour un stimulus social (un nouveau congénère) plutôt que pour un stimulus non social (objet) (Moy et al., 2004). D'autres tests permettent de mesurer la reconnaissance sociale chez les rongeurs (Cf : Méthodes III.b). Ils exploitent la capacité naturelle des souris à s'habituer à un individu familier et à exprimer un grand intérêt pour un individu nouveau. Ils permettent de déterminer la capacité des souris à discriminer une souris nouvelle, d'une souris familière (Moy et al., 2004). La mémoire sociale est mesurée par un test à 5 essais au cours desquels une même souris est présentée 4 fois, entrainant une habituation ; au 5ème essai un nouvel individu est présenté (Kogan et al., 2000 ; Hitti et Siegelbaum, 2014), entrainant un regain d'intérêt.

Chez l'humain, la théorie de l'esprit est définie comme la capacité à se mettre à la place de l'interlocuteur en prenant en compte ses sentiments, ses besoins et ses désirs ; l'empathie serait donc une aptitude primordiale. Il existe des protocoles comportementaux permettant de mesurer l'empathie chez le rongeur, par exemple en évaluant la modulation de la réponse à la douleur observée au contact d'un congénère. En effet, chez la souris, la présence d'un congénère familier induit un effet hypoalgésique et réduit les crampes abdominales d'un individu ayant reçu une injection intrapéritonéale d'acide acétique. En revanche, la mise en présence de deux souris rendues malades potentialise leur douleur et augmente le nombre de crampes abdominales (Langford et al., 2006). De la même façon, la présence d'une souris familière après un choc électrique limite le score d'immobilisation posturale (freezing) chez la souris (Chen et al., 2009 ; Kim et al., 2012)

Les structures cérébrales impliquées dans la motivation sociale ou la sociabilité, la reconnaissance sociale, la mémoire sociale et l'empathie ont été identifiées à l'aide des paradigmes évoqués ci-dessus. Les rongeurs présentent des homologies avec les primates concernant les mécanismes neuronaux et les structures impliquées dans la cognition sociale, permettant d'envisager des études transrationnelles.

a. Le cortex préfrontal (PFC)

Il a été montré que le PFC des primates, notamment ses régions ventromédiane, médiane et dorsomédiane, présente une certaine homologie avec les régions frontales des rongeurs, telles que le cortex cingulaire antérieur, les aires prélimbiques et les aires infralimbiques (Bicks et al., 2015) (Figure 5).

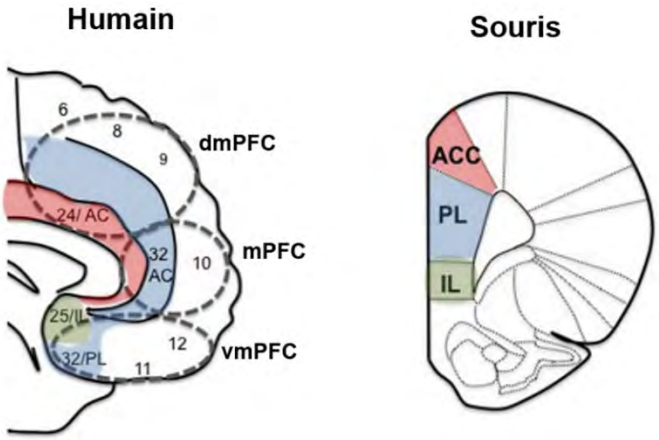


Figure 5 : Schéma des régions préfrontales impliquées dans la cognition sociale chez l'humain et chez la souris.
La région en bleu dans le cerveau humain correspond à l'aire prélimbique (PL) chez le rongeur, la région en rouge dans le cerveau humain correspond au cortex cingulaire antérieur (ACC) chez le rongeur et enfin la région en vert chez l'humain correspond au cortex infralimbique (IL) chez le rongeur. D'après Bicks et al., 2015

La possibilité d'effectuer des lésions ciblées et d'inactiver des populations neuronales spécifiques a permis d'acquérir une bonne connaissance des circuits neuronaux qui sous-tendent les différents aspects de la mémoire sociale des rongeurs. Chez le rat, la lésion du cortex orbitofrontal par injection d'acide quinoléique augmente l'agressivité sans diminuer la motivation à interagir avec un congénère (Rudebeck et al., 2007), démontrant ainsi l'implication de cette structure dans les réponses émotionnelles. Inversement, la lésion du cortex cingulaire antérieur provoque une perte de la reconnaissance sociale sans modifier l'agressivité de l'animal (Rudebeck et al., 2007). Une autre étude chez la souris montre que la lésion du cortex prélimbique (PrL) induit une augmentation de la durée d'interaction sociale, par rapport aux souris contrôles (Avale et al., 2011). La lésion du PrL semble provoquer une désinhibition du processus attentionnel dans le cas d'actions menant à une récompense, comme une interaction sociale (Avale et al., 2011). Les auteurs suggèrent que l'aire PrL serait impliquée dans la flexibilité comportementale et le passage d'un processus attentionnel à un autre (Ragozzino et al., 1999 ; Rich et Shapiro, 2009). De plus, le PFC médian est impliqué

dans la discrimination des signaux olfactifs sociaux, suggérant son implication dans le processus de catégorisation des stimuli olfactifs (Levy et al., 2019).
En conclusion, le PFC agirait comme un centre régulateur pour de nombreux domaines comportementaux chez le rongeur. Différentes régions du PFC sont par ailleurs impliquées dans la motivation, l'attention, la catégorisation et la flexibilité comportementale, qui sont des fonctions essentielles pour la reconnaissance sociale et la mémoire sociale.

b. Le noyau paraventriculaire de l'hypothalamus

Chez les primates comme chez les rongeurs, le noyau paraventriculaire (PVN) de l'hypothalamus est une région importante pour la modulation de la sociabilité et de la mémoire sociale. Cette structure cérébrale a la particularité de posséder des neurones qui produisent et libèrent les neurotransmetteurs et neuromodulateurs ocytocine et arginine-vasopressine (AVP). L'ocytocine et l'AVP sont des peptides neurohypophysaires, synthétisés dans le PVN et le noyau supraoptique (NSO) (Gainer, 1998). Les fonctions actuellement connues de ces deux neuromodulateurs sont présentées dans les paragraphes suivants.

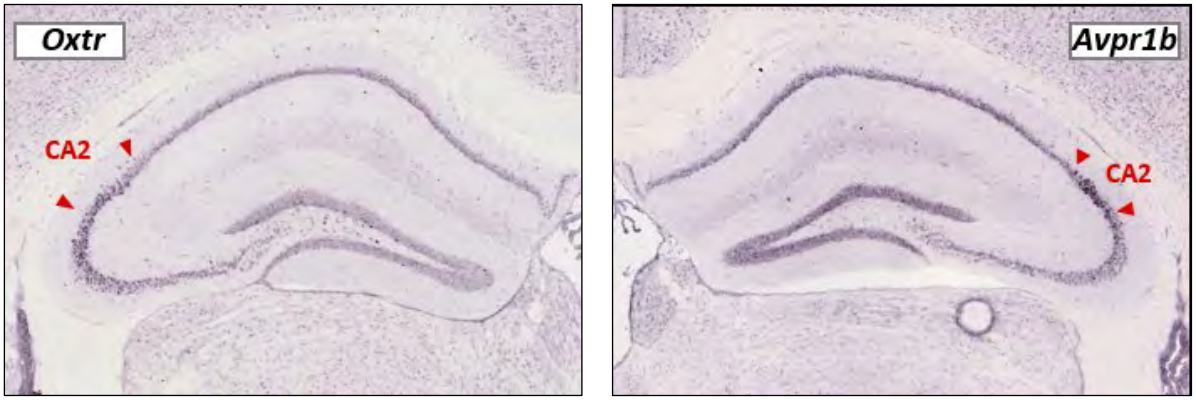


Figure 6 : *Hybridation in situ Otxr et Avpr1b dans l'hippocampe de souris adulte (https://atlas.brain-map.org/)*

L'ocytocine

Dans le PVN, deux populations neuronales exprimant l'ocytocine ont été identifiées : les neurones magnocellulaires qui projettent dans la neurohypophyse, et les neurones parvocellulaires qui projettent dans de nombreuses régions cérébrales (Gainer, 1998). Ces neurones parvocellulaires envoient des projections dans des régions clés pour la modulation des comportements sociaux chez le rongeur, notamment l'hippocampe

ventral et dorsal, le cortex entorhinal, les bulbes olfactifs et les noyaux du raphé (Argiolas et Gessa, 1991). Ainsi, des récepteurs à ocytocine sont présents dans les bulbes olfactifs, le cortex piriforme, le PVN, le raphé dorsal, les noyaux supraoptiques, et dans les aires CA2 et CA3 et le gyrus denté de l'hippocampe (Gimpl et Fahrenholz, 2001 ; Vaccari et al., 1998 ; Hernando et al., 2001 ; Young et al., 2006) (Figure 6). Si la concentration en ocytocine cérébrale dépend de la région considérée, elle varie aussi selon l'individu. En effet, les souris mâles et femelles ne présentent pas les mêmes niveaux d'ocytocine dans le cerveau. De plus, une souris nullipare présente moins d'ocytocine qu'une souris ayant déjà mise bas (Mitre et al., 2016). Les premières découvertes sur la fonction de l'ocytocine chez l'animal proviennent des travaux de Pedersen et Prange qui ont montré que l'administration intra-cérébro-ventriculaire d'ocytocine déclenche un comportement maternel chez les rattes nullipares (Pedersen et Prange, 1979) et renforce la mémoire sociale chez le rat mâle. L'ocytocine joue également un rôle dans les fonctions reproductrices, notamment dans la modulation du cycle ovarien (Fuchs et al., 1998). Par ailleurs, l'infusion d'ocytocine dans les bulbes olfactifs améliore la mémoire sociale de rats mâles (Dluzen et al., 1998). À l'inverse, l'infusion d'un antagoniste des récepteurs à ocytocine dans cette région ne perturbe ni la reconnaissance sociale, ni la mémoire sociale, mais entraine une diminution des interactions sociales, suggérant que l'ocytocine libérée dans les bulbes olfactifs agirait sur la motivation sociale et renforcerait ainsi la mémoire sociale (Dluzen et al., 1998). L'utilisation de souris dont le gène codant l'ocytocine (*Oxt)* (Ferguson et al., 2000) ou le récepteur de l'ocytocine (*Oxtr)* est invalidé (Takayanagi et al., 2005) a permis de renforcer les hypothèses concernant l'implication de ce neuropeptide dans les comportements sociaux, comme la mémoire sociale par exemple. En effet, ces deux lignées de souris mutantes (*Oxt et Oxtr*) présentent une amnésie sociale (déficit de reconnaissance sociale) (Ferguson et al., 2000 ; Takayanagi et al., 2005). Ces travaux, et d'autres, mettent en évidence que l'ocytocine joue un rôle crucial dans la modulation des comportements sociaux chez le rongeur.

L'arginine-vasopressine (AVP)

Les récepteurs Avpr1b sont exprimés dans les bulbes olfactifs, le cortex piriforme, le PVN, le noyau du raphé dorsal, le noyau supraoptique et l'hippocampe, notamment dans l'aire CA2 (Lolait et al., 1995 ; Vaccari et al., 1998) (Figure 6). L'injection sous-

cutanée d'AVP provoque une diminution de l'extinction de la réponse d'évitement et de la mémoire sociale chez le rat mâle, démontrant l'implication de ce neuropeptide dans la régulation de l'apprentissage et de la mémoire sociale (De Wied, 1965). L'infusion d'AVP dans les bulbes olfactifs améliore la capacité de mémoire sociale chez les rats mâles, en augmentant le temps de rétention d'un congénère présenté auparavant. En revanche, l'infusion de l'antagoniste des récepteurs à l'AVP ne perturbe ni la reconnaissance sociale, ni la mémoire sociale, mais diminue le temps total d'interaction avec le congénère. Ceci suggère que, dans les bulbes olfactifs, la vasopressine augmente la motivation sociale (Dluzen et al., 1998).

Des souris dont le gène codant le récepteur à vasopressine Avpr1b est invalidé ont été générées dans les années 2000 et les mâles de cette lignée présentent une forte diminution de leur comportement agressif (Wersinger et al., 2002). Ces souris montrent un déficit d'apprentissage et de mémoire sociale, alors que leur mémoire spatiale est intacte (test de piscine de Morris) ainsi que leur niveau d'anxiété (labyrinthe en croix surélevé) (Wersinger et al., 2002). De plus, leur déficit de mémoire sociale n'est pas dû à un trouble de l'olfaction puisque ces souris Avpr1b-KO conservent la capacité à discriminer des odeurs de souris mâles et femelles, et présentent une activation intacte des neurones des bulbes olfactifs suite à la présentation d'une souris familière (Wersinger et al., 2002 ; Wersinger et al., 2004). L'ensemble de ces données indique que l'activation des récepteurs Avpr1b serait impliquée dans la motivation sociale et dans la capacité à réagir de façon appropriée, en réponse à une agression sociale.

c. L'hippocampe

La formation hippocampique se compose de trois grandes sous-régions : le subiculum, le gyrus denté (DG) et les cornes d'Ammon ; ces dernières se subdivisent en 3 aires, CA1, CA2 et CA3, caractérisées par la morphologie des corps cellulaires et des neurites (Lorente de Nò, 1934), et le profil d'expression protéique de ces neurones (Bienkowski et al., 2018) (Figure 7).

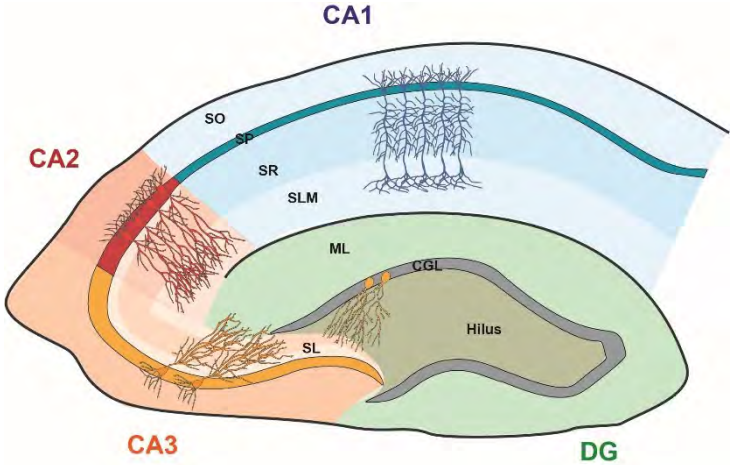


Figure 7 :
Schéma de l'hippocampe de souris. Les cornes Ammon (CA1 en bleu, CA2 en rouge et CA3 en orange) sont représentées avec leurs différentes couches (Stratum Oriens (SO), Stratum Pyramidale (SP), Stratum Radiatum (SR), Stratum lacunosum moleculare (SLM), Stratum Lacidum (SL).
Le gyrus denté (DG en vert) est subdivisé en trois régions (la couche moléculaire (ML), la couche de cellules granulaires (CGL) et le hilus.

Le DG est composé de deux sous-régions : la couche principale, elle-même organisée en deux lames (supérieure et inférieure) et le hile, qui s'étend entre ces lames. Le hile comprend des cellules moussues, glutamatergiques, et des somas des neurones inhibiteurs qui projettent sur l'aire CA3 (Figure 7). La couche principale est quant à elle composée de 1) la couche de cellules granulaires (CGL) où sont situés les somas des cellules granulaires, 2) la couche moléculaire (ML) où sont localisées les arborisations dendritiques des cellules granulaires et les axones provenant du cortex entorhinal qui constituent la voie perforante, et 3) la couche sous-granulaire contenant les corps cellulaires d'interneurones inhibiteurs ainsi que des cellules souches neuronales quiescentes permettant la neurogénèse hippocampique adulte.

Les cornes d'Ammon sont formées de 5 couches anatomiques qui ont des propriétés fonctionnelles bien spécifiques. La couche supérieure, le *stratum oriens* (SO) contient les dendrites basales des neurones pyramidaux et de certains neurones inhibiteurs (interneurones) ainsi que quelques corps cellulaires neuronaux. Le *stratum pyramidale* (SP), comprend la majorité des corps cellulaires des neurones excitateurs et inhibiteurs de l'hippocampe. Les couches les plus internes de l'hippocampe, le *stratum radiatum* (SR), le *stratum lacidum* (SL) et le *stratum lacunosum-moleculare* (SLM) comprennent les dendrites respectivement proximales et distales des neurones pyramidaux et des interneurones (Figure 7).

De par sa connexion avec de nombreuses structures impliquées dans l'intégration des informations spatiales, sociales, émotionnelles et de catégorisation, l'hippocampe joue un rôle fondamental dans le traitement et dans la sémantisation des informations.

Par ailleurs, l'hippocampe semble être impliqué dans la modulation de la reconnaissance sociale chez les rongeurs, notamment grâce à ses connexions avec le PFCm, le cortex cingulaire antérieur et l'amygdale (Tanimizu et al., 2017). Les premiers travaux suggérant l'implication de l'hippocampe dans la régulation du comportement social reposent sur l'injection intra-hippocampique d'un antagoniste Avpr1b chez le rat. Si l'injection est réalisée après la présentation d'un individu inconnu, la ré-introduction de ce même individu ne provoque pas de diminution du temps d'interaction, révélant un déficit de reconnaissance sociale (van Wimersma Greidanus et Maigret, 1996). Ce sont les travaux de Kogan en 2000 qui révèlent l'implication de l'hippocampe dans la mémoire sociale en montrant que sa lésion chez la souris entraine une incapacité à reconnaitre une souris familière (Kogan et al., 2000). Cependant, depuis, peu d'études ont cherché à déterminer quelles sous-régions de l'hippocampe sont impliquées dans la formation de la mémoire sociale. Plus récemment, l'utilisation de marqueurs permettant d'identifier et de distinguer les différentes sous-régions des cornes d'Ammon a permis de montrer que l'une de ces sous-régions apparait particulièrement dédiée à la régulation des comportements sociaux et la mémoire sociale.

IV. L'aire CA2

Grâce aux techniques anatomiques de Golgi, les observations de Lorente de Nò en 1934 lui permettent d'identifier l'aire CA2. La limite entre l'aire CA2 et CA3 est alors définie comme l'extrémité du *stratum lacunosum* (*lacidum*) correspondant à la fin de la couche de fibres moussues de l'aire CA3, alors que la limite entre les aires CA2 et CA1 se situerait dans la zone où on observe un changement radical de la taille et du nombre de neurones pyramidaux associée à un élargissement de la couche pyramidale de l'aire CA2 (Lorente de Nò, 1934) (Figure 8).

Bien qu'utilisée pendant de nombreuses années, cette description reste peu précise et ce n'est que dans les années 2000 que la localisation de l'aire CA2 est précisée, permettant ainsi d'étudier son implication dans les fonctions cognitives.

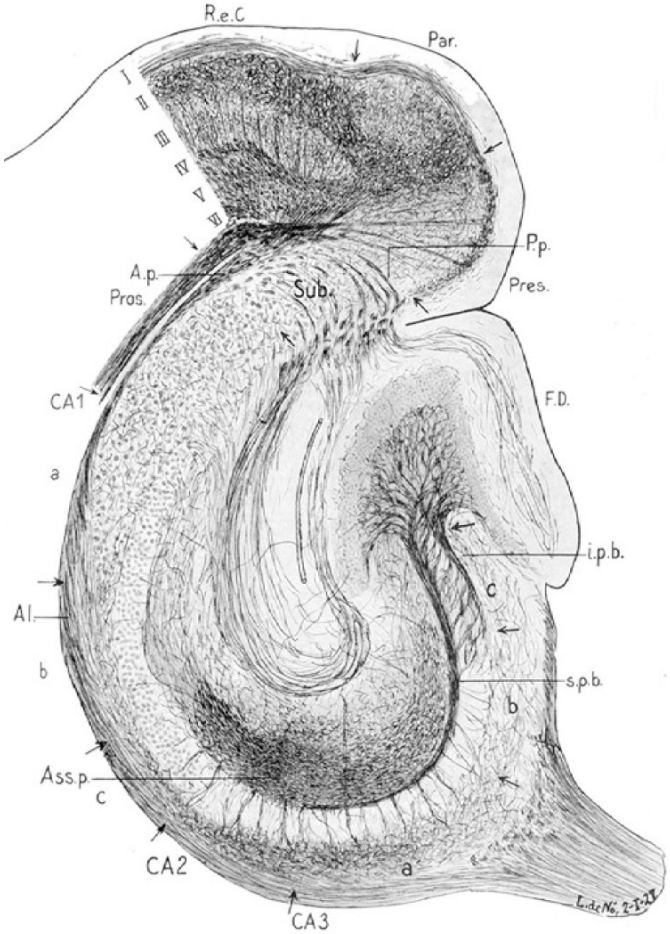


Figure 8 : Représentation de l'hippocampe par Lorente de Nò, 1934

a. Implication de l'aire CA2 dans les fonctions cognitives

L'hippocampe est l'une des structures cérébrales les plus décrites dans la littérature scientifique par l'étude de l'implication de différentes sous-régions telles que le DG, le CA3 et le CA1 dans les processus cognitifs. En revanche, ce n'est que très récemment que le profil d'expression génique des neurones de l'aire CA2 a été établi, permettant ainsi d'identifier certains marqueurs qui lui sont spécifiques par rapport aux autres régions de l'hippocampe (https://atlas.brain-map.org/ : Lein et al., 2007). Cela a permis le développement de souris transgéniques permettant la manipulation spécifique des

neurones de cette région, conduisant à montrer le rôle prépondérant de l'aire CA2 dans la mémoire sociale.

En effet, deux études ont levé l'ambiguïté sur la nécessité de l'aire CA2 dans la formation de la mémoire sociale. Une étude a examiné les conséquences comportementales de lésions induites par l'injection de NMDA dans l'aire CA2 (Stevenson et Caldwell, 2014). Chez les souris lésées, la reconnaissance sociale et la capacité à former une mémoire sociale sont altérées. Cependant la non-spécificité des lésions provoque des dysfonctionnements d'autres régions de l'hippocampe telles que l'aire CA1 et CA3, et limite la compréhension de la contribution de l'aire CA2 dans la mémoire sociale.

Une seconde étude, parue la même année, est basée sur l'inactivation spécifique des neurones pyramidaux de l'aire CA2 de souris Amigo2-cre par la surexpression de la toxine tétanique (Hitti et Siegelbaum, 2014). La toxine induit la suppression de l'activité des neurones pyramidaux de l'aire CA2 et provoque chez les souris une incapacité à reconnaître un congénère, et à former une mémoire sociale. De façon intéressante, cette manipulation ne perturbe pas la sociabilité des souris, ni les autres mémoires hippocampo-dépendantes. L'ensemble de ces données montre que l'aire CA2 joue un rôle crucial dans la reconnaissance des individus et dans la mémoire sociale.

Par la suite, d'autres travaux ont mis en évidence l'implication des systèmes vasopressine et ocytocine dans la modulation du comportement social *via* l'aire CA2. En effet, l'inhibition des Otxr dans l'aire CA2 provoque une perturbation de la reconnaissance sociale (Raam et al., 2017). Par ailleurs, l'activation par optogénétique des fibres vasopressinergiques dans l'aire CA2 augmente fortement la durée de la mémoire sociale chez la souris (Smith et al., 2016). Par conséquent, la modulation Otx et AVP dans l'aire CA2 semble renforcer de façon positive la mémoire sociale, en implémentant une composante émotionnelle dans l'encodage des informations sociales.

La régulation des entrées émotionnelles est un facteur fondamental pour adapter les réponses comportementales sociales en fonction du stimulus. La forte densité de récepteurs Avpr1b dans l'aire CA2 suggère un rôle important dans la régulation des émotions. Soutenant cette idée, les souris Avpr1b-KO présentent une altération de la reconnaissance sociale associée à une diminution de l'agressivité (Wersinger et al., 2002). La restauration de l'expression d'Avpr1b dans l'aire CA2 chez ces souris, par l'injection d'un lentivirus exprimant l'Avpr1b murin, provoque une augmentation de leur

agressivité, suggérant une implication de la vasopressine dans la régulation émotionnelle durant une interaction sociale (Pagani et al., 2015). Ainsi, l'aire CA2 semble agir comme un centre régulateur du comportement social par le biais de neuromodulateurs comme l'AVP et l'ocytocine.

D'autres fonctions sont attribuées à l'aire CA2 comme l'encodage de la mémoire contextuelle. En effet, l'aire CA2 comprend des cellules de lieu, c'est-à-dire dont la fréquence d'émission de potentiels d'action dépend de la position de l'animal dans son environnement. Cependant, les cellules de lieu de l'aire CA2 présentent des champs de lieu plus larges et plus nombreux que ceux des autres aires de l'hippocampe. Ceci indique que le codage spatial de ces cellules possède une mauvaise résolution spatiale. De plus, l'exposition répétée à un contexte n'améliore pas la précision des cellules de lieu de CA2 contrairement à celles de CA1 et CA3. L'ensemble de ces données suggère que les cellules de lieu de CA2 ont une implication différente dans le codage spatial (Mankin et al., 2015 ; Lu et al., 2015).

En effet, une autre particularité des cellules de lieu de l'aire CA2 est leur sensibilité aux changements de contextes et à la présentation d'un congénère (Alexander et al., 2016). Ainsi, l'activité des cellules de lieu de l'aire CA2 serait plutôt liée à la détection et au codage de la nouveauté contextuelle et sociale, permettant une mise à jour continuelle de la représentation contextuelle et sociale pendant l'exploration d'un nouvel environnement.

Ces données indiquent qu'au sein de l'hippocampe, l'aire CA2 participerait à l'intégration du contexte social dans un environnement, et jouerait un rôle prépondérant dans la régulation des comportements sociaux ; cela suggère une intégration dans le circuit hippocampique particulière et des connexions extra-hippocampiques différentes des autres régions de l'hippocampe.

b. L'aire CA2 dans le circuit hippocampique

Dans le circuit hippocampique, une multitude de voies neuronales coexistent pour permettre le passage et l'intégration des informations. La première description de la connectivité du circuit intra-hippocampique, nommé circuit trisynaptique, a été réalisée par Andersen et ses collègues (Andersen et al., 1969). Ce circuit unidirectionnel comprend trois grandes voies de projections excitatrices sur différentes sous-structures de l'hippocampe. Selon cette vision classique, les neurones de la couche 2

du cortex entorhinal (CE) projettent sur les cellules granulaires du DG *via* la voie perforante (Andersen et al., 1969) ; les axones de ces neurones granulaires, constituent les fibres moussues, et convergent vers les dendrites proximales des neurones de CA3. Les axones des neurones pyramidaux de CA3 forment des contacts synaptiques avec les neurones de l'aire CA1 *via* les collatérales de Schaffer (CS). Enfin, les neurones de CA1 connectent à leur tour le cortex entorhinal par le subiculum (Figure 9 : flèche rouge).

Cependant, et contrairement à ce qui devrait découler d'un tel circuit trisynaptique, l'inactivation de l'aire CA3 ne modifie pas la capacité du cortex entorhinal à stimuler l'aire CA1 (Chevaleyre et Siegelbaum, 2010). Ceci suggère l'existence d'un circuit monosynaptique contournant CA3. En effet, les neurones pyramidaux de la couche 2 du cortex entorhinal projettent directement sur le *stratum radiatum* de l'aire CA1 pour ensuite atteindre le cortex entorhinal par le subiculum (Figure 9 : flèche bleu).

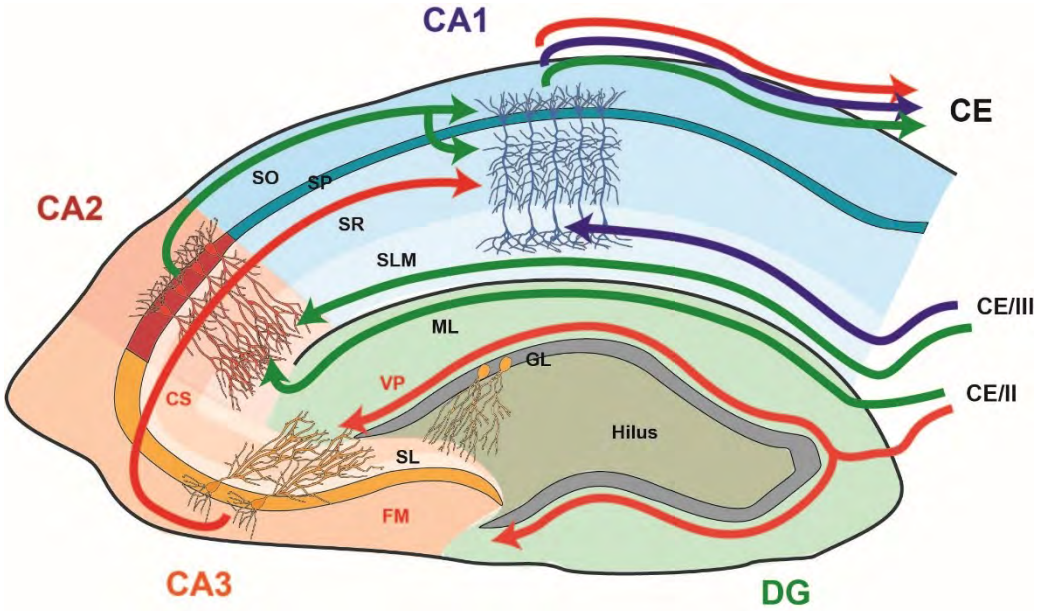


Figure 9 : Représentation des différentes circuits intrahippocampiques
Flèche rouge : *circuit trisynaptique CE-GD-CA3-CA1*
Fèche bleu : *circuit monosynaptique CE-CA1*
Fleche vert : *circuit disynaptique CE-CA2-CA1*

Durant de nombreuses années, l'aire CA2 n'apparaissait pas dans le circuit hippocampique car son identification histologique était impossible du fait de l'absence de critères précis et de marqueurs spécifiques. Ce n'est que récemment que l'aire CA2 a été intégrée dans la description anatomique du circuit hippocampique. Le développement et l'utilisation d'outils anatomiques, comme les marqueurs rétrogrades *Fluoro-Gold* et *Green Retrobeads* (Cui et al., 2013), ou génétiques comme les virus

rabiques rétrogrades trans-synaptiques (Kohara et al., 2014 ; Hitti et Siegelbaum, 2014) ont permis d'identifier les projections afférentes spécifiques à l'aire CA2. Ainsi, l'injection de ces traceurs dans l'aire CA2 induit le marquage de neurones localisés notamment dans les couches 2 et 3 du cortex entorhinal et dans l'aire CA3 (Cui et al., 2013 ; Kohara et al., 2014 ; Hitti et Siegelbaum, 2014). Ces outils ont révélé l'existence d'un circuit disynaptique au sein de l'hippocampe, qui transite par l'aire CA2. Les neurones des couches 2 et 3 du cortex entorhinal projettent sur les dendrites distales des neurones de l'aire CA2 dans le *stratum lacunosum-moleculare*. Ces axones innervent ensuite les neurones de l'aire CA1 pour enfin retourner vers le cortex entorhinal (Figure 9 : Flèche verte).

De plus, des enregistrements électrophysiologiques révèlent que la stimulation des couches 2 et 3 du cortex entorhinal provoque une forte activation des neurones pyramidaux de l'aire CA2, une potentialisation à long terme et une hyperpolarisation des neurones pyramidaux de CA1 (Chevaleyre et Siegelbaum, 2010). Inversement, la stimulation de l'aire CA3 par les CS provoque une faible dépolarisation dans l'aire CA2 mais une forte activation de l'aire CA1, suggérant la présence d'une inhibition par rétroaction (feedforward inhibition) sur les neurones de l'aire CA2 par l'aire CA3 (Chevaleyre et Siegelbaum, 2010). Ainsi, le circuit disynaptique de l'hippocampe offrirait la possibilité de contourner le circuit trisynaptique, en passant par l'aire CA2.

Les afférences de l'aire CA2

L'aire CA2 reçoit des afférences provenant de structures extra-hippocampiques, lui conférant la fonction d'intégrateur d'informations requises pour former la mémoire sociale. L'injection de traceurs rétrogrades dans l'aire CA2 a révélé l'existence de projections vasopressinergiques en provenance du PVN (Cui et al., 2013) (Figure 10). Par ailleurs, l'activation optogénétique des neurones à vasopressine du PVN d'une souris en train d'interagir avec un congénère augmente la mémoire sociale à long terme lors du test de reconnaissance sociale (Smith et al., 2016). Par conséquent, les projections du PVN modulent l'activité des neurones CA2 durant une interaction

sociale, suggérant que le CA2 code les informations sociales dans un contexte et/ou l'établissement d'une mémoire sociale.

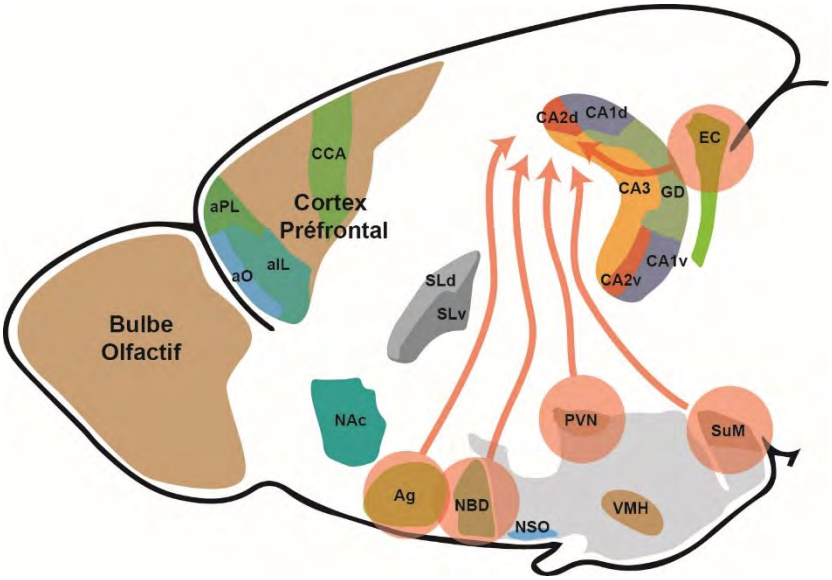


Figure 10 : Schéma des entrées extra-hippocampique de l'aire CA2.
L'aire CA2 reçoit des projections du cortex enthorinal (EC) notamment des neurones de la couche 2 et 3. D'autre projections sont décrites comme l'amygdale (Ag), la bande diagonale de Broca (NBD) et de nombreux noyaux de l'hypothalamus comme le noyau paraventriculaire (PVN), le noyau supramammillaire (SuM).

L'aire CA2 reçoit également des projections provenant du noyau supramammillaire (SuM) de l'hypothalamus postérieur, et plus précisément des neurones produisant la substance P, un neurotransmetteur associé à l'anxiété (Borhegyi et Leranth, 1997 ; Magloczky et al., 1994 ; Cui et al., 2013 ; Kohara et al., 2014 ; Hitti et Siegelbaum, 2014) (Figure 10). Les neurones du SuM sont activés lors d'une situation de stress comme lors d'une tâche de conditionnement de peur (Beck et Fibiger, 1995) ou pendant l'exploration d'un nouvel environnement (Ito et al., 2009). Par ailleurs, la lésion du SuM provoque chez le rat, un effet anxiolytique qui suggère son implication dans la modulation des aspects émotionnels (Aranda et al., 2006). Cependant, aucune étude n'a permis de faire un lien entre la modulation du SuM et sa potentielle implication dans la formation de la mémoire sociale. Par ailleurs, le SuM est impliqué dans la modulation directe des oscillations thêta dans l'hippocampe (Kirk 1998 ; Nakanishi et al., 2001 ; Panet et McNaughton, 2002). Ainsi, le SuM permettrait de réguler l'activité hippocampique à travers l'aire CA2. Ces éléments suggèrent que, sous l'influence de l'activité des neurones du SuM, les neurones de l'aire CA2 jouent un rôle de relai intégrateur des informations émotionnelles dans l'hippocampe. L'aire CA2, sous

l'influence du SuM serait également impliquée dans la modulation et la synchronisation de l'activité du réseau hippocampique.
L'aire CA2 reçoit en outre des projections en provenance de la bande diagonale de Broca, du noyau du raphé médian et du septum médian qui ne seront pas détaillées dans ce manuscrit (Cui et al., 2013 ; Hitti et Siegelbaum, 2014) (Figure 10).
En résumé, l'aire CA2 reçoit les projections de nombreuses structures impliquées dans la régulation des comportements sociaux chez les rongeurs, démontrant son rôle central dans l'intégration des informations et l'encodage de la mémoire sociale.

Les projections de l'aire CA2

L'utilisation de traceurs antérogrades et la réalisation d'enregistrements électrophysiologiques ont permis de révéler que l'aire CA2 possède de fortes connexions intra- et extra-hippocampiques. En effet, l'aire CA2 projette sur l'ensemble des Cornes d'Ammon (CA1, CA2 et CA3), de façon ipsi- et controlatérale (Cui et al., 2013 ; Hitti et Siegelbaum 2014), ce qui souligne sa position fondamentale dans la modulation du circuit hippocampique (Figure 11).
L'aire CA2 possède la particularité d'avoir des projections efférentes tout le long de l'axe rostro-caudal de l'hippocampe (Cui et al., 2013), lui conférant la capacité de réguler aussi les régions ventrales de l'hippocampe. Si l'hippocampe dorsal est impliqué dans les fonctions mnésiques, l'hippocampe ventral est plutôt associé à l'intégration des informations émotionnelles. Récemment, un circuit impliquant l'aire CA2 dorsale, le CA1 ventral et le noyau accumbens (Nac), et favorisant la formation de la mémoire sociale, a été décrit (Meira et al., 2018) (Figure 11). Par ailleurs, chez le rongeur, l'inactivation de l'aire CA1 ventrale par optogénétique lors d'une interaction sociale provoque une perturbation de la mémoire sociale (Okuyama et al., 2016 ; Meira et al., 2018). L'aire CA2 permettrait le transfert des informations sociales importantes dans l'aire CA1 ventrale, où elles seraient encodées sous forme d'un schéma d'activation spécifique appelé ''engramme'' (Okuyama et al., 2016 ; Tonegawa et al., 2015). Dans ce contexte, le Nac contribuerait à renforcer la formation d'engrammes dans l'aire CA1 ventrale pour permettre la consolidation de la mémoire sociale.

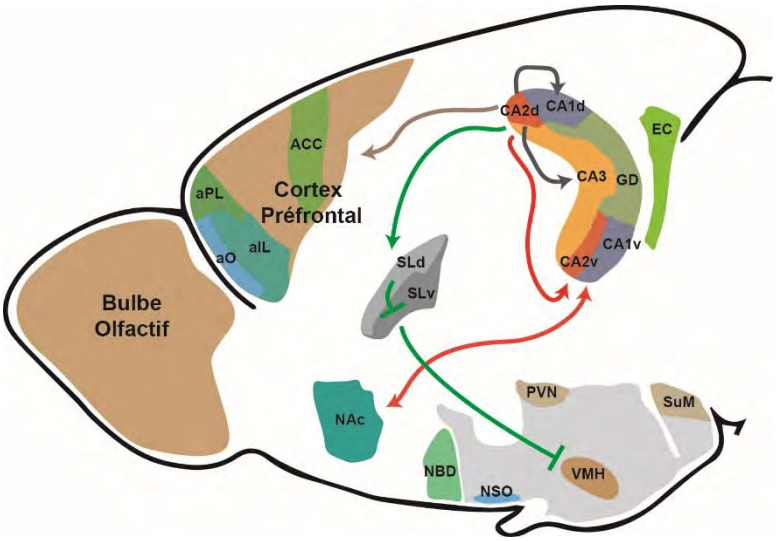


Figure 11 : Schéma des connexions extra-hippocampiques de l'aire CA2 impliquées dans la modulation des comportements sociaux.
L'aire CA2 projette en intra-hippocampique, dans les régions dorsales (CA1d, CA3) ou dans les régions ventrales (CA2v et CA1v). L'aire CA2 a aussi des projections extrahippocampiques notamment dans les régions frontales (cortex cingulaire antérieur (ACC), l'aire préslimbique (aPL), l'aire infralimbique (aIL) et l'aire orbitofrontale (aO) ainsi que dans le septum latéral (SLd et SLv) et dans le noyau accumbens (Nac).

L'aire CA2 projette aussi dans le septum latéral localisé dans la partie postérieure du lobe frontal (Cui et al., 2013). Le septum latéral se compose des noyaux latéro-dorsal et latéro-ventral et possède une forte population de neurones inhibiteurs GABAergiques. Les neurones inhibiteurs du septum latéro-dorsal vont réguler l'activité des interneurones du septum latéro-ventral qui inhibent le noyau ventro-médian de l'hypothalamus (VMH). Le VMH est impliqué dans la régulation du comportement agressif chez le rongeur (Wong et al., 2016). Une étude récente suggère que la stimulation des neurones de l'aire CA2 par les neurones à vasopressine, renforce le tonus inhibiteur exercé par le septum latéro-dorsal sur le septum latéro-ventral, ce qui provoque une désinhibition des neurones du VMH et une augmentation de l'agressivité (Leroy et al., 2018).

Le schéma de connectivité de l'aire CA2 est unique dans l'hippocampe, et confère à CA2 des fonctions spécifiques (Figures 10 et 11). Grâce à ses connexions avec des régions qui intègrent les informations sociales et émotionnelles, l'aire CA2 est potentiellement impliquée dans toutes les phases de la formation de la mémoire sociale, incluant l'encodage, la consolidation et le rappel (Hitti et Siegelbaum, 2014 ; Meira et al., 2018). Chez le rongeur, les connexions indirectes que possède l'aire CA2 avec des régions qui régulent le comportement agressif (VMH) et la valence des stimuli

(Nac), sont stratégiques pour lui permettre d'agir comme un centre modulateur du comportement social

c. Particularités anatomiques et fonctionnelles des neurones de l'aire CA2

Les neurones pyramidaux de l'aire CA2 présentent des caractéristiques morphologiques, des propriétés biophysiques, synaptiques, et des profils d'expressions génétiques et protéiques différents de ceux des neurones des autres aires hippocampiques.

Morphologie des neurones pyramidaux de l'aire CA2

Morphologiquement, les somas des neurones pyramidaux de l'aire CA2 sont 2 à 3 fois plus grands que ceux de l'aire CA1 (Ishizuka et al., 1995). Ces neurones présentent également une ramification dendritique différente des autres neurones de l'hippocampe. Dans CA1, les neurones possèdent une seule dendrite apicale parsemée de nombreuses dendrites secondaires qui longent le SR pour s'arrêter au niveau du SLM (Ishizuka et al., 1995). Cette dendrite principale se développe alors horizontalement en quelques branches dendritiques. Dans CA2, les neurones pyramidaux présentent une toute autre organisation : leur dendrite apicale bifurque près du soma pour se séparer en deux ou trois dendrites apicales qui s'étendent jusqu'au SLM (Figure 12). Ces dendrites sont peu ramifiées en dendrites obliques secondaires le long du SR. En revanche, au niveau du SLM, les dendrites apicales se ramifient en de nombreuses branches verticales (Ishizuka et al., 1995). Par ailleurs, les épines dendritiques des neurones pyramidaux de CA2 sont plus grandes et plus nombreuses que celles des neurones de CA1 (Srinivas et al., 2017).
Les neurones pyramidaux de CA2 sont également différents de ceux de CA3. Le nombre de dendrites dans le SO est plus important dans les neurones de l'aire CA3. En revanche, les dendrites apicales localisées dans le SR et SLM seraient plus diffuses dans l'aire CA2 que dans les neurones de CA3 (Ishizuka et al., 1995).

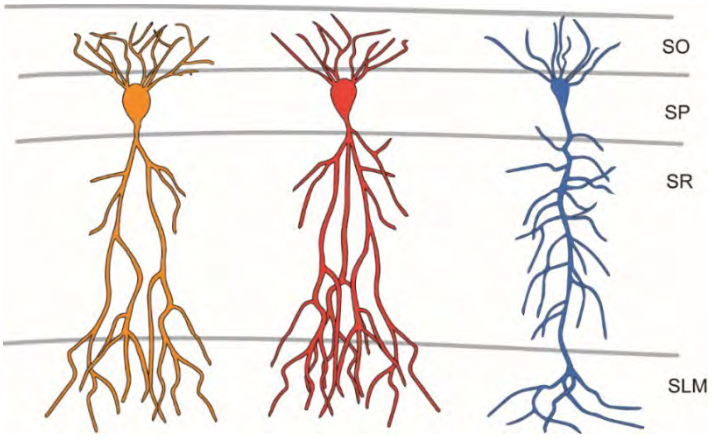


Figure 12 : Schéma de la morphologie des neurones excitateurs de l'aire CA3, CA2 et CA1
Les neurones de l'aire CA3 et CA2 présentent de nombreuses ramifications dendritiques contrairement au neurones de CA1.

Cette morphologie particulière des neurones de l'aire CA2 leur confère des propriétés électrophysiologiques spécifiques, notamment, la capacité des potentiels post-synaptiques de remonter plus facilement les dendrites provenant du SLM vers le soma par un effet de sommation, qui a lieu à chaque croisement des dendrites apicales. De plus, le faible nombre de dendrites obliques au niveau du SR limiterait la déperdition des potentiels excitateurs qui se propagent vers le soma des neurones de l'aire CA2 ce qui n'est pas le cas dans l'aire CA1 (Piskorowski et Chevaleyre, 2012) (Figure 13).

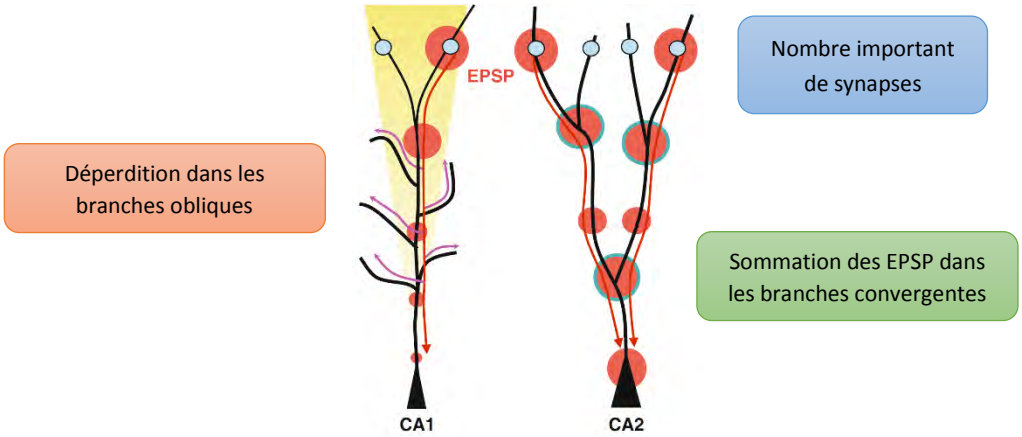


Figure 13 : Schéma du mécanisme de l'excitation des neurones pyramidaux de l'aire CA2 et CA1
Les neurones de l'aire CA1 présentent une forte déperdition des potentiels post-synaptiques excitateur (EPSP, rond rouge) causé par leurs nombreuses dendritiques obliques. Les neurones de CA2 arborent de nombreuses synapses dans le SLM.
Les nombreuses branches dendritiques permettent une sommation des EPSP tout le long des branches dendritiques distales. Ainsi, les entrées excitatrices distales sont favorisées dans les neurones de CA2 comparées aux neurones de CA1. D'après Piskorowski et Chevaleyre, 2012

D'autre part, la morphologie singulière des neurones pyramidaux de l'aire CA2 suggère que les informations provenant du SLM ou SR sont régulées différemment. En effet, la stimulation des collatérales de Schaffer ne permet pas l'induction d'une potentialisation à long terme (LTP) dans la couche pyramidale de l'aire CA2, contrairement à ce qu'on peut observer dans l'aire CA1 (Chevaleyre et Siegelbaum, 2010 ; Zhao et al., 2007). Ceci peut notamment s'expliquer par les propriétés morphologiques des neurones pyramidaux de l'aire CA2 décrites précédemment. En effet, les CS projettent directement sur les dendrites proximales des neurones de l'aire CA2 par le SR. Cependant, les dendrites proximales ont la particularité d'exprimer un faible nombre de dendrites obliques et ainsi limiteraient leur stimulation (Zhao et al., 2007). Au contraire, la stimulation des projections directes du cortex entorhinal sur le SLM des neurones pyramidaux de l'aire CA2 provoque une augmentation plus importante des potentiels post-synaptiques excitateurs (EPSP) que dans les somas des neurones de CA1 (Srinivas et al., 2017) (Figure 13). Par conséquent, la morphologie des neurones de l'aire CA2 permet un traitement de l'information différent en fonction de sa provenance de l'information.

Profil d'expression protéique des neurones pyramidaux de l'aire CA2

La présence de certaines protéines dans les neurones de l'aire CA2 confère également une résistance à l'induction de LTP. Par exemple, ces neurones expriment fortement les canaux potassiques TREK-1 et TREK-2 (Talley et al., 2001) (Figure 14). Ceci leur confère un potentiel de membrane au repos plus faible, nécessitant une stimulation plus importante pour permettre l'émergence d'un potentiel d'action, en comparaison de ce qui est observé dans les neurones de l'aire CA1 (Zhao et al., 2007). Cependant, l'application d'un bloqueur des canaux potassiques (le Césium) ne permet pas d'induire une LTP dans l'aire CA2 (Zhao et al., 2007). Ainsi, même si l'expression de TREK-1 et 2 modifie l'excitabilité des neurones de l'aire CA2, d'autres facteurs semblent impliqués dans leur incapacité à exprimer une LTP.

En effet, les neurones de l'aire CA2 expriment également une protéine qui limite la transduction du signal, la protéine RGS14 (Figure 14). Celle-ci inhibe les protéines G en augmentant l'activité de la GTPase dans le neurone (Lee et al., 2010 ; Vellano et al., 2011). L'induction de la LTP dans l'aire CA2 est rendue possible chez des souris pour lesquelles le gène codant RGS14 est invalidé (Lee et al., 2010). Ceci démontre

que la présence de cette protéine est déterminante dans cette incapacité à former une LTP dans l'aire CA2. La protéine RGS14 dans les neurones de l'aire CA2 limiterait la transmission du signal le long des dendrites apicales jusqu'au soma et bloque l'induction de la LTP.

Figure 14 : Hybridation in situ de PCP4, RGS14 et TREK-2 dans l'hippocampe de souris adultes. (https://atlas.brain-map.org/).

ces différents marqueurs sont principalement localisés dans l'aire CA2 de l'hippocampe.

De plus, les neurones pyramidaux de l'aire CA2 expriment fortement une protéine régulant le calcium, la calbindine (Sloviter, 1989 ; Leranth et Ribak, 1991), et le PEP-19 (PCP4) (Ziai et al., 1988 ; Renelt et al., 2014) qui est impliqué dans la régulation de l'activité neuronale (Figure 14). Ces protéines sont également exprimées dans les neurones inhibiteurs, les neurones granulaires du DG, et les cellules de Purkinje. L'application d'un inhibiteur de pompe calcique permet d'induire de la LTP dans les neurones de l'aire CA2, similairement à ceux de l'aire CA1, démontrant que la forte présence de ces régulateurs du calcium intracellulaire limite l'induction de cette plasticité dans l'aire CA2 (Simons et al., 2009).

L'apparition de ces caractéristiques morphogénétiques des neurones de CA2 a lieu au cours du développement post-natal et suggère que la plasticité de l'aire CA2 évolue au cours du processus de maturation cérébrale. Par exemple, la présence de l'ARNm et de la protéine RGS14 augmente au cours du développement et atteint un maximum à l'âge adulte (Evans et al., 2014), comme c'est le cas également pour la protéine PCP4 (San Antonio et al., 2014). L'apparition tardive de ces protéines pourrait être associée à l'apparition de la résistance à l'induction de la LTP qu'on observe chez l'adulte dans les neurones de CA2. À ce jour, aucune étude n'a mis en évidence l'implication de cette plasticité dans les comportements sociaux, à priori sous-tendus par l'aire CA2.

Par ailleurs, l'expression de ces protéines protège efficacement les neurones de l'aire CA2 comparés aux autres neurones de l'hippocampe face aux activités convulsives ou aux ischémies chez le rongeur (Sloviter et Damiano, 1981) et chez l'humain (Hatanpaa et al., 2014).

Cependant, l'aire CA2 semble être très sensible aux lésions causées par la MA. Chez les personnes âgées non atteintes, l'aire CA2 présente un nombre remarquablement faible de NFT par rapport aux autres régions de l'hippocampe. En revanche, dans le cadre de la MA, la présence de NFT augmente beaucoup plus dans l'aire CA2 que dans les autres aires hippocampiques (Mizutani et Shimada, 1991 ; Takayama et al., 2002). Chez les rongeurs modèles de la MA, une forte concentration du fragment βAPP C-terminal (C99) est retrouvée dans les neurones de l'aire CA2 (Figure 3) (Kammesheidt et al., 1992). Associée à ces marquages histo-pathologiques, une forte diminution de la calbindine est observée dans les neurones de l'aire CA2 de patients MA, suggérant que la résistance de ces neurones face aux lésions cytotoxiques est fortement altérée et pourrait contribuer aux troubles de cognition sociale associés à la pathologie (Maguirezeiss et al., 1995). L'altération des neurones excitateurs n'est pas la seule observation constatée chez les patients MA et chez les souris modèles de la pathologie. En effet, la MA est aussi associée à une forte diminution des interneurones inhibiteurs GABAergiques dans l'aire CA2, notamment des interneurones à parvalbumine (PV), suggérant une altération de la régulation inhibitrice de cette aire en conditions pathologiques, qui pourrait également contribuer aux déficits de mémoire sociale (Brady et Mufson, 1997 ; Cattaud et al., 2018).

d. Le système inhibiteur

Dans la formation hippocampique, on considère principalement les neurones excitateurs (glutamatergiques) et les interneurones inhibiteurs (GABAergiques). Ces derniers libèrent le GABA qui a la capacité d'hyperpolariser la membrane des neurones post-synaptiques, leur conférant un pouvoir inhibiteur sur les neurones ciblés. Même si les interneurones inhibiteurs ne représentent qu'environ 20% de la population neuronale totale, leur diversité est très importante (Gonchar et al., 2007). Ainsi, on répertorie dans l'hippocampe 21 sous-classes d'interneurones (Klausberger et Somogyi, 2008). Cette forte hétérogénéité est caractérisée par plusieurs facteurs

comme la morphologie, les propriétés biophysiques, l'expression protéique et la connectivité des interneurones (Somogyi et Klausberge, 2005).
Les interneurones possèdent des projections axonales denses permettant d'établir des boucles de rétroactions locales de « feedback inhibition », de « feedforward inhibition », et d'inhibition sélective d'autres interneurones (Kullmann et Lamsa, 2007). (Figure 15).

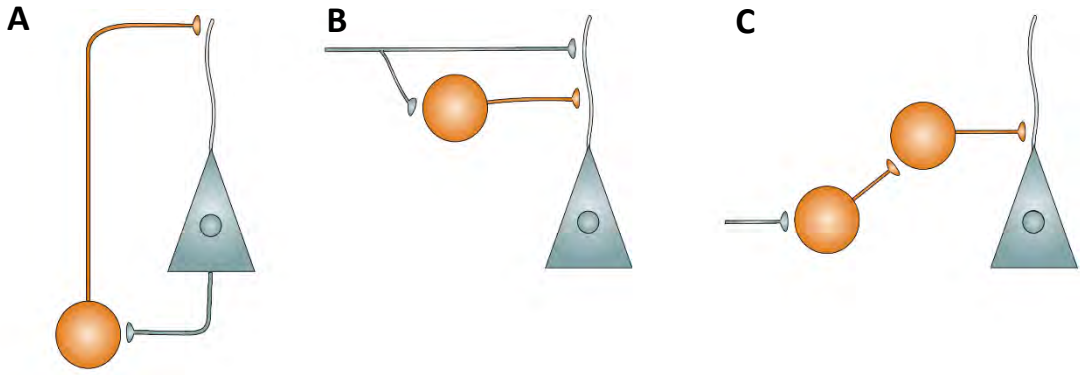


Figure 15 : Circuit inhibiteur local.
Schémas des différentes boucles de rétroaction mises en jeu par les interneurones (cercles orange) et les neurones pyramidaux (triangles bleu).
A : *feedback inhibition ;* ***B :*** *feedfoward inhibition ;* ***C :*** *Désinhibition (inhibition des interneurones par d'autres interneurones). D'après Kullmann et Lamsa, 2007*

Ces différents systèmes de régulation permettent ainsi aux interneurones d'exercer un contrôle inhibiteur sur les neurones excitateurs, de coordonner l'activité de réseaux de neurones, et d'organiser de manière spatiotemporelle le flux d'information.
Associée à ces boucles de rétroactions, ces interneurones possèdent un axone et une arborisation dendritique qui présentent une morphologie particulière. On distingue plusieurs catégories d'interneurones. Les interneurones péri-somatiques qui ciblent les somas et les dendrites proximales des neurones pyramidaux et peuvent aussi inhiber d'autre interneurones ; ces neurones sont notamment les cellules en panier (basket cells) (Freund et Katona, 2007). Les interneurones axo-axoniques ciblent les segments initiaux de l'axone des neurones pyramidaux. Les dendrites de ces interneurones sont localisées dans la SLM, SR et SO (Tremblay et al., 2016). Les cellules bistratifiées envoient leur arborisation axonale dans la SO et SR et ont la capacité de réguler l'activité des neurones pyramidaux directement au niveau de leurs dendrites proximales (Pawelzik et al., 2002 ; Muller et Remy, 2014). Enfin, les interneurones MLO (oriens-lacunosum moleculare) ont leur soma et leurs dendrites dans la SO, alors

que leur axone est localisé dans le SLM. Ces interneurones ont la capacité d'inhiber les dendrites distales des neurones pyramidaux mais aussi des interneurones grâce une innervation axonale dense (Maccaferri et Lacaille, 2003 ; Salesse et al., 2011).
Tous ces interneurones expriment des marqueurs spécifiques tels que la parvalbumine (PV), la reeline, la somatostatine (SOM), la calbindine (CB), la cholecystokinine (CCK), le polypeptide vasoactif intestinal (VIP) ou le neuropeptide Y (NPY). L'expression de ces protéines leur confère des particularités fonctionnelles, notamment les protéines de liaison au calcium telles que PV, SOM et CB.

V. Interneurones à parvalbumine

Les interneurones à parvalbumine (PV) constituent environ 16% de la population interneuronale de l'aire CA2 (Botcher et al., 2014). Ces interneurones expriment la parvalbumine, une protéine de liaison au calcium, qui leur confère la capacité d'émettre des potentiels d'action à haute fréquence (neurones dits fast-spiking) (Caroni, 2015). Cette capacité de décharge rapide est aussi permise par l'expression de plusieurs types de canaux voltage-dépendants, par exemple les canaux potassiques Kv3 et Kv1 (Du et al., 1996) ou encore les canaux sodiques Nav1.1 et Nav1.6 (Hu et al., 2014 ; Ogiwara et al., 2007). Par ailleurs, les interneurones PV ont une arborisation dendritique dense et établissent de nombreuses connexions péri-somatiques et axo-axoniques permettant à chacun d'être connectés à environ 1500 neurones pyramidaux et plusieurs dizaines d'autres interneurones (Chamberland et Topolnik, 2012 ; Cobb et al., 1997). Ces particularités morphologiques et fonctionnelles permettent aux interneurones PV de moduler l'activité d'une large population neuronale *via* un contrôle inhibiteur post-synaptique précis et rapide. Il est intéressant de noter que la capacité d'inhibition des interneurones PV diminue rapidement lors d'une forte stimulation, indiquant que ces interneurones sont plus efficaces sur des courtes périodes (Hofer et al., 2011).
Au niveau cortical, la précision temporelle des interneurones PV permet de contrôler les entrées sensorielles dès la première stimulation des neurones corticaux (HigleyetContreras 2006) et favorise le codage des informations spatiales (Panzeri et al., 2001) et visuelles (Resulaj et al., 2018 ; Cardin et al., 2010). Ainsi, les interneurones PV modulent l'activité et la dynamique des circuits corticaux et, par voie de conséquence, l'activité cérébrale (Cardin, 2018 ; Swadlow, 2003).

a. Implication des interneurones PV dans l'activité cérébrale

Les oscillations cérébrales sont générées par l'activité synchrone de grandes populations de neurones, activité qui varie en fréquence (en Hertz : Hz) et en puissance sur l'EEG, en fonction du type et du nombre de neurones recrutés (Buzsaki et Watson, 2012). Chez le rongeur, ces oscillations sont définies par des bandes de fréquences spécifiques: les oscillations delta (1-4 Hz), les oscillations thêta (5-10 Hz), les oscillations bêta (10-30 Hz) et les oscillations gamma (30-200 Hz) comprenant les oscillations gamma lentes (30-80 Hz) et rapides (80-200 Hz) (Buzsaki et Draguhn, 2004 ; Zheng et al., 2016 ; Bezzina et al., 2015). Dans cette thèse, nous décrirons les oscillations thêta et gamma impliquées dans la stabilité du réseau, et dans les processus de perception et de mémoire.

Les oscillations thêta

Les oscillations thêta sont observées dans l'hippocampe au cours d'une activité exploratoire (Vanderwolf, 1969) ou pendant le sommeil paradoxal (ou rapide eye movement (REM) sleep) (Robinson et al., 1977). La genèse des oscillations thêta dans l'hippocampe est depuis longtemps associée aux régions septales médianes qui projettent directement dans les régions hippocampiques. En effet, la lésion du septum médian abolit les oscillations thêta dans l'hippocampe (Freund et Antal, 1988). Les ondes thêta sont aussi modulées par le SuM qui projette directement sur le septum médian et les régions hippocampiques telles que l'aire CA2 et le DG (Kirk, 1998 ; Nakanishi et al., 2001 ; Pan et McNaughton, 2002).

Par ailleurs, l'hippocampe a la capacité à générer des oscillations thêta *via* ses interneurones PV. En effet, l'inactivation optogénétique spécifique des interneurones PV de CA1 provoque la disparition des ondes thêta dans une préparation septo-hippocampique *ex vivo* (Amilhon et al., 2015). En revanche, l'activation continue des neurones PV de l'aire CA1 induit une augmentation de la puissance de l'activité thêta à une fréquence de 8Hz. Cette étude montre aussi qu'imposer aux interneurones PV un taux de décharge à 8Hz permet de coordonner l'activation des neurones excitateurs entre eux. Par conséquent, les interneurones PV peuvent générer des oscillations thêta dans l'hippocampe, et ainsi synchronisent le circuit local excitateur.

D'autres études renforcent l'idée que les interneurones PV sont importants pour la genèse des oscillations thêta. En effet, l'ablation de la sous-unité NR1 des récepteurs

NMDA des interneurones PV provoque une diminution de la puissance de thêta dans l'hippocampe des souris, suggérant que même la diminution de l'excitabilité des interneurones PV provoque une altération de la bande de thêta. Par ailleurs, ces souris présentent, des déficits dans le test de reconnaissance d'objet et des troubles de mémoire spatiale (Korotkova et al., 2010).

La puissance de thêta varie en fonction de l'apprentissage. En effet, on observe une augmentation de la puissance de thêta chez des souris soumises à un conditionnement de peur au contexte (Ognjanovski et al., 2017). Suite à ce conditionnement, l'inactivation des interneurones PV avec la technique de DREADD altère la mémoire de peur et perturbe la capacité à augmenter de puissance de thêta (Ognjanovski et al., 2017). Cette étude indique que la régulation des oscillations thêta par les interneurones PV stabilise la dynamique locale de l'hippocampe et facilite l'encodage et la formation de la mémoire.

La puissance des oscillations thêta est également très importante au cours du sommeil paradoxal. Un article récent montre que la présence de thêta pendant cette phase de sommeil joue un rôle important dans la consolidation de la mémoire (Boyce et al., 2016). Dans cette étude, les neurones GABAergiques du septum médian sont inactivés par optogénétique spécifiquement pendant les différentes phases de sommeil qui font suite à un apprentissage (tâches de reconnaissance d'objets ou de conditionnement de peur). L'inactivation des interneurones du septum médian pendant le sommeil paradoxal provoque une diminution de la puissance de thêta dans l'aire CA1 et engendre une altération des performances de mémoire.

Ainsi, les oscillations thêta impliquent la synchronisation de l'hippocampe et des autres structures cérébrales, et leur présence est considérée comme critique pour la formation de la mémoire (Cardin, 2018).

Perturbation des oscillations thêta dans la maladie d'Alzheimer

De nombreuses études ont mis en évidence une modification de la puissance des activités cérébrales chez les patients MA, suggérant une altération des mécanismes permettant leur genèse. Précisément, les patients MA montrent une augmentation globale des amplitudes des oscillations thêta au repos (Babiloni et al., 2004 ; Coben et al., 1990).

Cette activité cérébrale aberrante est aussi observée dans les modèles murins de la pathologie. En effet, les souris Tg2576 et 5xFAD montrent une augmentation de la puissance des ondes thêta à des stades avancés de la pathologie (Wisor et al., 2005 ; Kent et al., 2018 ; Siwek et al., 2015). Ces altérations des oscillations thêta sont attribuées à la perturbation des interneurones PV dans les régions hippocampiques. En effet, une réduction du nombre d'interneurones PV a été rapportée dans le cerveau *post-mortem* de patients atteints de MA (Brady et Mufson, 1997), et une telle diminution est également observée dans les modèles murins de la maladie. Par exemple, les interneurones PV sont significativement moins nombreux dès l'âge de 6 mois dans l'hippocampe des souris Tg2576 (Cattaud et al., 2018), et même à un âge plus précoce (2 mois) chez les souris TgCRND8 (Hamm et al., 2017). Cependant, d'autres études présentent des données contradictoires. En effet, une diminution de la puissance des oscillations thêta est observée chez les souris 3xTg-AD (Mondragon-Rodriguez et al., 2018). Les souris APP/PS1, APP, et APP23 montrent également une diminution de la puissance des oscillations thêta (Scott et al., 2012 ; Wang et al., 2002, Ittner et al., 2014) qui semble être associée à une augmentation du tonus inhibiteur des interneurones PV chez les souris APP/PS1 (Hollnagel et al., 2019). En fonction du modèle étudié, la perturbation des oscillations thêta et des interneurones PV semble varier. Toutefois, l'ensemble de ces données soutient l'idée d'une altération de l'activité des interneurones PV, à l'origine de la détérioration de la régulation des oscillations thêta. Il est probable que ces altérations de l'activité cérébrale entrainent un traitement anormal de l'information causant ainsi les troubles de mémoire qui caractérisent la MA.

Les oscillations gamma

Chez les sujets humains, une augmentation sélective des oscillations gamma est observée pendant l'apprentissage et permet de prédire les performances lors du test de rappel (Sederberg et al., 2007). De même, chez les rongeurs, une augmentation de l'activité gamma est induite pendant l'apprentissage ou la détection de la nouveauté (Yamamoto et al., 2014).

Deux publications complémentaires ont permis d'établir le lien entre les interneurones PV et la génération des oscillations gamma. L'une d'elle révèle que l'inactivation des interneurones PV pendant une entrée sensorielle supprime le processus de traitement

sensoriel par le réseau de neurones excitateurs locaux. De plus, l'activation conjointe des interneurones PV à 40 Hz avec une entrée sensorielle permet de renforcer et d'affiner la réponse des neurones excitateurs (Cardin et al., 2009). La deuxième étude montre le lien entre les interneurones PV et la cohérence des oscillations gamma. L'activation des neurones excitateurs dans la fréquence gamma permet d'activer indirectement les interneurones PV. Les oscillations gamma vont être directement impactées par cette stimulation, en bénéficiant d'une diminution du bruit et d'une facilitation du passage de l'information (Sohal et al., 2009). Ces deux études démontrent ainsi le rôle majeur des interneurones PV dans la genèse des ondes gamma et par conséquent, dans la facilitation du transit des informations dans le réseau cortical.

Perturbation des oscillations gamma dans la maladie d'Alzheimer

Les patients atteints par la MA montrent parfois des augmentations aberrantes de la puissance gamma, ce qui pourrait être lié à une diminution de l'inhibition corticale (van Deursen et al., 2011). Mais dans l'ensemble, il est bien admis que les patients atteints de la MA présentent généralement une diminution de la puissance relative des oscillations gamma au repos (Herrmann et Demiralp, 2005 ; Nimmrich et al., 2015).
Dans la majorité des modèles murins de la MA, on constate des oscillations cérébrales anormales dans la fréquence de gamma. Une fluctuation anormale de la puissance gamma induite par le comportement se produit chez les souris Tg2576 âgées de 12 à 14 mois (Cramer et al., 2012). Il est intéressant de noter que les souris TgCRND8 présentent une puissance gamma réduite sur leur EEG au stade prodromique, c'est-à-dire avant les déficits cognitifs détectables et l'accumulation d'Aβ (Hamm et al., 2017). Dans la même ligne, une diminution des puissances gamma a été mise en évidence avant les perturbations de l'apprentissage spatial dans le modèle de souris 5xFAD (Schneider et al., 2014). Enfin, les souris hAPPJ20 présentent de brefs pics d'augmentation de la puissance gamma et de longues périodes de diminution de la puissance gamma, indépendamment de leur état comportemental (Verret et al., 2012).
Chez différents modèles de souris, les interneurones PV montrent des niveaux réduits de sous-unité Nav1.1 des canaux sodiques voltage-dépendants ; c'est le cas des souris des lignées hAPPJ20 (Verret et al., 2012), Tg2576 (Corbett et al., 2017), et TgCRND8 (Hamm et al., 2017). Cette diminution des niveaux d'expression de Nav1.1

dans les cellules PV, que l'on retrouve également chez les patients atteints de la MA, est directement liée à une altération de l'activité du réseau, c'est-à-dire à une diminution des oscillations gamma, à une activité épileptiforme et à des déficits de mémoire (Verret et al., 2012). Ainsi, la restauration du niveau de Nav1.1 chez des souris hAPPJ20 par manipulation génétique (Verret et al., 2012), ou la transplantation d'interneurones embryonnaires surexprimant Nav1.1 (Martinez-Losa et al., 2018), a été suffisante pour augmenter l'activité synaptique inhibitrice, restaurer les oscillations gamma et améliorer les fonctions cognitives (Martinez-Losa et al., 2018 ; Verret et al., 2012) (Figure 16).

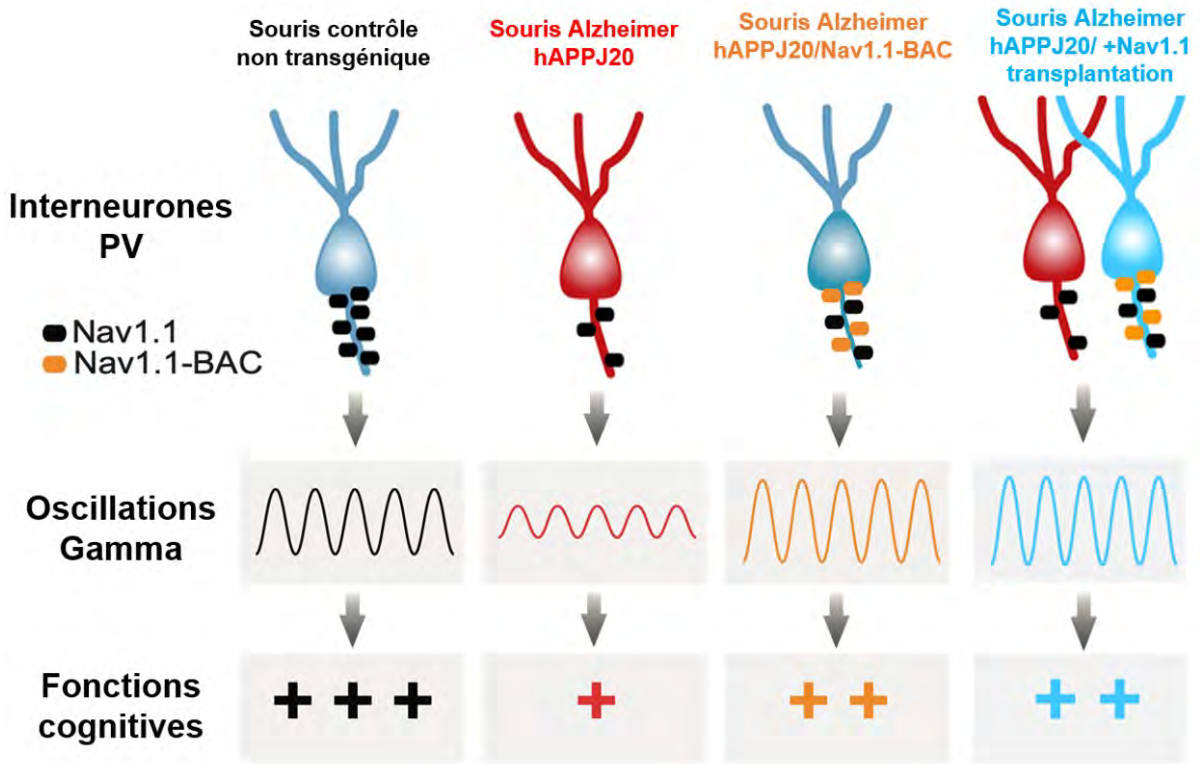


Figure 16 : Implication des interneurones PV dans la régulation des oscillations gamma et sur les fonctions cognitives *chez les souris contrôles non transgéniques (bleu gris, gauche), les souris hAPPJ20 modèles de la maladie d'Alzheimer (rouge, centre), les souris hAPPJ20/Nav1.1-BAC biogéniques (orange, droite) et les souris hAPPJ20 ayant reçu une transplantation d'interneurones PV surexprimant Nav1.1 (bleu, droite). D'après Martinez-Losa et al.,2018; Verret et al., 2012.*

D'autres études montrent que la régulation des oscillations gamma par les interneurones PV permet d'atténuer la charge amyloïde dans le cerveau de souris 5xFAD (Iaccarino et al., 2016). En effet, l'activation des interneurones PV à 40Hz par optogénétique provoque des oscillations gamma et favorise la recapture du peptide Aβ par les cellules microgliales (Iaccarino et al., 2016). Suite à cette étude, la même équipe a induit des stimulations d'ondes gamma par des approches non-invasives et

utilisant des stimulations sensorielles de différentes modalités, comme des stimuli sonores ou visuels. Ce système, appelé GENUS (gamma entrainment using sensory stimulus) permet de réduire la charge amyloïde dans l'hippocampe et restaurer la mémoire spatiale (Martorell et al., 2019).

Ainsi, les cellules PV jouent un rôle clé dans la perturbation du contrôle inhibiteur dans le cerveau des personnes atteintes de la MA, ce qui contribue aux déficits cognitifs tels que l'apprentissage et la mémoire. La stimulation des interneurones PV permet l'amélioration des fonctions cognitives chez les modèles murins de la MA confirmant que leur intégrité est perturbée en condition pathologique. Par ailleurs, les interneurones PV ont la particularité d'exprimer une matrice extracellulaire appelée réseau périneuronal (perineuronal net, PNN), qui est déterminante dans le maintien de leur intégrité et de leur fonction.

VI. Les réseaux périneuronaux, ou PNN

a. Structure des PNN

Les PNN sont localisés sur les corps cellulaires des neurones et leurs dendrites proximales (Figure 17). Les PNN ont été décrits pour la première fois par Camillo Golgi en 1882, qui a observé une structure de forme réticulaire ou continue enveloppant les corps cellulaires de certains neurones ainsi que leurs neurites. Les PNN se composent principalement de chondroïtine sulfate protéoglycan (CSPG), d'acide hyaluronique (HA), de protéines de liaison, et de tenascine-R (Tn-R). Les PNN sont constitués d'un assemblage de ces différents composants, bâti sur un squelette de hyaluronane (polymère d'acide hyaluronique) synthétisé par la hyaluronane synthase transmembranaire (HAS) qui est exprimée sur la surface des neurones (Bruckner et al., 1993 ; Kwok et al., 2010). Cette structure de soutien arbore des sites de liaisons qui fournissent la base pour la fixation des CSPG tels que aggrecan, versican, neurocan, et brevican (Day et Prestwich, 2002). Ces protéoglycans possèdent un nombre variable de chaines de polysaccharides glycosaminoglycanes (GAG) composées d'unités répétitives de disaccharides, elles-mêmes constituées d'acide uronique et de N-acetylgalactosamine (GalNac). Les CSPG qui composent les PNN sont stabilisés par des protéines de liaison (Link) permettant la formation d'une structure dense. Parmi ces protéines, la tenascine-R (Tn-R) assure la fixation des CSPG entre eux en position C-terminal (Lundell et al., 2004).

Glycosaminoglycan	Chondroitin sulfate proteoglycans (CSPGs)			Matrix glycoprotein	Link proteins	Secreted / bound proteins
	Lecticans	Matrix-associated proteoglycans	Cell surface proteoglycans			
Hyaluronan / hyaluronic acid	Aggrecan Brevican Neurocan Versican	Phosphacan	Neuroglycan-C Neuroglycan-G	Tenascin-R	Hyaluronan and proteoglycan link protein 1 (Hapln1/Crtl1) Hyaluronan and proteoglycan link protein 4 (Hapln4/Bral2)	Semaphorin 3A Orthodenticle homeobox 2 protein

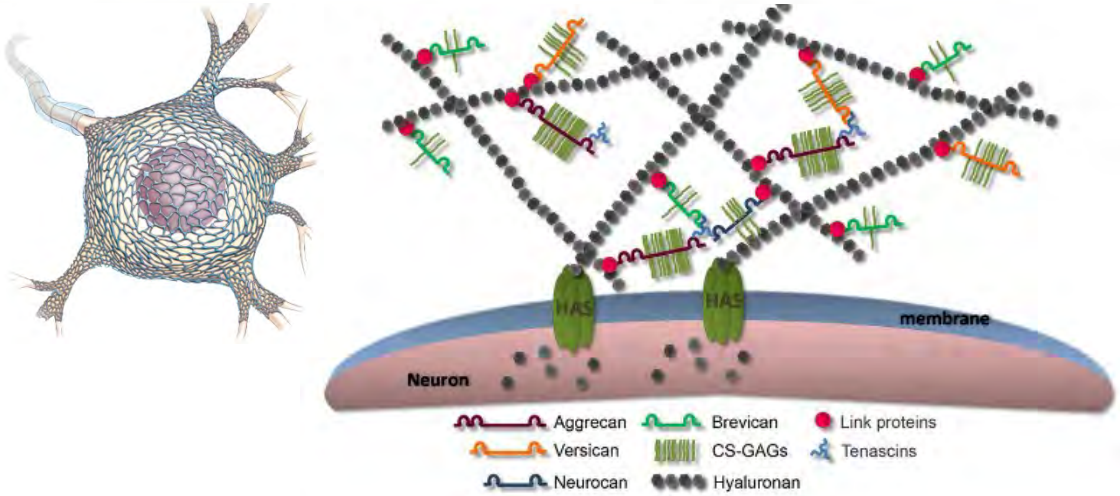


Figure 17 : Structure des PNN.
Le PNN est composé principalement de CSPG de la famille des lecticans (incluant aggrecan, versican, brevican et neurocan), d'un squelette d'acide hyaluronique (HA), des protéines de liaison et de la tenascine-R (Tn-R). L'hyaluronan syntase transmembranaire (HAS) permet aux PNN de se fixer sur la cellule. D'après Kwok et al., 2010.

b. Formation des PNN

La maturation du système nerveux au cours du développement post-natal est associée à une réorganisation des circuits neuronaux et à l'émergence de certaines capacités et fonctions cognitives. On considère généralement un système comme étant mature une fois qu'il a traversé une période dite critique, au-delà de laquelle les stimulations sensorielles et les expériences vécues par les individus ne sont plus en mesure de provoquer des modifications structurales majeures des structures cérébrales. Par ailleurs, la plasticité cérébrale en réponse aux stimulations sensorielles et environnementales est particulièrement importante pendant cette période critique (Hensch, 2005) (Figure 18).

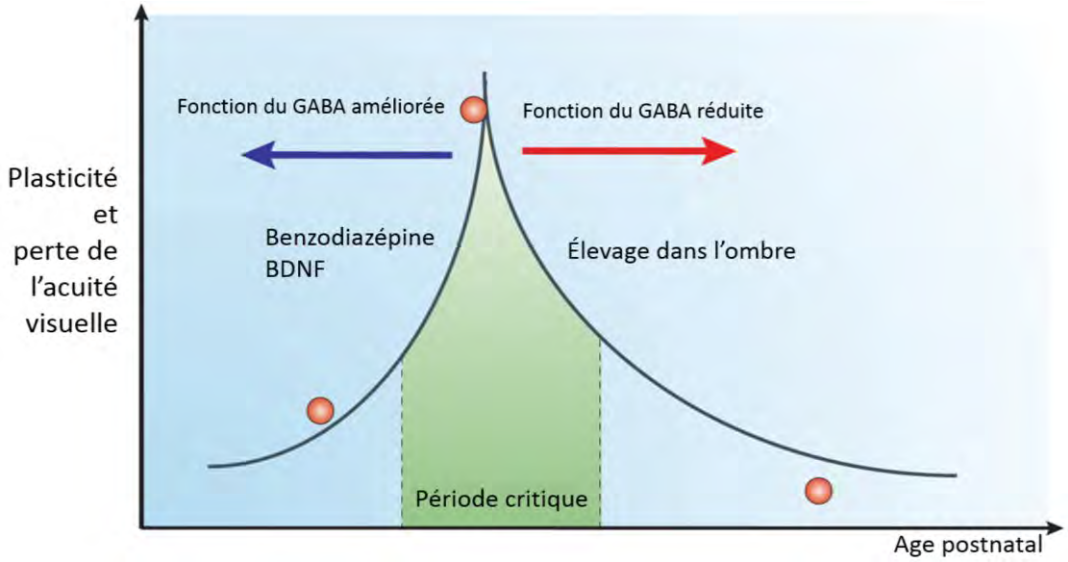


Figure 18 : Maturation du contrôle inhibiteur au cours de la période critique.
L'apparition de la période critique peut être retardée en soumettant les souris à une privation monoculaire ou en limitant la maturation de la transmission GABAergique (Flèche rouge). Cette période critique peut aussi être avancée en renforçant la transmission GABAergique grâce à une injection de benzodiazépines juste après l'ouverture des yeux, ou une surexpression de BDNF pour permettre la maturation rapide des interneurones (Flèche bleue). D'après Hensch, 2005.

Plusieurs études démontrent un lien direct entre la maturation des interneurones PV du néocortex et la période critique (Hensch, 2005). Les premières études démontrant le rôle des interneurones PV dans cette régulation de la plasticité cérébrale concernent le cortex visuel, et la dominance oculaire. Chez les rongeurs, l'ouverture des yeux se fait entre 11 et 12 jours après la naissance (Del Rio et De Felipe, 1994). Cet évènement est concomitant avec la détection des interneurones PV dans le cortex visuel, suggérant la nécessité de l'entrée d'informations sensorielles pour induire l'expression de la parvalbumine dans les interneurones PV (Del Rio et De Felipe, 1994). En effet, la privation monoculaire chez des souris juvéniles provoque un ralentissement de la maturation des interneurones PV. Ainsi, l'expression de PV dans ces interneurones PV semble dépendre de la présence ou l'absence de stimulations sensorielles lors de la période critique.

De façon générale, la fin de la période critique correspond au déclin de la plasticité. Les interneurones arborent alors progressivement des PNN, suggérant que cette matrice extracellulaire est nécessaire à la maturation des interneurones PV et que sa formation dépend de l'expérience vécue par les individus et/ou de l'activité des interneurones PV (Celio et al., 1998 ; Pizzorusso et al., 2002). Ainsi, de nombreuses études ont montré l'effet de la privation sensorielle sur la formation des PNN autour

des interneurones PV. En effet, la privation monoculaire chez le chat juvénile provoque une diminution du nombre de PNN dans le cortex visuel controlatéral à la privation visuelle (Guimaraes et al., 1990). Ces mêmes constatations sont faites chez le rongeur dans les régions corticales associées aux privations sensorielles, qu'elles soient visuelles pour le cortex visuel (Sugiyama et al., 2008), somatosensorielles pour le cortex en barillet (McRae et al., 2007), ou sociales pour l'hippocampe et le cortex préfrontal (Ueno et al., 2017). D'autres études, démontrent *in vitro* que l'augmentation de l'entrée de Ca^{2+} par les récepteurs AMPA ou par la dépolarisation chronique provoque la formation des PNN autour des interneurones PV (Dityatev et al., 2007 ; Giamanco et Matthews, 2012). Ces études démontrent l'importance des entrées sensorielles dans l'activation des interneurones PV et dans la formation des PNN.

De façon remarquable, la dégradation des PNN dans le cortex visuel par une enzyme bactérienne, la chondroïtinase ABC (ChABC) rouvre la période critique et entraine une facilitation de la plasticité et de la récupération fonctionnelle du cortex visuel après une privation monoculaire précoce (Pizzorusso et al., 2002; Pizzorusso et al., 2006). Ces résultats suggèrent que la formation des PNN dans les cortex sensoriels détermine la période critique de ces réseaux corticaux, leur présence limitant la plasticité du réseau chez l'adulte. En effet, des études montrent que les PNN permettent une stabilisation des entrées synaptiques présentes sur les interneurones PV, tout limitant la formation de nouvelles synapses (Kwok et al., 2011). Cette « rigidité » des synapses à la fin de la période critique suggère que les interneurones PV arborant des PNN sont dans l'incapacité de moduler leur activité en fonction du vécu des individus au-delà de cette période critique.

Plus récemment, ce raisonnement a été étendu aux régions associatives, et en particulier à l'amygdale, région cérébrale nécessaire à l'établissement d'un comportement de peur conditionné à un stimulus. En effet, l'apparition de PNN dans l'amygdale au cours du développement post-natal coïncide avec la capacité à mettre en place une mémoire associative de peur conditionnée chez les animaux juvéniles (Gogolla et al., 2009). Par ailleurs, l'injection de ChABC dans l'amygdale de rats adultes ayant subi un conditionnement de peur entraine la dégradation des PNN dans l'amygdale, associée à une suppression du comportement de peur conditionnée, suggérant que la présence de PNN contribue au maintien de la trace de cette mémoire associative (Gogolla et al., 2009). Des études similaires dans le cortex auditif d'individus adultes démontrent que la présence de PNN est nécessaire à la formation

et au maintien d'un conditionnement de peur au son ; de façon intéressante, il a également été observé que les niveaux d'ARNm de plusieurs composants des PNN - dont brevican, neurocan et aggrecan - sont à la hausse dans le cortex auditif 4 h après le conditionnement de peur (Banerjee et al., 2017).

Ainsi la présence de PNN autour des interneurones PV semble être importante pour la stabilité des réseaux neuronaux qui sous-tendent le traitement des informations sensorielles, mais aussi de certains processus cognitifs. D'autre part, les entrées sensorielles, et plus largement les expériences vécues par les individus, apparaissent nécessaires à la formation des PNN autour des interneurones PV. Cependant, les mécanismes et signaux cellulaires provoquant la formation des PNN, et donc la stabilité des réseaux, demeurent largement incompris.

L'homéobox de l'orthodenticule - 2 (Otx2)

Parmi les facteurs dont la présence est liée à la période critique et à la maturation des neurones PV, la protéine 2 de l'homéobox de l'orthodenticule (Otx2) apparaît critique, bien que sa contribution soit encore mal comprise. Otx2 est une homéoprotéine contenant des séquences de sécrétion et d'internalisation lui conférant la capacité à se déplacer de cellule en cellule et ainsi une capacité de migration très importante au sein des tissus (Joliot et Prochiantz, 2004 ; Brunet et al., 2007). Dans le cerveau, l'ARNm d'Otx2 est transcrit dans les régions impliquées dans le système visuel (la rétine, le corps géniculé dorso-latéral, le colliculus supérieur et le plexus choroïde). La protéine Otx2 est observée dans la plupart des régions corticales (préfrontal, auditif, somatosensoriel, visuel, amygdale basolatérale et hippocampe) (Spatazza et al., 2013) (Figure 19A).

L'Otx2 a donc la capacité à migrer vers toutes les régions du cortex. La production d'Otx2 n'est pas dépendante de l'activité des cellules de la rétine. En revanche, la migration de cette homéoproteine dans le cortex visuel pour être principalement intégrée dans les interneurones PV dépend de l'activité et notamment de la stimulation visuelle (Sugiyama et al., 2008). En effet, élever des souris dans l'obscurité provoque une diminution de l'expression d'Otx2 associée à une diminution de l'expression en protéine parvalbumine dans les interneurones PV du cortex visuel (Sugiyama et al., 2008). L'injection d'Otx2 dans le cortex controlatéral à une privation monoculaire

provoque une restauration du nombre d'interneurones PV, associée à une augmentation des PNN autour de ces neurones (Sugiyama et al., 2008) (Figure 19B).

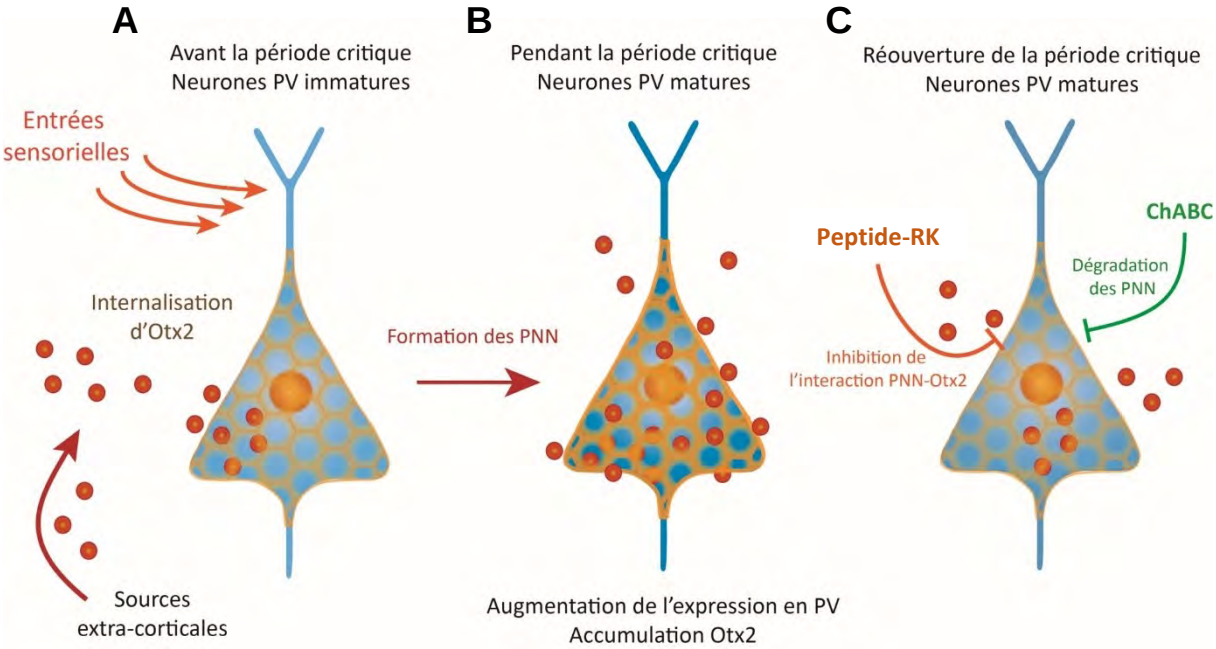


Figure 19 : Mécanisme de régulation d'Otx2 pendant la période critique
A : *Au début de la période critique, l'activité sensorielle induit la formation initiale des PNN, permettant ainsi l'internalisation d'Otx2 (ronds rouge) dans les inerneurones PV.*
B : *Pendant la période critique, l'accumulation d'Otx2 par les interneurones PV densifie le maillage des PNN et favorise encore plus l'internalisation d'Otx2. Cette boucle de rétroaction positive augmente l'expression en parvalbumine dans les somas des interneurones PV et maintient les PNN dans un état mature.* ***C :*** *Le fait d'interférer avec l'interaction d'Otx2-PNN en dégradant les PNN (ChABC, vert) ou en infusant le domaine de liaison GAG d'Otx2 (peptide-RK, orange) provoque une réinitialialisation, ou dématuration, des interneurones PV et permet de rouvrir la période critique.*

Par ailleurs, l'internalisation de la protéine Otx2 dans les interneurones PV est fortement dépendante de la présence de PNN (Beurdeley et al., 2012). En effet, Otx2 exogène présente une plus forte affinité pour les neurones entourés de PNN que pour ceux qui en sont dénués (Beurdeley et al., 2012). De plus, la dégradation des PNN dans le cortex visuel provoque une diminution de l'expression d'Otx2 dans les interneurones PV (Beurdeley et al., 2012). L'affinité importante d'Otx2 pour les neurones entourés de PNN est liée à la présence d'homéodomaines sur cette protéine, reconnus par un domaine présent sur les PNN, le motif RK (Beurdeley et al., 2012). La saturation de l'homéodomaine par l'injection de peptide RK provoque une diminution du marquage PNN et de l'expression PV et Otx2 dans les interneurones PV. Le motif RK sur les PNN est donc nécessaire à l'internalisation d'Otx2 et induit la maturation des interneurones PV (Figure 19C).

Ainsi, Otx2 fonctionnerait de façon synergique avec les PNN pour promouvoir la maturation des interneurones en augmentant l'expression en parvalbumine et la formation des PNN autour de ces interneurones PV.

La voie NRG1/ErbB4

La neuréguline 1 (NRG1) est un facteur neurotrophique exprimé tout au long du développement embryonnaire et post-natal. La présence de NRG1 est notamment nécessaire à partir de la 2ème semaine de développement embryonnaire des souris afin de permettre la migration des précurseurs d'interneurones issus de l'éminence ganglionnaire médiane (MGE) vers le cortex, au sein duquel ils se différencient en interneurones PV, notamment (Marin, 2013). La NRG1 est exprimée principalement par les neurones excitateurs de manière dépendante de l'activité (Mei et Xiong, 2008 ; Mei et Nave, 2014 ; Ting et al., 2011). Son récepteur à tyrosine kinase ErbB4 est détecté dès le 13ème jour du stade embryonnaire, (Yau et al., 2003), et cette expression est spécifique aux interneurones GABAergiques, principalement les interneurones PV (Bean et al., 2014 ; Fazzari et al., 2010).

Au cours du développement post-natal, NRG1 joue un rôle crucial dans la fermeture de la période critique. En effet, la privation monoculaire provoque un ralentissement de la maturation des interneurones PV du cortex visuel controlatéral à la privation sensorielle, se traduisant par une réduction de l'expression de NRG1 et d'ErbB4 phosphorylé (activé) par les interneurones PV. L'injection de NRG1 dans le cortex visuel permet de restaurer rapidement l'activité des interneurones PV en augmentant les entrées excitatrices sur leur soma (Sun et al., 2016). Ainsi, la NRG1 permettrait d'assurer la maturation des interneurones PV au cours de la période critique, en réponse aux stimulations sensorielles (Sun et al., 2016). Par ailleurs, l'application de NRG1 provoque *via* l'activation d'ErbB4 une augmentation du nombre et de la taille des projections excitatrices sur les interneurones PV, se traduisant par une augmentation de la fréquence et de l'amplitude des courants post-synaptiques excitateurs miniatures (mEPSC) des interneurones PV (Ting et al., 2011). En accord avec ces données, la suppression d'ErbB4 dans les interneurones PV de souris adultes entraine une réduction du nombre de terminaisons axonales Vglut1+ sur ces neurones (Fazzari et al., 2010). Ces résultats suggèrent que l'activation de la voie NRG1/ErbB4 induit un renforcement et/ou une stabilisation des synapses excitatrices

sur les interneurones PV, favorisant leur activation par le réseau environnant en réponse aux stimulations.

En effet, l'application de NRG1 sur tranche d'hippocampe induit une augmentation de l'amplitude des courants post-synaptiques inhibiteurs (IPSC) plus importante sur les neurones pyramidaux de l'aire CA1, suggérant une augmentation de l'activité des interneurones inhibiteurs (Chen et al., 2010). Dans ces conditions, l'utilisation d'un protocole standard de stimulation des collatérales de Schaffer ne permet pas d'induire une potentialisation à long terme (Chen et al., 2010). Par ailleurs, l'invalidation d'ErbB4 provoque un déficit de mémoire contextuelle si cette invalidation concerne les interneurones PV, spécifiquement (Chen et al., 2010 ; Lu et al., 2014). Ces données mettent en évidence l'importance de la voie NRG1/ErbB4 sur les interneurones PV dans la régulation de la plasticité synaptique dans l'hippocampe.

Ainsi, NRG1 apparaît jouer un rôle crucial dans la maturation des interneurones PV dans le cerveau en développement, comme dans la plasticité du réseau chez l'adulte. Le fait que la voie NRG1/ErbB4 est impliquée dans la fermeture de la période critique, *via* une stabilisation des synapses excitatrices sur les interneurones PV, rappelle la fonction présumée des PNN décrite précédemment (Cf : Introduction VI-b). Cependant à ce jour aucune étude n'a établi de lien entre le système NRG1/ErbB4 et la formation des PNN.

c. Régulation de la plasticité des interneurones PV et de leur PNN dans l'apprentissage et la mémorisation.

L'apprentissage et la consolidation de la mémoire chez l'adulte sont associés à une modification de la plasticité cérébrale, en particulier dans l'hippocampe. Cela concerne également les interneurones PV, dont l'activité et l'expression des PNN peuvent varier en fonction de la tâche cognitive ou de l'apprentissage.

L'expression en parvalbumine dans le soma des interneurones PV est dépendante de l'activité de ces neurones (Patz et al., 2004). Ainsi, un neurone PV avec une faible activité contiendra peu de protéine parvalbumine (configuration « low-PV »), alors qu'une activité unitaire soutenue provoquera l'augmentation de la présence de parvalbumine dans le soma de ces neurones (configuration « high-PV »). Il a été rapporté que, au moins dans l'aire CA3 de l'hippocampe, la proportion relative des interneurones PV « low-PV » et « high-PV » peut changer en fonction de l'expérience vécue par les individus, et plus particulièrement du type d'apprentissage auquel ces

individus sont soumis (Donato et al., 2013). Ainsi, des souris placées dans un environnement enrichi, sans tâche particulière à apprendre, présentent une plus grande proportion de neurones « low-PV » dans l'aire CA3 que des souris élevées en conditions standards. Cette configuration « low-PV » est sous-tendue par une augmentation du nombre de synapses inhibitrices et une diminution des synapses excitatrices sur les interneurones PV (Donato et al., 2013). La modification du réseau local sur les interneurones PV permettrait de favoriser l'acquisition et la rétention de nouvelles informations et la plasticité synaptique. Cette configuration « low-PV » serait le reflet d'une réduction de l'activité des interneurones PV, et donc d'une désinhibition des neurones excitateurs, ce qui faciliterait l'établissement d'un nouvel apprentissage. En revanche, lors d'un conditionnement de peur, quand une tâche est acquise ou consolidée, on observe des souris une augmentation de la proportion de neurones « high-PV », associée à une augmentation du nombre de synapses excitatrices sur les interneurones PV et à un fort tonus inhibiteur sur les neurones excitateurs dans l'aire CA3. Cette configuration « high-PV » permettrait de stabiliser la mémoire acquise, mais provoquerait des interférences pour l'acquisition de nouveaux souvenirs (Donato et al., 2013 ; Tripodi et al., 2018) (Figure 20).

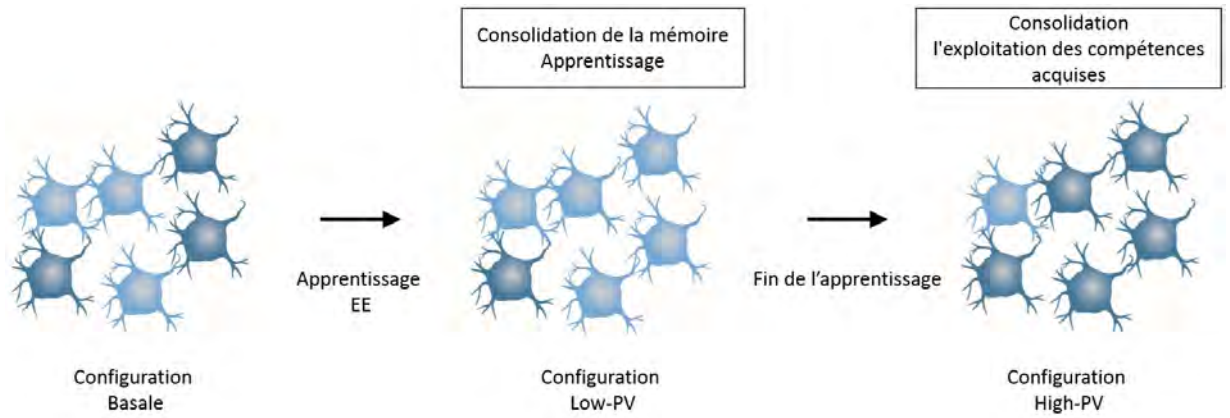


Figure 20 : Schéma illustrant la modification de la plasticité des interneurones PV en fonction de l'apprentissage ou de la mémorisation.
Le début d'un apprentissage ou le passage dans un environnement enrichi (EE), provoque une configuration des interneurones PV avec une faible concentration en parvalbumine (low-PV). Inversement, la fin d'un apprentisage, ou la consolidation de nouvelles informations induit un changement dans la configuration des interneurones PV, favorisant une forte concentration en PV (High-PV). D'après Donato et al., 2013.

Comme vu précédemment, l'expérience vécue par les individus, et donc l'apprentissage, peut également modifier la présence de PNN autour des interneurones PV. Or, les modifications de l'expression de parvalbumine par les

interneurones PV durant l'apprentissage sont aussi associées à la formation des PNN. En effet, l'exposition à environnement enrichi, ou aux premières sessions d'un apprentissage séquentiel, la proportion d'interneurones « low-PV » augmente alors que la présence des PNN autour de ces interneurones diminue (Favuzzi et al., 2017). Au contraire, un apprentissage aversif ou la fin d'un apprentissage séquentiel sont associés à une augmentation de la proportion d'interneurones « high-PV » et à une présence importante de PNN autour de ces neurones PV (Favuzzi et al., 2017 ; Shi et al., 2019). Ces observations mettent en évidence un lien entre PNN et niveau d'activité des interneurones PV dans l'hippocampe, suggérant une implication du système PV/PNN dans les fonctions mnésiques.

d. Rôle des PNN dans l'activité des interneurones PV.

L'expérience vécue par les individus apparaît être un facteur déterminant pour l'activité des interneurones PV de l'hippocampe et pour la présence de PNN autour de ces interneurones. Toutefois, le rôle joué par les PNN dans le fonctionnement des interneurones PV reste incompris.

En tant que matrice extracellulaire, les PNN représentent une barrière physique autour des neurones, et jouent un rôle dans la régulation du mouvement des protéines qui se fixent à la membrane (Dick et al., 2013 ; Frischknecht et al., 2009). Les PNN sont par ailleurs considérés comme des tampons locaux, absorbant les fortes variations de concentration en cations extracellulaires (Hartig et al., 1999 ; Morawski et al., 2015). C'est particulièrement le cas pour les interneurones PV qui sont des interneurones à décharge rapide, caractérisés par un important flux entrant de Na^+ et un flux sortant de K^+ médié par des canaux potassiques (Kv3.1b). Ainsi, la présence de PNN facilite le déplacement des cations extracellulaires locaux (Hartig et al., 1999 ; Bruckner et al., 1993).

L'altération d'une des protéines composant les PNN, brevican, dans l'aire CA1 provoque une diminution du nombre de projections pré-synaptiques excitatrices (Vglut1) et post-synaptiques excitatrices (PSD95) et inhibitrices (Géphyrine) sur les interneurones PV. Ces modifications de la nature et du nombre des synapses sur les neurones PV en absence de PNN fonctionnel s'accompagnent d'une augmentation de leur excitabilité et de leur résistance membranaire, associée à une demi-largeur du potentiel d'action plus long et une période réfractaire plus longue (Favuzzi et al., 2017).

Ainsi, l'activité de ces interneurones PV dépourvus de PNN fonctionnel, devient moins efficace à haute fréquence (Favuzzi et al., 2017).

D'autres études ont utilisé la ChABC pour dégrader les PNN entourant les interneurones PV. Il a ainsi été montré que la disparition de PNN dans l'aire CA1 de l'hippocampe provoque une modification de l'excitabilité et de la résistance membranaire des interneurones PV, causant également une diminution de leur expression somatique en parvalbumine (Shi et al., 2019). De plus, l'absence de PNN s'accompagne d'une diminution de la libération de GABA, démontrant que la présence de PNN autour des neurones PV garantit leur capacité à exercer un tonus inhibiteur dans le réseau hippocampique (Shi et al., 2019).

Sur le plan fonctionnel, cette modification de l'excitabilité des interneurones PV en fonction de la présence ou de l'absence de PNN suggère un changement dans leur capacité à réguler et à encoder les informations. En effet, l'utilisation de ChABC dans l'aire CA1 provoque une perturbation de l'acquisition, de la consolidation, et de la reconsolidation chez des souris soumises à un conditionnement de peur au contexte (Shi et al., 2019). En revanche, l'inhibition de l'expression de brevican spécifiquement dans les interneurones PV de l'aire CA1 provoque une altération de mémoire de travail et de mémoire épisodique à court terme, tout en facilitant la capacité de discrimination (Favuzzi et al., 2017). Ainsi, l'absence ou la présence de PNN autour des interneurones PV de l'hippocampe impacte les fonctions mnésiques liées à l'activité de ces interneurones. Or, il existe une pathologie affectant la mémoire, et pour laquelle un lien entre dysfonctionnement des interneurones PV et déficits mnésiques est établi : la maladie d'Alzheimer.

e. Les PNN dans la maladie d'Alzheimer.

Comme vu précédemment, les PNN jouent un rôle de tampon local contre les fortes variations de concentration en cations extracellulaires (Hartig et al., 1999 ; Morawski et al., 2015). En accord avec cette idée, les interneurones PV immatures, dénués de PNN, sont plus sensibles au stress oxydatif (Cabungcal et al., 2013). D'ailleurs, l'application d'$A\beta_{42}$ sur des cellules corticales en culture montre une survie plus importante des neurones qui possèdent des PNN. Au contraire, la dégradation des PNN par la ChABC provoque une mort cellulaire importante dans ces mêmes conditions, démontrant le rôle protecteur des PNN contre l'effet neurotoxique du

peptide amyloïde (Miyata et al., 2007). Il est intéressant de noter que les neurones possédant des PNN ne présentent pas d'enchevêtrements neurofibrillaires (Morawski et al., 2010 ; Suttkus et al., 2016). Ceci s'expliquerait par la capacité des PNN à capter la protéine Tau et à limiter son internalisation par le neurone qu'il entoure. Enfin, les pertes neuronales sont moins importantes dans les régions cérébrales ayant conservé leurs PNN (Bruckner et al., 1999 ; Morawski et al., 2010 ; Morawski et al., 2012). Ainsi, la présence de PNN autour des neurones PV pourrait limiter les dommages histopathologiques liés à la MA.

Cependant, les études évaluant la présence de PNN dans les tissus cérébraux de patients atteints de MA sont peu nombreuses, notamment du fait de la dégradation rapide des PNN *post-mortem*. En effet, la dégradation des matrices extracellulaires aurait lieu entre 4 et 8h après le décès (Beach et al., 2008). Malgré ces limites, plusieurs études rapportent une diminution du nombre de PNN dans le cerveau des patients MA, notamment dans les régions frontales (Baig et al., 2005 ; Kobayashi et al., 1989). À l'inverse, d'autres études n'observent aucune modification, voire une augmentation, de la présence de PNN dans le cerveau MA par rapport à celui de sujets sains du même âge (Bruckner et al., 1999 ; Morawski et al., 2012 ; Howell et al., 2015). D'autres études ont cherché à évaluer l'impact de la MA sur la présence de PNN en mesurant la présence de ces différents composants dans le liquide cérébrospinal, et ont conclu à une absence de modification par rapport aux sujets contrôles (Minta et al., 2019). L'expression des différents composants des PNN (brevican, Ctl-1 et aggrecan) a été mesurée par Western Blot aux stades modéré et sévère de la pathologie. Il ressort que l'expression des composants des PNN tend à diminuer pour les patients MA modérés par rapport aux sujets contrôles du même âge, mais augmentent fortement chez les patients MA sévères (Lendvai et al., 2013). D'après cette étude, il y aurait donc une régulation différente de l'expression des PNN en fonction du degré de sévérité de la pathologie. Par conséquent, il est difficile de déterminer l'impact de la MA sur la présence de PNN chez ces sujets.

Cette difficulté est retrouvée lors des études utilisant des modèles murins de la pathologie. Ainsi, certains travaux ne détectent aucune altération de l'aggrecan dans l'hippocampe des souris Tg2576 de 12 mois (Morawski et al., 2010), alors que d'autres basés sur des souris APPswe/PS1dE9 observent une augmentation de l'expression des PNN en fonction de l'avancement de la pathologie (Vegh et al., 2014). Dans cette dernière étude, la dégradation par la ChABC, des PNN de l'aire CA1 des souris

APPswe/PS1dE9 améliore même la mémoire contextuelle de ces animaux, et permet également de restaurer en partie la potentialisation à long terme altérée dans ce modèle (Vegh et al., 2014). Chez ces souris APPswe/PS1dE9, la dégradation des PNN par la ChABC réduit également les plaques amyloïdes dans l'hippocampe (Howell et al., 2015). Ces résultats démontrent que la présence des PNN est associée à une augmentation des altérations caractéristiques de la MA.

Cependant, d'autres études rapportent une toute autre régulation des PNN en conditions pathologiques. Ainsi des travaux récents de notre équipe décrivent une diminution du nombre de PNN autour des neurones PV des aires CA1, CA2 et CA3 de l'hippocampe de souris Tg2576 (Cattaud et al., 2018). Dans cette étude, la diminution des PNN observée dès l'âge de 6 mois est associée à une forte diminution d'interneurones PV détectables (Cattaud et al., 2018 ; Annexe 2). En revanche, à l'âge de 13 mois, la réduction des interneurones PV entourés de PNN est similaire chez les souris Tg2576 et les souris non-transgéniques, en accord avec des études antérieures (Morawski et al., 2010). Ainsi les souris Tg2576 semblent présenter une diminution précoce des interneurones PV et de leur PNN dans l'hippocampe, ce qui pourrait contribuer à la survenue des troubles cognitifs (Cattaud et al., 2018). D'autre part cette diminution de PNN est d'autant plus remarquable dans l'aire CA2 de ces souris modèles de la MA, du fait d'une présence particulièrement importante de PNN en conditions contrôles.

Étant donné l'importance jouée par les PNN dans l'intégrité fonctionnelle des neurones PV, ces modifications suggèrent que la transmission inhibitrice dans l'hippocampe atteint de MA serait perturbée, entrainant des activités cérébrales aberrantes qui pourraient contribuer aux altérations cognitives associées à la MA.

VII. Une plasticité spécifique PV-dépendante dans l'aire CA2

L'aire CA2 est la région de l'hippocampe possédant la plus forte densité en interneurones PV (Botcher et al., 2014). Cette importante population GABAergique présente des ramifications axonales développées à l'origine d'une robuste régulation inhibitrice des neurones pyramidaux de CA2 (Ribak et al., 1993). Dans CA2 la transmission inhibitrice est plus importante que dans les autres aires de l'hippocampe (Piskorowski et Chevaleyre, 2013). Par conséquent, l'incapacité de la stimulation des collatérales de Schaffer (CS) à induire une LTP dans l'aire CA2 serait le reflet du fort

tonus inhibiteur GABAergique exercé par les interneurones sur les neurones pyramidaux (Cf : Introduction IV-c). En effet, l'application d'antagonistes des récepteurs GABA-A et GABA-B sur tranche d'hippocampe induit une forte augmentation des potentiels post synaptiques excitateurs (PPSE) dans l'aire CA2 suite à la stimulation des CS (Chevaleyre et Siegelbaum, 2010 ; Piskorowski et Chevaleyre, 2013), et permet l'apparition de LTP.

Ainsi, la diminution du contrôle inhibiteur exercé par les interneurones PV sur les neurones pyramidaux de CA2 apparaît nécessaire à l'induction d'une LTP dans cette aire cérébrale. Ceci est rendu possible par l'existence d'une forme singulière de plasticité des interneurones PV eux-mêmes : la dépression à long-terme des synapses inhibitrices (iLTD). Ainsi, la stimulation à haute fréquence des CS provoque une dépression à long terme des interneurones PV, et entraine une diminution de la libération de GABA sur les neurones pyramidaux. En parallèle, la levée de l'inhibition permet à la stimulation des CS induire une LTP sur les neurones pyramidaux (Piskorowski et Chevaleyre, 2013) (Figure 21).

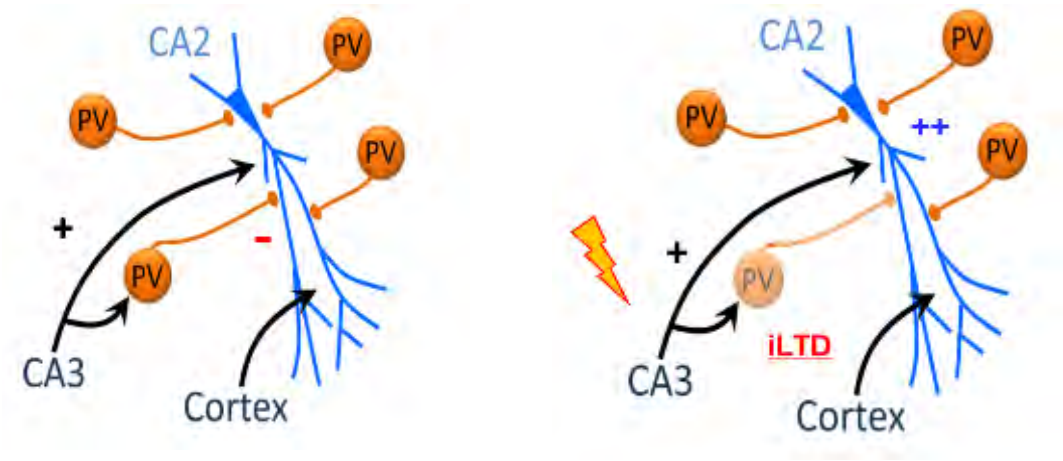


Figure 21 : Schéma illustrant le mécanisme de la dépression à long terme dépendant des interneurones PV dans l'aire CA2

En condition basale, les entrées excitatrices provenant des collatérales de schaffer de CA3 vont induire l'activation des interneurones PV provoquant une inhibition des neurones pyramidaux de l'aire CA2. La stimulation à haute fréquence ou une activité accrue dans l'aire CA3 va induire une dépression à long terme sur les interneurones PV de l'aire CA2 permettant une désinhibition des neurones pyramidaux de l'aire CA2. D'après Chevaleyre et Piskorowski , 2016.

Plusieurs études cherchant à identifier les mécanismes sous-tendant cette iLTD dans l'aire CA2 ont révélé l'importance des récepteurs delta opioïdes (DOR) pour ce type de plasticité. Les DOR sont fortement exprimés dans l'aire CA2 (Crain et al., 1986) et plus particulièrement par les interneurones PV (Erbs et al., 2012). De plus,

l'enképhaline, un opioïde endogène et ligand principal des DOR, est particulièrement abondante dans l'aire CA2 (Sar et al., 1978). L'inactivation des DOR par un antagoniste sélectif empêche l'induction de LTD des interneurones PV après une stimulation à haute fréquence (Piskorowski et Chevaleyre, 2013). Par ailleurs, la présence de cette iLTD DOR-dépendante est nécessaire pour pouvoir provoquer une LTP dans les neurones de CA2 (Nasrallah et al., 2019).

La contribution de l'aire CA2 dans la régulation du transfert des informations au sein de l'hippocampe (Cf : Introduction IV-b) suggère que la iLTD DOR-dépendante serait cruciale dans ce processus. Une altération de la iLTD modifierait la régulation de la transmission inhibitrice dépendante de l'activité du réseau, et pourrait altérer les fonctions mnésiques, et particulièrement la mémoire sociale pour laquelle CA2 joue un rôle clé (Piskorowski et Chevaleyre, 2013). En accord avec cette idée, le blocage des DOR par l'injection d'un antagoniste (Naltrindole) dans l'aire CA2 provoque un déficit de mémoire sociale chez les souris (Leroy et al., 2017). Par ailleurs, des souris modèles du syndrome de délétion 22q11.2 lié à la schizophrénie présentent une diminution des interneurones PV de l'aire CA2, associée à une diminution de la transmission inhibitrice et de la iLTD, et à un déficit de mémoire sociale (Piskorowski et al., 2016). De façon intéressante, ces perturbations des propriétés des interneurones PV ne sont visibles qu'à la fin de l'adolescence, suggérant que les neurones PV de l'aire CA2 subissent des changements importants au cours de cette période.

Ainsi, les interneurones PV de l'aire CA2 sont déterminants dans la régulation de la plasticité de cette région de l'hippocampe. Étant donné que l'aire CA2 sous-tend les processus de mémoire sociale, la contribution des interneurones PV pourrait être cruciale pour ce type de mémoire. Or, l'excitabilité des interneurones PV est fortement dépendante des PNN, suggérant que leur présence ou absence serait déterminante pour le fonctionnement de l'aire CA2.

a. Rôle des PNN dans la plasticité de l'aire CA2

L'aide CA2 possède une forte densité d'interneurones PV, et de ce fait, est enrichie en PNN et ses différents composants (brevican, neurocan et aggrecan) (Cabungcal et al., 2013 ; Bruckner et al., 2003 ; Ajmo et al., 2008 ; Carstens et al., 2016).

Outre les PNN typiquement organisés en maillage autour des somas des neurones PV, l'aire CA2 possède une forte expression de PNN diffus localisée dans la couche pyramidale (Celio, 1993) (Figure 22). On ne sait pas encore si ce marquage témoigne de la présence atypique de PNN autour des neurones pyramidaux de CA2 (Carstens et al., 2016 ; Celio, 1993), ou s'il est le reflet du fait que les cellules pyramidales de la région CA2 sont plus densément couvertes par les terminaisons des cellules PV que celles des autres régions de l'hippocampe (Piskorowski et al., 2016). Récemment, il a été proposé que les composants des PNN périsomatiques et ceux des PNN diffus de l'aire CA2 pourraient avoir des origines différentes : les PNN autour des interneurones PV seraient issus de composants produits par les neurones PV eux-mêmes, alors que le marquage diffus observé dans l'aire CA2 pourrait provenir de composants produits par les astrocytes (Favuzzi et al., 2017). Ainsi, la signification fonctionnelle des PNN diffus de la région CA2 pourrait être différente de celle des PNN en maillage entourant les neurones PV.

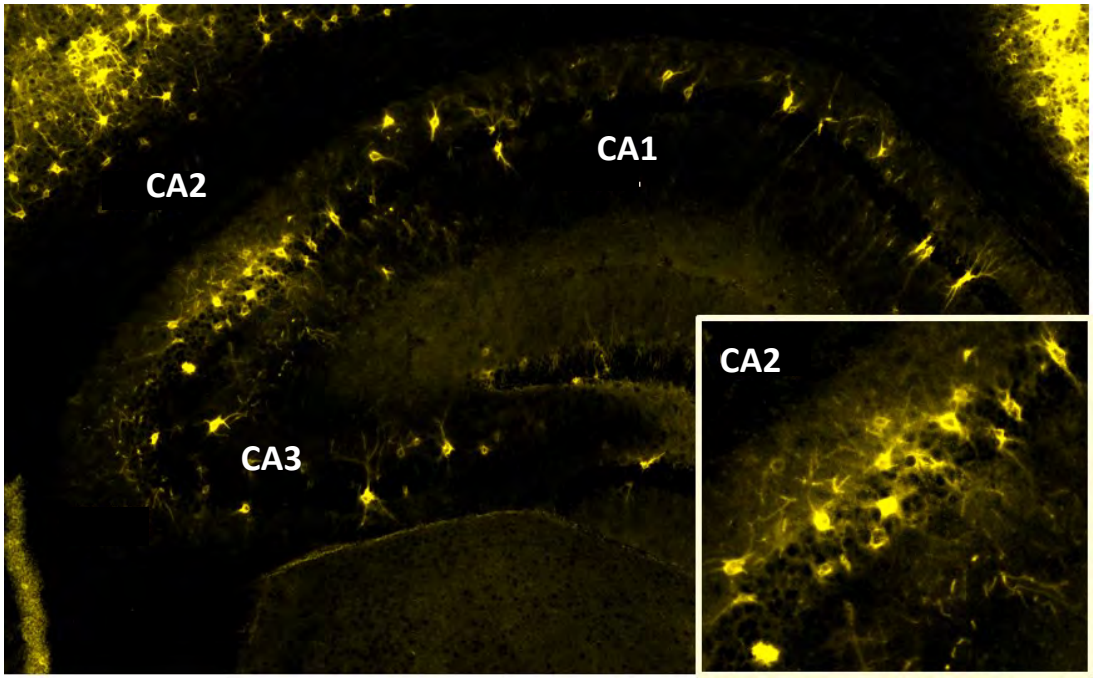


Figure 22 : Marquage WFA (PNN) d'un hippocampe de souris adulte.
On peut constater la présence d'une forte densité en marquage WFA (PNN) dans l'aire CA2 comparée aux autres aires de l'hippocampe. Le marquage PNN est localisé en périsomatique autour des somas des neurones avec une forte intensité. Un autre marquage plus diffus est observé dans la totalité de l'aire CA2. CA1 : Corne d'Ammon 1, CA2 : Corne d'Ammon 2, CA3 : Corne d'Ammon 3

Comme nous l'avons vu précédemment, les neurones excitateurs de l'aire CA2 ne présentent pas de LTP induite par une stimulation des CS dans le *stratum radiatum*

(Cf : Introduction IV-c) ; cette résistance à la LTP est notamment due à la grande densité de neurones PV et au contrôle inhibiteur important qui existe dans cette région (Cf : Introduction VII). Les PNN participant à la régulation de l'activité des interneurones PV, la présence ou l'absence de cette matrice extracellulaire dans l'aire CA2 pourrait avoir des conséquences sur la plasticité de cette aire hippocampique.
Une étude récente a examiné la contribution des PNN dans la plasticité des neurones de l'aire CA2 au cours du développement post-natal. À l'âge de 14 et 21 jours, les souris présentent un marquage Wisteria Floribunda Agglutinine (WFA, le marqueur le plus utilisé dans la littérature pour révéler la présence de cette matrice extracellulaire), faible dans l'aire CA2 par rapport aux souris adultes. Le séjour de ces souris juvéniles dans un environnement enrichi provoque une augmentation de l'expression de PNN dès l'âge de 21 jours, indiquant que le développement de cette matrice dans l'aire CA2 dépend de l'expérience vécue par les individus, comme c'est le cas dans les cortex sensoriels et associatifs (Cf : Introduction VI-c) (Carstens et al., 2016). Cette même étude indique que dégrader les PNN sur des préparations de tranches d'hippocampe de souris adultes suffit pour permettre l'apparition d'une LTP dans la couche pyramidale de l'aire CA2 après un protocole standard de stimulation dans l'aire CA3 (Carstens et al., 2016). Par ailleurs, la dégradation des PNN dans l'aire CA2 provoque 7 jours après l'injection de la ChABC des effets importants sur l'excitabilité des interneurones PV et des neurones pyramidaux de cette aire. Ainsi, l'absence de PNN abaisse le seuil de genèse de potentiels d'action des interneurones PV, augmentant donc l'excitabilité de ces neurones (Hayani et al., 2018 ; Dityatev et al., 2007).

Les PNN apparaissent tardivement au cours du développement post-natal suggérant que l'établissement de plasticités à long-terme (LTP et/ou iLTD) dans l'aire CA2, et les capacités cognitives associées, varient en fonction de l'âge des individus. Par ailleurs, le fait que les souris Tg2576 présentent très tôt une diminution du nombre d'interneurones PV et PV/PNN dans l'aire CA2 (Cattaud et al., 2018) laisse penser que la plasticité induite par les neurones PV de cette région et les fonctions mnésiques associées seraient altérées dans ce modèle murin de la MA.

OBJECTIFS

Dans le cerveau, le développement du système inhibiteur est dépendant de la plasticité et de la maturation des interneurones PV. Dans le cerveau immature, l'absence de PNN autour des interneurones PV est associée à une incapacité à former une trace mnésique stable (Gogolla et al., 2009). Avec le temps, et l'accumulation d'expériences vécues, l'apparition des PNN autour des interneurones PV clôture la période critique, et signe la transition entre un cerveau immature et mature (Hensch, 2005). Des facteurs de maturation tels que Otx2, ou NRG1 sont mis en jeu pour clore cette période critique (Sugiyama et al., 2008 ; Sun et al., 2016).
En conditions pathologiques, les interneurones PV et leur PNN présentent des dysfonctionnements importants. Chez le rongeur, ces altérations s'observent notamment dans les modèles de maladies neuropsychiatriques telles que la schizophrénie (Piskorowski et al., 2016) ou de maladies neurodégénératives comme la MA (Verret et al., 2012 ; Cattaud et al., 2018). Dans ces pathologies, l'altération de la composante inhibitrice est associée aux troubles cognitifs, notamment mnésiques (Piskorowski et al., 2016 ; Verret et al., 2012). Bien que seulement 20% des neurones inhibiteurs de l'hippocampe soient des neurones PV, la préservation de leur intégrité et de leur fonction apparaît donc cruciale pour permettre les processus mnésiques.

L'aire CA2 assume des fonctions distinctes de celles des autres aires de l'hippocampe. Plusieurs études ont mis en évidence l'implication de l'aire CA2 dans la mémoire sociale. Chez la souris, l'inhibition des cellules pyramidales excitatrices de l'aire CA2 induit des déficits de mémoire sociale, sans affecter les performances dans d'autres types de mémoires hippocampo-dépendantes (Hitti et Siegelbaum, 2014). De plus, en conditions non-pathologiques, l'aire CA2 présente une forte densité en neurones PV ainsi qu'une densité importante de PNN, lui conférant des particularités anatomo-fonctionnelles atypiques (Botcher et al., 2014 ; Carstens et al., 2016; Piskorowski et Chevaleyre, 2013). En effet, les neurones inhibiteurs PV de l'aire CA2 peuvent être soumis à une dépression à long terme (iLTD), médiée par leurs récepteurs Delta opioïdes (DOR), ce qui n'est pas le cas par exemple des interneurones PV présents dans l'aire CA1 (Piskorowski et Chevaleyre, 2013). Ce phénomène particulier à l'aire CA2 est dépendant de la présence des neurones PV et de leur activité (Nasrallah et al., 2019). Le rôle prépondérant de la iLTD dans la régulation de l'aire CA2 serait ainsi potentiellement lié aux processus de mémoire sociale.

Au cours de cette thèse, nous avons cherché à mettre en évidence chez la souris, le lien entre le degré de maturation des neurones PV de l'aire CA2, sous-tendue par la présence de PNN, et la capacité à établir une mémoire sociale, en condition non-pathologique, et dans la MA. Ce travail s'est organisé autour de 3 objectifs :

1) Définir le lien entre la maturation des interneurones à parvalbumine de l'aire CA2 et l'émergence de la mémoire sociale à la fin de l'adolescence.

L'adolescence est une période de transition entre la fin de l'enfance et le début de l'âge adulte qui se caractérise par d'importants changements comportementaux et cognitifs. Parmi eux, l'émergence de la cognition sociale est l'un des plus significatifs (Blakemore 2008). L'adolescence est aussi une période de susceptibilité aux facteurs environnementaux pouvant entraîner des modifications persistantes dans le cerveau et potentiellement faciliter l'émergence de maladies psychiatriques telle que la schizophrénie. Cependant, les changements cellulaires et synaptiques se produisant dans l'hippocampe au cours de l'adolescence restent mal compris.

Dans cette thèse, nous avons cherché à déterminer les modifications cellulaires et fonctionnelles au cours de la maturation de l'aire CA2 survenant à la fin de l'adolescence. De plus, nous avons examiné si ces modifications sont associées à l'émergence de nouvelles capacités cognitives. Pour mener à bien ce travail collaboratif, les études électrophysiologiques sur tranche d'hippocampe ont été réalisées par l'équipe de Vivien Chevaleyre et Rebecca Piskorowski (Inserm U1266 IPNP, Paris), et j'ai été en charge des approches *in vivo*.

2) Dysfonctionnements des interneurones à parvalbumine dans l'aire CA2 et les troubles de la mémoire sociale chez des souris modèles de la maladie d'Alzheimer.

Dans le circuit hippocampique, l'aire CA2 occupe une fonction distincte de celles des autres aires. Elle est en particulier impliquée dans la mémoire sociale (Hitti et Siegelbaum 2014). La forte densité en interneurones PV et en PNN dans l'aire CA2 suggère une forte implication de ces neurones dans la régulation des fonctions cognitives (Botcher et al., 2014 ; Carstens et al., 2016). En effet, les interneurones PV de l'aire CA2 peuvent exprimer une iLTD médiée par les DOR (Piskorowski et

Chevaleyre 2013), et cette forme de plasticité serait directement liée à la capacité à former une mémoire sociale (Leroy et al., 2017). Or, les souris Tg2576 modèles de la MA, présentent très tôt une diminution du nombre d'interneurones PV et PV/PNN dans l'aire CA2 (Cattaud et al., 2018) suggérant que la plasticité induite par les interneurones PV de cette région et les fonctions mnésiques associées sont altérées dans ce modèle murin de la MA. Cette partie, qui est le cœur de mon travail de thèse, vise à démontrer les liens potentiels entre les perturbations du réseau PV/PNN de l'aire CA2 des souris modèles de la MA, et leurs déficits de mémoire sociale.

3) Caractériser les effets de l'interaction sociale sur l'activité des interneurones à parvalbumine de l'aire CA2.

De nombreuses études ont révélé l'importance des interneurones PV dans la régulation de l'activité cérébrale notamment dans la génération des ondes thêta et gamma (Amilhon et al., 2015 ; Cardin et al., 2009 ; Sohal et al., 2009). Cependant, l'intégrité des interneurones PV dans des modèles murins de la MA est perturbée, causant l'émergence d'activités oscillatoires aberrantes (Verret et al., 2012). Cette l'altération des interneurones PV serait en lien avec l'hyperexcitabilité hippocampique et l'apparition des troubles cognitifs (Verret et al., 2012 ; Bezzina et al., 2015). L'influence de la stimulation cognitive sur la modulation de la plasticité des interneurones PV a été largement mise en évidence (Donato et al., 2013 ; Favuzzi et al., 2017 ; Cattaud et al., 2018). En effet, il est observé que certaines stimulations cognitives, comme le séjour dans un environnement enrichi, améliore l'intégrité des interneurones PV et la formation des PNN chez les souris Tg2576 (Cattaud et al., 2018).

Dans cette dernière partie, nous avons examiné si une stimulation sociale suffit à modifier la plasticité des interneurones PV de l'aire CA2 chez des souris en conditions non-pathologique et pathologique, et si cela entraine une modification de l'activité cérébrale de ces souris.

MÉTHODES

I. Modèles animaux

a. Souris Tg2576

Nous avons utilisé des souris transgéniques issues de la lignée Tg2576 (Hsiao et al., 1996). Les souris de cette lignée sur-expriment le gène humain codant la protéine précurseur du peptide amyloïde (*hAPP*) et portant une double mutation (Lys670-Asn, Met671-Leu [K670N, M671L]). L'expression de *hAPP* mutée est régulée par le promoteur de la protéine du prion de hamster. Au sein de cette lignée de souris, la protéine hAPP est exprimée dès la naissance et constitutivement. On retrouve le transgène majoritairement dans le cerveau et plus faiblement dans le foie et le rein (Van Ess et al., 2002).

Au laboratoire, la lignée de souris Tg2576 est obtenue par croisements de souris mâles C57BL/6J avec des femelles SJL/J (Charles River, L'Arbresle, France), générant des femelles C57BL6/SJL F1, qui sont ensuite croisées avec des mâles Tg2576. La descendance est génotypée par PCR afin de révéler la présence de la séquence d'ADN *hAPP*. Les souris Tg2576 et leurs frères et sœurs non-transgéniques (NTg) sont ensuite hébergées entre individus de même sexe (3 à 5 souris/cage) dans des cages en polycarbonate (32x16x14cm) au sein de l'animalerie dont l'environnement est contrôlé (température 23°C±1°C ; cycle jour-nuit 12h-12h ; nourriture et eau *ad libitum*).

b. Souris DORflox

Les souris DORflox proviennent d'un don de Dominique Massotte du Chronobiotron de Strasbourg. Les souris utilisées dans notre étude sont issues du croisement de souris DORflox/flox homozygote avec des souris Na(V)1.8-Cre, générant ainsi la lignée DORflox/flox; Na(V)1.8-Cre de fond génétique C57BL/6 . Nous avons utilisé les souris DORflox/flox; Na(V)1.8-Cre-/- et quelques individus DORflox/flox; Na(V)1.8-Cre+/-. Les souris sont hébergées entre individus de même sexe (3 à 5 souris) dans des cages en polycarbonate (32x16x14cm) au sein de l'animalerie.

II. Chirurgie

a. Anesthésie gazeuse

L'anesthésie gazeuse permet une administration en temps réel du produit anesthésiant. Ainsi, la gestion du gaz limite les surdosages pouvant entraîner une détresse respiratoire et un rétablissement plus difficile des animaux.

Pour chaque procédure chirurgicale - implantation de canule, d'EEG et injections intra-hippocampiques (Cf : Tableau 1) - les souris sont anesthésiées par voie gazeuse au Vetfluorane (1000mg/g/ml ; ref : Vnr137317 ; Virbac). Tout au long de la chirurgie, l'anesthésie est contrôlée *via* différentes observations telles que l'immobilisation, la relaxation musculaire et la respiration régulière de l'animal. En parallèle, la réponse aux réflexes est vérifiée toutes les 10-15 min afin de contrôler la profondeur de l'anesthésie.

Pour diminuer le stress et ainsi faciliter l'anesthésie, le rongeur est tout d'abord acclimaté pendant 5 minutes à la chambre d'induction sans gaz. Ensuite, l'anesthésie se déroule en 3 phases et commence par l'induction du gaz. Le gaz anesthésiant est alors induit dans la chambre à une concentration de 4% avec un débit d'air/oxygène à 0.2ml/min. Lors de la deuxième phase, dite de délire, l'animal présente des déplacements aléatoires et une accélération de son rythme respiratoire. Enfin, dans la troisième phase, la souris est immobile avec une respiration lente et régulière. L'animal est ensuite installé dans l'appareil stéréotaxique (Kopf) équipé d'un masque permettant de maintenir l'anesthésie tout le long de la procédure. La concentration du gaz est diminuée à 2-1.5% quand la souris est stabilisée. Afin de limiter les cas d'hypothermie récurrents lors de l'anesthésie des petits animaux, une couverture chauffante est placée sous l'animal. Puis, un gel oculaire (Ocrygel) est appliqué, permettant d'éviter le dessèchement des yeux.

b. Injections aigües de solutions de ChABC, NRG1b ou adénovirales dans l'aire CA2

Généralités

L'injection aigüe est une injection unique réalisée sous anesthésie générale et en absence de canule. Les souris sont injectées avec 0.1µl par site, via l'utilisation d'une seringue Hamilton de 5µl reliée à un micro-injecteur. Les injections sont réalisées en deux sites (CA2 dorsal et CA2 ventral) pour chaque hémisphère. L'aire CA2 est très restreinte, et ses coordonnées peuvent substantiellement changer en fonction du fond génétique et du sexe des individus. Afin de s'assurer de la spécificité des injections dans les différentes expériences, les coordonnées stéréotaxiques sont systématiquement contrôlées et ajustées pour chaque lignée de souris. Concrètement, des injections de bleu de méthylène sont réalisées chez quelques individus (un à trois) avant de réaliser les lots expérimentaux. Les volumes choisis et la vitesse d'administration de 0.05µl/min permettent une injection restreinte à l'aire CA2. Cinq sutures sont ensuite réalisées avec un fil résorbable aseptique pour refermer la peau. Pendant son réveil, la souris est placée seule dans une cage. Sa température et sa fréquence cardiaque sont contrôlées jusqu'à son réveil complet. L'animal est alors replacé dans sa cage d'origine avec ses congénères.

Injections aigües de Chondroïtinase-ABC dans l'aire CA2

Nous avons réalisé des injections de Chondroïtinase-ABC (ChABC), une enzyme bactérienne capable de dégrader les protéoglycans qui composent les PNN (Bruckner et al., 1998). La ChABC est diluée à 50U/ml dans une solution de PBS contenant 0.1% de BSA. Les souris contrôles sont injectées bilatéralement dans l'aire CA2 d'une solution de PBS et de 0.1% d'albumine de sérum bovin (BSA) (Cf : Tableau 1). Pour cette expérience, des souris C57BL/6J mâles (Cf : Résultats partie 1) et femelles (Cf : Résultats partie 2) de 5 semaines sont utilisées (Charles River, L'Arbresle, France). Les souris reçoivent à deux injections intra-CA2 dans chaque hémisphère (coordonnées : site CA2 rostral L : ±0.60, AP :-1.10, DV :-2.05 mm, et site CA2 caudal L : ±2.30, AP :-1.98, DV :-2.00 mm) (Figure 23). Les souris sont ensuite laissées 7 jours avant d'être manipulées.

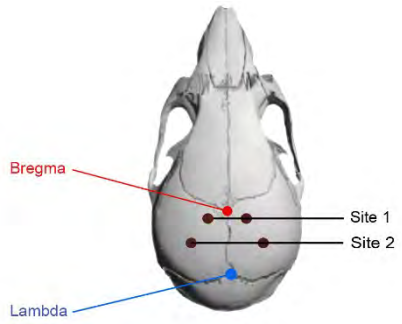


Figure 23 : *Localisation des sites d'injection (en noir) dans l'aire CA2 chez des souris C57BL/6j de 5 semaines*

Injections aigües de NRG1b dans l'aire CA2

Des souris Tg2576 femelles de 9 mois recoivent à deux injections intra-CA2 dans chaque hémisphère (coordonnées : site CA2 rostral L : ±0.70, AP : -0.5, DV : -2.05, site CA2 caudal L : ±2.30, AP : -1.38, DV : -2.00) (Figure 24), et selon la même procédure que celle décrite précédemment. La solution de Human Heregulin-beta 1 (NRG1b) 6.66 nM est diluée dans une solution de PBS. Les injections contrôles sont effectuées avec une solution de PBS (Cf : Tableau 1). Les souris sont maintenues dans leur cage respective pendant 5 jours après l'intervention, avant d'être testées.

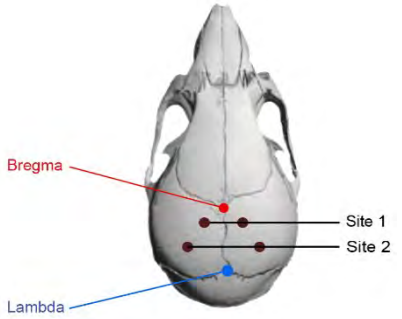


Figure 24 :
Localisation des sites d'injection (en noir) dans l'aire CA2 chez des souris Tg2576

Injections adénovirales dans l'aire CA2

Nous avons utilisé le système Cre-lox afin de bloquer l'expression des récepteurs delta opioïde (DOR). Le principe consiste à utiliser des souris DORflox qui présentent deux sites loxP encadrant la partie essentielle du gène codant pour les DOR. Ces souris sont injectées dans l'aire CA2 avec un adénovirus rAAV5-hSyn-GFP-Cre qui exprime la Cre-recombinase (Cre) couplée à la Green Fluorescent Protein (GFP) sous le contrôle du promoteur hSyn (human synapsin). Ce système permet l'expression de Cre uniquement dans les neurones. L'activité Cre-recombinase entraine l'excision des séquences encadrées par les sites loxP, et remplace la séquence DOR par une séquence GFP, ce qui permet de supprimer DOR et de visualiser les neurones pour

lesquels cette recombinaison a eu lieu. Pour cette expérience, le groupe contrôle est constitué de souris DORflox injectées avec une solution d'adénovirus rAAV5-hSyn-eGFP, induisant une expression de la GFP par tous les neurones transfectés par le virus, sans altérer l'expression des DOR.

Les souris DORflox âgées de 2 à 4 mois reçoivent 0.1µl d'une solution de rAAV5-hSyn-GFP-Cre (titre qPCR: 3.5x10^12 Vg/ml) ou 0.1µl d'une solution contrôle de rAAV5-hSyn-eGFP (titre qPCR: 4x10^12 Vg/ml) (University of North Carolina at Chapel Hill (UNC)) (Cf : Tableau 1). Les injections sont réalisées en deux sites pour chaque hémisphère (coordonnées : site CA2 rostral L : +/- 0.6 AP : -1.1, DV: -2.05 et le CA2 caudal (L : +/-2.3, AP : -1.98, DV : -2.00) (Figure 25). Les souris sont testées 4 semaines après les injections pour permettre une expression virale optimale.

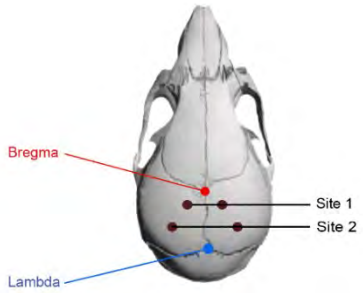


Figure 25 :
Localisation des sites d'injection dans l'aire CA2 chez des souris DORflox

Lignées	Solutions injectées	Références	Concentrations (Vol=0.1µl)	Tests comportementaux
Tg2576	Human Hereguline 1b	Peprotech (100-03)	6.66nM	Mémoire sociale / localisation objet
C57BL/6J	Chondroïtinase ABC (ChABC)	Sigma-Aldrich Cat# C3667	50U/ml	Mémoire sociale / localisation objet
DORflox	rAAV5-hSyn-GFP-Cre	UNC	qPCR : 3.5x10^12 Vg/ml	Mémoire sociale / localisation objet
	rAAV5-hSyn-eGFP		qPCR: 4x10^12 Vg/ml	

Tableau 1 : *Tableau récapitulatif des protocoles d'injection et tests comportementaux utilisés pour les différentes lignées de souris.*

c. Implantation des électrodes subdurales

Nous avons utilisé un système d'électroencéphalographie sans-fil pour l'enregistrement de l'activité cérébrale des souris au cours des tâches comportementales. Pour ce faire, des souris Tg2576 et NTg de 9 mois sont implantées avec des électrodes permettant l'utilisation du transmetteur sans-fil W2100-HS4 (Multi Channel Systems). L'implantation consiste à poser des électrodes au niveau subdural,

qui sont elles-mêmes fixées à un connecteur adapté au transmetteur sans-fil. Pour la mise en place des électrodes, l'animal est anesthésié et placé dans un appareil stéréotaxique comme décrit précédemment. Une trépanation à l'aide d'une fraise de 0.5mm est effectuée dans les zones droite et gauche du cortex pariétal (L : ±3, AP :-1.5) ainsi qu'au niveau du cortex occipital (L : 0, AP :-6.5). Trois électrodes EEG de fil d'argent (0.125mm de diamètre) et gainé de téflon, soudées à un connecteur multicanal (8 mm de longueur et 8.1 mm de haut), sont insérées dans la zone subdurale au niveau des cortex pariétaux droit et gauche pour l'EEG et du cortex occipital pour la référence (Figure 26).

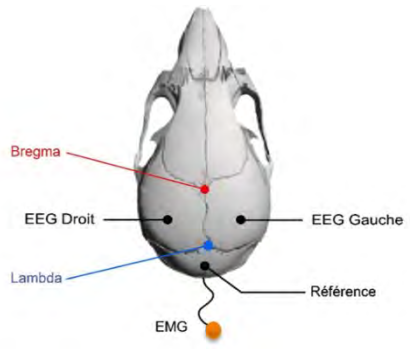


Figure 26 *: Localisation des sites d'implantations des électrodes EEG et EMG en subdural chez des souris Tg2576.*

De plus, une électrode d'électromyographie (EMG) constituée d'un fil de 0.15mm est insérée dans la zone intramusculaire du cou de la souris. Enfin, un fil d'argent placé sous la peau du cou est utilisé comme terre. Pour consolider le dispositif, de la colle dentaire (Superbond) est appliquée, puis un casque de ciment dentaire à base de méthylméthacrylate (Duralay) est réalisé afin de maintenir l'ensemble. Une fois le ciment sec, trois sutures sont réalisées avec un fil résorbable aseptique pour refermer le site. Pendant son réveil la souris est placée dans une cage, seule, sous une lampe chauffante. La température corporelle et de la fréquence cardiaque sont relevées toutes les 10 minutes par l'expérimentateur jusqu'au réveil complet de l'animal qui est alors replacé dans sa cage d'origine.

Après 7 jours de récupération, les souris sont habituées au dispositif d'EEG sans fil (2 ou 3 sessions de 10 minutes) avant d'être soumises aux procédures comportementales.

Procédure d'enregistrement et analyse des signaux

L'utilisation d'un transmetteur sans-fil W2100-HS4 (Multi Channel Systems) offre la possibilité d'enregistrer un EEG sans limiter la mobilité de la souris. Le transmetteur est branché au connecteur placé sur la tête de l'animal lors des sessions d'enregistrement. Le dispositif comportemental est constitué d'une arène rectangulaire (35x25cm) contenant en son centre une cage à barreaux amovibles (8 cm x 16 cm). Trois conditions sont étudiées, l'interaction avec la cage vide (non-sociale), l'interaction avec une souris familière placée dans la cage à barreaux (familière) et l'interaction avec une souris jamais rencontrée est placée dans la cage à barreaux (nouvelle). Les sessions d'enregistrement sont effectuées pendant une phase d'exploration de 10 minutes. L'acquisition se fait avec le système W2100 à une fréquence d'échantillonnage de 2000 Hz avec le système Multi Channel Experimenter. Pour chaque animal, 4 à 5 segments d'EEG enregistrés lors de l'interaction avec une souris familière, nouvelle ou non-sociale sont sélectionnés pour l'analyse de spectre de fréquence. Une transformée de Fourier rapide (FFT), de fenêtre 4096 (analyse sur des évènements de 0.8192s de résolution 1.221Hz permet de déterminer la puissance absolue des différentes fréquences de l'EEG, notamment thêta (5-10) et gamma (30-200Hz).

III. Tests comportementaux

a. Paradigme à trois chambres

Le paradigme à trois chambres se décompose en deux tests. Le premier, le test de sociabilité, repose sur la préférence naturelle des souris à rechercher le contact de leurs congénères. Le second, le test de reconnaissance sociale, met en jeu l'attrait des souris pour la nouveauté, ici, un individu jamais rencontré auparavant. Ce test évalue la capacité des souris à discriminer un individu familier d'un individu nouveau. Le dispositif expérimental est une arène rectangulaire en plexiglas transparent, composée de trois chambres de taille égale, séparées par deux parois comprenant chacune une ouverture. Une cage cylindrique à barreaux (8cm x 16cm) est disposée dans chaque chambre latérale, aux extrémités du dispositif.

Pour chaque phase de test, la souris est placée à l'intérieur de la chambre centrale et peut explorer librement les 3 chambres du dispositif durant 10 min. Au cours des tests,

le temps pendant lequel la souris interagit avec les deux cages à barreaux est mesuré. L'interaction est comptabilisée quand la tête de la souris est orientée vers la cage à barreaux et située au minimum à 1 cm de celle-ci. En revanche, les frôlements et l'escalade de la cage à barreaux (au-dessus de 11 cm, matérialisés par une bande en plastique transparent) ne sont pas considérés comme des interactions directes et ne sont pas mesurés.

Le test de préférence sociale permet de déterminer la sociabilité des souris. Pour ce faire, une souris familière (souris de la même cage) est placée dans une des deux cages à barreaux, alors que l'autre cage reste vide (Figure 27A). Une souris avec une sociabilité normale montrera une préférence pour la cage contenant la souris familière. À la veille du test, les souris sont familiarisées au dispositif à trois chambres en présence des deux cages vides. Pour les souris qui présentent une préférence innée pour l'un des deux côtés du dispositif, lors du test, la souris familière sera présentée du côté opposé à la préférence.

Vingt-quatre heures après le test de préférence sociale, les souris sont soumises au test de reconnaissance sociale. Ce test permet de mesurer la capacité des souris à discriminer un individu familier d'un individu nouveau. Le dispositif utilisé est le même que précédemment à la différence que cette fois, une cage contient une souris familière et l'autre cage contient une nouvelle souris, jamais rencontrée (Figure 27B). Le temps d'exploration des souris familière et nouvelle est mesuré par un expérimentateur, qui travaille en aveugle, à l'aide du logiciel Ethovision (Noldus). Le pourcentage de temps d'interactions est calculé en prenant le temps d'interactions d'une cage par rapport au temps d'interaction total. Une souris capable de distinguer un congénère familier d'un individu nouveau interagira préférentiellement avec la nouvelle souris.

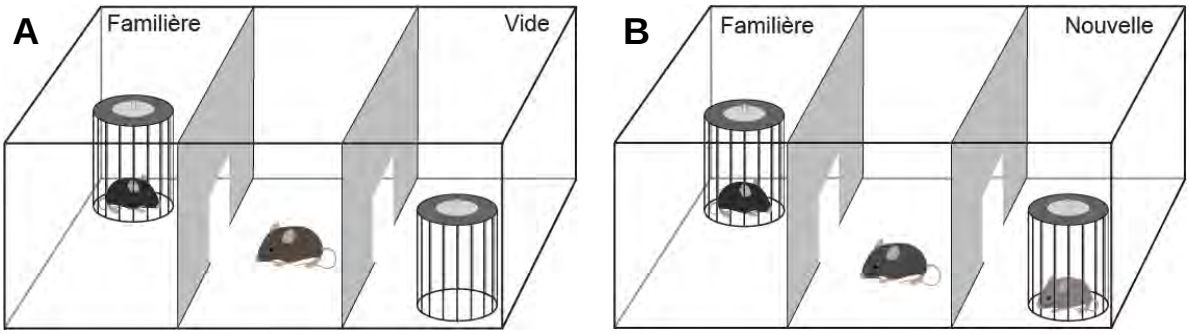


Figure 27 :
A : *Dispositif du test de préférence sociale avec une souris familière (gauche) et une cage vide (droite).*
B : *Dispositif du test de reconnaissance sociale avec une souris familière (gauche) et une souris nouvelle jamais rencontrée (droite).*

b. Test de mémoire sociale à 5 essais

Ce test permet de mettre en évidence la capacité de reconnaissance sociale et l'apprentissage social chez la souris. Inspiré du dispositif décrit dans la littérature (Kogan et al., 2000 ; Hitti et Siegelbaum, 2014), le dispositif est constitué d'une arène rectangulaire (35x25cm) contenant en son centre une cage à barreaux amovibles (8 cm x 16 cm). Pour la phase d'habituation, la souris est placée 10 min dans l'arène, en présence d'une cage à barreaux vide. Une souris nouvelle de même sexe et de même couleur de pelage est ensuite placée dans la cage à barreaux, au cours de 4 essais de 5 min chacun, espacés de 10min (Figure 28). Entre les essais, la cage à barreaux contenant la souris nouvelle est remplacée par une cage à barreaux vide. Une souris dont la mémoire sociale est intacte montrera une diminution du temps d'exploration de la nouvelle souris au cours des 4 essais, témoignant de la perte d'intérêt pour cette souris, et reflétant un apprentissage social. Lors du 5ème essai, une nouvelle souris (différente de celle présentée lors des 4 premiers essais) est placée dans la cage à barreaux pendant 5 minutes (Figure 28). La présentation d'une nouvelle souris pendant ce 5ème essai permet de vérifier que la diminution de l'exploration lors des 4 premiers essais n'est pas due à une perte de motivation du sujet pour le test.
Au cours de ce test, le temps passé à explorer les souris familière et nouvelle placées dans la cage à barreaux est mesuré. Enfin, avec les mesures du temps d'exploration, nous calculons un temps d'exploration relatif au premier essai. Pour cela, le temps d'exploration à chaque essai est divisé par la moyenne du temps d'exploration lors du premier essai pour chaque groupe, puis multiplié par 100. Le temps d'exploration est

mesuré manuellement par un expérimentateur, en aveugle, à l'aide du logiciel Ethovision (Noldus).

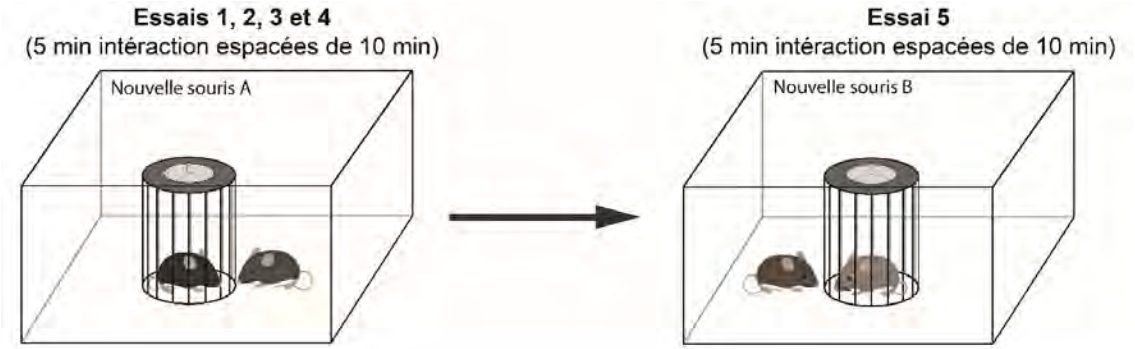


Figure 28 : Test de mémoire sociale à 5 essais qui permet de mesurer l'apprentissage progressif d'un nouvel individu

c. Test de localisation d'objet

Ce test évalue la mémoire spatiale basée sur la capacité de l'animal à percevoir une modification de configuration spatiale après le déplacement d'un objet. Ce test mesure le temps passé par une souris à explorer un objet déplacé, dans un environnement devenu familier. Le dispositif expérimental est constitué d'une arène cylindrique opaque de 40 cm de diamètre. Sur le mur de l'arène, un indice visuel (une carte plastifiée (21 x 21 cm) arborant des bandes noires et blanches), permet à la souris de se repérer dans l'espace. Deux objets identiques (11 cm de hauteur) sont placés dans l'arène à égale distance de la paroi (Figure 29).

Le test de déplacement d'objet se déroule sur deux jours. Les souris sont déposées dans l'arène la tête dirigée vers l'indice visuel. Chaque essai dure 10 min. Le 1er jour est une phase de familiarisation au cours de laquelle les souris sont placées dans l'arène vide. Le jour suivant, c'est la phase d'acquisition : la souris est placée dans l'arène contenant deux objets identiques. Le temps exploration de chacun des deux objets est comptabilisé pendant 10 min. Ensuite la souris est replacée dans sa cage pendant 3 heures, à l'issue desquelles l'animal est remis dans l'arène où l'un des deux objets a été déplacé en direction du repère visuel. Le choix de l'objet qui est déplacé dépend de la préférence de place observée pendant l'acquisition et /ou est choisie aléatoirement pour limiter les biais. Le temps d'exploration de chaque objet est mesuré par un expérimentateur en aveugle, à l'aide du logiciel Ethovision (Noldus). Les comportements d'escalade et le fait de frôler les objets ne sont pas considérés comme des comportements d'exploration et ne sont donc pas comptabilisés. Une souris ayant

mémorisé l'emplacement de l'objet, sera capable de détecter la modification de position et donc explorera préférentiellement l'objet déplacé.

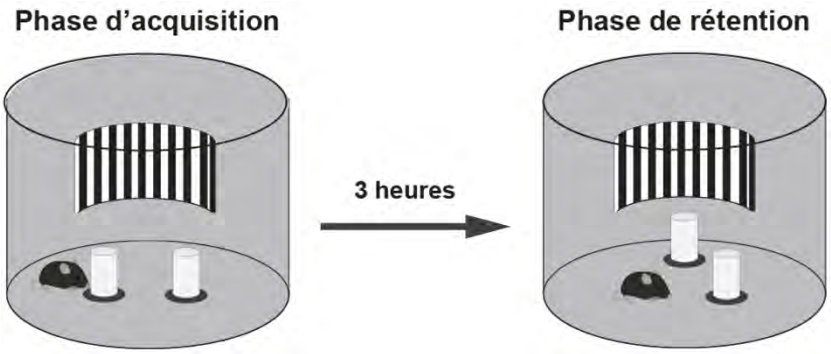


Figure 29 : Représentation du test de localisation d'objet à gauche la phase d'acquisition et à droite la phase de rétention
Lors de la phase d'acquisition, les souris sont libres d'explorer deux objets identiques (gauche).
Pendant la phase d'acquisition, l'un des deux objets est déplacé vers le repère visuel (droite).

d. Test de discrimination olfactive

Afin d'évaluer la capacité des souris à discriminer des odeurs non-sociales et sociales, nous avons utilisé un test d'habituation-déshabituation olfactive (Yang et Crawley, 2009 ; Crawley et al., 2007) (Figure 30). Ce test consiste à présenter 2 odeurs non-sociales (arôme de banane et d'amande douce) d'intérêt égal pour les souris, et 2 odeurs dites sociales (litière de cages de souris étrangères et de même sexe) puis, à mesurer l'intérêt des animaux pour ces odeurs. Le dispositif est une cage standard (32x16x14 cm) fermée par un couvercle percé d'une multitude de trous. Chaque odeur est présentée 3 fois, sur des cotons tiges qui sont changés toute les deux minutes sans pose afin de conserver leur pouvoir odorant.

Que les odeurs soient sociales ou non, les souris ayant des capacités olfactives intactes montrent une habituation lorsqu'une odeur est présentée plusieurs fois et montrent un regain d'exploration lorsqu'une nouvelle odeur est présentée. D'autre part, le temps d'exploration lors de la présentation d'odeurs sociales est très supérieur au temps d'exploration lors de la présentation d'odeurs non-sociales. Ceci souligne l'intérêt inné des souris pour les odeurs de congénères par rapport à des odeurs n'ayant pas de valence connue.

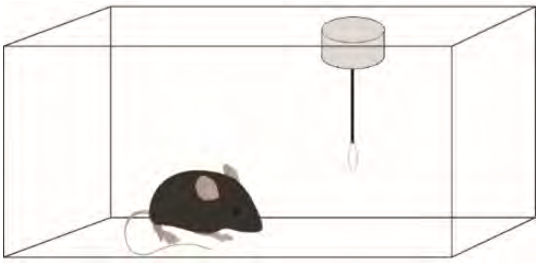


Figure 30: Test l'habituation-déshabituation olfactive

Présentation d'odeurs
- 3x2 min amande douce
- 3x2 min banane
- 3x2 min litière de cage 1
- 3x2 min litière de cage 2

IV. Histologie et immunohistochimie

a. Perfusion et préparation des tissus

Perfusion intracardiaque

À la fin des expériences de comportement, les souris sont sacrifiées afin de prélever leur cerveau et procéder à des marquages immunohistochimiques. Les souris sont anesthésiées avec une dose létale de Doléthal (150mg/Kg) en injection intrapéritonéale. Quand les souris ne présentent plus de réflexe moteur, une dissection thoracique est réalisée. Une aiguille reliée à une pompe péristaltique est insérée dans l'apex du cœur, côté ventricule gauche, puis l'oreillette droite est sectionnée. Une solution osmotique de chlorure de sodium (NaCl 0.9%) à température ambiante est alors délivrée pendant 20-30 secondes, à une vitesse de 16 ml/min, permettant ainsi une exsanguination et un lavage du cerveau. Le cerveau est ensuite sorti de la boite crânienne.

Préparation des tissus

Après le prélèvement, les cerveaux sont post fixés pendant 48h dans une solution de paraformaldéhyde (PFA) 4% diluée dans du tampon phosphate (PB) 0.1M à 4°C. Les cerveaux sont ensuite transférés dans une solution PB 0,1M contenant 30% de saccharose et 0,1% d'azide de sodium pendant une journée, à 4°C. Cette solution permet de laver les tissus de la PFA et de déshydrater les cerveaux grâce à la forte osmolarité de la solution sucrée. Ainsi, les tissus restent intacts lors de la congélation. L'azide de sodium est utilisé pour éviter les contaminations microbiennes et permet la conversation à long terme des tissus.
Après les différents traitements, les cerveaux sont sectionnés en coupes frontales de 30µm d'épaisseur sur toute l'étendue rostro-caudale de l'hippocampe (coordonnées

AP : -1.00 à -2.80mm par rapport au bregma), à l'aide d'un microtome (Leica SM2010R) équipé d'un système de congélation (Physitemp). Les coupes sont récoltées de façon sérielle dans 10 tubes contenant une solution cryoprotectrice (PB 0.1M, 30% éthylène glycol et 30% glycérol) permettant leur conservation à -20°C.

b. Immunohistochimie

Principe de l'immunofluorescence

L'immunofluorescence vise à détecter, sur un échantillon de tissu, un antigène d'intérêt grâce à l'utilisation d'anticorps couplés à un fluorochrome. Pour visualiser l'anticorps fixé sur l'antigène d'intérêt, une amplification du signal est souvent nécessaire. Pour cela, un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome et dirigé contre l'espèce chez laquelle l'anticorps primaire a été généré est utilisé. Nous avons utilisé des anticorps polyclonaux qui se fixent sur plusieurs épitopes de l'anticorps primaire. Le fluorochrome est ensuite visualisé par microscopie à fluorescence (Figure 31).

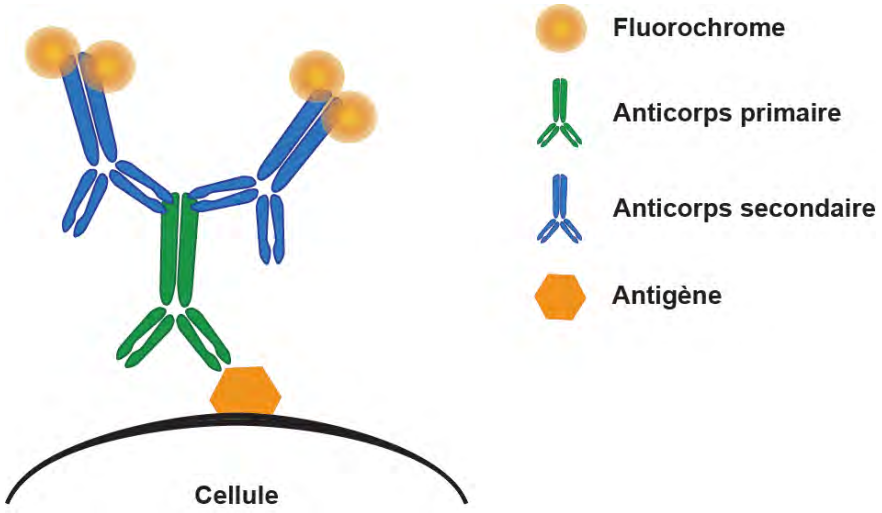


Figure 31 :
Principe de l'immunofluorescence. L'anticorps primaire se fixe sur un épitope spécifique de l'antigène. Un anticorps secondaire, dirigé contre l'anticorps primaire et couplé à un fluorochrome permet l'amplification du signal fluorescent.

Généralités

Toutes les incubations et rinçages sont réalisés sous agitation et à température ambiante en utilisant des séries de 1/10 coupes, correspondant à un échantillonnage d'une coupe tous les 300µm. Les anticorps utilisés sont répertoriés dans le tableau 2. Avant chaque réaction, les coupes sont soumises aux étapes suivantes :

- Un lavage rapide dans une solution composée de PB 0.1M contenant 0.9% de NaCl (PBS 0.1M)
- Deux rinçages de 30 minutes dans une solution de PBS 0.1M contenant 0.25% de triton (X-100) (PBST)
- Une incubation de 15 minutes dans une solution de PBS 0.1M contenant 10% de méthanol (pour réduire l'auto-fluorescence des tissus) et 3% H_2O_2 (pour désactiver les peroxydases endogènes des hématies et limiter le marquage non-spécifique)
- Deux rinçages successifs de 10 minutes dans une solution de PBST

Triple marquage PV/WFA/PCP4

Cette immunofluorescence permet de marquer les interneurones à parvalbumine grâce à l'anticorps de chèvre anti-PV, les perineuronal nets (PNN) sont marqués par la lectine Wisteria Floribunda Agglutinin (WFA) biotinylée et les neurones pyramidaux de CA2 sont visualisés grâce à l'anticorps de lapin anti-Purkinje cell protein 4 (PCP4). L'utilisation du sérum normal d'âne 10% (NDS) permet de bloquer les sites non-spécifiques, et de limiter le signal non-spécifique.

Le protocole d'immunofluorescence Parvalbumine/WFA/PCP4 est le suivant :

- Une incubation de 60 minutes dans une solution de PBST contenant 10% de NDS.
- Une incubation se déroulant toute la nuit dans une solution de PBST contenant :
    - Anticorps anti-PV (fait chez la chèvre) à 1/2500
    - Anticorps anti-PCP4 (fait chez le lapin) à 1/500
    - Lectine WFA biotinylée à 1/500
    - 10% de NDS
- Deux rinçages successifs de 20 min dans une solution de PBST
- Une incubation de 90 minutes dans une solution de PBST contenant :
    - Alexa 488 anti chèvre à 1/250 (pour visualiser les interneurones PV)
    - Alexa 647 anti lapin à 1/500 (pour visualiser les neurones pyramidaux de CA2)
    - Streptavidine couplée à la tetramethylrhodamine (TRITC) à 1/500 (pour visualiser les PNN)
- Deux rinçages de 20 minutes dans du PBST

Toutes les coupes sont montées sur lames (Superfrost) et placées sous lamelles scellées par une solution de Mowiol.

Double immunofluorescence PV/GFP

Afin de déterminer la localisation et la spécificité de l'infection virale chez les souris DORFlox, nous avons réalisé un immunomarquage PV/GFP permettant de visualiser les interneurones PV ainsi que les cellules possédant la construction virale grâce à la GFP.

Le protocole est le suivant :

- Une incubation de 60 minutes dans une solution de PBST contenant 10% de NDS
- Une incubation se déroulant toute la nuit dans une solution contenant :
    - Anticorps anti-PV à 1/2500 (fait chez le lapin)
    - Anticorps anti-GFP à 1/5000 (fait chez la chèvre)
    - 10% de NDS
- Deux rinçages successifs de 20 min dans une solution de PBST
- Une incubation de 90 minutes dans une solution de PBST contenant :
    - Alexa 488 anti lapin à 1/250 (pour visualiser les interneurones PV)
    - Alexa 555 anti chèvre à 1/250 (pour visualiser les neurones infectés par le virus)
- Deux rinçages de 20 minutes dans une solution de PBST

Double immunofluorescence PV/Fos

Les souris utilisées pour cette immunohistochimie sont au préalable conditionnées dans une arène rectangulaire (35x25cm). Durant la phase de conditionnement de 10 minutes, les souris interagissent avec une cage vide ou contenant une souris familière ou une cage avec une souris nouvelle. Les souris sont sacrifiées 90 minutes après le conditionnement. Ainsi pour déterminer indirectement l'activation des neurones excitateurs et des interneurones PV suite à une interaction sociale et non-sociale, nous avons réalisé un immunomarquage permettant de visualiser les interneurones PV et les cellules exprimant la protéine Fos, une des protéines reportrices de l'activité neuronale.

Le protocole est le suivant :

- Une incubation de 60 minutes dans une solution de PBST contenant 10% de NDS et 1% de BSA
- Une incubation se déroulant toute la nuit dans une solution contenant :
    - Anticorps anti-PV à 1/2500 (fait chez la chèvre)
    - Anticorps anti-cFos à 1/2000 (fait chez le lapin)
    - 10% de NDS
    - 1% de BSA
- Deux rinçages successifs de 20 min dans une solution de PBST
- Une incubation de 90 minutes dans une solution de PBST contenant :
    - Alexa 555 anti chèvre à 1/250 (pour visualiser les interneurones PV)
    - Alexa 488 anti lapin à 1/250 (pour visualiser les neurones Fos+)
    - 10% de NDS
- Deux rinçages de 20 minutes dans une solution de PBST

Antigènes	Espèce hôte	Dilution	Référence
Parvalbumine (PV)	Chèvre	1/2500	Swant (PVG213)
Parvalbumine (PV)	Lapin	1/2500	Swant (PV27)
Purkinje Cell Protein 4 (PCP4)	Lapin	1/500	Santa Cruz (sc-74816)
Wisteria Floribunda Agglutinin (WFA)	-	1/500	Sigma (L1516)
Aggrecan	Lapin	1/1000	Millipore (AB1031)
GFP	Chèvre	1/500	Rockland (600-101-215)
cFos	Lapin	1/2000	Santa Cruz (sc-52)
Streptavidine Dyelight 549		1/500	Vector (SA-5549)
Alexa 488 anti-chèvre	Âne	1/250	Invitrogen (A-11055)
Alexa 488 anti-lapin	Âne	1/250	Invitrogen (A-11008)
Alexa 555 anti-chèvre	Âne	1/250	Invitrogen (A-32794)
Alexa 647 anti-lapin	Âne	1/500	Invitrogen (A-31573)

Tableau 2 *: Tableau récapitulatif des anticorps utilisés pour immunohistochimie*

c. Analyse des résultats histologiques

Généralités

Les immunofluorescences sont réalisées sur des séries de coupes échantillonnées tous les 300µm. Pour chaque individu, 5 coupes sont analysées (situées à -1.10mm, -1.40mm, -1.70mm, -2.0mm, -2.30mm du bregma) correspondant à l'étendue rostrocaudale de l'aire CA2. L'analyse des coupes immunomarquées est effectuée à l'aide du logiciel d'analyse d'image (Mercator, ExploraNova, La Rochelle, France) sur un microscope Leica DM6000 B équipé d'une platine motorisée et d'une caméra (Jenoptik). Pour délimiter l'aire CA2, nous avons utilisé le marqueur PCP4, qui est exprimé par les neurones pyramidaux de l'aire CA2 (Tableau 1), mais pas par ceux de CA1 ni CA3. Les contours de l'aire CA2 et de ses couches sont dessinés à faible grossissement (objectif x5), permettant une mesure automatique des surfaces correspondantes (Figure 32).

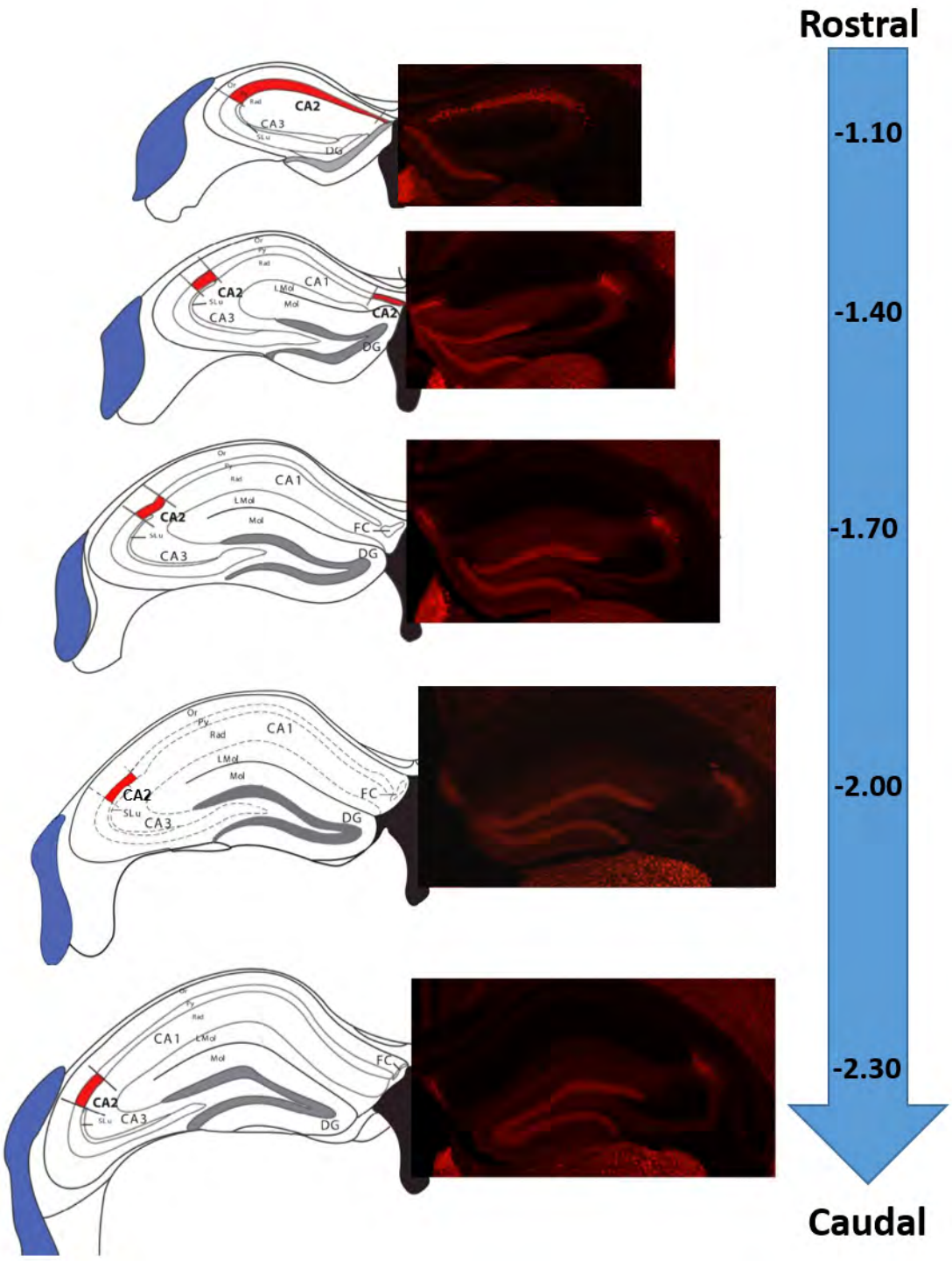


Figure 32 : Analyse des marquages immunohistofluorescents.
Les différents marquages PV+, PV+/PNN+, Fos+ et PV+/Fos+ sont analysés dans l'aire CA2 sur la base du marquage PCP4 (rouge).
Gauhe : *Schéma de la délimitation de l'aire CA2 dans l'hippocampe*
Centre et droite : *Photographies de l'hippocampe après l'immunhistochimie PCP4 (rouge) en fonction des différentes coordonnées rostro-caudales par rapport au bregma.*
des différentes coupes analysées pendant la quantification du nombre de neurones
Pour les analyses d'intensité de fluorescence PV et WFA, nous avons sélectionné les coupes -1.10mm et -2.00mm par rapport au bregma.

Quantification du nombre d'interneurones PV et de leur PNN

Nous avons quantifié le nombre d'interneurones immunomarqués pour la PV (cellules PV+) et d'interneurones PV+ entourés de PNN (PV+/PNN+) dans les couches *stratum Oriens, stratum Pyramidale et stratum Radiatum* de l'aire CA2 (Figure 33).

Après avoir tracé le contour des structures anatomiques de l'aire CA2, les neurones immunomarqués sont pointés à fort grossissement (objectifs x20 et x40).

Le volume de référence de l'aire CA2 est calculé pour chaque animal, en multipliant la somme des volumes quantifiés (aire de la structure x l'épaisseur de la coupe) par l'espacement entre les coupes (300µm). Pour estimer le nombre de neurones présents dans toute l'aire CA2, la densité est rapportée au volume de référence.

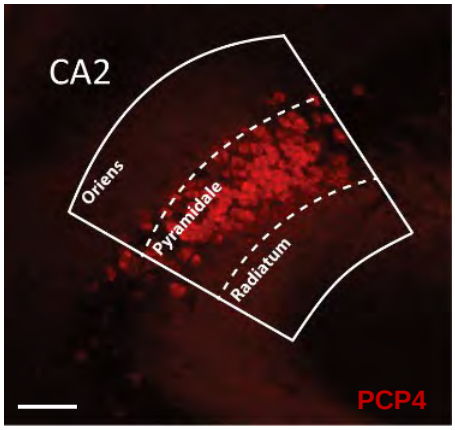


Figure 33 :
Photographie de la région CA2 après l'immunohistochimie PCP4 qui marque les cellules pyramidales. Les différentes sous-couches de l'aire CA2 (oriens, pyramidale, radiatum) sont identifiées visuellement sur la base du marquage PCP4. Barre d'échelle = 50 µm

Mesure de l'intensité de fluorescence des neurones PV

Les contours de l'aire CA2 et de ses sous-structures sont dessinés. Nous avons pris des photos de l'aire CA2 avec l'immunomarquage PV et PCP4 à fort grossissement (objectif x20) avec des paramètres d'acquisition constants (Cf : Tableau 3) et un recouvrement de 20%, avec le logiciel Mercator. Les mosaïques des régions photographiées sont exportées dans le logiciel Fidji (ImageJ), puis assemblées afin d'obtenir une image de la structure entière. Le contour de la couche pyramidale est dessiné pour faciliter la localisation de l'aire CA2. Sur les images, le soma des cellules PV+ est ensuite délimité manuellement afin de mesurer la valeur moyenne de gris (VmG) (Figure 34). La VmG correspond à la somme des valeurs de gris de tous les pixels de la sélection, divisée par le nombre de pixels. Pour mesurer la différence d'intensité entre cellules, en faisant abstraction du bruit de fond, un ratio d'intensité est

calculé pour chaque cellule PV+. Pour ce faire, la mesure de la VmG de la cellule PV+ est rapportée à la moyenne de la VmG de quatre neurones immuno-négatifs pour PV et localisés dans la même coupe.

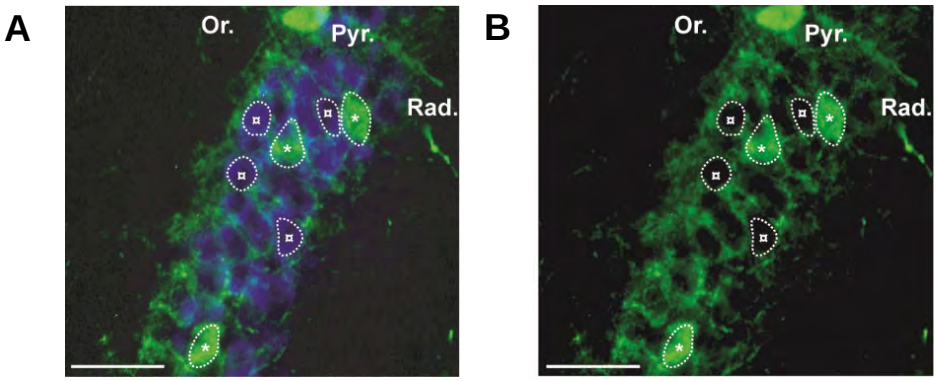


Figure 34 : Photographies de l'aire CA2 après l'immunohistochimie de parvalbumine (vert) et PCP4 (bleu).
Le niveau d'expression de la protéine parvalbumine est déterminé grâce à la mesure de l'intensité de la fluorescence dans le soma des cellules PV+ de la couche pyramidale.
Les interneurones PV+ sont délimités (contours en pointillés (*)), et les neurones pyramidaux, servant de valeur référence, sont égalment déssinés (contours en pointillés (¤)).Barre d'échelle = 50 µm. Les différentes couches de la zone CA2 sont mentionnées par Stratum oriens Or. ; Stratum pyramidale : Pyr ; stratum radiatum : Rad.

Mesure de l'intensité de fluorescence de la WFA dans l'aire CA2

Après avoir dessiné le contour de l'aire CA2 sur les coupes contenant les sites injections (coordonnées site 1 :-1.10mm et site 2 : -2.00mm par rapport au bregma), et marquées au WFA et PCP4, la région CA2 est photographiée à fort grossissement (objectif x20), en gardant constants les paramètres d'illumination et d'acquisition des images (Tableau 3) et avec un recouvrement de 20% (Mercator). Les mosaïques des régions photographiées sont exportées dans le logiciel Fidji (ImageJ) puis assemblées pour générer l'image de la structure entière. Les contours des couches *oriens, pyramidale et radiatum* de l'aire CA1, CA2 et CA3 sont dessinés, puis la valeur moyenne gris est mesurée pour chaque couche.

	Lumière d'émission	Intensité	Temps exposition	Gain	Dark
PV	L5	55%	500ms	6	1
PNN	RHO	30%	500ms	4	1
PCP4	Cy5	100%	500ms	16	1

Tableau 3 : *Paramètres d'acquisition des images utilisés pour toutes les quantifications.*

RÉSULTATS

1. Définir le lien entre la maturation des interneurones à parvalbumine de l'aire CA2 et l'émergence de la mémoire sociale à la fin de l'adolescence.

Afin de déterminer les facteurs impliqués dans l'émergence de la plasticité dans l'aire CA2 à la fin de l'adolescence et d'examiner si cette plasticité est associée à l'apparition de nouvelles capacités cognitives, nous avons participé à un travail collaboratif avec l'équipe de Vivien Chevaleyre et Rebecca Piskorowski (IPNP, Paris). Les principaux résultats de ce travail présentés ci-dessous font l'objet d'un article paru en Octobre 2019 dans *Cell Reports* et dont je suis deuxième auteur (Annexe 2) (Dominguez et al., 2019). La quantification de l'intensité du marquage WFA dans l'aire CA2 au cours du développement post-natale et les enregistrements sur les tranches d'hippocampe ont été effectués par nos collaborateurs. Nous avons de notre côté, mesuré l'effet de l'injection de ChABC sur le niveau d'intensité du marquage WFA dans l'aire CA2 et effectué toute les mesures comportementales.

1.1. Modifications anatomiques et fonctionnelles de l'aire CA2 au cours du développement post-natal.

Au cours du développement post-natal, l'apparition des PNN autour des interneurones PV est associée à la maturation fonctionnelle du système inhibiteur (Hensch, 2005 ; Horii-Hayashi et al., 2015). Afin de déterminer la cinétique d'apparition de ces PNN dans l'aire CA2, nous avons réalisé des marquages avec la Wisteria Floribunda Agglutinine (WFA) chez des souris sauvages à 4 âges : P17 (jour post-natal 17 ; stade juvénile), P22-29 (stade adolescent), P35 (stade post-adolescent) et P50-60 (adulte) (Figure 35A).

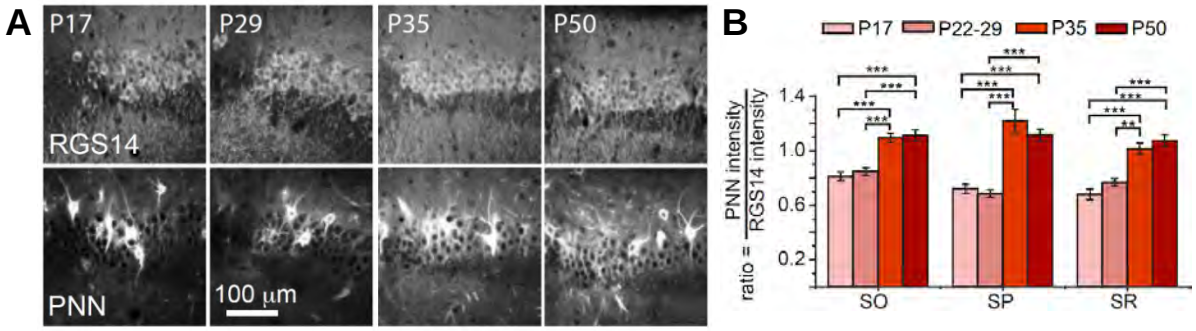


Figure 35
A : *Photographies d'immunohistochimies RGS14 et PNN dans l'aire CA2 de souris aux âges P17, P29, P35 et P50.*
B : *Quantification du rapport de l'intensité PNN moyenne sur l'intensité RGS14, dans l'aire CA2. Les PNN de l'aire CA2 parviennent à maturité à P30. (Barres d'erreur = SEM).SO : Stratum Oriens; SP : Stratum Pyramidale SR : Stratum radiatum.Test Mann Whitney : **p<0.01, ***p<0.001.*

Ces marquages, analysés dans les différentes couches de l'aire CA2 révèlent que les souris expriment un faible niveau de PNN entre P17 et P29, en comparaison avec les individus post-adolescents et adultes (P35-50) (Figure 35B : SO : P35 *vs* P22-29: 0,85 ± 0,03 ; SP : P35 *vs* P22-29: 0.68 ± 0.02 ; SR : P35 *vs* P22-29: 0,77 ± 0,03). Ceci indique que l'apparition des PNN dans l'aire CA2 a lieu dans une fenêtre de temps restreinte, située entre P29 et P35 (Figure 35B).

Plusieurs études suggèrent que la plasticité de l'aire CA2 serait limitée par la présence atypique de PNN autour du soma et des dendrites proximales des neurones pyramidaux (Carstens et al., 2016 ; Celio 1993). Cependant, ces études ne prennent pas en compte la contribution du circuit inhibiteur dans l'établissement de la plasticité dans l'aire CA2. Or, une particularité anatomique de l'aire CA2 est justement sa forte densité en interneurones PV, associés aux PNN, qui projettent massivement sur les neurones pyramidaux de CA2 (Ribak et al., 1993). Contrairement aux études antérieures, nos résultats indiquent que le marquage PNN diffus dans l'aire CA2 est lié aux projections axonales des interneurones PV (Figures 36A et 36B). Ainsi, une partie des PNN serait localisée autour des dendrites proximales des neurones pyramidaux alors que la majeure partie des PNN se trouverait au niveau des axones terminaux des interneurones PV. La présence des PNN autour des interneurones PV suggère que les PNN seraient impliqués dans la capacité des interneurones PV de l'aire CA2 à libérer du GABA, et donc à réguler la plasticité dans cette région.

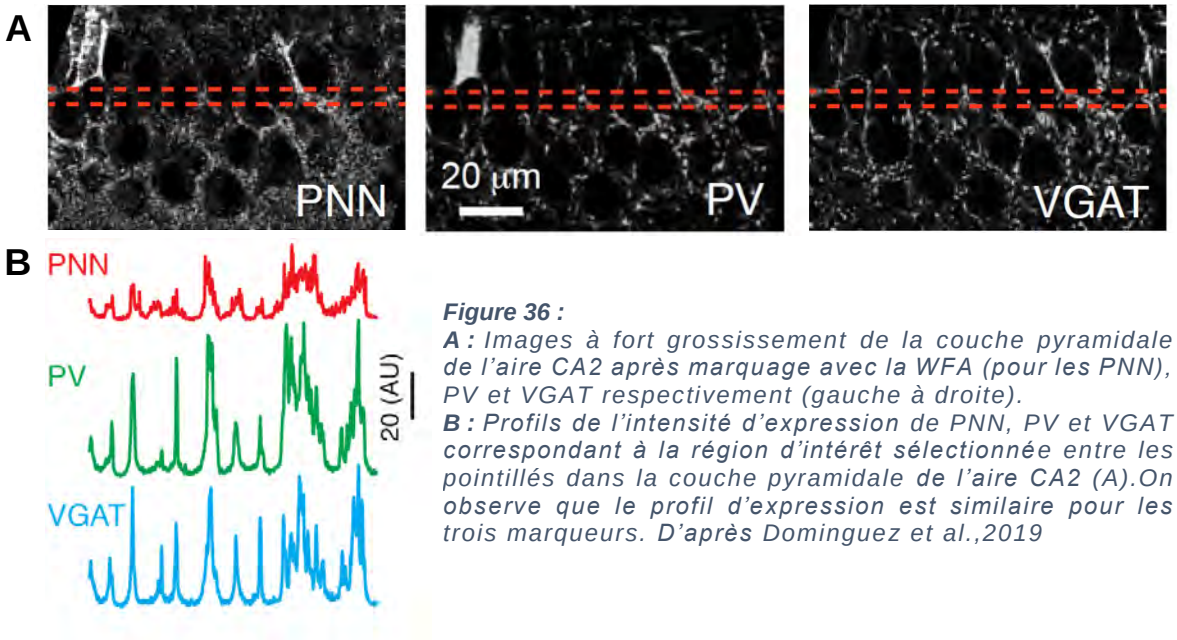


Figure 36 :
A : *Images à fort grossissement de la couche pyramidale de l'aire CA2 après marquage avec la WFA (pour les PNN), PV et VGAT respectivement (gauche à droite).*
B : *Profils de l'intensité d'expression de PNN, PV et VGAT correspondant à la région d'intérêt sélectionnée entre les pointillés dans la couche pyramidale de l'aire CA2 (A).On observe que le profil d'expression est similaire pour les trois marqueurs. D'après Dominguez et al.,2019*

Nous avons ensuite examiné si la formation de PNN dans l'aire CA2 coïncide avec la capacité à induire une iLTD dépendante des interneurones PV. Pour ce faire, nos collaborateurs ont évalué si la stimulation à haute fréquence (HFS) des collatérales de Schaffer permet l'induction d'une iLTD dans l'aire CA2 sur des tranches d'hippocampe de souris âgées de P17 à P70. La présence de iLTD est déterminée par la modification de l'amplitude du signal mesurée avant et après la stimulation. Les données obtenues révèlent que la iLTD peut être induite dans l'aire CA2 de souris adultes (Figure 37 : Pourcentage de l'amplitude de l'iLTD après stimulation à haute fréquence, à P33-45 n=8 : 70.9 ± 1.5% et à P>70 n = 8: 67.9 ± 2.1%), alors que cette forme de plasticité n'est pas observée dans les préparations issues d'individus juvéniles et adolescents (Figure 37 : Pourcentage de l'amplitude de l'iLTD après stimulation à haute fréquence, à P17-21 n=5: 97.4 ± 1.1% ; à P22-26 n = 7 : 96.4 ± 4.1% ; à P27-32 n = 6, 94.4 ± 2.4%). Ainsi, l'émergence de la plasticité dans l'aire CA2 serait concomitante avec l'apparition des PNN autour des interneurones PV.

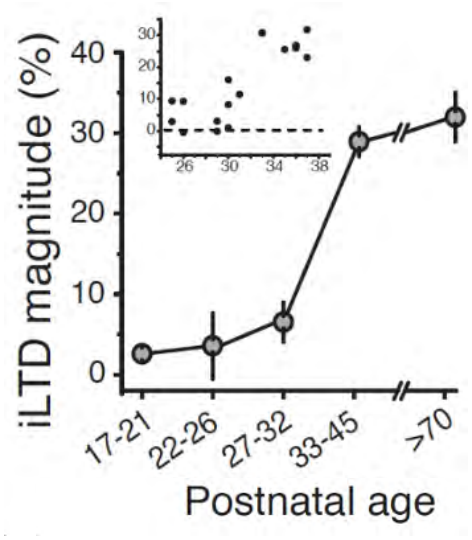


Figure 37 :
Amplitude moyenne de la iLTD mesurée chez des souris à différent âges dans CA2. La capacité d'induire une iLTD par une stimulation à haute fréquence apparait à P33-45, donc à l'âge adulte. D'après Dominguez et al.,2019.

Afin d'établir l'existence d'un lien entre l'émergence de cette plasticité dans l'aire CA2 et la capacité à établir une mémoire sociale, nous avons soumis des souris juvéniles (P28) et adultes (P60) au test de mémoire sociale à 5 essais (Figure 38). Les souris adultes (P60) montrent une habituation lors des présentations successives de la souris nouvelle, reflétant leur capacité à former une mémoire sociale (Figure 38B : souris à P60 n=8 : ANOVA à un facteur : T2 :80,90 ± 10,66 *vs* T1 p=0.42, T3: 43,08 ± 10,0 *vs* T1 p=0.007, T4 : 27.72 ± 7.38 *vs* T1 p=0.001, et T5 : 112,13 ± 22,77 *vs* T1 p=0.58). Au contraire, les souris juvéniles (P28) ne montrent pas d'habituation au cours des

essais successifs (Figure 38B : Souris à P28 n=10 : ANOVA à un facteur T2 : 118,9 ± 21,64 *vs* T1 p=0.87, T3 : 86,37 ± 18,42 *vs* T1 p=0.88, T4 : 81.46 ± 18.01 *vs* T1 p=0.76, T5 : 128,03 ± 29,7 *vs* T1 p=0.86), ce qui indique l'incapacité des jeunes souris à former une mémoire sociale.

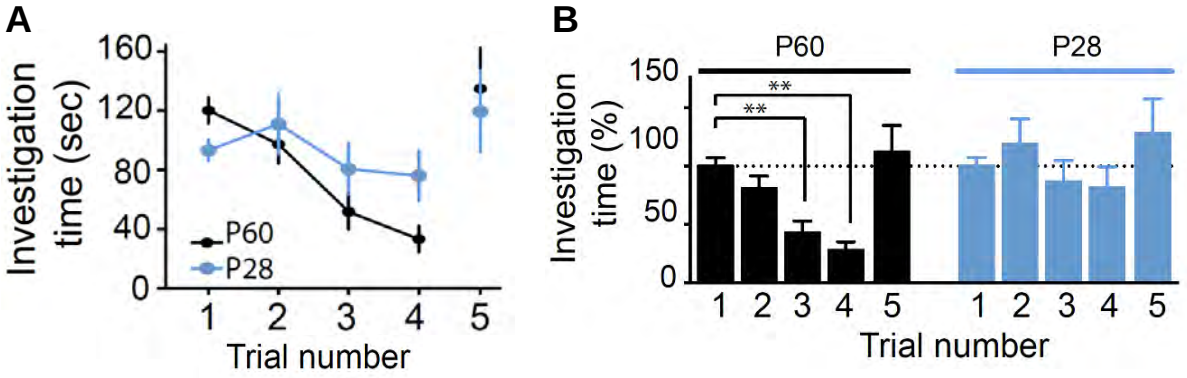


Figure 38 : Test de mémoire sociale à 5 essais
A : *Le temps d'interaction diminue au cours des expositions successives chez les souris adultes (P60, n = 8), au 5ème essai une augmentation du temps d'interaction est observée. Chez les souris juvéniles (P28, n = 10), aucune diminution significative du temps d'interaction n'est observée et aucun changement de l'interaction n'est relevé après la présentation d'une nouvelle souris (5ème essai).*
B : *Temps d'interaction normalisé par rapport au premier essai, chez les souris à P60 et P28. Les souris juvéniles sont incapables de former une mémoire sociale. (Barres d'erreur = SEM). ANOVA à un facteur mesures répétées T(n) vs T1: **p<0.01. D'après Dominguez et al.,2019.*

Par conséquent, nos résultats indiquent que l'apparition des PNN et de la plasticité spécifique de l'aire CA2 sont concomitantes avec l'émergence de la capacité à former une mémoire sociale, et surviennent après la fin de l'adolescence chez les souris.

1.2. Implication des PNN et des récepteurs delta opioïdes de l'aire CA2 dans la mémoire sociale.

1.2.1. Les PNN dans l'aire CA2 sont nécessaires à la formation de la mémoire sociale.

Nous avons ensuite examiné s'il existait un lien de cause à effet entre l'absence de PNN dans CA2, la capacité à établir une iLTD et la formation de la mémoire sociale.
Dans un premier temps, nos collaborateurs ont évalué si la présence de PNN dans l'hippocampe est nécessaire pour l'induction d'une iLTD chez les souris adultes. Pour ce faire, des tranches d'hippocampe sont placées dans un bain contenant de l'enzyme bactérienne Chondroïtinase-ABC (ChABC) afin de dégrader les PNN (Figure 39A). L'amplitude des courant post-synaptiques inhibiteurs (IPSC) induits dans l'aire CA2 par une stimulation à haute fréquence des SC est alors mesuré, en condition contrôle

et en présence de ChABC. Les données obtenues (Figure 39B) indiquent que la stimulation à haute fréquence sur des préparations hippocampiques placées en présence de ChABC, et donc dénuées de PNN, induit une dépression dont l'amplitude est réduite par rapport à la condition contrôle (Figure 39B : Contrôle n = 5 : 64.2 ± 2.6% de la base de référence, ChABC n = 7 : 89.6 ± 4.8% de la base de référence; test-t : Contrôle *vs* ChABC p=0.000016). Cette dépression est transitoire, ce qui indique que la dégradation des PNN suffit à empêcher l'induction de iLTD dans l'aire CA2. L'ensemble de ces données suggère que les PNN sont nécessaires à l'induction de la iLTD dans l'aire CA2.

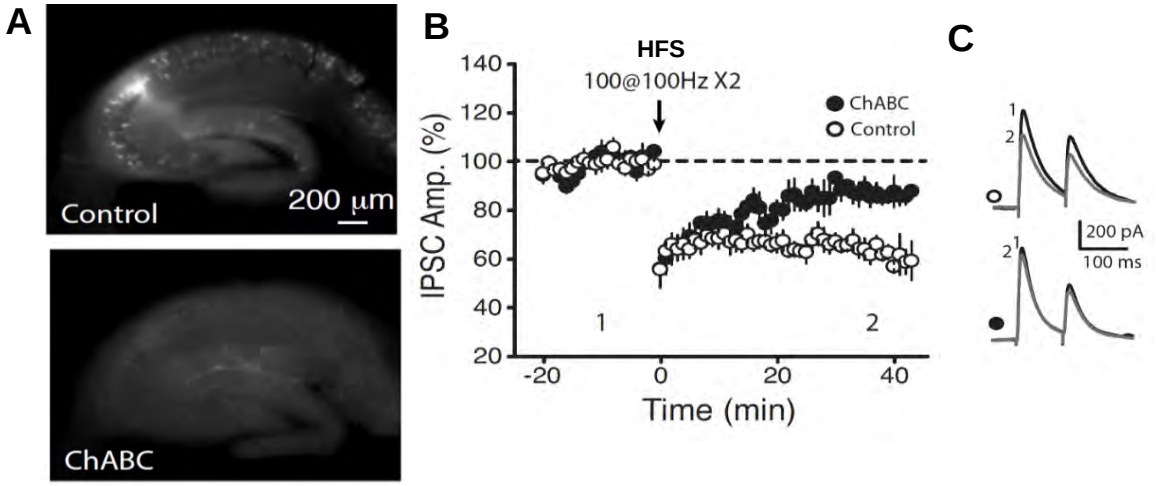


Figure 39 :
***A** : Photographie des préparations de tranches d'hippocampe de souris adulte (>P35) dans un bain de liquide cérébro-spinal artificiel avec du PBS (haut) ou contenant 2U/mL de ChABC (bas) et marquées avec la WFA. La ChABC provoque une digestion presque complète des PNN.*
***B :** Les tranches hippocampiques précédemment incubées dans la ChABC montrent une iLTD réduite après une stimulation à haute fréquence (Ronds noirs, n=5) par rapport aux préparations contrôles (Ronds blancs n=7).*
***C :** Exemples de tracés avant (1) et après (2) HFS.*
D'après Dominguez et al.,2019.

Parallèlement, nous avons étudié si la présence des PNN dans l'aire CA2 est nécessaire à la formation de la mémoire sociale. Pour cela, nous avons injecté une solution de ChABC (ou de PBS) dans l'aire CA2 de souris adultes pour dégrader les PNN. Sept jours plus tard, nous avons évalué leurs performances dans un test de mémoire sociale à 5 essais. Comme attendu, l'injection de la ChABC provoque une dégradation massive des PNN dans l'aire CA2 spécifiquement (Figure 40A). Au niveau comportemental, les souris ayant reçu la solution contrôle (PBS) montrent une diminution du temps d'exploration au cours des essais (Figure 40B, ANOVA à un facteur : souris PBS n=10: T2 : 76.74 ± 8.87 *vs* T1 p=0.015, T3 : 52.83 ± 8.84 *vs* T1 p=0.0008, T4 : *vs* 43.12 ± 5.09 T1 p=0.0005, T5 : 123,96 ± 11,61 *vs* T1 p=0.088). En

revanche, les souris dont les PNN sont dégradées, présentent un temps d'exploration qui ne diminue pas significativement au cours des essais (Figure 40B, ANOVA à un facteur : souris ChABC n=12 : T2 110,29 ± 9,82 *vs* T1 p=0.73, T3 : 102,35 ± 10,86 *vs* T1 p=0.79, T4 : 87.19 ± 12.72 *vs* T1 p=0.73, T5 : 132,15 ± 11,89 *vs* T1 p=0.13), indiquant une absence d'habituation à la souris présentée. Ces données révèlent que l'absence des PNN dans l'aire CA2 empêche la formation de la mémoire sociale de souris adultes.

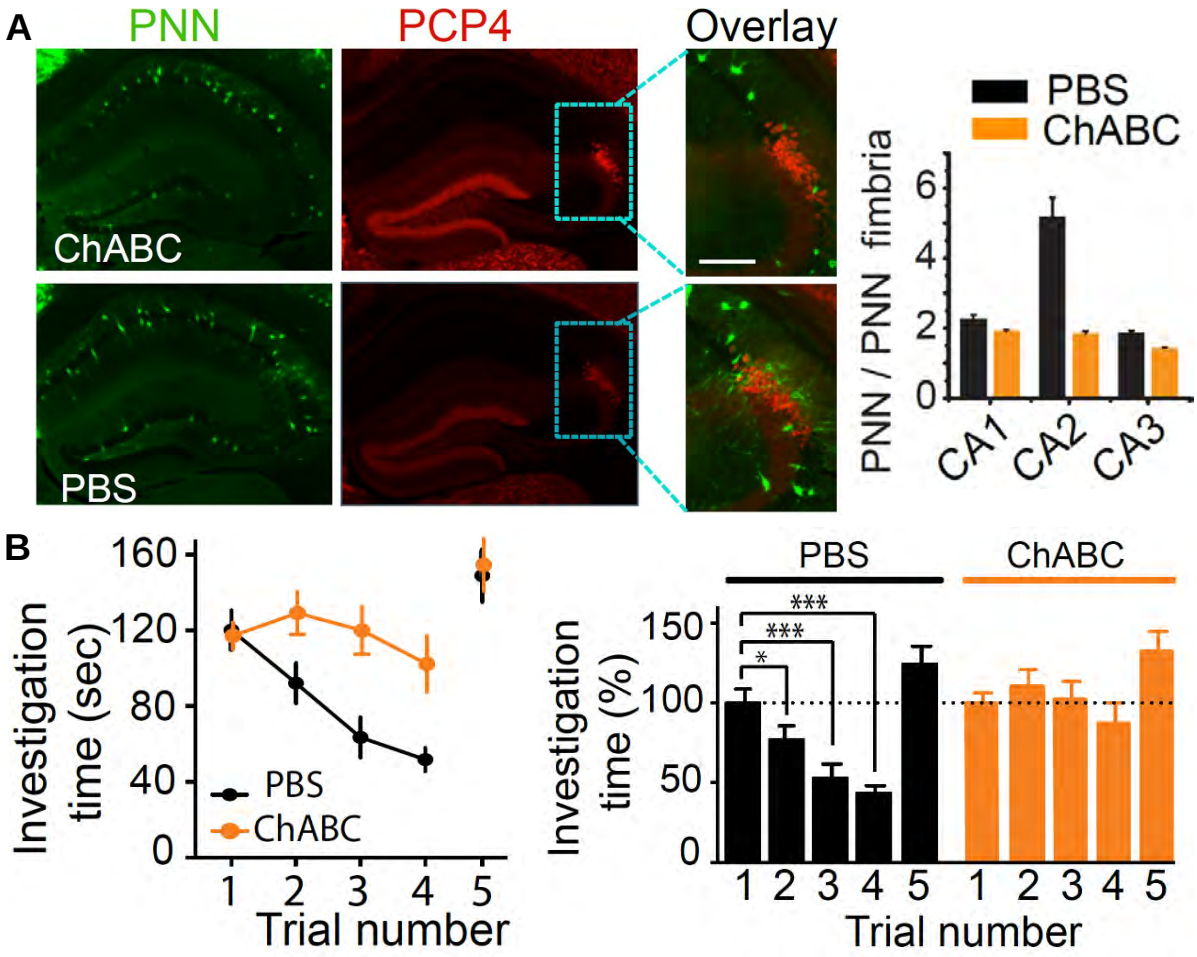


Figure 40 :
A : *Marquages immunohistochimiques pour PNN (vert) et PCP4 (rouge) chez des souris injectées avec la chondroïtinase ABC (ChABC) ou une solution saline (PBS).*
B : *Les souris injectées avec du PBS montrent une diminution du temps d'interaction (n = 10), contrairement aux souris ayant reçu une injection de ChABC. Le temps d'interaction ne diminue pas comparativement à l'essai 1 chez des souris ayant reçu une injection de ChABC (n = 12). La normalisation du temps d'interaction montre une diminution significative chez les souris contrôles, alors qu'aucune diminution n'est observée chez des souris ChABC. Les barres d'erreur indiquent SEM, ANOVA à un facteur T(n) vs T1 : *p<0.05, ***p<0.001*

Afin de déterminer si cet effet est spécifique la mémoire sociale, les souris traitées ou non avec la ChABC ont été soumises à un test de localisation objet qui évalue la mémoire spatiale (Figure 41). Au cours de ce test, le temps d'exploration de chaque objet est mesuré. Les souris PBS et ChABC expriment une nette préférence pour l'objet déplacé (Souris PBS n=6 : Objet déplacé 73.7 ± 5.9sec, objet fixe 58.7 ± 4.8 sec ; test-t : Objet déplacé *vs* objet fixe p=0.034 ; souris ChABC n=8 : Objet déplacé 75.3 ± 5.4 sec, objet fixe 58.4 ± 3.6 sec ; test-t : Objet déplacé *vs* objet fixe p= 0.00079), indiquant que la mémoire spatiale est préservée malgré la dégradation des PNN dans l'aire CA2 (Figure 41).

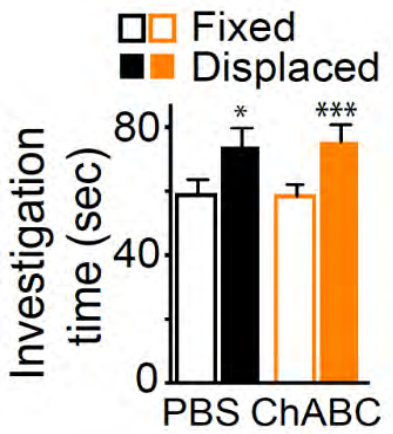


Figure 41 : *Les deux groupes de souris présentent une préférence pour l'objet déplacé dans la tâche de localisation d'objet. test-t apparié : objet déplacé vs objet fixe: *p<0.05, ***p<0.001. D'après Dominguez et al.,2019*

En conclusion, nos données révèlent que l'apparition des PNN dans l'aire CA2 durant la fin de l'adolescence est associée à l'émergence d'une plasticité inhibitrice dans l'aire CA2 et sous-tend les capacités de mémoire sociale.

1.2.2. Les récepteurs delta opioïdes dans l'aire CA2 sont nécessaires à la formation de la mémoire sociale.

Nos collaborateurs ont montré qu'une stimulation à haute fréquence (HFS) provoque une iLTD chez les souris adultes, contrairement aux souris juvéniles (Cf : Résultats 1.1). De plus, leurs données indiquent que la iLTD peut également être induite chez les souris adultes par la simple activation des récepteurs delta opioïde (DOR) *via* l'application de leur agoniste sélectif, le [D-Pen2,5]-Enkephalin hydrate (DPDPE) (Piskorowski et Chevaleyre, 2013). En revanche, cet agoniste sélectif des DOR ne déclenche pas de iLTD chez les souris juvéniles, provoquant seulement une dépression transitoire des IPSC (Figures 42A et 42B : Souris à P<35 n = 8 : 73,5 ± 4,2 % de la base de référence; Souris à P26-30 n = 6 : 98,8 ± 2,5 % de la base de

référence). Ainsi, ce résultat montre que les DOR sont exprimés au niveau des synapses terminales inhibitrices chez les juvéniles, mais que leur activation ne permet pas une dépression durable de la libération de GABA.

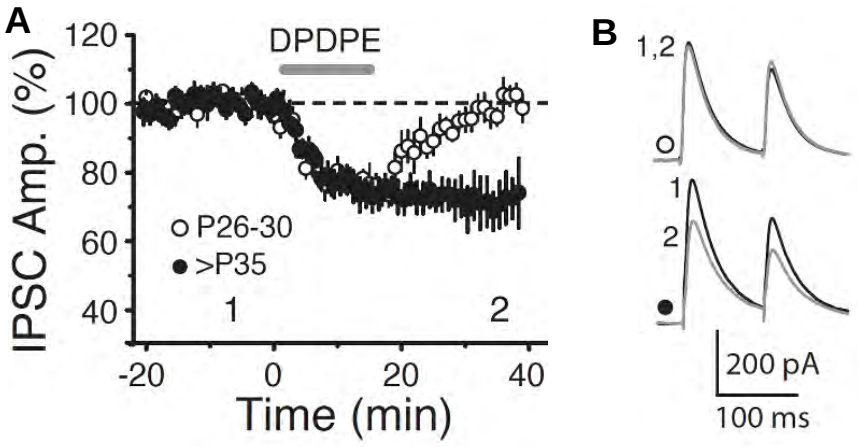


Figure 42 :
A : *Evolution temporelle de l'effet de l'agoniste sélectif DOR (DPDPE,15 minutes, 5 µM) sur l'amplitude des IPSC chez des souris âgées de P26-30 et >P35. L'application de DPDPE provoque une dépression durable chez les souris P35 (Ronds noirs, n = 8), contrairement aux souris de P26-30 qui déclenchent une dépression transitoire (Ronds blancs, n = 6).*
B : *Exemples de tracés avant application (1) et après (2) application du DPDPE. D'après Dominguez et al.,2019.*

Ces observations indiquent que l'incapacité des souris juvéniles à former une iLTD ne serait pas causée par l'inactivation des DOR, et suggèrent qu'un élément déclencheur de cette iLTD est manquant et empêcher la mise en place de la plasticité dans CA2 chez les juvéniles.

Sur la base de ces observations, nous avons donc émis l'hypothèse que l'incapacité des souris juvéniles à former une mémoire sociale serait liée à l'immaturité de leurs récepteurs delta opioïde. Afin de tester cette hypothèse, nous avons utilisé des souris DOR-Flox (Orpd1 fl/fl) chez lesquelles il est possible d'inactiver localement l'expression des DOR par des injections de vecteurs viraux (Figure 43). Nous avons réalisé des injections de virus rAAV5-hSyn-GFP-Cre (AAV-Cre) ou de virus contrôle rAAV5- hSyn-eGFP (AAV-GFP), dans l'aire CA2 des souris, avant de tester leur mémoire sociale (Figure 43).

Suite à l'injection virale, nous observons l'expression de la GFP, co-localisée avec le marqueur des neurones pyramidaux (PCP4) et restreinte à l'aire CA2 (Figure 43A). Au niveau comportemental, les souris contrôles présentent une habituation visible dès le 3ème essai (Figure 43B : ANOVA à un facteur : souris AAV-GFP n=10: T2 : 60.9% *vs*

T1 p=0.15, T3 : 47.7% *vs* T1 p=0.04, T4 : 32.55% *vs* T1 p=0.04, T5 : 90.0% *vs* T1 p=0.64). En revanche, les souris chez lesquelles l'expression des DOR est abolie dans CA2, montrent une habituation visible seulement au 4ème essai (Figure 43B, souris AAV-Cre n=12 : T2 : 91.55% *vs* T1 p=0.73, T3 : 60.0% *vs* T1 p=0.17, T4 : 47.7% *vs* T1 p=0.03, T5 : 109.2% *vs* T1 p=0.73). Il semble donc que l'invalidation des DOR provoque un ralentissement de la formation de la mémoire sociale.

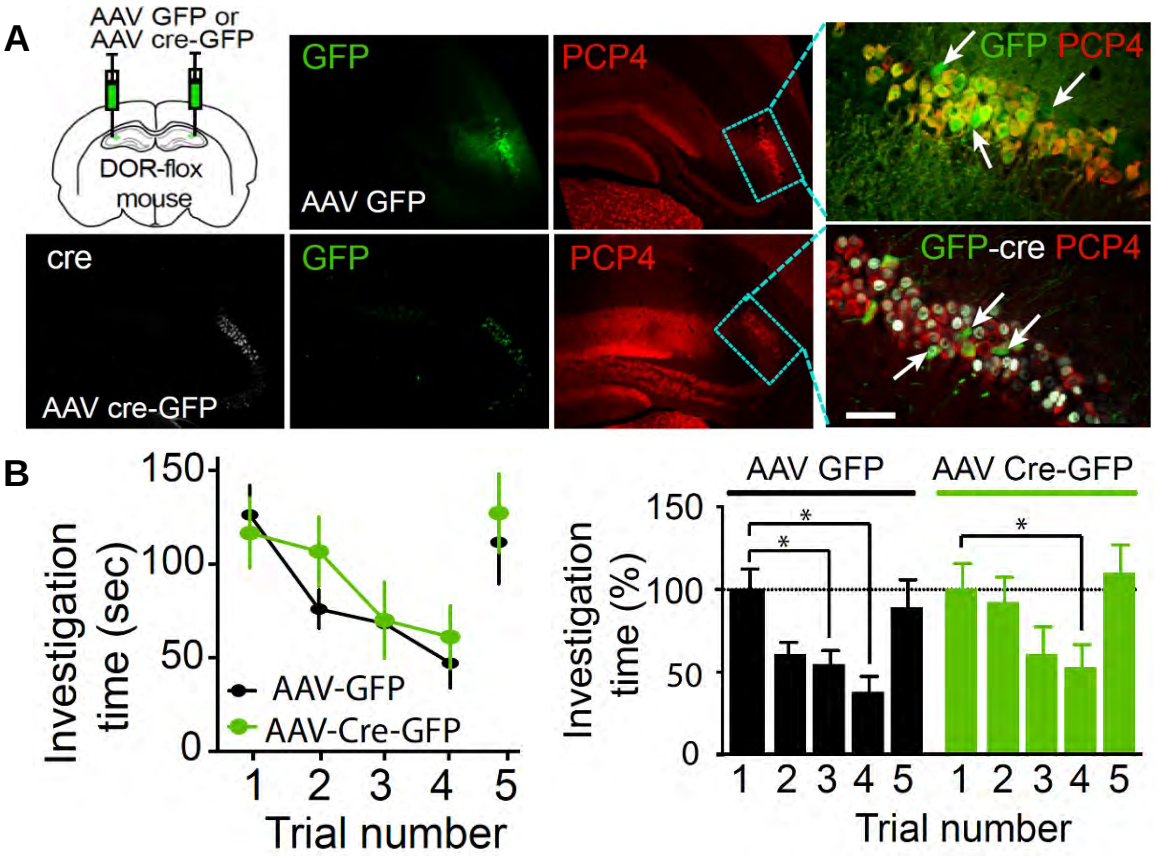


Figure 43 :
***A** : Représentation schématique de l'injection des vecteurs AAV dans CA2. Photographies des immunohistochimies GFP (vert), PCP4 (rouge) et cre (blanc) chez des souris DOR-flox injectées avec AAV-GFP ou AAV-cre-GFP dans l'aire CA2. À fort grossissement, les flèches indiquent les neurones GFP positifs et PCP4 négatifs (interneurones) et au-dessous les neurones exprimant cre-GFP (blanc). Barre d'échelle 50 µm.*
***B :** Les souris injectées avec l'AAV-GFP montrent une diminution du temps d'interaction à l'essai 2 et une diminution significative aux essais 3 et 4 (n = 7). En revanche, les souris injectées avec AAV-cre-GFP (n = 8) ne présentent une diminution significative du temps d'interaction qu'au 4ème essai, ce qui indique que l'acquisition de la mémoire sociale est retardée. ANOVA à un facteur mesures répétées T(n) vs T1 : *p<0.05, ***p < 0.001.*
D'après Dominguez et al.,2019.

Nous avons ensuite examiné la contribution des DOR de CA2 dans une autre forme de mémoire hippocampo-dépendante, la mémoire spatiale. Dans un test de localisation objet, les deux groupes de souris AAV-GFP et AAV-Cre explorent préférentiellement l'objet déplacé (Figure 44 : souris AAV-GFP n=7 : Objet déplacé

48.2 ± 9.3 sec, objet fixe 36.6 ± 7.4 sec ; test-t : Objet déplacé *vs* objet fixe p=0.026 ; souris AAV-Cre n=8 : Objet déplacé 75.4 ± 11.3 sec, objet fixe 46.7 ± 8.8 sec ; test-t : Objet déplacé *vs* objet fixe p= 0.0063), révélant une mémoire spatiale intacte. Ceci indique que les DOR de l'aire CA2 ne seraient pas indispensables à la formation et au rappel d'une mémoire spatiale.

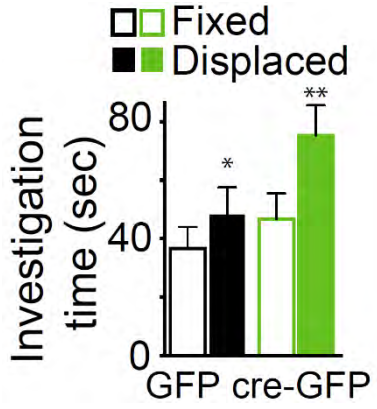


Figure 44 : *Les souris injectées avec AAV-GFP et AAV-cre-GFP affichent toutes les deux une préférence pour l'objet déplacé dans la tâche de localisation d'objet. Les barres d'erreur indiquent la SEM, test-t apparié: objet déplacé vs objet fixe: *p<0.05, **p < 0.01. D'après Dominguez et al.,2019.*

En conclusion, l'ensemble des données présentées dans cette partie indiquent que les récepteurs delta opioïde sont impliqués dans l'établissement de la mémoire sociale chez la souris adulte. Ainsi, l'incapacité des souris juvéniles à former une mémoire sociale semble associée à la présence réduite de PNN dans l'aire CA2 ainsi qu'à l'immaturité des DOR des interneurones PV, qui empêche l'induction d'une iLTD.

Les PNN sont composés de chondroïtine sulfate protéoglycan (CSPG) formant un maillage complexe autour des neurones PV ; cette structuration permet probablement la régulation de nombreuses molécules de signalisation extracellulaire ou transmembranaire capables de moduler la libération de neurotransmetteurs. Nous avons ici postulé que la Neuréguline-1 (NRG1) et son récepteur ErbB4 pourraient jouer un rôle actif dans la régulation de la transmission inhibitrice et de la plasticité dans l'aire CA2. En effet, l'activation d'ErbB4 par la NRG1 affecte la libération de GABA dans plusieurs structures (Woo et al., 2007 ; Chen et al., 2010 ; Wen et al., 2010 ; Ting et al., 2011). Si la signalisation ErbB4/NRG1 sous-tend la mise en place de la iLTD et/ou des PNN, alors ErbB4 doit être présent dans les cellules exprimant également les DOR, ce qui est le cas (Figure 45).

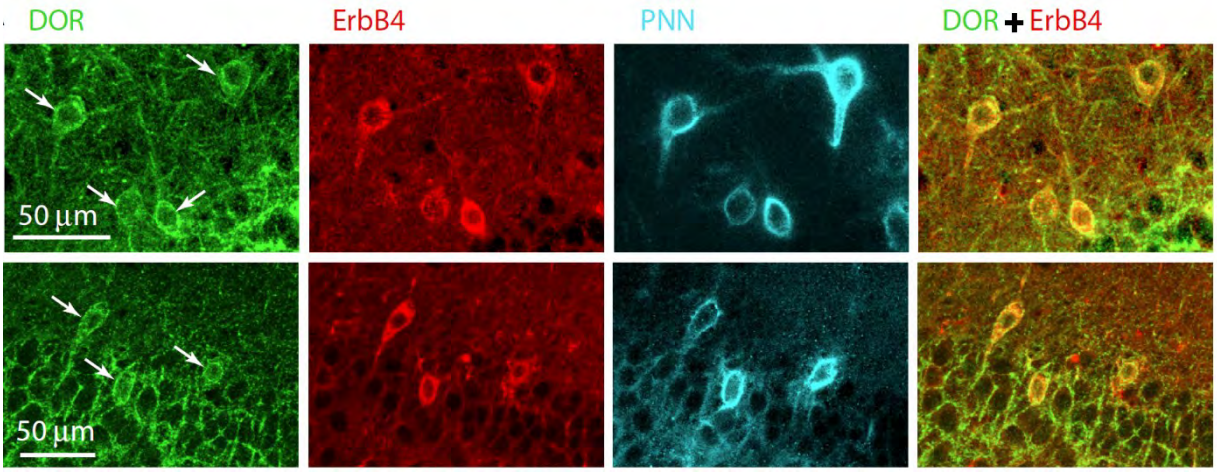


Figure 45 :
Marquages immunohistochimiques pour DOR (vert), ErbB4 (rouge) et PNN (bleu). À droite, on observe une colocalisation des DOR avec ErbB4 dans l'aire CA2 de souris DOR-GFP. Barre d'échelle : 50µm. D'après Dominguez et al.,2019.

Nos collaborateurs ont ensuite démontré que la libération de GABA dans l'aire CA2 est bien sous le contrôle de l'activation âge-dépendante d'ErbB4, et que la signalisation NRG1/ErbB4 est impliquée dans la formation de la iLTD dépendant des DOR (Figure 46).

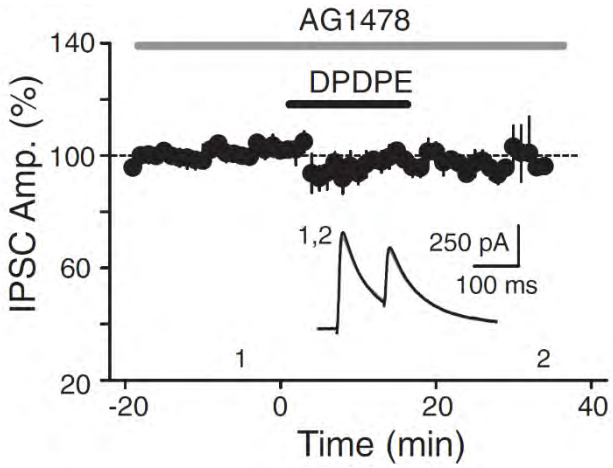


Figure 46 :
Évolution temporelle de l'effet de l'agoniste sélectif DOR (DPDPE,15 minutes, 5 µM) sur l'amplitude des IPSC en présence d'un antagoniste ErbB4 (AG1478) dans l'aire CA2 de souris adulte. L'application de DPDPE ne provoque pas de dépression en présence de AG1478 (ronds noirs, n = 7). D'après Dominguez et al.,2019.

D'autre part, il est montré que la régulation de la libération de GABA contrôlée par le système NRG1/ErbB4 et les DOR est dépendante de la présence des PNN (Figure 47). En effet, la dégradation des PNN sur des tranches d'hippocampes ne permet pas d'induire une iLTD après l'application de DPDPE, provoquant seulement une légère dépression des IPSC (Figure 47A : DPDPE avec ChABC n=5 : pourcentage de différence IPSC 87.1 ± 3.9%), contrairement aux tranches contrôles (Figure 47A : DPDPE avec Contrôle n=6 : pourcentage de différence IPSC 64.1 ± 3.4%, test-t

contrôle *vs* ChABC : p=0.003) démontrant que les PNN sont requis pour permettre l'action des DOR sur la libération du GABA. L'action de la NRG1 endogène par les ErbB4 sur la libération du GABA est aussi dépendante de la présence des PNN. L'incubation de la ChABC sur des tranches d'hippocampe ne permet que d'induire une faible dépression des IPSC en présence d'AG1478 (Figure 47A : DPDPE avec ChABC n=5 : pourcentage de différence IPSC 89.0 ± 2.7 %) comparé aux tranches contrôles (Figure 47B : AG1478 avec Contrôle n=5 : pourcentage de différence IPSC 64.9 ± 2.9%, test-t contrôle *vs* ChABC : p= 0.0003). Ainsi, la présence des PNN est nécessaire à la régulation de la libération de GABA, elle-même contrôlée par le système NRG1/ErbB4, et permettant la formation de la iLTD dépendant des DOR.

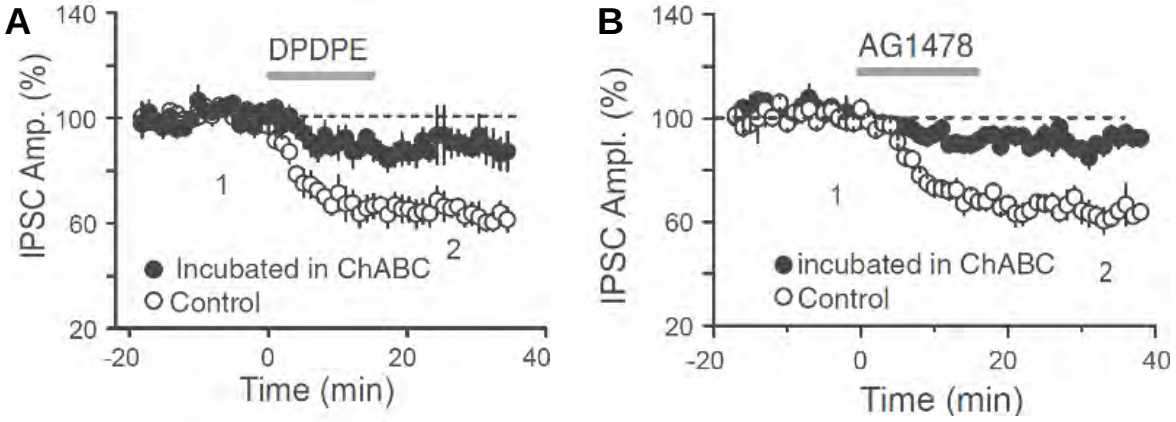


Figure 47 :
A : *L'application de DPDPE entraîne une dépression nettement plus faible des IPSC dans l'aire CA2 précédemment incubées dans la ChABC (ronds noirs, n = 5) par rapport aux tranches témoins (ronds blancs, n = 6).*
B : *Dans les tranches précédemment incubées dans la ChABC (ronds noirs, n = 5), le blocage de ErbB4 par AG1478 entraîne une dépression plus faible des IPSC par rapport aux tranches contrôles (ronds blancs, n = 5). D'après Dominguez et al.,2019.*

1.3. Conclusion

L'objectif de cette partie était d'identifier la contribution des PNN et des récepteurs delta opioïdes dans l'apparition des capacités de plasticité et de mémoire sociale propres à l'aire CA2.

Dans cette étude, nous avons montré que la présence des PNN est nécessaire à l'établissement de la plasticité dans l'aire CA2. Nous avons vu que l'aire CA2 contient une forte densité d'interneurones PV et que les neurones pyramidaux de CA2 reçoivent des afférences inhibitrices massives (Piskorowski et al., 2016 ; Ribak et al., 1993). Ces données anatomiques sont en accord avec le fait que l'induction d'une augmentation de l'amplitude des potentiels post-synaptiques dans l'aire CA2 n'est

possible qu'en présence d'un antagoniste des récepteurs $GABA_A$ et $GABA_B$, ce qui corrobore l'existence d'un puissant tonus inhibiteur dans l'aire CA2 (Nasrallah et al., 2019). L'induction d'une dépression à long terme des interneurones PV permet de lever l'inhibition qu'ils imposent aux neurones pyramidaux de l'aire CA2. Cette levée d'inhibition rend alors possible l'activation des neurones pyramidaux et l'établissement de plasticité dans CA2 (Piskorowski et Chevaleyre, 2013).

Dans l'aire CA2, la dégradation des PNN altère la stabilisation des projections excitatrices sur les somas des interneurones PV et réduit leur degré de maturation, modifiant ainsi l'intégrité des interneurones PV (Donato et al., 2013 ; Hayani et al., 2018). La disparition des PNN altère la capacité de libération du GABA, de façon semblable à l'iLTD. Cependant, chez les souris juvéniles, nous observons une impossibilité à induire une iLTD et une absence de PNN, associées à une incapacité à former une mémoire sociale. La dégradation des PNN et la suppression des DOR dans l'aire CA2 des souris adultes provoquent donc une altération de la mémoire sociale. Un niveau de PNN important et des DOR fonctionnels sont indispensables pour l'établissement des fonctions cognitives sous-tendues par l'aire CA2 chez l'adulte. Ainsi, même si la dégradation des PNN préserve la capacité d'induire une LTP dans l'aire CA2 (Carstens et al., 2016), elle ne permet pas l'intégration et le codage des informations sociales (Dominguez et al., 2019).

Ces travaux montrent que la dépression à long-terme des neurones PV de CA2 induite par les DOR n'apparaît qu'à la fin de l'adolescence (Dominguez et al., 2019). L'émergence de la iLTD au cours du développement post-natal coïncide avec la forte augmentation de l'intensité du marquage PNN et la mise en place d'une signalisation par la NRG1 et son récepteur ErbB4 contrôlant la libération de GABA. Ainsi, l'intégrité des PNN et la signalisation NRG1/ErbB4 sont requises pour l'induction de iLTD dans l'aire CA2, elle-même cruciale pour la formation de mémoires sociales. Il reste encore à élucider en détail les mécanismes permettant l'émergence des capacités de mémoire sociale après l'adolescence. Notamment pour comprendre comment la plasticité de l'aire CA2 sous-tend la mise en place de cette mémoire, et comment cette plasticité est régulée par l'expérience.

2. Dysfonctionnements des interneurones à parvalbumine dans l'aire CA2 et les troubles de la mémoire sociale chez les souris modèles de la maladie d'Alzheimer.

De nombreuses études ont démontré le rôle crucial de l'aire CA2 dans la mémoire sociale (Robert et al., 2018). En accord avec ces données, nous avons montré que la présence des PNN et l'intégrité des interneurones PV sont nécessaires à la formation de la mémoire sociale chez la souris (Dominguez et al., 2019). Si en condition physiologique, l'aire CA2 possède une forte densité d'interneurones PV (Botcher et al., 2014), des altérations sont observées dans la région CA2 en conditions pathologiques. En effet, nous avons observé une diminution du nombre d'interneurones PV et de leurs PNN, notamment dans l'aire CA2 chez des souris modèles de la maladie d'Alzheimer (souris Tg2576) (Cattaud et al., 2018). De façon intéressante, il a été rapporté que les patients atteints de la MA présentent des troubles de mémoire sociale et de reconnaissance sociale (Small et al., 1997 ; Hodges et al., 1993). Sur la base de ces éléments, nous avons émis l'hypothèse que la perte des neurones PV dans l'aire CA2 des souris Tg2576 entrainerait une perturbation de la plasticité et par conséquent, des troubles de la mémoire sociale.

Afin de tester cette hypothèse de travail, nous avons confronté, à différents stades de la pathologie, l'état des interneurones PV et de leur PNN (Cattaud et al., 2018) avec les performances de reconnaissance sociale et de mémoire sociale des souris Tg2576. Ensuite, nous avons caractérisé les perturbations anatomiques et fonctionnelles des souris Tg2576 de 9 mois, cet âge correspond à un stade transitoire chez ce modèle. En effet, les souris Tg2576 de 9 mois n'ont pas encore de plaques amyloïdes. Nous nous sommes ensuite intéressés aux conséquences comportementales liées à la réduction du contrôle inhibiteur de l'aire CA2 des souris Tg2576. Enfin, nous avons examiné si la restauration de l'intégrité des interneurones PV et de leur PNN dans l'aire CA2 avait des conséquences bénéfiques sur la mémoire sociale des souris Tg2576.

2.1. Évolution du réseau PV/PNN de l'aire CA2 et des capacités de mémoire sociale en fonction du décours de la pathologie des souris Tg2576.

Dans cette partie, nous avons déterminé si l'apparition des dysfonctionnements des interneurones PV et de leurs PNN dans l'aire CA2 était associée aux altérations des

comportements sociaux chez les souris Tg2576 à différents stades de la pathologie. Nous avons caractérisé l'état des interneurones PV et de leur PNN dans toutes les cornes d'Ammon de l'hippocampe (CA1, CA2 et CA3) chez des souris Tg2576 à différents stades de la pathologie. Ce travail fait l'objet d'une publication parue dans la revue *Neurobiology of Aging* en Septembre 2018, et pour laquelle je suis 3e auteur (Cattaud et al., 2018). La partie suivante présente des données publiées de cet article (Cattaud et al., 2018) et des résultats obtenus au cours de ma thèse.

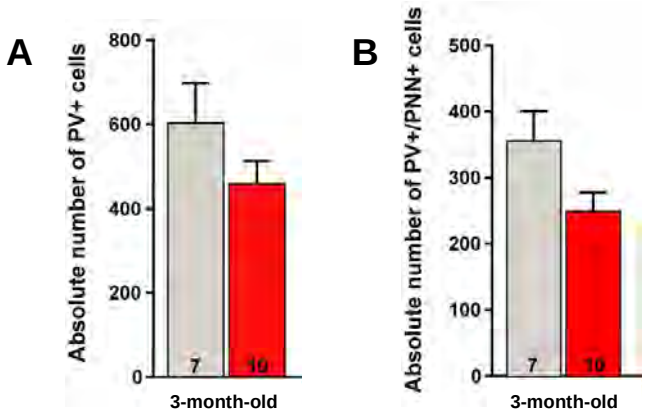


Figure 48 :
A : *Nombre de neurones à parvalbumine (PV+) dans l'aire CA2 de souris NTg et Tg2576 âgées de 3 mois.*
B : *Nombre d'interneurones PV entourés de PNN dans l'aire CA2 des souris NTg et Tg2576 âgées de 3 mois.*
Les bâtons représentent la moyenne et les barres d'erreur la SEM. D'après Cattaud et al., 2018.

Nous avons montré que dès 3 mois, âge qui correspond à un stade prodromal de la maladie, les souris Tg2576 présentent une diminution non significative du nombre d'interneurones PV dans l'aire CA2 (Figure 48A: Souris NTg n=7 : 602,1 ± 94,49, souris Tg2576 n=10 : 457,2 ± 53,88, test-t nombre de cellules PV+ NTg *vs* Tg2576 p= 0,1708) et du nombre de neurones PV exprimant les PNN (Figure 48B: Souris NTg n=7 : 359,4 ± 45,84, souris Tg2576 n=10 : 252,1 ± 29,18, test-t nombre de cellules PV+ NTg *vs* Tg2576 p=0.0563) par rapport aux souris sauvages du même âge. Cette tendance à la diminution est associée à une forte perturbation de l'expression des PNN dans l'aire CA2 (non montré ici) (Cattaud et al., 2018). À ce stade de la pathologie, les enregistrements EEG révèlent déjà la présence de pointes onde-ondes spontanées chez les souris Tg2576, traduisant une activité épileptique précoce (Bezzina et al., 2015). Nos données suggèrent donc que cette hyperexcitabilité hippocampique serait associée à une réduction de l'inhibition provoquée par la perte des interneurones PV et de leur PNN, ainsi qu'à la diminution substantielle des PNN dans CA2. Il est

probable que la perte des neurones PV hippocampiques favorise l'apparition de troubles cognitifs tels que les déficits de mémoire spatiale et contextuelle qui ont été décrits chez les souris Tg2576 de 3-4 mois (Holcomb et al., 1998 ; Jacobsen et al., 2006 ; Duffy et al., 2015).

Nous avons testé la mémoire sociale des souris Tg2576 âgées de 3 mois dans le paradigme à 5-essais (Figure 49A). Au cours des essais, les souris NTg montrent une habituation rapide à la souris présentée (Figure 49B : ANOVA à un facteur : souris NTg n=6 : T2 67,90 ± 10,17 *vs* T1 p=0.0045, T3 : 46,10 ± 7,41 *vs* T1 p=0.0006, T4 : 29,00 ± 9,70 *vs* T1 p<0.0001, T5 : 87,45 ± 5,38 *vs* T1 p=0.5305). En effet, aucune différence significative n'est observée chez les souris Tg2576, lorsqu'on compare le 1er essai aux suivants (Figure 49B : ANOVA à un facteur: souris Tg2576 n=6 : T2, 103.6 ± 18.40 *vs* T1 p=0.996, T3 : 72.09 ± 18.55 *vs* T1 p=0.382, T4 : 44.49 ± 13.66 *vs* T1 p=0.1317, T5 : 106.5 ± 15.76 *vs* T1 p=0.9959). Ainsi, à 3 mois, les souris Tg2576 sont plus lentes que les souris NTg à former une mémoire sociale.

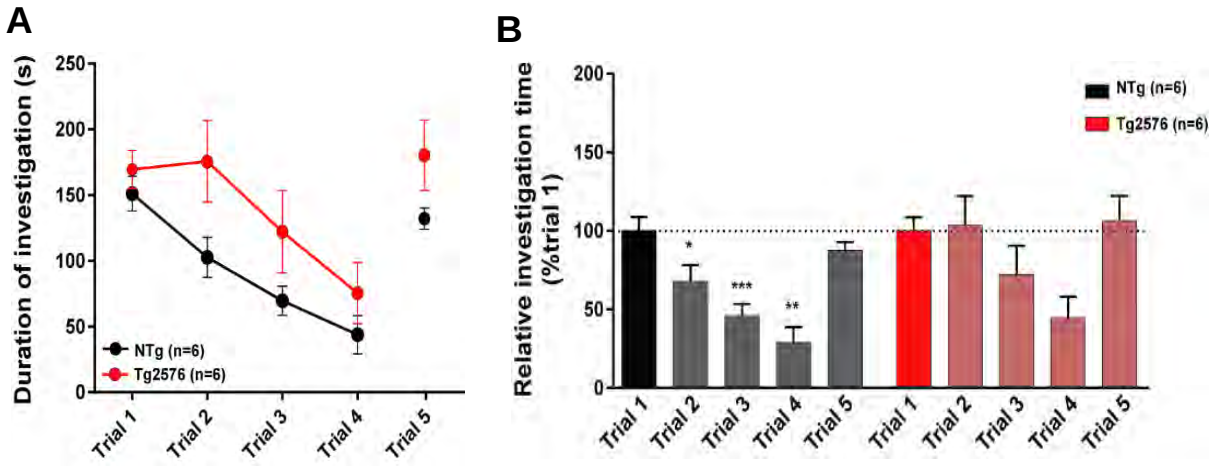


Figure 49 :
A: *L'exploration de la souris nouvelle diminue au cours des essais pour les souris NTg et Tg2576. Cependant, le temps d'interaction ne diminue pas à l'essai 2 comparé à l'essai 1 chez les souris Tg2576 âgées de 3 mois (n = 6).*
B : *Le temps d'interaction normalisé diminue significativement chez les souris NTg au fur-et-à mesure, mais pas chez les souris Tg2576 âgées de 3 mois. Les diagrammes représentent la moyenne et les barres d'erreur, la SEM. *p < 0.05, **p < 0.01 et ***p < 0.001 pour l'ANOVA à un facteur mesures répétees Trial(n) vs Trial 1.*

De façon intéressante, notons que les souris DOR-Flox (sans DOR dans l'aire CA2), présentent dans ce test, un comportement similaire à celui des souris Tg2576 (Figure 43B). Nous avons émis l'hypothèse que ce ralentissement de l'apprentissage social serait associé à l'altération des interneurones PV (Dominguez et al., 2019). Il est donc

envisageable que le système des DOR sur les interneurones PV soit altéré chez les souris Tg2576 de 3 mois.

À 6 mois, les souris Tg2576 miment un stade plus avancé de la pathologie. Elles possèdent notamment une concentration importante d'Aβ soluble (Lesne et al., 2006) et un début d'oligomérisation de Aβ dans le cerveau (Kawarabayashi et al., 2001) comparable au stade MCI (Mild Cognitive Impairment ou Trouble Cognitif Léger) des patients. Au niveau anatomique, nous observons une forte diminution du nombre de leurs interneurones PV (Figure 50A: Souris NTg n=10 : 650.1 ± 32.89, souris Tg2576 n=6 : 445.7 ± 73.28, test-t NTg *vs* Tg2576 : p=0.0113) et de leur PNN (Figure 50B: Souris NTg n=10 : 422.1 ± 21.02, souris Tg2576 n=6 : 245.4 ± 41.81, test-t NTg *vs* Tg2576 : p=0.0009) dans l'aire CA2 des souris Tg2576 de 6 mois. Ceci est en accord avec les résultats observés précédemment et dans les autres régions hippocampiques (Cattaud et al., 2018).

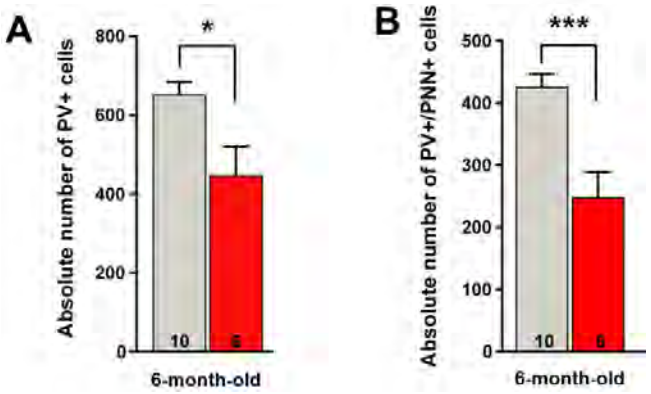


Figure 50 *:*
A : *Nombres absolus de cellules PV+ dans l'aire CA2. On note une réduction du nombre de cellules PV+ chez les souris Tg2576 (n=10) par rapport aux souris NTg (n=6). *p < 0,05 pour le test t non apparié entre génotypes.*
B : *La quantification stéréologique indique une diminution du nombre absolu de cellules PV+/PNN+ dans l'aire CA2 des souris Tg2576 (n=10) comparé aux souris NTg (n=6). ***p < 0.001 pour le test t non apparié entre les deux génotypes.*
Les bâtons représentent la moyenne et les barres d'erreur la SEM. D'après Cattaud et al., 2018.

D'après notre hypothèse de travail, cette robuste diminution des neurones PV/PNN devraient être associée à des troubles de reconnaissance sociale chez les souris Tg2576 de 6 mois. Nous avons donc testé ces animaux et nos données montrent que les souris Tg2576 ont une sociabilité comparable à celle des souris NTg (Figure 51A : souris NTg n=7 : souris familière 82.22 ± 12.03 sec, cage vide 19.74 ± 6.83 sec ; test-t : cage vide *vs* familière p=0.0091 ; souris Tg2576 n=10 : souris familière 87.70 ± 5.30 sec, cage vide 14.40 ± 3.58 sec ; test-t : cage vide *vs* familière p<0.0001). Cependant,

et contrairement aux souris NTg, les souris Tg2576 n'expriment pas de préférence pour le nouveau congénère (Figure 51B : souris NTg n=7 : souris familière 21.93 ± 5.45 sec, souris nouvelle 66.90 ± 8.15 sec ; test-t : nouvelle *vs* familière p=0.0022 ; souris Tg2576 n=10 : souris familière 31.96 ± 4.91 sec, nouvelle 42.78 ± 7.88 sec ; test-t : nouvelle *vs* familière p=0.1541). Ceci révèle que les souris modèles de la MA présentent un déficit de leur capacité à discriminer une souris familière d'une souris nouvelle. Par manque de temps, nous n'avons pas mesuré la mémoire sociale des souris Tg2576 dans le test à 5 essais, mais nous faisons l'hypothèse que les souris Tg2576 de 6 mois devraient présenter un ralentissement de l'apprentissage comparable aux souris Tg2576 de 3 mois, voire une aggravation des troubles de mémoire sociale en lien avec la forte altération de leurs interneurones PV.

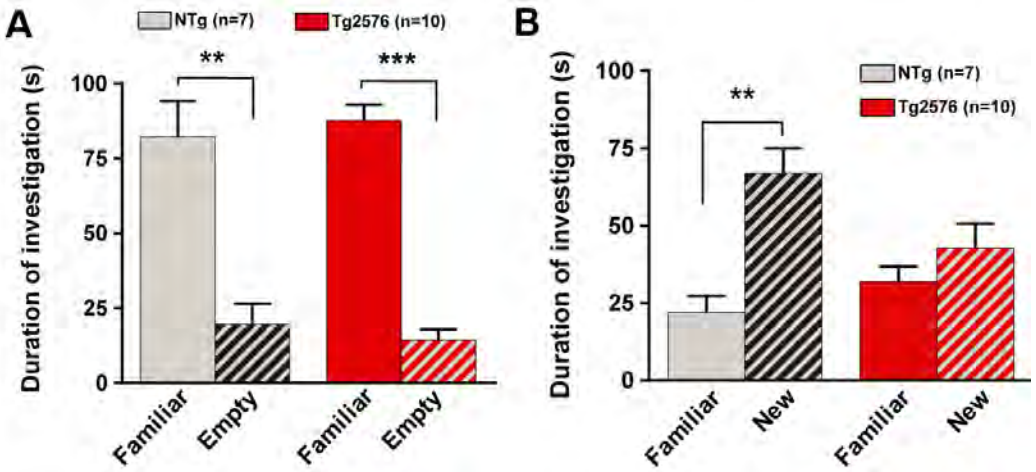


Figure 51 :
A : *Les souris NTg (n=7) et Tg2576 (n=10) âgées de 6 mois montrent une préférence pour la souris familière. **p <0.05 et ***p < 0.001 pour le test t apparié entre les deux cages.*
B *: Les souris NTg présentent une préférence pour la souris nouvelle, en revanche aucune préférence n'est trouvée chez les souris Tg2576 démontrant chez ces souris un trouble de reconnaissance sociale dès 6 mois. **p < 0.01 pour le test t apparié entre les deux cages. Les bâtons représentent la moyenne et les barres d'erreur la SEM.*

À 13 mois, les souris Tg2576 présentent des taux élevés d'Aβ solubles et oligomérisés, et de nombreuses plaques amyloïdes (Kawarabayashi et al., 2001). Elles miment donc un stade sévère de la MA. Chez les souris NTg et Tg2576 âgées de 13 mois, nous avons observé un nombre semblable d'interneurones PV (Figure 52A: Souris NTg n=9 : 364.5 ± 57.02, souris Tg2576 n=10 : 391.2 ± 71.61, test-t :NTg *vs* Tg2576 : p=0.7134) et de PV associés à leur PNN (Figure 52B: Souris NTg n=9 : 235.7 ± 39.93, souris Tg2576 n=10 : 227.4 ± 32.55, test-t :NTg *vs* Tg2576 : p=0.8720).

Ces résultats sont en accord avec des travaux précédents qui rapportent que les souris Tg2576 et NTg âgées de 14-18 mois présentent le même nombre de PNN hippocampiques (Morawski et al., 2010). Ces résultats suggèrent que l'expression de la parvalbumine dans les somas des interneurones PV et la présence de leur PNN diminuent avec l'âge, chez les souris contrôles et transgéniques. En revanche cette diminution n'est pas associée à une réduction de PNN dans l'aire CA2 chez les souris NTg âgées de 13 mois, contrairement aux souris Tg2576. Nous n'avons pas évalué la mémoire sociale chez les souris Tg2576 et NTg âgées de 13 mois.

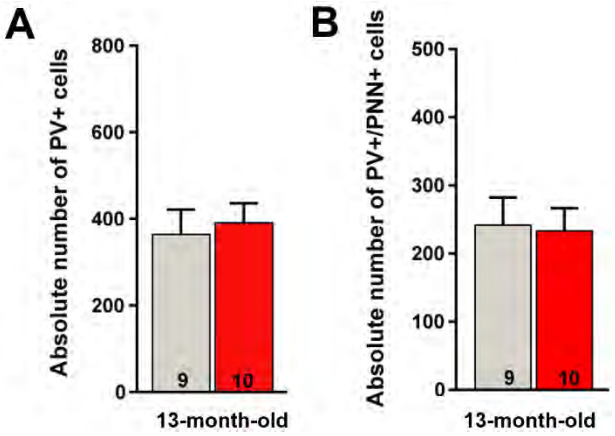


Figure 52 :
A : *Nombres absolus de cellules PV+ dans l'aire CA2. On note une réduction du nombre de cellules PV+ chez les souris Tg2576 (n=10) par rapport aux souris NTg (n=6).*
B : *La quantification stéréologique indique que le nombre absolu de cellules PV+/PNN+ dans l'aire CA2 des souris Tg2576 (n=10) est diminué par rapport à celui des souris NTg (n=6). Les bâtons représentent la moyenne et les barres d'erreur la SEM.*
D'après Cattaud et al., 2018.

En conclusion, l'apparition des déficits de mémoire sociale au cours de la pathologie semble être associée à la perturbation des interneurones PV et des PNN dans l'aire CA2 des souris modèles de la MA.

2.2. Modification de la transmission inhibitrice et la plasticité PV-dépendante dans l'aire CA2 des souris Tg2576.

Pour cette étude, nous avons utilisé des souris Tg2576 âgées de 9 mois correspondant au stade modéré de la MA (entre MCI (6 mois) et sévère (13 mois)). À 9 mois, les souris présentent des taux élevés d'Aβ solubles et oligomérisés mais peu voire pas de plaques amyloïdes, comme dans le stade modéré de la pathologie chez les patients.
Dans un premier temps nous avons réalisé une quantification stéréologique, similaire à celle utilisée pour obtenir les résultats du paragraphe précédent, afin d'évaluer le nombre de neurones PV+ dans l'aire CA2 des souris Tg2576 âgées de 9 mois. Cette quantification met en évidence une diminution du nombre de neurones PV+ dans l'aire CA2 des souris Tg2576 par rapport aux souris contrôles (Figure 53B ; Souris NTg n=7 : 558.6 ± 31.12, souris Tg2576 n=7 : 387.1 ± 52.90, test-t : NTg *vs* Tg2576 : p=0.0163). Cette quantification par couche de l'aire CA2 révèle que cette diminution est

notamment observable dans les *stratums oriens* et *pyramidale* (SO et SP), suggérant une perturbation de la transmission inhibitrice localement dans CA2 (Figure 53C: test-t : SO NTg 121.4 ± 13.70 *vs* Tg2576 67.14 ± 13.22: p=0.0146 ; SP NTg 388.6 ± 31.43 *vs* Tg2576 278.6 ± 40.62: p=0.0534 ; SR NTg 48.57 ± 5.94 *vs* Tg2576 41.43 ± 11.43: p=0.5895 ; n=7 souris pour chaque génotype). Sachant que la fonction et l'intégration des interneurones PV dans le circuit hippocampique dépendent de leur localisation au sein de l'aire CA2 et que les neurones PV du SP de l'aire CA2 projettent localement, alors que ceux localisés dans le SO projettent plutôt sur les autres aires hippocampiques (Mercer et al., 2012), ceci suggère que la transmission inhibitrice serait aussi perturbée plus largement dans l'hippocampe

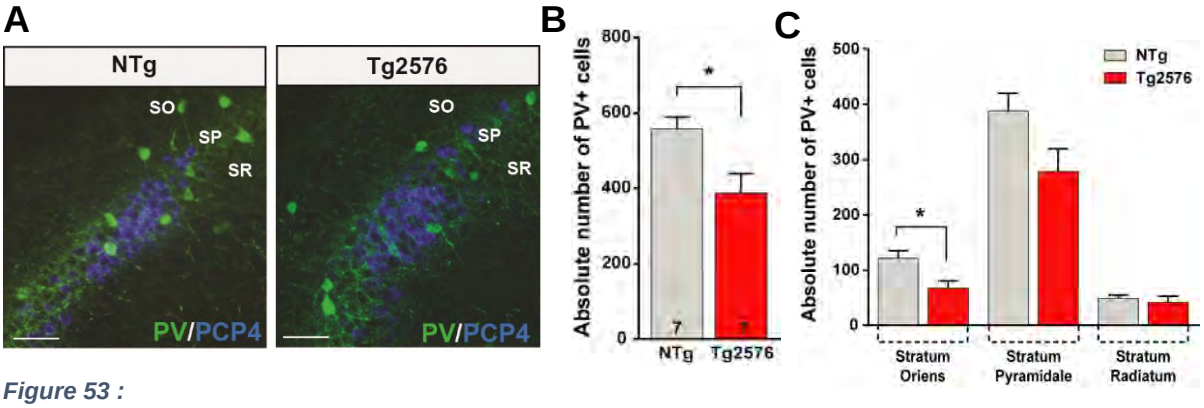


Figure 53 :
A : *Immunomarquages PV (vert) et PCP4 (bleu) montrant l'aire CA2 de l'hippocampe dorsal de souris NTg et Tg2576 âgées de 9 mois. Barres d'échelle = 50 µm. (Stratum oriens : SO ; Stratum pyramidale : SP ; stratum radiatum : SR).*
B : *Nombres absolus de cellules PV+ dans l'aire CA2. On note une réduction du nombre de cellules PV+ chez les souris Tg2576 (n=7) par rapport aux souris NTg (n=7). *p < 0,05 pour le test t non apparié entre génotypes.*
C : *La quantification du nombre absolu de cellules PV+ dans les différentes couches de l'aire CA2 indique que cette diminution est principalement observée dans la SO avec une forte tendance dans la SP. *p < 0,05 pour le test t non apparié entre les génotypes pour chaque couche. Les bâtons représentent la moyenne et les barres d'erreur la SEM.*

Par ailleurs, nous avons noté que cette diminution du nombre d'interneurones PV est associée à une moindre présence des PNN autour des interneurones dans l'aire CA2 des souris Tg2576 (Figure 54B : Souris NTg n=7 : 478.6 ± 25.02, souris Tg2576 n=7 : 282.9 ± 40.16, test-t : NTg *vs* Tg2576 : p=0.0014). Cette réduction du nombre de cellules PV+/PNN+ est notamment observable dans les SO et SP (Figure 54C: test-t : SO NTg 97.14 ± 16.72 *vs* Tg2576 30.00 ± 5.77: p=0.0026 ; SP NTg 348.6 ± 30.35 *vs* Tg2576 230.0 ± 34.71: p=0.0245 ; SR NTg 32.96 ± 5.21 *vs* Tg2576 22.86 ± 9.18: p=0.3624 ; n=7 souris pour chaque génotype). Au niveau fonctionnel, cette diminution du nombre d'interneurones PV+/PNN+ dans le *stratum pyramidale* suggère une

réduction de la transmission inhibitrice dans l'aire CA2. La perte des interneurones PV dans le *stratum oriens* de l'aire CA2 suggère une diminution de la régulation de l'inhibition dans les aires CA1 et CA3.

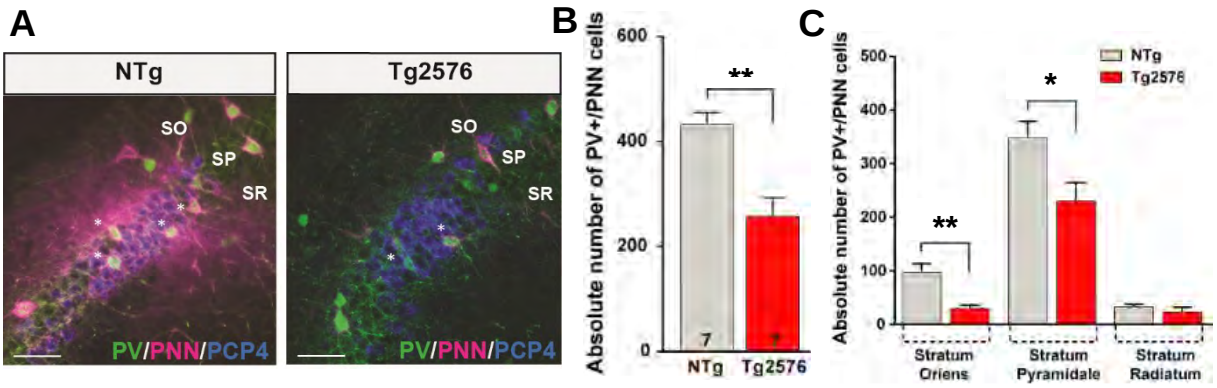


Figure 54 :
A : *Immunomarquages PV (vert), PNN (rose) et PCP4 (bleu) montrant l'aire CA2 de l'hippocampe dorsal de souris NTg et Tg2576 âgées de 9 mois. Barres d'échelle = 50 µm. (Stratum oriens : SO ; Stratum pyramidale : SP ; stratum radiatum : SR).*
B : *Nombres absolus de cellules PV+/PNN+ dans l'aire CA2. On note une réduction du nombre de cellules PV+ entourées de PNN chez les souris Tg2576 (n=7) par rapport aux souris NTg (n=7). **p < 0,01 pour le test t non apparié entre génotypes.*
C : *La réduction du nombre absolu de cellules PV+/PNN+ chez les souris Tg2576 est plus prononcée dans le SO et SP de l'aire CA2. *p < 0,05 et **p < 0.01 pour le test t non apparié entre les génotypes pour chaque stratum. Les bâtons représentent la moyenne et les barres d'erreur la SEM.*

Nous avons précédemment montré que l'intensité du marquage WFA dans la couche pyramidale de CA2 reflète le niveau de plasticité de cette aire, notamment sa capacité à induire une iLTD (Dominguez et al., 2019) (Cf : Résultats 1.1). Nous avons logiquement cherché à déterminer si la disparition des PNN autour des somas des interneurones PV+ est associée à une modification de l'expression des PNN diffus dans la couche pyramidale du CA2 des souris Tg2576. Pour cela, l'intensité du marquage WFA est mesurée dans les différentes couches de l'aire CA2 (Cf : Méthodes IV-c). Cette analyse indique que la présence de PNN est fortement diminuée dans l'aire CA2 des souris Tg2576 comparées aux souris NTg, et ce dans toutes les couches (Figure 55C: test-t : SO NTg 16.69 ± 1.439 *vs* Tg2576 6.66 ± 0.94: p<0.0001 ; SP NTg 27.51 ± 3.24 *vs* Tg2576 9.33 ± 1.31: p<0.0001 ; SR NTg 8.84 ± 0.491 *vs* Tg2576 4.29 ± 0.785: p<0.0001 ; n=7 souris pour chaque génotype).

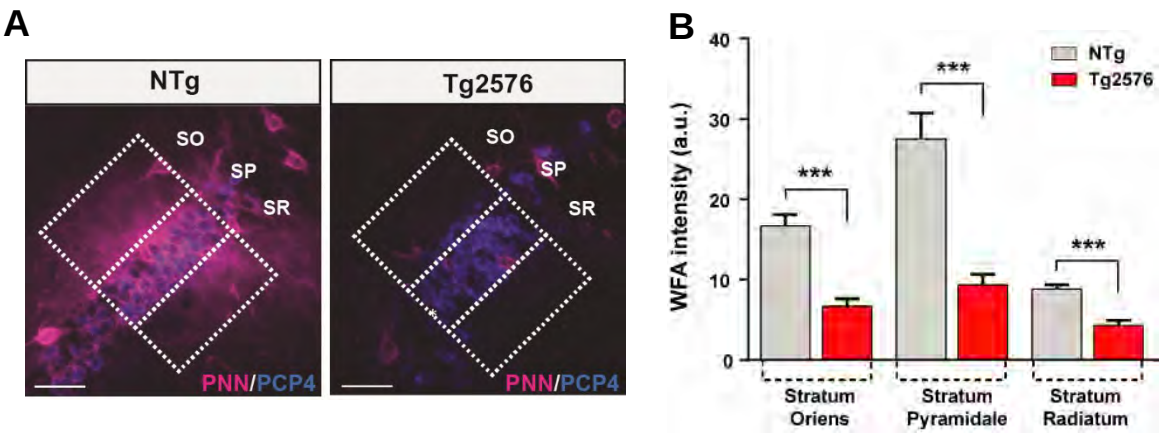


Figure 55 :
A : *Marquages WFA (PNN, magenta) et PCP4 (bleu) dans l'aire CA2 de souris NTg et Tg2576 de 9 mois. Barres d'échelle = 50 µm. (Stratum oriens : SO ; Stratum pyramidale : SP ; stratum radiatum : SR).*
B *: La mesure de l'intensité de WFA dans les différentes couches de la zone CA2 montre que la coloration WFA est réduite dans toutes les couches chez les souris Tg2576 (n=7) comparativement aux souris NTg (n=7). ***p < 0,001 pour le test t non apparié entre les génotypes pour chaque couche. Les bâtons représentent la moyenne et les barres d'erreur la SEM.*

Sachant que la mesure de la fluorescence du marquage PV fournit une estimation indirecte de l'activité et de l'intégrité des neurones PV (Donato et al., 2013 ; Favuzzi et al., 2017), nous avons ensuite mesuré l'intensité de fluorescence du signal parvalbumine révélé par immunohistochimie dans le soma des interneurones de la couche pyramidale des souris Tg2576 (Cf : Méthodes IV-c).

Nos données montent qu'une forte diminution de l'expression de parvalbumine dans les neurones PV+ de l'aire CA2 des souris Tg2576 par rapport à ce qui est observé chez les souris NTg (Figure 56 : Test Mann-Whitney : souris NTg 3.05 *vs* Souris Tg2576 2.68 : p<0.0001).

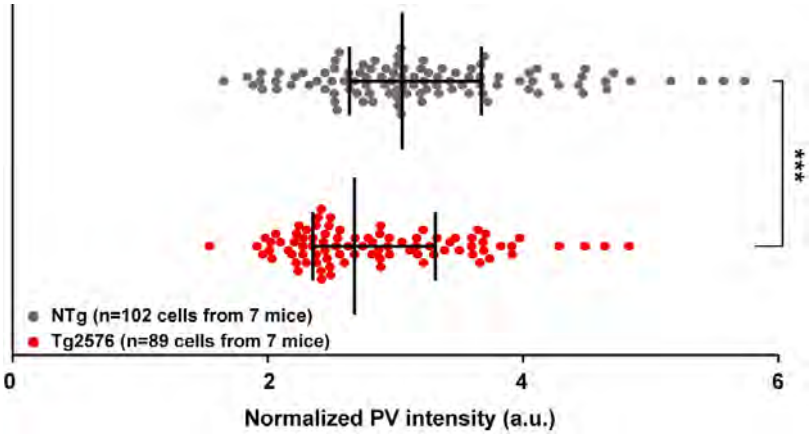


Figure 56 :
*Intensité de l'immunomarquage PV normalisée (a.u.) dans le soma des cellules PV+ du SP de l'aire CA2. Les neurones PV+ des souris Tg2576 (n= 7 souris / 6 à 15 cellules par souris) ont une intensité de fluorescence réduite par rapport à ceux des souris NTg (n= 7 souris / 13 à 15 cellules par souris). Les barres représentent la médiane et l'écart interquartile, et chaque point représente la fluoresence d'un neurone PV+. ***p < 0,001 entre les génotypes avec le test de Mann-Whitney.*

Ainsi, non seulement les souris Tg2576 possèdent moins d'interneurones PV+ dans l'aire CA2, mais ceux-ci ont un contenu en parvalbumine qui est plus faible que celui des neurones PV+ des souris NTg. Ceci est en accord avec les résultats précédents, indiquant une diminution de la présence de PNN dans l'aire CA2 ; en effet, l'absence de PNN autour des neurones PV est associée à une diminution de leur excitabilité, entraînant une activité neuronale plus faible et une teneur réduite en protéine PV (Yamada et al., 2015 ; Favuzzi et al., 2017). L'ensemble de ces observations suggèrent donc que les neurones PV des souris Tg2576 sont hypoactifs par rapport à ceux des animaux contrôles.

Pour déterminer si ces altérations anatomiques sont effectivement associées à des perturbations fonctionnelles de l'aire CA2 des souris Tg2576, nos collaborateurs ont mesuré la transmission inhibitrice sur tranches d'hippocampe (Figure 57). Les enregistrements de cellule entière en imposant des stimulations d'intensités croissantes montrent une augmentation de l'amplitude des potentiels post-synaptiques (PSP) chez les souris Tg2576, principalement due à la diminution de l'amplitude de l'hyperpolarisation sur la séquence EPSP/IPSP (Figure 57A). Ceci met en évidence une réduction de la régulation inhibitrice dans l'aire CA2 des souris Tg2576 par rapport à ce qui est observé chez les souris NTg.

De plus, les enregistrements extracellulaires dans la couche pyramidale de CA2 révèlent l'apparition de bouffées d'activité chez les souris Tg2576 (Figure 57B). Ceci indique que la couche pyramidale de l'aire CA2 est plus excitable chez les souris modèles de la MA par rapport aux souris NTg. En conditions basales, le rapport des pulsations par paires (paired pulse ratio : PPR) de la transmission inhibitrice est accru chez les souris Tg2576, ce qui reflète une réduction de la libération du GABA dans l'aire CA2 des souris Tg2576 par rapport aux souris NTg (Figure 57C).

En résumé, les souris Tg2576 montrent une réduction de la transmission inhibitrice dans l'aire CA2, provoquée par la diminution de la libération de GABA par les interneurones. Par conséquent, le contrôle inhibiteur exercé sur les neurones pyramidaux est réduit, provoquant une hyperexcitabilité de l'aire CA2 des souris Tg2576.

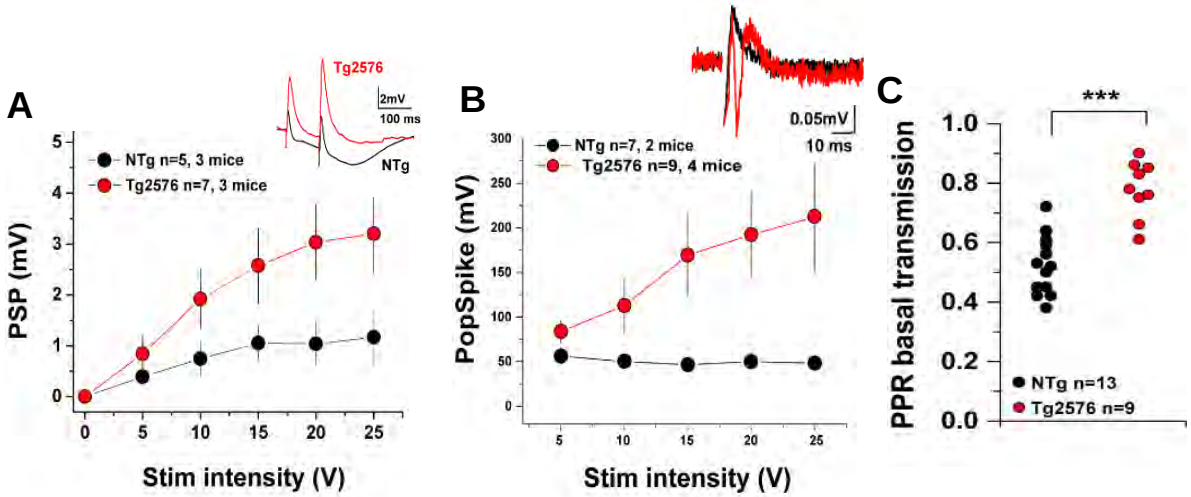


Figure 57 :
A : *Les enregistrements de cellules entières indiquent que la composante inhibitrice de la séquence EPSP/IPSP est réduite dans les neurones pyramidaux de l'aire CA2 des souris Tg2576 (trace rouge) comparativement à ceux des souris NTg (trace noire), ce qui entraîne une amplitude accrue des potentiels post synaptiques globaux (PSP) lorsque les stimulations augmentent.*
B : *L'amplitude de la décharge de la population neuronale de la couche pyramidale de l'aire CA2 indique qu'elle est plus excitable chez les souris Tg2576 (n = 9 enregistrements de 4 souris) que chez les souris NTg (n = 7 enregistrements de 2 souris).*
C : *L'augmentation du paired pulse ratio (PPR) indique que la transmission inhibitrice basale est diminuée dans l'aire CA2 des souris Tg2576 (n = 9) par rapport aux souris NTg (n = 13). ***p < 0.001. test-t*

Nos collaborateurs ont ensuite déterminé si cette réduction de la transmission inhibitrice était associée à une modification de la plasticité synaptique dans l'aire CA2 des souris Tg2576. La stimulation à haute fréquence des CS (HFS, 100 impulsions à 100 Hz répétées deux fois) permet de déclencher une iLTD chez les souris NTg. En revanche, ils ont observé que cette HFS induit une iLTD réduite chez les souris Tg2576, révélant ainsi une perturbation de la plasticité dépendante des interneurones PV chez ces animaux (Figure 58A). Enfin, l'enregistrement des potentiels post-synaptiques excitateurs (EPSP) dans l'aire CA2 révèle une augmentation de l'excitabilité des neurones pyramidaux des souris NTg après HFS (Figure 58B). En conditions pathologiques, la HFS déclenche une potentialisation de l'excitation moins prononcée par rapport à la ligne de base, suggérant que la plasticité à long terme est altérée chez les souris Tg2576 modèles de la MA (Figure 58B).

En conclusion, chez les souris Tg2576, la disparition des interneurones PV et de leur PNN, ainsi que la faible expression somatique en parvalbumine des interneurones PV, sont bien associées à des altérations fonctionnelles de l'aire CA2. En effet, on observe une diminution de la libération de GABA, traduisant une réduction du contrôle inhibiteur de la part des interneurones sur les neurones pyramidaux de l'aire CA2. Ces

modifications fonctionnelles entrainent une hyperexcitabilité des neurones pyramidaux en dehors de toute stimulation, ce qui perturbe la plasticité de l'aire CA2.

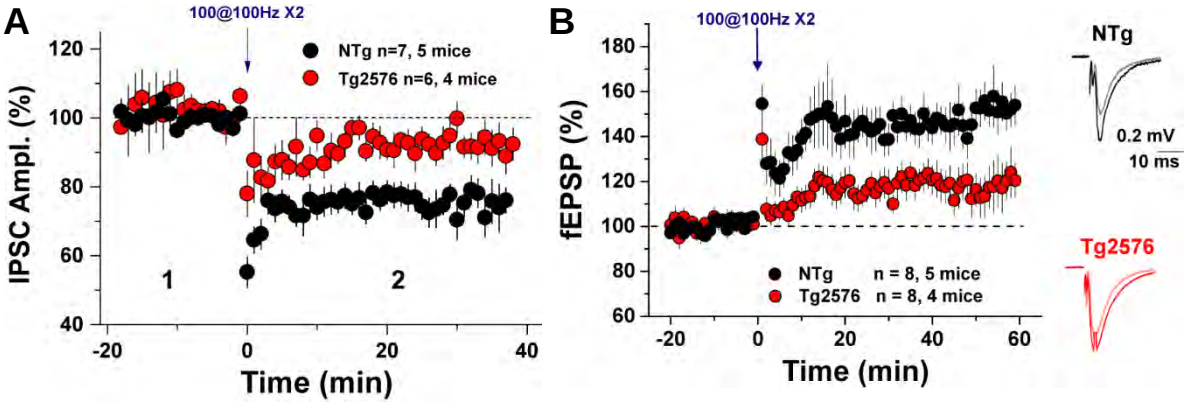


Figure 58 :
A : *L'amplitude des IPSC dans les neurones pyramidaux de l'aire CA2 avant (1) et après (2) les stimulations à haute fréquence (HFS, 100 impulsions à 100 Hz répétées deux fois) montrent que l'iLTD peut être déclenchée chez des souris NTg (n=7 enregistrements sur 5 souris) mais que cette dépression est transitoire chez les souris Tg2576 (n = 6 enregistrements sur 4 souris).*
B : *Les courants excitateurs post synaptiques enregistrés dans les neurones pyramidaux de l'aire CA2 révèle qu'une LTP peut être induite chez les souris NTg après une HFS. Chez les souris Tg2576, cette LTP est moins prononcée. NTg : n = 8 enregistrements chez 5 souris, Tg2576 : n = 8 enregistrements chez 4 souris.*

2.3. Capacité de reconnaissance et de mémoire sociale des souris Tg2576

Nos résultats anatomiques et électrophysiologiques indiquent que les souris modèles de la MA présentent une altération de la transmission inhibitrice issue des neurones PV sur les neurones pyramidaux de l'aire CA2, résultant en une incapacité à induire la iLTD. La iLTD semblant directement impliquée dans la capacité à former une mémoire sociale (Leroy et al., 2017 ; Dominguez et al., 2019), nous avons évalué les capacités de mémoire sociale des souris Tg2576.

En dépit de son importance dans la pathologie humaine, peu d'études ont évalué la mémoire sociale de modèles murins de la MA. Si Deacon et al ont décrit une perturbation de la mémoire sociale chez les souris Tg2576 âgées de 23 mois (Deacon et al., 2009), aucune étude n'a recherché l'âge auquel ce déficit apparait. Nous avons donc évalué si à 9 mois les souris Tg2576 présentent des déficits de mémoire sociale. Dans un premier temps, les souris ont été soumises au test à 3 chambres (Cf : Méthodes III-a) afin de mesurer leur sociabilité, c'est-à-dire leur attractivité naturelle pour un congénère. Indépendamment du génotype, nous observons que les souris explorent d'avantage la cage contenant un congénère plutôt que la cage vide (Figure

59A : souris NTg n=14 : souris familière 56.58 ± 9.84 sec, cage vide 14.20 ± 3.76 sec ; test-t : familière *vs* cage vide p=0.0012 ; souris Tg2576 n=21 : souris familière 59.78 ± 8.35 sec, cage vide 10.69 ± 2.30 sec ; test-t : familière *vs* cage vide p<0.0001), indiquant une sociabilité normale des souris Tg2576 et NTg. Les souris ont ensuite été soumises à un test de nouveauté sociale, qui consiste à discriminer une souris familière d'une souris inconnue. Alors que les souris contrôles interagissent significativement plus avec la souris inconnue (Figure 59B : souris NTg n=14 : souris familière 22.95 ± 4.93 sec, souris nouvelle 60.97 ± 5.28 sec ; test-t : nouvelle *vs* familière p<0.0001), les souris Tg2576 n'expriment pas de préférence pour la souris jamais rencontrée (Figure 59B : souris Tg2576 n=21 : souris familière 30.51 ± 4.44 sec, souris nouvelle 41.27 ± 5.44 sec ; test-t : nouvelle *vs* familière p=0.0586) : Ce test révèle l'incapacité des souris Tg2576 à discriminer un congénère familier d'une souris inconnue.

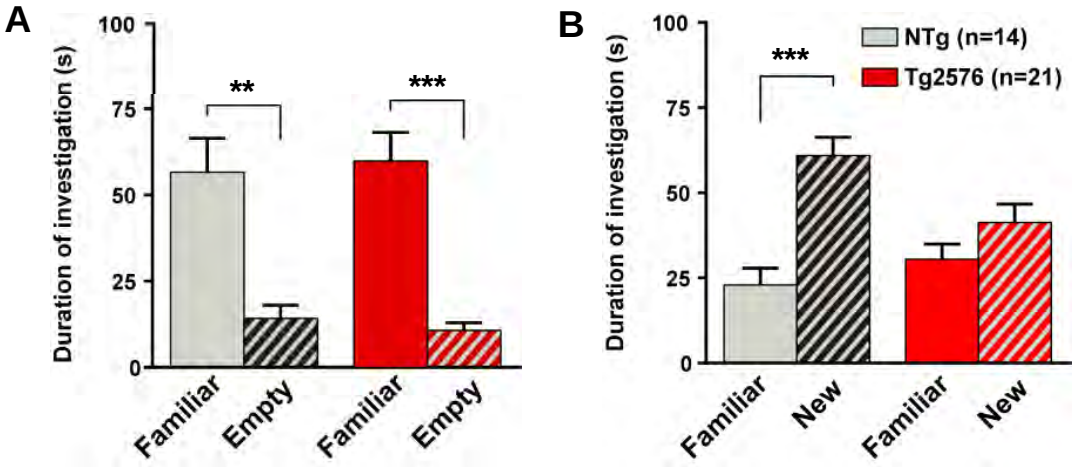


Figure 59 :
A : *La mesure du temps d'interaction montre que les souris des deux génotypes passent plus de temps avec un congénère qu'avec une cage vide. **p < 0.05 et ***p < 0,001 pour un test t apparié entre les deux cages.*
B : *Les souris NTg passent d'avantage de temps avec la nouvelle souris qu'avec la souris familière, tandis que les souris Tg2576 passent autant de temps avec les deux souris. ***p < 0,001 pour un test t apparié entre les deux cages.*

Afin d'évaluer de la composante mnésique de cette altération de la reconnaissance sociale, nous avons ensuite réalisé le test de mémoire sociale à 5 essais décrit précédemment (Cf : Méthodes III-b). Au cours des 4 essais, les souris NTg passent de moins en moins temps à interagir avec la souris présentée, ce qui indique que les animaux forment une mémoire sociale. En revanche, les souris Tg2576 montrent toujours le même intérêt pour la souris présentée, indiquant qu'elles sont incapables de se souvenir de cette nouvelle souris. Lors de l'essai 5, une nouvelle souris est

présentée et cela induit un regain d'interaction chez les souris NTg, mais pas chez les souris Tg2576 (Figure 60A: ANOVA à deux facteurs pour l'effet génotype: p < 0.1034, pour les essais p<0.0001 et pour l'interaction p<0.0001. Le test post hoc (Sidak) entre les souris NTg et Tg2576 montre : T1 : p=0.8691, T2 : p=0.0279, T3 : p=0.0943, T4 : p=0.0023 et T5 : p=0.9139 ; n=10-13 souris par génotype).

Nous avons ensuite comparé le temps moyen d'interaction à l'essai 1 avec celui des essais 2-3-4. Nous observons une forte diminution du temps d'investigation au fur-et-à-mesure des essais chez les souris NTg contrairement à ce qui est observé chez les souris Tg2576 (Figure 60B : ANOVA à un facteur mesures répétées: souris NTg n=10 : T2, 44.38 ± 4.42 *vs* T1 p=0.009, T3 : 37.29 ± 6.87 *vs* T1 p=0.0006, T4 : 23.09 ± 5.39 *vs* T1 p=0.0011, T5 : 103.4 ± 12.54 *vs* T1 p=0.9994 ; souris Tg2576 n=13 : T2, 97.80 ± 13.77 *vs* T1 p=0.9994, T3 : 82.28 ± 12.12 *vs* T1 p=0.2095, T4 : 90.62 ± 12.79 *vs* T1 p=0.8381, T5 : 98.75 ± 13.60 *vs* T1 p=0.9998), témoignant du fait que les souris modèles de la MA de 9 mois présentent une altération importante de la composante mnésique de la mémoire sociale.

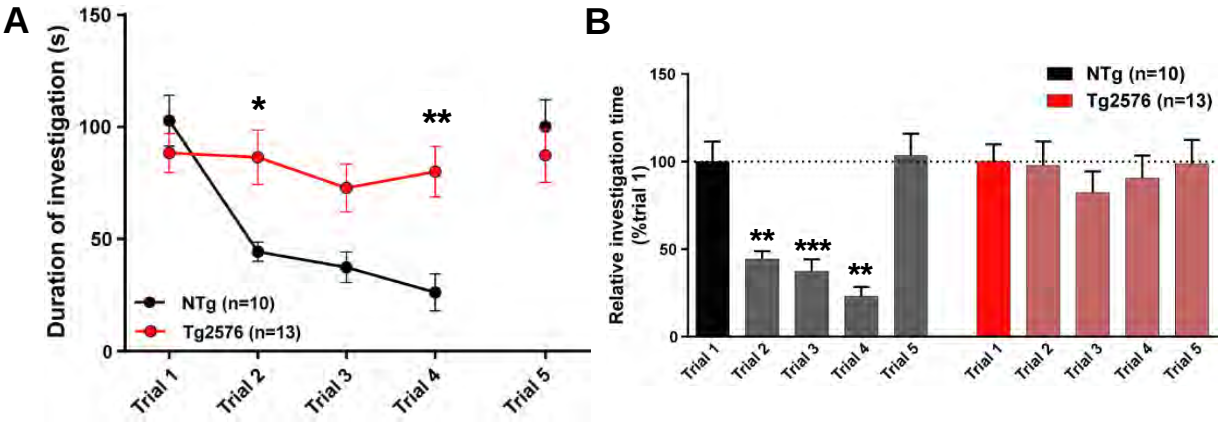


Figure 60 :
A : *Les souris sont exposées pendant 4 essais à la même nouvelle souris, puis à une autre nouvelle souris pendant un 5ème essai. La durée du temps d'interaction au cours des 5 essais du test de mémoire sociale révèle une altération de cette mémoire chez les souris Tg2576. Les points représentent la moyenne et les barres d'erreur la SEM. ANOVA à deux facteurs mesures répétées pour le génotype et les essais ; les moyennes sont comparées à chaque essai entre les deux génotypes à l'aide d'un test-t avec correction de Sidak (*p < 0.05 et **p<0.01).*
B : *Le temps d'interaction normalisé montre une diminution significative chez les souris NTg (n=10) de l'essai 2 à l'essai 4, alors que chez les souris Tg2576 (n=13), aucun changement significatif du temps d'interaction n'est observé. Les diagrammes représentent la moyenne et les barres d'erreur la SEM. **p < 0,05 et ***p < 0,001* pour l'ANOVA à un facteur mesures répétées Trial(n) vs Trial 1.

Afin d'exclure l'hypothèse d'un déficit olfactif altérant les capacités des souris Tg2576 à discriminer leur congénère, nous avons réalisé un test d'habituation/déshabituation olfactive (Yang et Crawley, 2009) (Cf : Méthodes III-d). Les souris des 2 génotypes

présentent le même comportement lors de la présentation des odeurs. Lors de chaque première présentation d'odeur, l'ensemble des animaux montre un temps d'interaction important qui s'accompagne, lors des présentations suivantes, d'une perte d'intérêt (diminution du temps d'investigation) (Figure 61: ANOVA à deux facteurs pour le génotype $p = 0.5454$; pour les odeurs: $p < 0.0001$, pour l'interaction $p = 0.7283$; n= 9-8 souris par génotype ; Le test post hoc (Sidak) souris NTg *vs* Tg2576 ne montre aucune différence significative). D'autre part, le temps d'exploration lors de la présentation d'odeurs sociales est très supérieur au temps d'exploration lors de la présentation d'odeurs non-sociales, quel que soit le génotype des individus. Ces données indiquent que les souris Tg2576 et NTg sont capables de discriminer et de mémoriser des odeurs non-sociales et sociales. Ainsi, les perturbations de reconnaissance et de mémoire sociale mises en évidence chez les souris Tg2576 ne sont pas dues à des problèmes de perception olfactive.

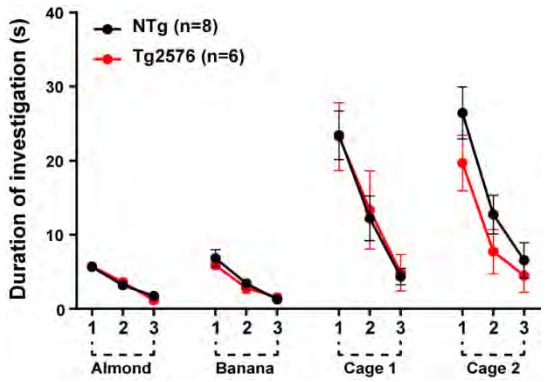


Figure 61 : Temps investigation pendant le test habituation/déshabituation olfactive
Les observations révèlent que les deux génotypes ont le même comportement et discriminent et de s'habituent aux odeurs non sociales et sociales. Les points représentent la moyenne et les barres d'erreur la SEM.

En résumé, nos données montrent que les souris Tg2576 présentent des troubles du comportement social et notamment une incapacité à discriminer un individu familier d'un individu inconnu. Elles sont aussi incapables se souvenir d'un congénère présenté de manière répétitive.

2.4. La perte des PNN dans l'aire CA2 cause-t-elle des déficits de mémoire sociale ?

Nos données indiquent que les souris Tg2576 ont des altérations de la reconnaissance et de la mémoire sociale, mais une sociabilité et une perception olfactive intactes. Nous avons émis l'hypothèse que les altérations du réseau PV/PNN dans l'aire CA2, et de la plasticité qui en dépend, sont responsables des troubles de la mémoire sociale des souris modèles de la MA. Dans l'objectif de démontrer ce lien de cause à effet, nous

avons mimé la perte des PNN en les dégradant avec l'enzyme ChABC dans l'aire CA2 des souris sauvages C57Bl6 âgées de 3 mois (Figure 62).

Tout d'abord, nous avons confirmé que l'injection localisée de ChABC provoque une forte diminution du marquage WFA, qui est restreinte à l'aire CA2 (Figure 62B : test-t : CA1 PBS 17.83 ± 1.55 *vs* ChABC 14.81 ± 1.30: p=0.1610 ; CA2 PBS 29.46 ± 3.20 *vs* ChABC 17.19 ± 2.06: p=0.0022 ; CA3 PBS 16.60 ± 1.08 *vs* ChABC 13.34 ± 0.94: p=0.0282 ; n=12-10 souris par condition).

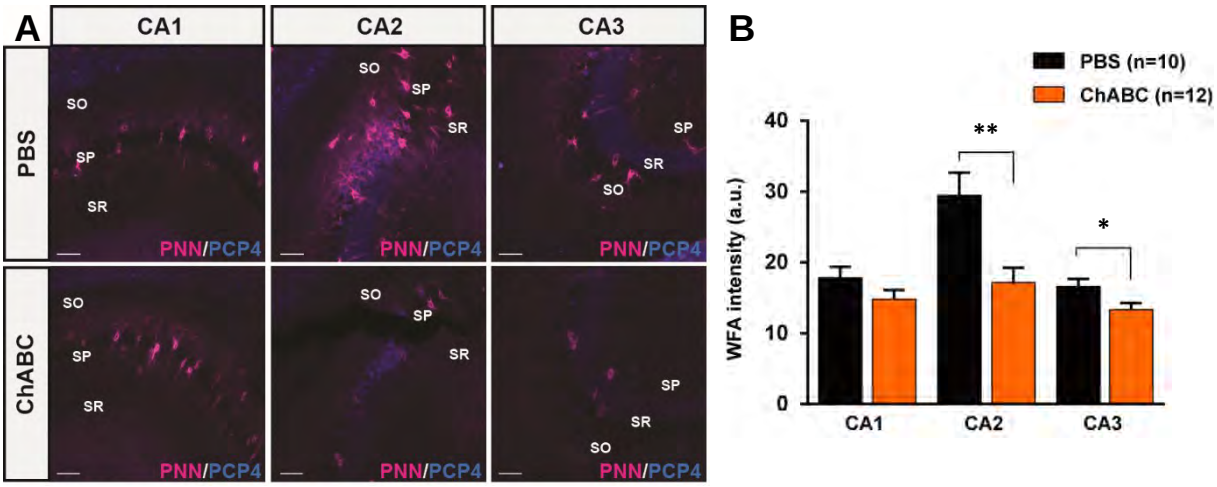


Figure 62 :
A : *Marquages WFA (PNN, magenta) et PCP4 (bleu) dans les aires CA1, CA2 et CA3 de souris WT après injection intra-CA2 de solution de PBS ou de ChABC. Barre d'échelle = 50µm. (Stratum oriens SO ; Stratum pyramidale : SP; stratum radiatum : SR.*
B : *La mesure de l'intensité de WFA dans les aires CA1, CA2 et CA3 des souris ayant reçu une injection de ChABC (n = 12) montre une forte diminution de la présence de PNN dans la zone CA2, mais pas dans les zones CA1 et CA3. *p < 0.05 et **p < 0,01 pour le test t non apparié entre enre les deux conditions pour chaque région de l'hippocampe. Les bâtons représentent la moyenne et les barres d'erreur la SEM.*

De façon intéressante, la perte de PNN dans l'aire CA2 de ces souris est associé à une diminution de l'intensité de fluorescence pour le signal parvalbumine dans le soma des interneurones PV (Figure 63B: test Mann-Whitney : souris PBS 3.46 a.u *vs* Souris ChABC 2.84 a.u : p<0.0001 ;132-146 cellules pour n=10-12 souris par condition).

Les données suggèrent que dégrader les PNN dans l'aire CA2 suffis à réduire l'activité des interneurones PV, qui conduirait au niveau fonctionnel à perturber la transmission inhibitrice dans l'aire CA2 (Figure 63).

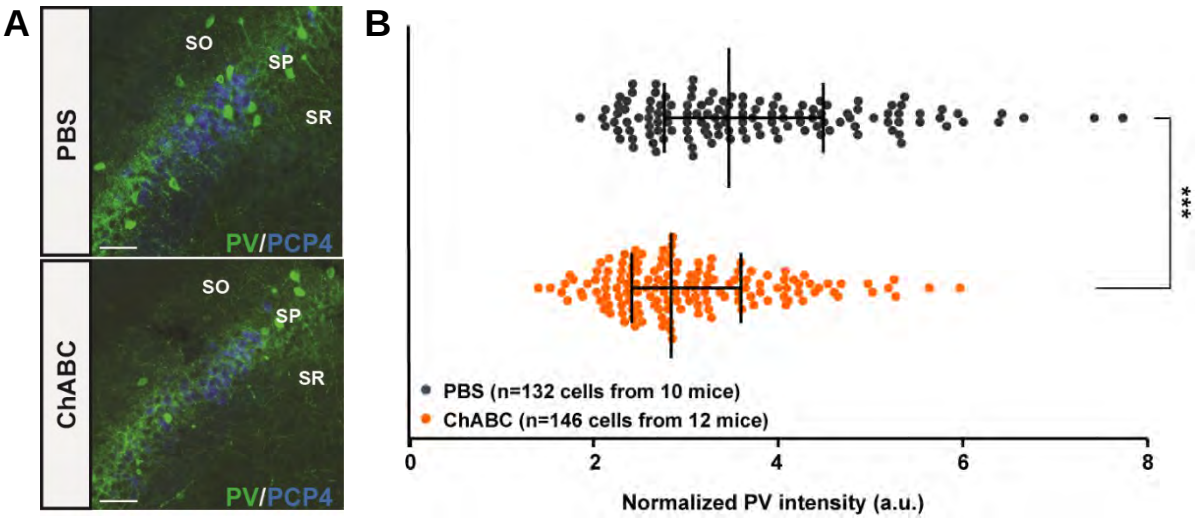


Figure 63
A : *Immunohistochimie pour PV (vert) et PCP4 (bleu) dans l'aire CA2 de souris sauvages après une injection locale de solution de PBS ou de ChABC. Barre d'échelle = 50 µm. (Stratum oriens SO. ; Stratum pyramidale : SP ; stratum radiatum : SR).*
B : *Intensité de l'immunomarquage PV normalisée (a.u.) dans le soma des cellules PV+ du SP de l'aire CA2. Les neurones PV+ des souris injectées avec la solution ChABC (n= 12 souris / 146 cellules par souris) ont une intensité de fluorescence réduite par rapport à ceux des souris PBS (n= 10 souris / 132 cellules par souris).Les barres représentent la médiane et l'écart interquartile, et chaque point représente la fluorescence d'un neurone PV+. ***p < 0,001 entre les conditions avec le test de Mann-Whitney.*

Dans un second temps, nous avons évalué l'impact de cette absence de PNN dans CA2 spécifiquement sur le comportement. Dans le test de mémoire sociale à 5 essais, les souris contrôles, ayant reçu une injection de PBS dans l'aire CA2, présentent une diminution du temps d'interaction avec la souris présentée au cours des essais (Figure 64B : ANOVA à un facteur : souris PBS n=10 : T2, 68.90 ± 6.92 *vs* T1 p=0.0231, T3 : 44.66 ± 6.15 *vs* T1 p=0.0002, T4 : 40.21 ± 10.55 *vs* T1 p=0.0049, T5 : 98.00 ± 14.14 *vs* T1 p=0.9998). Lors de la présentation d'une nouvelle souris (5ème essai), on observe un regain d'intérêt, en comparaison avec le 4ème essai. Ceci montre que l'injection de PBS dans l'aire CA2 ne perturbe pas la mémoire sociale.

En revanche, les souris ayant reçu une injection de ChABC dans l'aire CA2 s'avèrent incapables de former une mémoire sociale (Figure 64B : ANOVA à un facteur : souris ChABC n=12 : T2, 105.1 ± 8.29 *vs* T1 p=0.9465, T3 : 88.21 ± 9.14 *vs* T1 p=0.7417, T4 : 73.42 ± 8.42 *vs* T1 p=0.1110, T5 : 127.2 ± 10.33 *vs* T1 p=0.0422). Les données normalisées par rapport au temps d'interaction au 1er essai indiquent que dès le 2ème essai, les souris injectées avec du PBS montrent une diminution du temps d'interaction, ce qui n'est pas le cas pour ces souris injectées avec la ChABC.

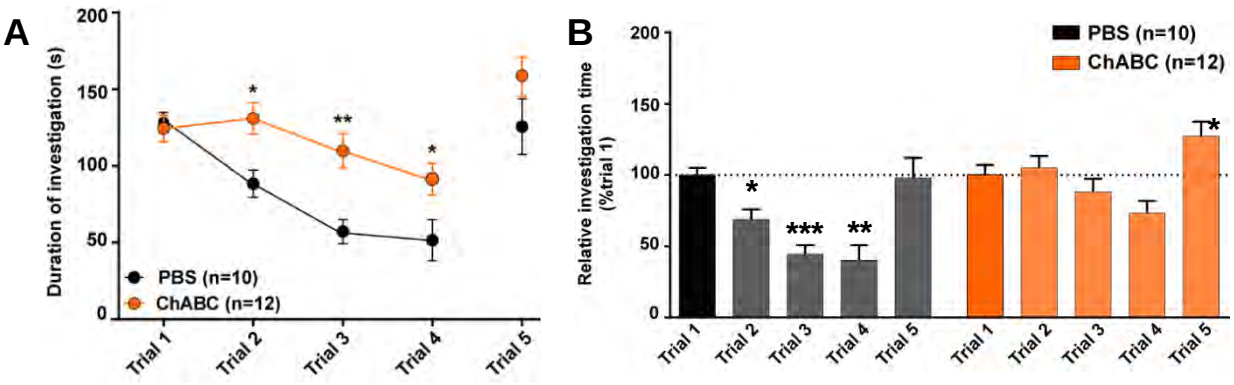


Figure 64 :
A *: Le temps d'interaction avec la souris présentée révèle une perturbation de la mémoire sociale chez les souris dont les PNN de l'aire CA2 ont été dégradés avec une solution de ChABC. Les points représentent la moyenne et les barres d'erreur la SEM. ANOVA à deux facteurs mesures répétées pour la condition et les essais ; les moyennes sont comparées à chaque essai entre les deux conditions à l'aide d'un test-t avec correction de Sidak (*p < 0.05 et **p<0.01).*
B *: Le temps d'interaction normalisé montre une diminution significative chez les souris PBS (n=10) au cours des essais 2 à 4, alors qu'aucun changement significatif n'est observé chez les souris ChABC (n=12). Les diagrammes représentent la moyenne et les barres d'erreur la SEM.*p < 0.05, **p < 0,01 et ***p < 0,001 pour l'ANOVA à un facteur mesures répétées Trial(n) vs Trial 1.*

Ces données indiquent que la dégradation des PNN dans l'aire CA2 induit un déficit d'apprentissage social chez les souris sauvages et soutiennent l'hypothèse selon laquelle la perte des interneurones PV et de leur PNN dans l'aire CA2 contribue aux troubles de mémoire sociale chez les souris modèles de la MA.

2.5. Rétablir la présence de PNN dans l'aire CA2 des souris modèles de la MA est-il suffisant pour restaurer leur mémoire sociale ?

Nous avons montré qu'à l'âge de 9 mois, les souris Tg2576 présentent une diminution du nombre d'interneurones PV et de leur PNN dans l'aire CA2 ce qui induit une diminution de leur activité inhibitrice sur le réseau. Nos travaux antérieurs indiquent que, dans le décours de la pathologie chez les souris Tg2576, la disparition des PNN autour des neurones PV survient avant la diminution du nombre de neurones PV (Cattaud et al., 2018). Cette observation suggère qu'une disparition des PNN autour des neurones PV peut déclencher la perte de ces interneurones. Cependant, l'absence de PNN autour des neurones PV induit la formation de synapses inhibitrices sur le soma des interneurones PV (Donato et al., 2013), provoquant leur inhibition tonique et une baisse de l'expression de la protéine PV (Yamada et al., 2015), comme en témoigne la diminution de la fluorescence PV observée dans l'aire CA2 des souris Tg2576. Il est ainsi possible que certains interneurones PV des souris Tg2576 sont toujours présents, mais que leur contenu en PV n'est pas assez élevé pour être détecté

par immunohistochimie. Si tel est le cas, l'utilisation d'un paradigme permettant de rétablir l'activité des neurones PV de l'aire CA2 devrait être suffisant à la formation de PNN et à l'émergence de plasticité dans cette aire, et à la restauration des capacités de mémoire sociale des souris Tg2576.

Dans notre précédent travail (Dominguez et al., 2019), nous avons montré l'importance de l'activation de la signalisation NRG1/ErbB4 pour provoquer la maturation des neurones PV et de leur PNN, permettre la plasticité DOR-iLTD dans l'aire CA2, et l'émergence de la mémoire sociale (Cf : Résultats 1). Dans le cortex visuel, la maturation des neurones PV au cours de la période critique de dominance oculaire dépend de l'activation de la voie NRG1/ErbB4 (Gu et al., 2016). La privation monoculaire pendant cette période régule diminue la signalisation NRG1/ErbB4 dans les neurones PV, entrainant la rétractation des entrées excitatrices sur ces neurones. Dans ce contexte, l'administration de NRG1 exogène restaure 5 jours plus tard ces entrées excitatrices, améliorant ainsi l'inhibition neuronale PV sur les neurones excitateurs du cortex visuel (Sun et al., 2016). Nous avons donc choisi d'injecter du NRG1 (6.66 nM ; 100 nl par injection) dans le CA2 de souris Tg2576, puis d'évaluer l'impact de cette injection sur les neurones PV et PV/PNN (Figures 65).

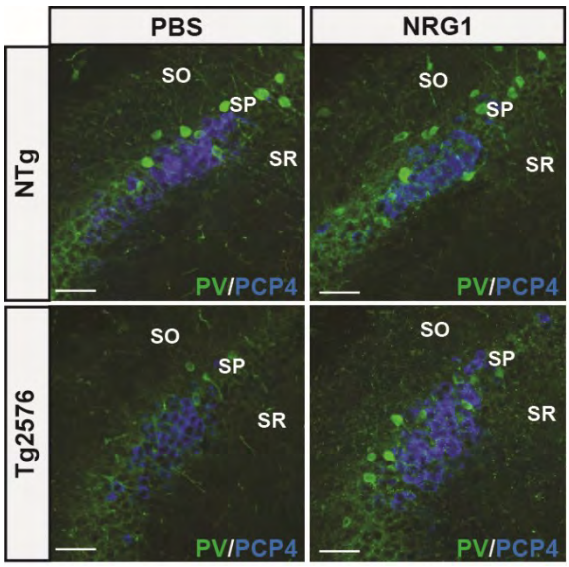


Figure 65
Immunomarquages PV (vert) et PCP4 (bleu) dans l'aire CA2 de souris NTg et Tg2576 après injection locale de solution de PBS ou NRG1. Barre d'échelle = 50µm. Stratum oriens : SO. ; Stratum pyramidale : SP ; stratum radiatum : SR.

Nous constatons que chez les souris contrôles, l'injection de NRG1 (NTg-NRG1) ou de PBS (NTg-PBS), ne provoque aucune modification du nombre d'interneurones PV dans l'aire CA2. En revanche, l'injection de NRG1 (Tg2576-NRG1) dans l'aire CA2 des souris Tg2576 induit une augmentation du nombre d'interneurones PV par rapport à l'injection de PBS (Tg2576-PBS) (Figure 66A: souris NTg-PBS n=10 : 586 ± 47.89,

NTg-NRG1 n=10 : 673 ± 42.19, Tg2576-PBS n=11 : 390.9 ± 43.72, Tg2576-NRG1 n=10 : 556 ± 27.94 ; ANOVA à deux facteurs pour l'effet génotype p = 0.0006; pour l'effet traitement p = 0.0042, pour l'interaction p = 0.3511 ; le test post-hoc de Sidak : PBS-NTg *vs*. PBS-Tg2576 : p=0.0104, PBS-Tg2576 *vs*. NRG1-NTg : p=0.0001 et PBS-Tg2576 *vs*. NRG1-Tg2576 : p=0.0412).

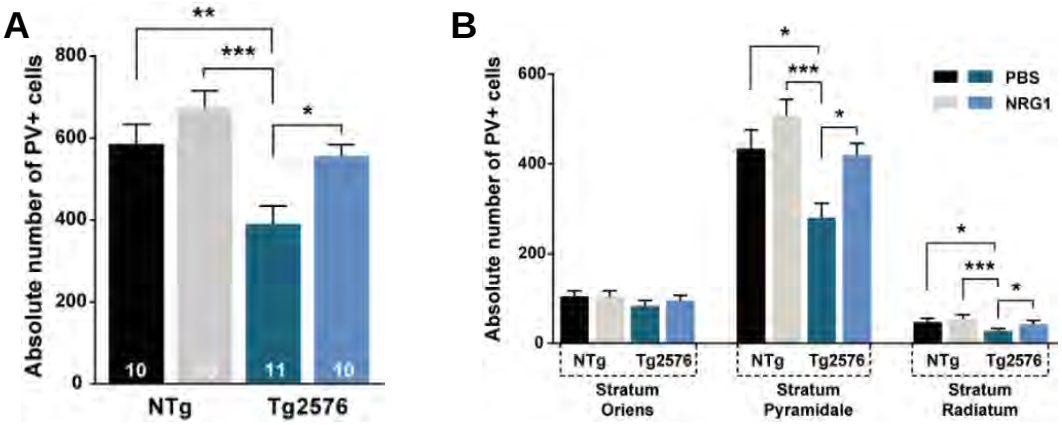


Figure 66 :
A-B : *La quantification du nombre absolu de cellules PV+ dans l'aire CA2 et ses sous régions révèle une restauration du nombre de cellules PV+ chez les souris Tg2576 après injection de NRG1 (Tg2576 NRG1 n=10) et plus précisément dans le SP et dans le SR. Au contraire, les souris Tg2576 après injection de PBS (Tg2576 PBS n= 11) présentent toujours un déficit du nombre de cellules PV dans l'aire CA2, dans les couches SP et SR. Les bâtons représentent la moyenne et les barres d'erreur la SEM. ANOVA à deux facteurs (génotypes et traitement) suivie d'une correction et d'un test de Sidak. *p < 0.05, ** p <0.01 et ***p < 0.001*

De plus, l'expression de la parvalbumine dans les somas des interneurones PV augmente chez les souris Tg2576-NRG1 et atteint une intensité de fluorescence comparable à celle observée dans les groupes NTg-PBS et NTg-NRG1 (Figure 67: souris NTg-PBS n=10 : 2.54, NTg-NRG1 n=10 : 2.81, Tg2576-PBS n=11 : 2.21, Tg2576-NRG1 n=10 : 2.68 ; Test Kruskal-Wallis: p < 0.0001 ; le test post-hoc de Dunn : PBS-NTg *vs*. NRG1-NTg : p=0.032, PBS-NTg *vs*. PBS-Tg2576 : p=0.0006, PBS-Tg2576 *vs*. NRG1-NTg : p<0.0001 et PBS-Tg2576 *vs*. NRG1-Tg2576 : p<0.0001).

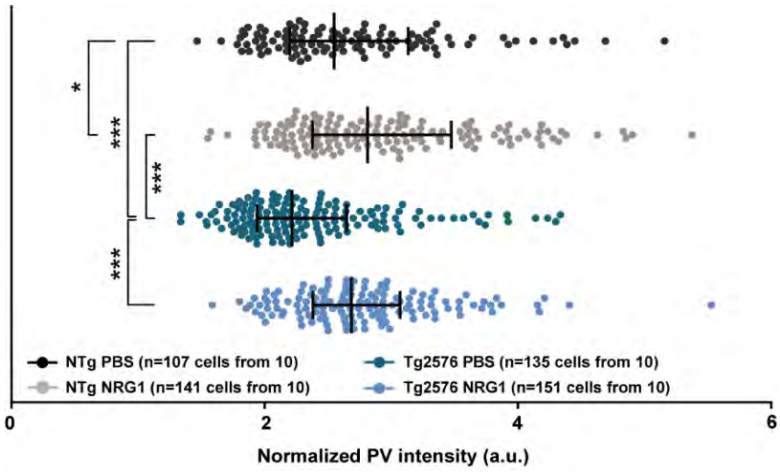


Figure 67 :
*L'intensité normalisée de fluorescence (a.u.) pour la parvalbumine dans les cellules PV+ de la SP de l'aire CA2 montre que la fluorescence PV est plus élevée dans les cellules PV+ des souris Tg2576-NRG1 (n= 8 à 15 cellules par souris) que dans celles des souris Tg2576-PBS (n= 5 à 15 cellules par souris). Les barres représentent la médiane avec l'écart interquartile et chaque point représente les neurones des cellules PV+. Les médianes sont comaprées entre chaque condition avec le test de Kruskal-Wallis correction de Dunn. * p < 0,05, *** : p < 0,005*

De façon remarquable, l'effet de NRG1 sur les neurones PV s'accompagne de l'apparition des PNN autour de ces neurones (Figure 68A: souris NTg-PBS n=10 : 540 ± 33.10, NTg-NRG1 n=10 : 566 ± 33.11, Tg2576-PBS n=11 : 314.5 ± 15.10, Tg2576-NRG1 n=10 : 444 ± 34.90 ; ANOVA à deux facteurs pour l'effet génotype p<0.0001; pour l'effet traitement p = 0.0125, pour l'interaction p = 0.0889 ; le test post-hoc de Sidak : PBS-NTg *vs*. PBS-Tg2576 : p<0.0001, PBS-Tg2576 *vs*. NRG1-NTg : p<0.0001 et PBS-Tg2576 *vs*. NRG1-Tg2576 : p=0.0204). Ainsi, la NRG1 déclenche la maturation des interneurones PV en stimulant l'expression somatique de parvalbumine et provoque la formation des PNN.

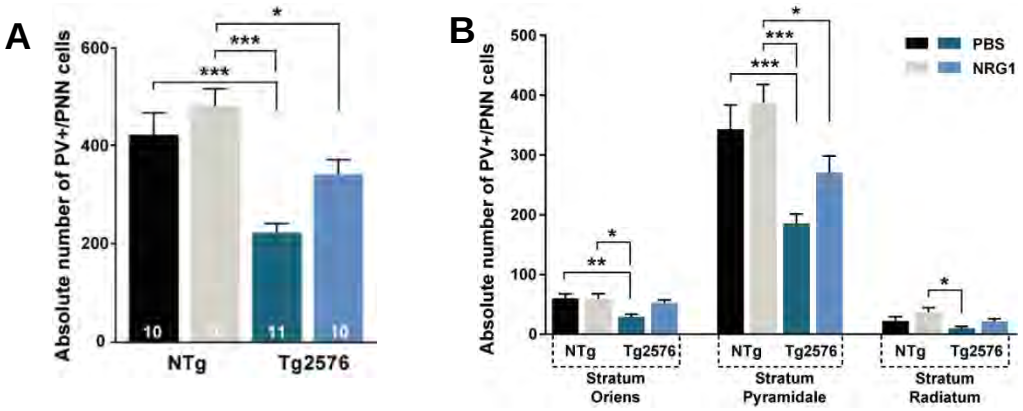


Figure 68 :
A-B : *Nombres absolus de cellules PV+/PNN+ dans l'aire CA2 et ses sous-régions. Il n'y a pas de différence entre le nombre de cellules PV+/PNN+ chez les souris Tg2576 NRG1 et les souris NTg PBS dans l'aire CA2 et plus précisément dans les stratums oriens, pyramidale et radiatum. Les bâtons représentent la moyenne et les barres d'erreur la SEM. ANOVA à deux facteurs (génotypes et traitement) suivie d'une correction et d'un test de Sidak. *p < 0.05, ** p <0.01 et ***p < 0.001*

En revanche, l'injection de NRG1 ne modifie pas l'intensité du marquage PNN diffus dans l'aire CA2, quel que soit le génotype (Figure 69A: souris NTg-PBS n=10 : 11.08 ± 1.129, NTg-NRG1 n=10 : 11.20 ± 1.014, Tg2576-PBS n=11 : 6.102 ± 0.6190, Tg2576-NRG1 n=10 : 5.575 ± 0.4411 ; ANOVA à deux facteurs pour l'effet génotype p<0.0001; pour l'effet traitement p = 0.8128, pour l'interaction p = 0.7007 ;le test post-hoc de Sidak : PBS-NTg *vs*. PBS-Tg2576 : p=0.0004, PBS-Tg2576 *vs*. NRG1-NTg : p<0.0001 et PBS-Tg2576 *vs*. NRG1-Tg2576 : p=0.9984).

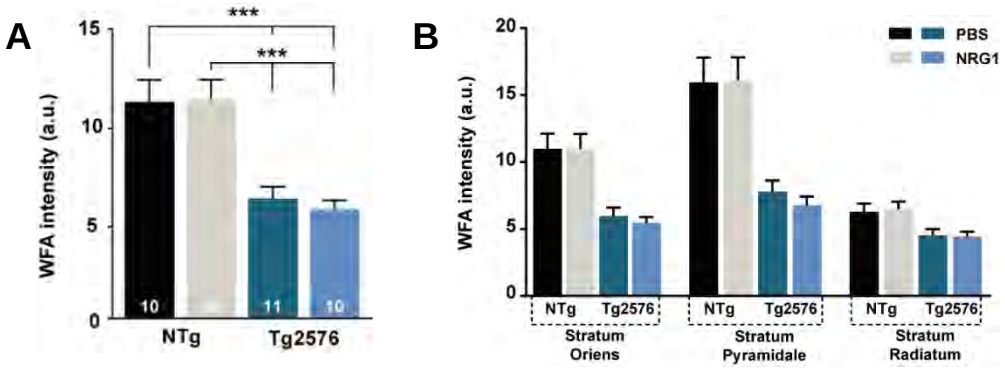


Figure 69 :
A-B : *La mesure de l'intensité de la WFA de l'aire CA2 et des différentes couches chez les souris Tg2576 ayant reçu du PBS et du NRG1 montre une forte diminution de la présence de PNN comparativement aux deux groupes NTg. La diminution de la fluorescence de la WFA dans les deux groupes de souris Tg2576 est observée dans toutes les couches de la zone CA2. Les bâtons représentent la moyenne et les barres d'erreur la SEM. ANOVA à deux facteurs (génotypes et traitement) suivie d'une correction et d'un test de Sidak. *p < 0.05, ** p <0.01 et ***p < 0.001*

Nous avons ensuite cherché à déterminer si la restauration des interneurones PV et de leur PNN induite par NRG1 dans l'aire CA2 s'accompagne d'une récupération fonctionnelle de la mémoire sociale chez les souris Tg2576.

L'injection d'une solution de PBS, ne modifie pas le déficit de mémoire sociale des souris Tg2576 (Figure 70B : ANOVA à un facteur : Souris Tg2576-PBS : n=11 : T2, 109.9 ± 11.62 *vs* T1 p=0.9446, T3 : 90.05 ± 14.88 *vs* T1 p=0.9444, T4 : 92.71 ± 16.11 *vs* T1 p=0.9866, T5 : 117.6 ± 13.56 *vs* T1 p=0.7641). En revanche, l'injection de NRG1 améliore les capacités des souris Tg2576 qui montrent alors un apprentissage social comparable à celui des souris NTg (Figure 70B : ANOVA à un facteur : Souris NTg-PBS : n=15 : T2, 57.95 ± 10.23 *vs* T1 p=0.0032, T3 : 42.49 ± 8.56 *vs* T1 p=0.0001, T4 : 26.40 ± 7.311 *vs* T1 p<0.0001, T5 : 90.16 ± 10.18 *vs* T1 p=0.8119). La présence d'une mémoire sociale rétablie chez les souris Tg2576-NRG1 est reflétée par une forte diminution de la durée d'interaction dès le 2ème essai par rapport à la 1ère présentation de la souris nouvelle (Figure 70B : ANOVA à un facteur : Souris Tg2576-NRG1 : n=14 :

T2, 69.90 ± 7.819 *vs* T1 p=0.0007, T3 : 34.22 ± 6.906 *vs* T1 p<0.0001, T4 : 34.22 ± 6.906 *vs* T1 p<0.0001, T5 : 96.56 ± 15.07 *vs* T1 p=0.9970).

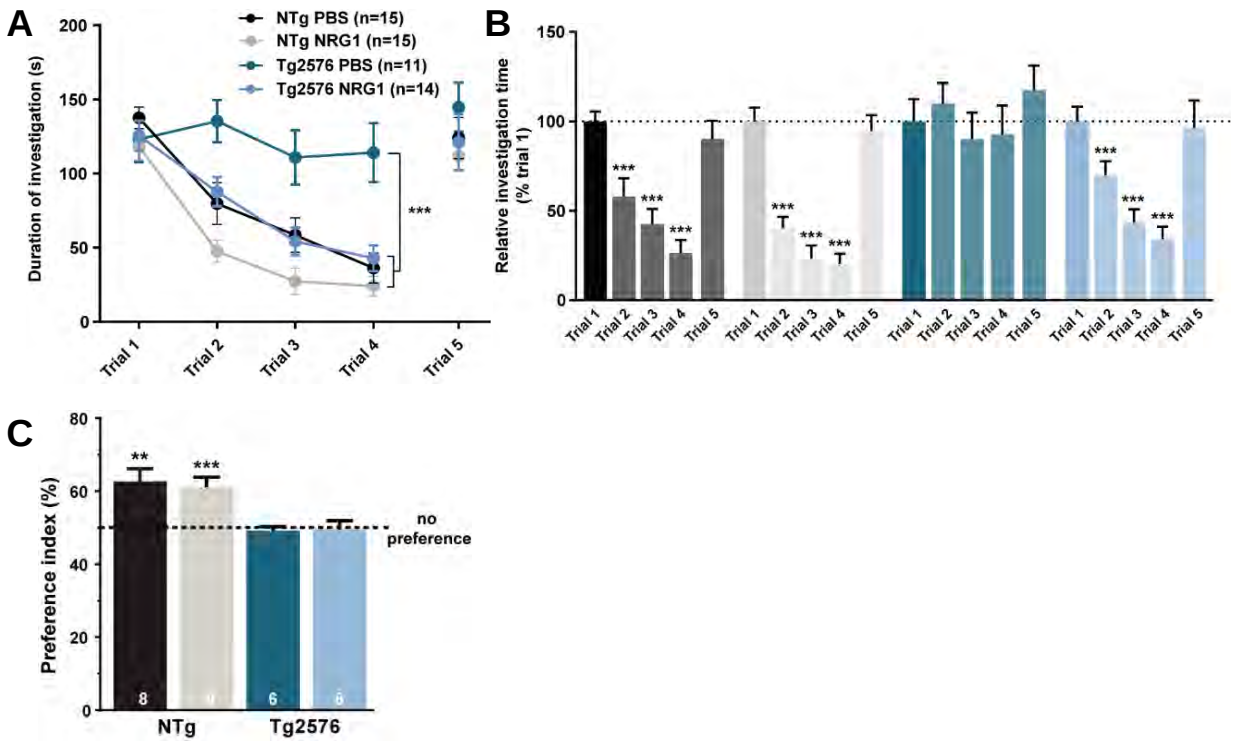


Figure 70 :
A : *Les injections locales de NRG1 dans la zone CA2 induisent une restauration de la mémoire sociale chez des souris Tg2576. Les bâtons représentent la moyenne et les barres d'erreur la SEM. ANOVA à deux facteurs (génotype et traitement) suivie d'une correction et d'un test de Sidak. *p < 0.05, ** p <0.01 et ***p < 0.001*
B : *On observe une diminution significative du temps d'interaction normalisé des souris Tg2576 injectées avec NRG1 (Tg2576 NRG1 : n= 14) entre les essais 2 et 4, similaire aux deux groupes de souris NTg (NTg PBS : 11, NTg NRG1 : n= 15). Les diagrammes à barres représentent la moyenne et les barres d'erreur du SEM. ***p < 0,001 pour l'ANOVA à un facteur mesure répétées Trial(n) vs Trial 1.*
C : *Indice de préférence du temps d'exploration pour l'objet déplacé. On observe une altération de la mémoire spatiale dans les deux groupes de souris Tg2576 (Tg2576 PBS n= 6, Tg2576 NRG1 n=8) comparativement aux souris NTg (NTg PBS n= 8, NTg NRG1 n= 9). Les bâtons représentent la moyenne et les barres d'erreur du SEM. **p < 0,01, *** : p < 0,001 par rapport à la chance (ligne en pointillé indique 50%, soit la chance).*

Afin de déterminer si cette amélioration de la mémoire sociale s'accompagne d'effets bénéfiques sur d'autres formes de mémoires hippocampo-dépendantes, nous avons testé les souris dans un test de déplacement d'objet qui évalue la mémoire spatiale. On observe que les souris Tg2576 injectées avec la solution contrôle ou NRG1 dans l'aire CA2 ne présentent aucune préférence pour l'objet déplacé (Figure 70C : test t avec une valeur théorique moyenne à 50%: Tg2576-PBS 49.24 ± 1.07 *vs* 50% p = 0.5097, Tg2576-NRG1 49.52 ± 2.38 p = 0.8457), contrairement aux souris NTg (Figure 70C : Test t avec une valeur théorique moyenne à 50%: NTg-PBS 62.61 ± 3.57 *vs*

50% p = 0.0097, NTg-NRG1 61.13 ± 2.69 p = 0.0033). Ces résultats illustrent la spécificité de l'action de NRG1 dans l'aire CA2 sur la mémoire sociale des souris modèles de la MA.

2.6. Conclusion

Nos travaux, établissent un lien causal entre le dysfonctionnement des neurones PV de l'aire CA2 de l'hippocampe et les déficits de mémoire sociale chez les souris modèles de le MA (Rey et al., In prep). Nous montrons que l'activation de la signalisation NRG1/ErbB4, qui est fortement impliquée dans la maturation dépendante de l'expérience des neurones PV du cerveau post-natal (Dominguez et al., 2019 ; Sun et al., 2016 ; Gu et al., 2016), permet de restaurer la présence de neurones PV et PV/PNN détectables dans l'aire CA2 des souris Tg2576, et de rétablir leur capacité de mémoire sociale.

Nos résultats suggèrent que stimuler l'activité des neurones PV et leur maturation (*i.e.* formation de PNN) par l'expérience (Cattaud et al., 2018), ou par l'activation de voies de signalisation mise en jeu pendant le développement post-natal (Rey et al., In prep) – permet de rétablir la mémoire sociale des souris modèles de la MA. Cependant, les conséquences fonctionnelles de la disparition des PNN autour des neurones PV au cours de la MA restent largement incomprises.

3. Activation de l'aire CA2 en réponse aux stimulations sociales

3.1. Influence des stimulations sociales sur l'activité des interneurones PV de l'aire CA2

L'objectif ici était d'examiner dans quelle mesure les interactions sociales modifient l'activité des interneurones PV et la formation de leurs PNN dans l'aire CA2, chez la souris en conditions normales et pathologiques.

Afin de caractériser les conséquences d'une interaction sociale sur le nombre d'interneurones PV et leurs PNN dans l'aire CA2, nous avons exposé des souris NTg et Tg2576 à des congénères familiers ou non, ou à une cage vide, pendant 10 minutes. Les animaux sont sacrifiés les animaux 90 minutes plus tard. Ces expériences sont préliminaires, c'est pourquoi nous n'avons pas réalisé de statistiques inférentielles. Nous avons déterminé par immunohistochimie, pour chaque groupe expérimental, le nombre d'interneurones PV et de PNN détectables dans l'aire CA2 (Figure 71). Nos résultats indiquent que pour les deux génotypes, le nombre absolu d'interneurones PV dans l'aire CA2 augmente suite à une interaction sociale par rapport à une interaction non-sociale (Figure 71A : NTg-Cage n=6: 256.70 ± 43.26, NTg-Nouvelle n=9: 382.20 ± 69.30, NTg-Familière n=9 : 452.20 ± 64.29 ; Tg2576-Cage n=2: 256.70 ± 43.26, Tg2576-Nouvelle n=6: 382.20 ± 69.30, Tg2576-Familière n=6 : 452.20 ± 64.29). Ces observations sont en accord avec celles de Donato et collaborateurs qui montrent qu'une augmentation de l'expression de parvalbumine a lieu dans les neurones PV après un apprentissage (Donato et al., 2013). Nos données mettent aussi en évidence que des PNN apparaissent autour des neurones PV après une interaction sociale mais pas suite à une interaction non-sociale (Figure 71B : NTg-Cage n=6: 291.67 ± 18.87, NTg- Nouvelle n=9: 212.20 ± 53.87, NTg- Familière n=9 : 277.80 ± 70.75 ; Tg2576-Cage n=2: 40 ± 10,00 Tg2576-Nouvelle n=6: 161.00 ± 58.28, Tg2576-Familière n=6 : 161.70 ± 65.85).

En résumé, une interaction sociale avec une souris familière ou non, augmente sensiblement la présence de PNN autour des neurones PV. Ainsi, la plasticité des neurones PV de l'aire CA2 peut être influencée par une interaction sociale, même courte. Cette plasticité est également mobilisable chez les souris Tg2576.

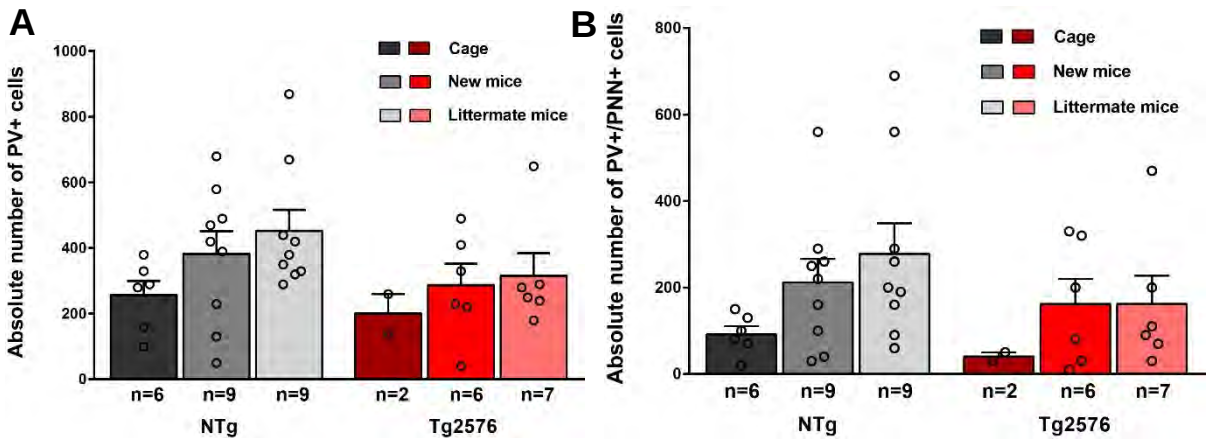


Figure 71 :
*Le nombre absolu de cellules PV+ **(A)** et PV+/PNN+ **(B)** dans l'aire CA2 tend à augmenter dans les deux génotypes après la présentation d'un congénère comparé à une interaction non-sociale. Les bâtons représentent la moyenne et les barres d'erreur la SEM.*

Nous avons ensuite évalué si l'augmentation des PNN autour des neurones PV était plus généralement associée à la formation de PNN diffus dans la couche pyramidale de l'aire CA2. L'analyse de l'intensité du marquage WFA (Figure 72) indique que la présence de PNN diffus dans l'aire CA2 ne varie pas en réponse à une interaction sociale, pour aucun des deux génotypes étudiés (NTg-Cage n=6: 49.64 ± 3.62, NTg-Nouvelle n=9: 49.10 ± 3.87, NTg-Familière n=9 : 62.93 ± 8.25 ; Tg2576-Cage n=2: 35.17 ± 3.19 Tg2576-Nouvelle n=6: 25.28 ± 2.21, Tg2576-Familière n=6 : 21.76 ± 1.50).

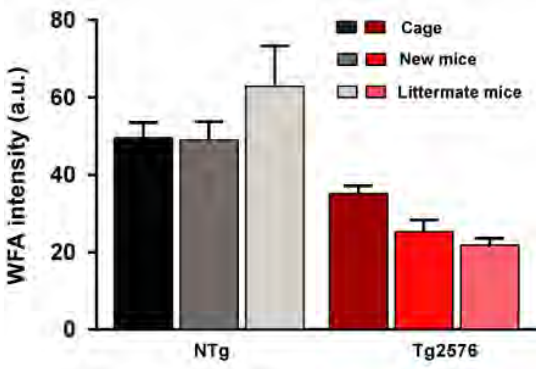


Figure 72 :
La mesure de l'intensité de WFA de l'aire CA2 montre aucun effet de l'interaction sociale pour les deux génotypes. Les souris Tg2576 présentent toujours une faible intensité en WFA par rapport aux souris NTg. Les bâtons représentent la moyenne et les barres d'erreur la SEM.

L'intensité du marquage WFA reste plus faible chez les souris Tg2576 comparée à que chez les souris contrôles. Contrairement à l'exposition à un environnement enrichi (Cattaud et al., 2018), la présentation d'une souris nouvelle ou familière n'est pas suffisante pour augmenter l'expression des PNN diffus dans l'aire CA2. Ces résultats, suggèrent que la formation des PNN autour des interneurones PV et l'apparition du marquage diffus dans l'aire CA2 répondraient à des signaux différents.

Sur la base de ces résultats, nous avons émis l'hypothèse que l'augmentation du nombre d'interneurones PV détectables dans l'aire CA2 serait associée à une activation neuronale, identifiable par l'expression de gènes immédiats précoces tels que *cfos*. Nous avons caractérisé le schéma d'expression de *cfos* dans l'aire CA2 des souris T2576 et contrôles (Figure 73) après une interaction sociale ou non. Pour cela, nous avons quantifié le nombre de cellules immunopositives pour la protéine Fos (Fos+) dans l'aire CA2, en fonction du génotype des souris et du type d'interaction (sociale ou non). Quel que soit l'interaction ou le génotype, le nombre de cellules Fos+ dans CA2 ne varie pas (Figure 73A: NTg-Cage n=6: 105.0 ± 17.2, NTg-Nouvelle n=9: 195.6 ± 53.0, NTg-Familière n=9 : 135.6 ± 31.3 ; Tg2576-Cage n=2: 310.0 ± 60.0 Tg2576-Nouvelle n=6: 106.7 ± 63.2, Tg2576-Familière n=6 : 214.3 ± 59.8). Nous avons aussi quantifié l'activation spécifique des interneurones PV en analysant les colocalisations PV+/Fos+ dans l'aire CA2 (Figure 73B). Nous constatons que le nombre de cellules PV+/Fos+ tend à augmenter chez les souris NTg après avoir interagit avec une souris familière (NTg-Familière n=9 : 53.3 ± 13.5), plutôt qu'avec une cage vide (NTg-Cage n=6 : 15 ± 4.2) ou une souris nouvelle (NTg-nouvelle n=9 : 22.0 ± 9.8). En revanche, le nombre de cellules PV+/Fos+ ne varie pas chez les souris Tg2576 quelle que soit type d'interaction (Figure 73B : Tg2576-Cage n=2: 25.0 ± 5.0 Tg2576-Nouvelle n=6: 15.0 ± 7.6, Tg2576-Familière n=7 : 51.4 ± 26.6).

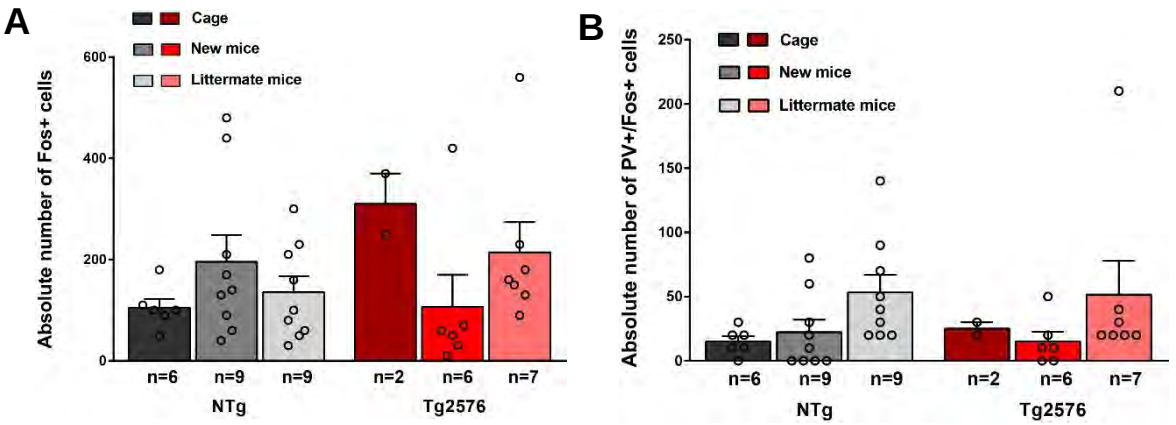


Figure 73 :
A: *Le nombre absolu de cellules Fos+ dans l'aire CA2 ne diffère pas avec le génotype , ni le type d'intéraction.*
B : *Le nombre absolu de cellules PV+/Fos+ tend à augmentater suite à une interaction avec une souris familière chez les souris NTg. En revanche, les souris Tg2576 ne présentent aucun changement du nombre de cellules PV+/PNN+, quel que soit le type d'interaction.* Les bâtons *représentent la moyenne et les barres d'erreur la SEM*.

La forte variabilité des valeurs observée parmi les souris Tg2576 interagissant avec une souris familière est trop importante pour pouvoir interpréter ce résultat. Néanmoins, nos observations suggèrent que l'activité des interneurones PV de CA2 augmente chez les souris contrôles lorsqu'elles sont engagées dans une interaction sociale. Nos données semblent en revanche indiquer que les interactions sociales (ou non-sociales) ne déclenchent pas un tel patron d'activation des neurones PV chez les souris modèles de la MA, dont on sait qu'elles présentent des altérations de la mémoire sociale

3.2. Influence des stimulations sociales sur l'activité cérébrale.

L'étude de l'activité des réseaux neuronaux et des oscillations cérébrales suscite un grand intérêt pour la compréhension des troubles cognitifs. Les oscillations cérébrales résultent de l'activité synchrone de populations de neurones, et sont visualisées sur l'électroencéphalogramme. Parmi les oscillations cérébrales, les ondes thêta (5-10 Hz) et gamma (30-200 Hz) sont associées à des activités cognitives spécifiques (Ognjanovski et al., 2017 ; Yamamoto et al., 2014). En effet, le rythme thêta, notamment généré par l'hippocampe, est fortement présent lors que l'animal est engagé dans un comportement actif, une activité d'exploration ou se trouve en phase de sommeil paradoxal (Ognjanovski et al., 2017 ; Boyce et al., 2016). L'activité de type gamma, est générée lors de la perception sensorielle et de la formation de la mémoire (Chen et al., 2014 ; Lapray et al., 2009 ; Sederberg et al., 2007). Il a été montré que l'activité des interneurones PV régule la puissance des ondes thêta et gamma (Amilhon et al., 2015 ; Sohal et al., 2009 ; Cardin et al., 2009). Cependant, les oscillations gamma et thêta sont altérées en conditions pathologiques (Bott et al., 2016 ; Verret et al., 2012). Les travaux de Bezzina et collaborateurs dans l'équipe montrent une hyperactivité hippocampique sur l'EEG des souris Tg2576, susceptible de refléter une perturbation de la transmission inhibitrice dans l'hippocampe (Bezzina et al., 2015).

Lors de cette thèse, nous avons évalué l'influence respective des interactions sociales et non sociales sur les oscillations de type thêta et gamma chez les souris NTg et Tg2576. L'enregistrement EEG des animaux pendant les interactions sociale (souris familière ou nouvelle) ou non sociale (cage vide) a été réalisé grâce à un système d'acquisition sans fil (Cf : Méthodes II-c).

Après analyse des données (Cf : Méthodes II-c), la puissance absolue des différentes fréquences de l'EEG est comparée entre les génotypes (Figure 74). Par rapport aux souris contrôles, les Tg2576 semblent présenter une augmentation de la puissance des ondes thêta (5-10Hz) et gamma (30-100Hz), quelle que soit l'interaction (sociale ou non sociale) proposée (Figure 74G : NTg-Cage n=5: 5.08E-03 ± 1.79E-03 mV², NTg-Nouvelle n=6: 6.94E-03 ± 1.25E-03 mV², NTg-Familière n=6 : 6,36E-03 ± 3,28E-04 mV² ; Tg2576-Cage n=5: 8.49E-03 ± 1.79E-03 mV², Tg2576-Nouvelle n=6: 9.16E-03 ± 1.94E-03 mV², Tg2576-Familière n=6 : 9.54E-03 ± 9.75E-04 mV²). La comparaison des interactions sociales et non sociales montre que la puissance des ondes gamma a tendance à augmenter chez les souris Tg2576 lors de l'interaction avec un congénère (familier ou nouveau), par rapport aux puissances mesurées lors de la présentation d'une cage vide (Figure 74G : NTg-Cage n=5: 1.53E-03 ± 1.73E-04 mV², NTg-Nouvelle n=6: 2.14E-03 ± 3.68E-04 mV², NTg-Familière n=6 : 1.83E-03 ± 1.96E-04 mV²; Tg2576-Cage n=5: 2.57E-03 ± 3.62E-04 mV², Tg2576-Nouvelle n=6: 3.29E-03 ± 4.54E-04 mV², Tg2576-Familière n=6 : 3.11E-03 ± 2.10E-04 mV²). Lors de l'interaction des souris Tg2576 avec une souris inconnue, aucune différence de rythme thêta n'est observée (Figure 74G). Chez les souris NTg, on observe une augmentation de la puissance de thêta et de gamma pendant l'interaction avec un congénère (nouveau ou familier), par rapport à une cage vide (Figure 74G-H).

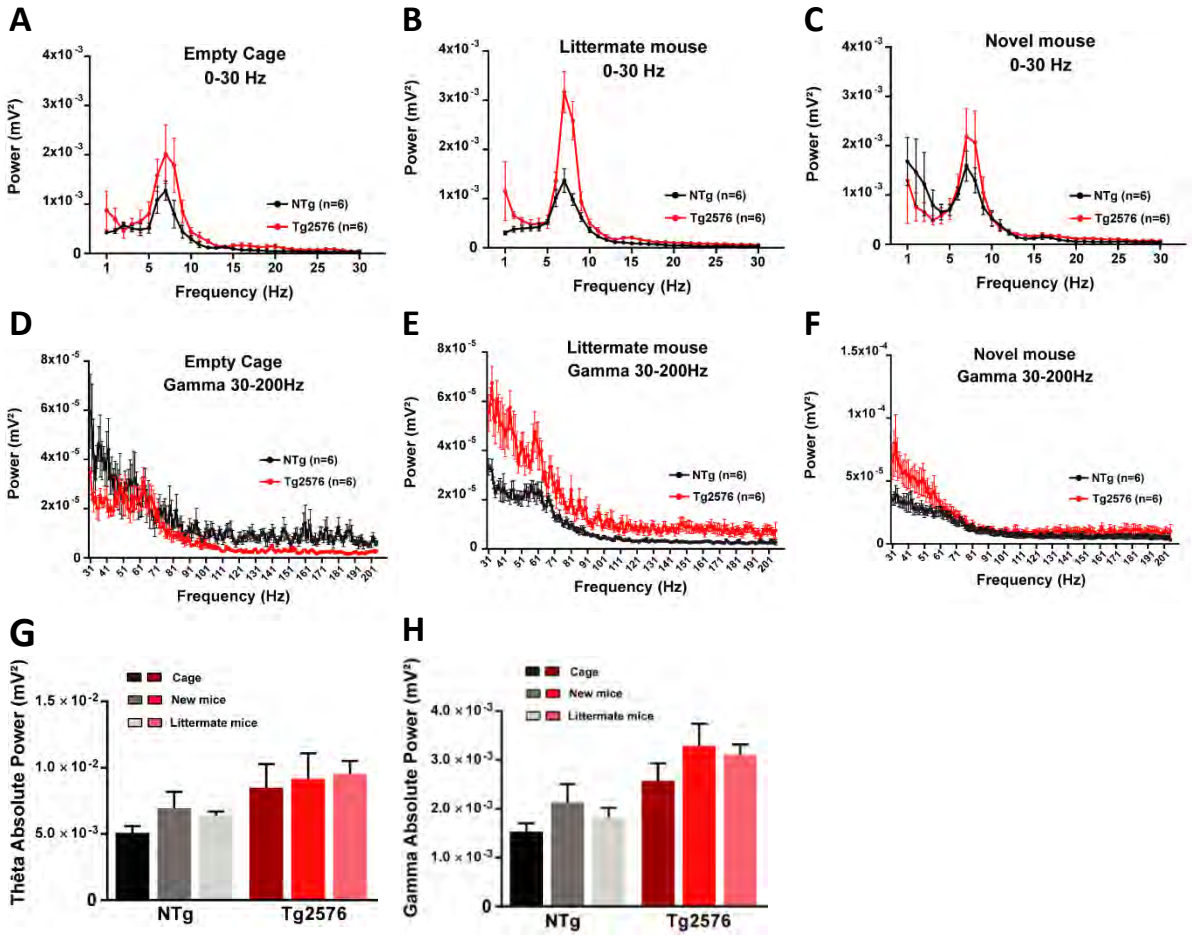


Figure 74 :
A-B-C : *Représentation des bandes de puissances entre 0-30 Hz sur l'EEG de souris Tg2576 et NTg en fonction des interactions non-sociales (A) et sociales (B-C).*
D-E-F : *Représentation des bandes de puissances entre 30-200 Hz sur l'EEG des souris Tg2576 et NTg en fonction des interactions non-sociales (D) et sociales (E-F).*
G-H : *Graphique des bandes de puissances absolues de thêta et de gamma chez les souris Tg2576 et NTg en fonction des interactions propsées. Les bâtons représentent la moyenne et les barres d'erreur la SEM.*

De manière générale, on observe une augmentation des puissances de gamma et thêta chez les souris Tg2576 par rapport aux souris NTg, quelle que soit l'interaction proposée. Ces résultats sont en accord avec des données de l'équipe montrant une hyperexcitabilité hippocampique chez cette lignée de souris MA (Bezzina et al., 2015). De plus, nous observons des modifications de la puissance de gamma sont observées entre les interactions sociales et non-sociales indépendamment du génotype. En revanche, la puissance de gamma est inchangée par la présentation d'une souris familière ou nouvelle.

Dans la suite de cette étude, nous avons réalisé des expériences préliminaires visant à évaluer la contribution des PNN aux activités oscillatoires aberrantes. Pour cela, nous avons dégradé les PNN dans l'aire CA2 de souris NTg puis enregistré les

différentes bandes de fréquence chez ces souris (Figure 75). Nous observons que la souris NTg injectée avec la ChABC présente un patron d'activité des ondes thêta qui est aberrant et comparable à celui des souris Tg2576 (Figure 75A : NTg n=2: 5.76E-09 ± 1.49E-09 mV², Tg2576 n=4: 9.50E-09 ± 1.31E-09 mV², NTg-ChABC n=1 : 8,46E-09 mV²). En revanche, la puissance des ondes gamma reste inchangée après l'injection de ChABC (Figure 75B : NTg n=2: 2.06E-10 ± 8.75E-11 mV², Tg2576 n=4: 3.09E-10 ± 2.92E-11 mV², NTg-ChABC n=1 : 1,73E-10 mV²).

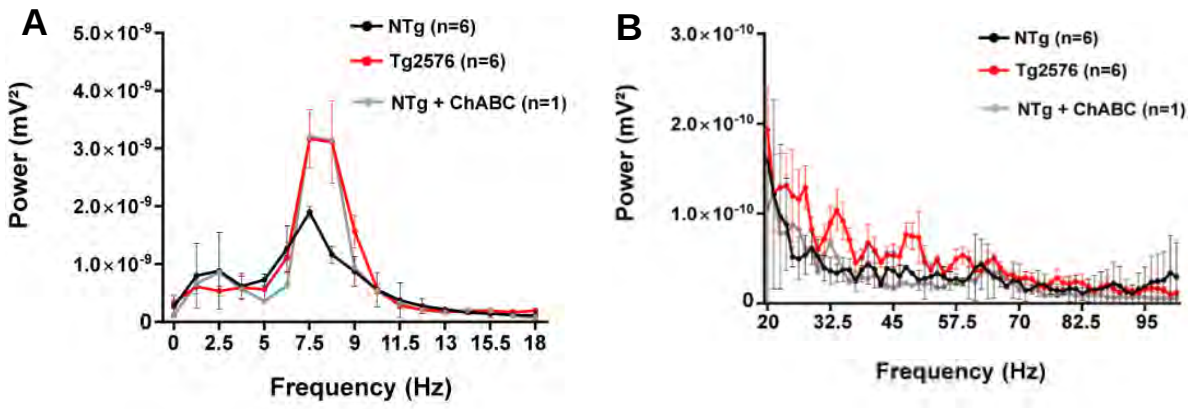


Figure 75 :
Gauche : *Représentation des bandes de puissances entre 0-20 Hz chez les souris Tg2576, NTg et NTg injectées avec la ChABC dans l'aire CA2.*
Droite : *Représentation des bandes de puissances entre 20-100 Hz chez les souris Tg2576, NTg et NTg injectées avec la ChABC dans l'aire CA2. L'injection de la ChABC semble provoquer une augmentation de la puissance de thêta sans modifier la puissance de gamma.*

Cette étude très préliminaire, indique que la perte des PNN de l'aire CA2, et plus largement dans l'hippocampe, pourrait perturber l'activité cérébrale en modifiant les ondes thêta, un phénomène qui est associé au trouble de mémoire sociale observé chez les souris Tg2576 et contrôles injectées avec du ChABC. Ces observations suggèrent que les PNN sont nécessaires à la régulation de l'activité du réseau hippocampique qui sous-tend les capacités de reconnaissance sociale et de mémoire sociales.

3.3. Conclusion

Nous avons obtenu des résultats préliminaires suggérant qu'une interaction sociale, même courte, suffirait à induire la formation de PNN autour des interneurones PV. Ceci soutient l'idée que la formation des PNN dépend de l'activation des PV (Dityatev et al., 2007). De plus, nos données d'activations cellulaires indiquent également que les

interneurones PV des souris contrôles sont activés lors d'une interaction sociale, que ce soit avec un individu familier ou non. Ce recrutement des interneurones PV de CA2 pourrait permettre l'intégration et le codage des informations mnésiques. De plus, les interneurones PV étant impliqués dans la synchronisation locale des neurones excitateurs, leur activation entraine probablement une augmentation des activités oscillatoires nécessaires à l'acquisition (Tort et al., 2009) et à la consolidation (Bandarabadi et al., 2017) mnésique.

De façon remarquable, l'activité des neurones PV des souris modèles de la MA ne varie pas en réponse à une interaction (sociale ou non).De plus, l'activité de l'aire CA2 de ces souris reste inchangée, même après une interaction sociale, ou l'exploration d'une cage vide. Ceci suggère que la présence d'un congénère ou d'un objet ne déclenche pas de traitement d'information dans l'aire CA2 des souris Tg2576. Ces résultats sont cohérents avec l'hyperexcitabilité (Bezzina et al., 2015) et les déficits de mémoire sociale (Deacon et al., 2009) observés chez les souris Tg2576.

CONCLUSION GÉNÉRALE

Ce travail de thèse nous a permis d'apporter des réponses aux objectifs fixés :

1) Définir le lien entre la maturation des interneurones à parvalbumine de l'aire CA2 et l'émergence de la mémoire sociale à la fin de l'adolescence.

Nos résultats ont permis de montrer que les souris juvéniles présentent une régulation inhibitrice immature dans l'aire CA2, associée à une incapacité à former une mémoire sociale. En effet, à cet âge, le faible niveau de PNN dans l'aire CA2 et l'immaturité du système NRG1/ErbB4 ne permettent pas l'induction de la iLTD dépendante des récepteurs delta opioïde. Nous avons par ailleurs démontré que dégrader les PNN dans l'aire CA2 de souris adultes induit une altération de la plasticité dépendante des interneurones PV associée à un déficit de mémoire sociale. Ainsi, nos résultats indiquent que la présence des PNN contribue à l'apparition de la plasticité dans l'aire CA2 des souris adultes, permettant l'émergence de la capacité à former une mémoire sociale.

2) Dysfonctionnements des interneurones à parvalbumine dans l'aire CA2 et les troubles de la mémoire sociale chez des souris modèles de la maladie d'Alzheimer.

Nos résultats indiquent que les souris Tg2576, modèle de la MA, présentent une altération importante des interneurones PV et de leur PNN dans l'aire CA2, associée à une diminution de la transmission inhibitrice et de la plasticité qui y est associée. Par ailleurs, nous avons montré que l'injection de NRG1 dans l'aire CA2 des souris Tg2576 est en mesure d'améliorer intégrité des interneurones PV en induisant leur maturation et la formation de PNN autour d'eux. Cela est associé à une restauration spécifique des troubles de la mémoire sociale. Ainsi, nous avons démontré que l'altération des interneurones PV et de leurs PNN dans l'aire CA2 est la cause des troubles de mémoire sociale des souris Tg2576, et que provoquer la maturation de ces neurones, *via* l'activation de la voie NRG1/ErbB4, permet de restaurer cette capacité de mémoire.

3) Caractériser les effets de l'interaction sociale sur l'activité des interneurones à parvalbumine de l'aire CA2

Cette partie de la thèse est une étude préliminaire sur les effets d'une interaction sociale sur l'activité cérébrale et la modification des interneurones PV. Nous avons observé qu'une stimulation sociale augmente la présence d'interneurones PV détectables et de PNN dans l'aire CA2 de souris Tg2576 et NTg. Ces résultats suggèrent que la stimulation sociale provoque une modification positive sur les interneurones PV. Nous avons confirmé une augmentation de l'activité cérébrale notamment des oscillations thêta et gamma chez les souris Tg2576 quelle que soit la stimulation sociale ou non-sociale. Enfin, nous avons montré que la dégradation des PNN dans l'aire CA2 chez des souris saines induit une augmentation de la puissance de thêta comme observé chez les souris Tg2576 suggérant que les PNN de l'aire CA2 jouent un rôle clé dans la régulation de l'activité hippocampique par les neurones PV.

DISCUSSION

Apparition des troubles de la mémoire sociale au cours de la MA.

Au cours de cette thèse, sur la base d'observations effectuées sur des souris Tg2576 à différents âges modélisant 4 stades de la MA (3 mois : prodromal, 6 mois : MCI, 9 mois : MA avérée, 13 mois : MA sévère), nous avons pu compléter les résultats obtenus par Cattaud et al., (2018) et améliorer notre compréhension du décours des perturbations interneuronales dans l'aire CA2 de l'hippocampe, qui accompagnent le développement des troubles de la mémoire sociale dans ce modèle murin.

Ainsi, nos données indiquent que les souris Tg2576 présentent à l'âge de 3 mois une tendance à la diminution du nombre d'interneurones PV entourés de PNN dans l'aire CA2 de l'hippocampe, associée à une forte diminution des PNN diffus dans la couche pyramidale de CA2. Cela suggère la présence d'une perturbation précoce de la plasticité PV-dépendante dans notre modèle. En accord avec ces observations, les souris Tg2576 de 3 mois présentent également une hyperexcitabilité et une hypersynchronie neuronale se traduisant par la présence de pointes interictales, causées par une diminution du tonus inhibiteur (Bezzina et al., 2015). Concernant les capacités cognitives, les souris Tg2576 montrent à cet âge une hyperactivité locomotrice associée à des troubles de mémoire de travail et de mémoire spatiale (King et al., 1999). Nos résultats indiquent que les souris Tg2576 de 3 mois présentent également un ralentissement de la formation de la mémoire sociale par rapport aux souris NTg du même âge. Ces résultats révèlent que, dès le stade précoce de la pathologie, les souris Tg2576 montrent une modification de la transmission inhibitrice dans l'aire CA2, associée à une perturbation de la mémoire sociale. Une étude plus approfondie des modifications de la plasticité dans l'aire CA2 des souris Tg2576 pourrait ainsi permettre de mieux comprendre la relation entre la diminution de PNN dans l'aire CA2 et les troubles de la mise en place de la mémoire sociale.

De façon intéressante, notre étude réalisée sur des souris juvéniles montre que ces individus pré-adolescents présentent le même schéma d'expression en PNN autour des interneurones PV dans l'aire CA2 que ce que nous observons chez les souris Tg2576 (Dominguez et al., 2019). Dans cette même étude, nous avons démontré que le niveau faible en PNN dans l'aire CA2 est associé à une absence de plasticité PV-dépendante et à une incapacité à former une mémoire sociale. Par ailleurs, l'émergence de la capacité à induire une iLTD dans l'aire CA2 des souris post-adolescentes implique l'activation de la voie NRG1/ErbB4. En effet, dans notre étude

les souris dont les DOR dont invalidés dans l'aire CA2, présentent un ralentissement de l'apprentissage social, rappelant ce qui est observé chez les souris Tg2576. Les DOR étant exprimés préférentiellement par les neurones PV, ces résultats confortent l'idée selon laquelle l'absence ou le ralentissement de l'apprentissage social est associé à l'altération des interneurones PV de l'aire CA2 (Dominguez et al., 2019). Il est donc possible que les DOR des interneurones PV soient absents ou dysfonctionnels chez les souris Tg2576 dès l'âge de 3 mois.
Ainsi, il serait intéressant de déterminer si la iLTD peut être induite chez les souris Tg2576 de 3 mois et si les mécanismes d'induction de la plasticité synaptique dans l'aire CA2 sont modifiés précocement dans ce modèle de la MA. D'autre part, ces résultats indiquent que lors du stade précoce de la pathologie, la faible concentration en Aβ intracérébral soluble coïncide avec la présence d'un phénotype immature, c'est-à-dire similaire à ce qui est observé dans les premières semaines post-natales, des neurones PV de l'aire CA2. Ainsi, la plasticité des interneurones PV de l'aire CA2 semble modifiée dès le stade précoce de la pathologie, causant probablement l'installation progressive des troubles de la mémoire sociale.

Avec l'âge, et donc l'avancement de la pathologie, on observe une importante réduction du nombre d'interneurones PV détectables, mais aussi une disparition des PNN autour de ces neurones dans l'aire CA2 des souris Tg2576. Ces modifications anatomiques sont importantes dès l'âge de 6 mois, et restent stables à 9 et 13 mois, malgré le fait que la pathologie continue de s'aggraver. Nous observons aussi une altération de la reconnaissance sociale chez les souris Tg2576 de 6 mois, suggérant ainsi que l'aggravation de l'état des interneurones PV et de leur PNN provoque des altérations cognitives plus prononcées que ce que nous avons observé à l'âge de 3 mois, notamment des troubles de la cognition sociale.
Au-delà de la diminution de PNN et du nombre d'interneurones PV détectables, nous avons observé une réduction de l'expression en parvalbumine dans les cellules PV+ dans l'aire CA2 des souris Tg2576 de 9 mois, suggérant une hypoactivité de cette population neuronale dans le contexte de la MA. Ceci est en accord avec le fait que l'absence de PNN autour des interneurones PV favorise l'apparition de synapses inhibitrices sur ces neurones, provoquant ainsi leurs inhibitions toniques et la diminution de l'expression PV (Donato et al., 2013). De plus, l'absence de PNN provoque une modification de l'excitabilité et de la résistance membranaire des

interneurones PV, causant une diminution de la libération de GABA, limitant ainsi leurs fonctions inhibitrices exercées dans le circuit hippocampique (Shi et al., 2019). Nos enregistrements électrophysiologiques de tranches d'hippocampe de souris Tg2576 démontrent les mêmes phénomènes dans l'altération de la transmission inhibitrice. En effet, l'aire CA2 des souris Tg2576 présente une diminution de la libération du GABA. Cette perturbation des interneurones PV est associée à une modification de la plasticité notamment dans la capacité à induire une iLTD ou une LTP dans l'aire CA2. Ces résultats révèlent donc une régulation inhibitrice réduite qui pourrait être la cause de la plasticité synaptique limitée mais aussi de l'hyperexcitabilité hippocampique observée chez ces souris modèles de la MA.
Il est désormais bien démontré que le bon fonctionnement des neurones PV est nécessaire à l'organisation de l'activité cérébrale, et notamment à la génération d'oscillations thêta et gamma (Verret et al., 2012, Amilhon et al., 2015, Sohal et al., 2009). Or les souris Tg2576 présentent une augmentation de la puissance des oscillations thêta et gamma sur leur EEG, en absence de toutes tâches cognitives (Bezzina, 2015). Par ailleurs, nous avons observé que la dégradation des PNN dans l'aire CA2 de souris sauvages induit une augmentation de la puissance de thêta, similaire à ce que nous avons observé chez les souris Tg2576, suggérant que la présence de PNN est nécessaire à la régulation de l'activité oscillatoire dans l'hippocampe. Mises ensemble, ces données soutiennent le lien entre la réduction des interneurones PV et de leur PNN, et l'activité cérébrale altérée chez les souris Tg2576. De plus, cette perturbation de l'activité neuronale semble être un facteur déterminant dans les troubles de mémoire sociale, observées chez les souris Tg2576.

De façon intéressante, nous avons observé chez les souris NTg une diminution du nombre d'interneurones PV et de leur PNN à l'âge de 13 mois. Cependant, aucune altération cognitive n'est observée chez ces souris, contrairement aux souris Tg2576 du même âge (Verret et al., 2013). Ces résultats suggèrent que les souris Tg2576 présentent un vieillissement ''accéléré'' des interneurones PV de l'aire CA2 qui ne dépend pas des mêmes mécanismes que chez les souris NTg. En effet, l'augmentation croissante de la concentration Aβ et l'apparition de plaques amyloïdes chez les souris Tg2576 provoquent la mise en place de mécanismes compensatoires comme l'hyperexcitabilité hippocampique. La présence de l'amyloïdopathie chez les souris Tg2576 provoque des altérations de la plasticité synaptique sur les interneurones PV

par des mécanismes encore mal connu. De nombreuses études ont essayé de limiter les effets délétères de l'Aβ en utilisant des molécules permettant de limiter l'activation de la voie amyloïdogène (Rey et al., 2020 ; Annexe 3). Cependant, les premiers essais cliniques réalisés avec ces molécules visant à réduire Aβ dans le cerveau des patients MA montrent un bénéfice très limité sur leurs fonctions cognitives. Ce manque d'efficacité pourrait notamment être causé par la prise en charge trop tardive des patients. En effet, il est possible que l'utilisation de médicaments visant à réduire la charge amyloïde soit plus efficace au stade précoce. En ce sens, l'utilisation de modèle transgénique progressif de la pathologie, telles que les souris Tg2576, permettrait d'évaluer un bénéfice de ces stratégies dès les formes précoces.

Modification des composants des PNN chez les souris Tg2576.

Lors de cette étude, nous avons observé une forte diminution des PNN autour des interneurones PV et une réduction de l'expression en PNN au sein de l'aire CA2 des souris Tg2576. Dans notre étude, nous avons utilisé la WFA afin de visualiser les PNN, et ainsi déterminer leur présence et leur niveau d'expression dans l'aire CA2. La WFA est une protéine reconnaissant les résidus N-acetyl-D-galactosamines sur les aggrecans qui composent les PNN (Yamada et Jinno, 2017). Afin de mieux comprendre les interactions entre les différents composants des PNN au cours du développement de la pathologie, d'autres marqueurs de PNN peuvent être utilisés comme brevican, neurocan, versican et aggrecan, ainsi que les protéines de liaisons comme Tn-R. De façon intéressante, nous avons effectué des expériences préliminaires révélant que les souris Tg2576 de 9 mois présentent le même niveau d'expression d'aggrecan dans l'aire CA2 que les souris NTg du même âge (données non-montrées). La réduction des interneurones PV détectables dans l'aire CA2 et la modification de la plasticité chez les souris Tg2576 ne sont donc pas *a priori* liées à une perturbation d'aggrecan mais pourraient être dues à la disparition d'autres composants des PNN. D'autre part, nous avons constaté que la dégradation des PNN dans l'aire CA2 par la ChABC ne provoque pas non plus de modification du marquage aggrecan. Ces résultats suggèrent que l'utilisation de la ChABC est un bon outil pour simuler la perte des PNN observée chez les souris Tg2576. Par conséquent, mieux caractériser la composition des PNN chez les souris Tg2576 tout au long de la pathologie, permettrait de déterminer quelles sont les causes de la perte de PNN

autour des interneurones PV au sein de l'aire CA2. Nous pourrons ainsi potentiellement intervenir sur leur mécanisme de production et favoriser la formation des PNN chez les souris Tg2576.

Cependant, il est aussi possible que les constituants moléculaires des PNN soient présents dans le contexte de la MA, mais que leur organisation en maillage, sous-tendant leur fonction, et reconnu par la WFA, soit absente. Dans ce cadre, l'utilisation de l'imagerie à super résolution STORM (Stochastic Optical Reconstruction Microscopy) permettrait d'observer l'arrangement structural des PNN. En effet, la densité du maillage qui forme le PNN confère des propriétés synaptiques différentes au neurone qui l'entoure (Sigal et al., 2019). Dans le cortex visuel, un maillage plus large et moins dense de PNN avec une intensité faible est observé sur les interneurones immatures de souris âgées de 30 jours. Cette configuration est associée à un nombre important de synapses excitatrices (Vglut2) et un faible nombre en synapses inhibitrices (Syt2) sur les neurones PV. Au contraire, les PNN matures de souris âgées de 90 jours montrent un maillage plus dense et serré avec une forte densité en synapses inhibitrices sur les neurones PV (Sigal et al., 2019). Cependant, des études sur l'hippocampe montrent que l'absence de PNN autour des neurones PV est associée à une diminution du nombre de synapses excitatrices (Vglut1+ ou Basson+), suggérant que les interneurones PV reçoivent alors moins d'afférences excitatrices (Favuzzi et al., 2017 ; Donato et al., 2013). Bien que contradictoires, ces travaux indiquent que la structure des PNN dépend de leur degré de maturation, ce qui sous-tend par ailleurs, la nature et le nombre des entrées synaptiques sur les neurones PV, et donc du niveau d'activité de ceux-ci. Dans ce contexte, l'analyse de la structure des PNN par l'imagerie à super résolution en condition pathologique permettrait de déterminer la nature des modifications des entrées synaptiques sur les interneurones PV des souris Tg2576

Effet de la NRG1 sur la régulation des interneurones PV en condition pathologique.

Nos résultats montrent que l'injection de NRG1 dans l'aire CA2 des souris Tg2576 favorise la formation de PNN autour des neurones PV. Les interneurones PV montrent alors un phénotype « mature », associé à une restauration des capacités de formation de la mémoire sociale chez ces souris.

Plusieurs études révèlent le rôle de la voie NRG1-ErbB4 dans la régulation des mécanismes cellulaires sous-tendant la formation des fonctions cognitives dans la maladie d'Alzheimer. En effet, l'injection intra-cérébro-ventriculaire de NRG1 pendant 1 mois permet d'augmenter le nombre d'épines dendritiques et de densités post-synaptiques sur les neurones pyramidaux de l'aire CA1 de souris Tg2576 âgées de 13 mois (Ryu et al., 2016). Dans cette même étude, l'augmentation des contacts synaptiques sur les neurones excitateurs est associée à une restauration des performances de mémoire spatiale mesurée dans le test de piscine de Morris. Ainsi, associés à cette étude, nos résultats semblent montrer que NRG1 modifie la transmission synaptique dans l'hippocampe de souris Tg2576, améliorant leurs fonctions cognitives. Des études plus approfondies devront être effectuées pour déterminer ce que provoque l'injection de NRG1 dans l'aire CA2 au niveau des interneurones PV ; par exemple, la mesure du nombre de synapses inhibitrices et excitatrices sur les interneurones PV permettrait de mieux comprendre les modifications induites par l'activation de la voie NRG1/ErbB4, et dans quelle mesure la présence de PNN est nécessaire à l'observation de cet effet.

Au niveau cellulaire, l'application de NRG1 augmente la présence d'APP transmembranaire et la sécrétion du sAPPα dans le milieu extracellulaire, suggérant que NRG1 stimule la voie non-amyloïdogène (Kim et al., 2018). Par ailleurs, l'application préalable de NRG1 sur des tranches d'hippocampe incubées avec le peptide Aβ, permet de préserver la capacité d'induction de la LTP, normalement altérée par la présence du peptide Aβ (Min et al., 2011 ; Woo et al., 2012). La présence de NRG1 permet également de diminuer les réactions cytotoxiques et la mort neuronale dans des cultures neuronales incubées avec APP (Ryu et al., 2012 ; Woo et al., 2012). Par conséquent, NRG1 semble diminuer les effets délétères du peptide Aβ sur le fonctionnement des neurones ; il est donc possible que, dans notre étude, la présence de NRG1 protège les neurones PV de la présence néfaste d'Aβ, induisant par ce biais une amélioration de leur fonction. Cependant, on ignore à ce jour si la perturbation du fonctionnement des neurones PV dans le cadre de la MA est une conséquence directe de la présence d'Aβ.

En contradiction avec le potentiel rôle bénéfique de NRG1 dans la pathologie amyloïde, l'expression de son récepteur ErbB4 est plus importante chez les patients et certains modèles de la MA (Woo et al., 2011). De plus, la délétion d'ErbB4 sur les interneurones PV des souris hAPPJ20 permet d'atténuer les déficits de plasticité

synaptique, notamment de l'induction de LTP, et augmente les performances dans un test de mémoire spatiale (Zhang et al., 2017). De plus, l'utilisation d'un antagoniste ErbB sur des tranches d'hippocampe de souris Tg2576 âgées de 6-7 mois permet de restaurer partiellement la LTP dans l'aire CA1 (Huh et al., 2016). Par ailleurs, il a été observé une présence importante NRG1 et ErbB4 autour des dépôts amyloïdes de souris APP/PS1 et chez les patients MA (Chaudhury et al., 2003). De plus, une interaction directe entre ErbB4 et le peptide Aβ a été mise en évidence par co-immunoprécipitation, suggérant que l'accumulation du peptide Aβ en condition pathologique perturbe la signalisation NRG1-ErbB4 (Zhang et al., 2017).
Ainsi, bien que la nature de la dérégulation de la voie NRG1-ErbB4 induite par la MA reste mal comprise, cette voie de signalisation semble fortement impliquée dans l'expression des déficits de plasticité synaptique et de mémoire associés à la pathologie. Par conséquent, mesurer le niveau d'Aβ soluble et sous forme d'oligomères par western blot chez les souris Tg2576 injectées ou non avec NRG1 permettrait de déterminer les conséquences de la présence de NRG1 sur l'amyloïdopathie.

Par ailleurs, il est encore difficile de comprendre le rôle de NRG1 sur la mise en place de la plasticité dans l'aire CA2 des souris Tg2576. Des enregistrements électrophysiologiques seraient nécessaires afin de déterminer les effets de l'amélioration des interneurones PV et de leurs PNN sur la plasticité de l'aire CA2. En effet, nous avons constaté que l'injection de NRG1 provoque une augmentation de la concentration en parvalbumine et la formation des PNN sur les interneurones PV, suggérant que NRG1 augmente la plasticité synaptique sur ces interneurones. De plus, comme vu précédemment, l'infusion de NRG1 pendant 1 mois provoque l'apparition d'épines dendritiques sur les neurones excitateurs, ce qui pourrait induire une augmentation de l'activité de ces neurones, qui pourraient à leur tour stimuler les interneurones PV (Ryu et al., 2016). En accord avec cette idée, l'application de NRG1 sur les tranches d'hippocampe induit l'augmentation de l'amplitude des courants post-synaptiques inhibiteurs (IPSC) sur les neurones pyramidaux de l'aire CA1, suggérant une augmentation de l'activité des interneurones inhibiteurs (Chen et al., 2010). Par conséquent, l'injection de NRG1 permettrait de restaurer directement et/ou indirectement la libération de GABA par les interneurones PV des souris Tg2576, favorisant l'instauration de plasticité hippocampique.

Par ailleurs, nous avons démontré que la plasticité PV-dépendante de l'aire CA2 nécessaire à l'établissement de la mémoire sociale dépend de la présence des PNN et de l'activation de la voie NRG1-ErbB4 (Dominguez et al., 2019). Ceci suggère que, chez les souris Tg2576, la réapparition des PNN autour des interneurones PV suite à l'injection de NRG1 s'accompagne de la restauration de la capacité à induire la iLTD dans l'aire CA2. Il serait donc intéressant de déterminer chez les souris Tg2576 si l'iLTD de l'aire CA2 est rétablie 5 jours après l'injection de NRG1, c'est-à-dire au moment où nous observons l'augmentation de PNN et l'amélioration de la mémoire sociale.

D'autre part, nous ne connaissons pas les effets à long terme de l'injection de NRG1 sur les propriétés des neurones PV ou du comportement des souris Tg2576. En effet, la restauration de la mémoire sociale et l'amélioration de la plasticité pourraient n'être que temporaire, et des injections répétées de NRG1 seraient alors nécessaires pour pallier aux altérations causées par la MA. Il serait donc important de déterminer la durée des effets bénéfiques de la NRG1 en condition pathologique.

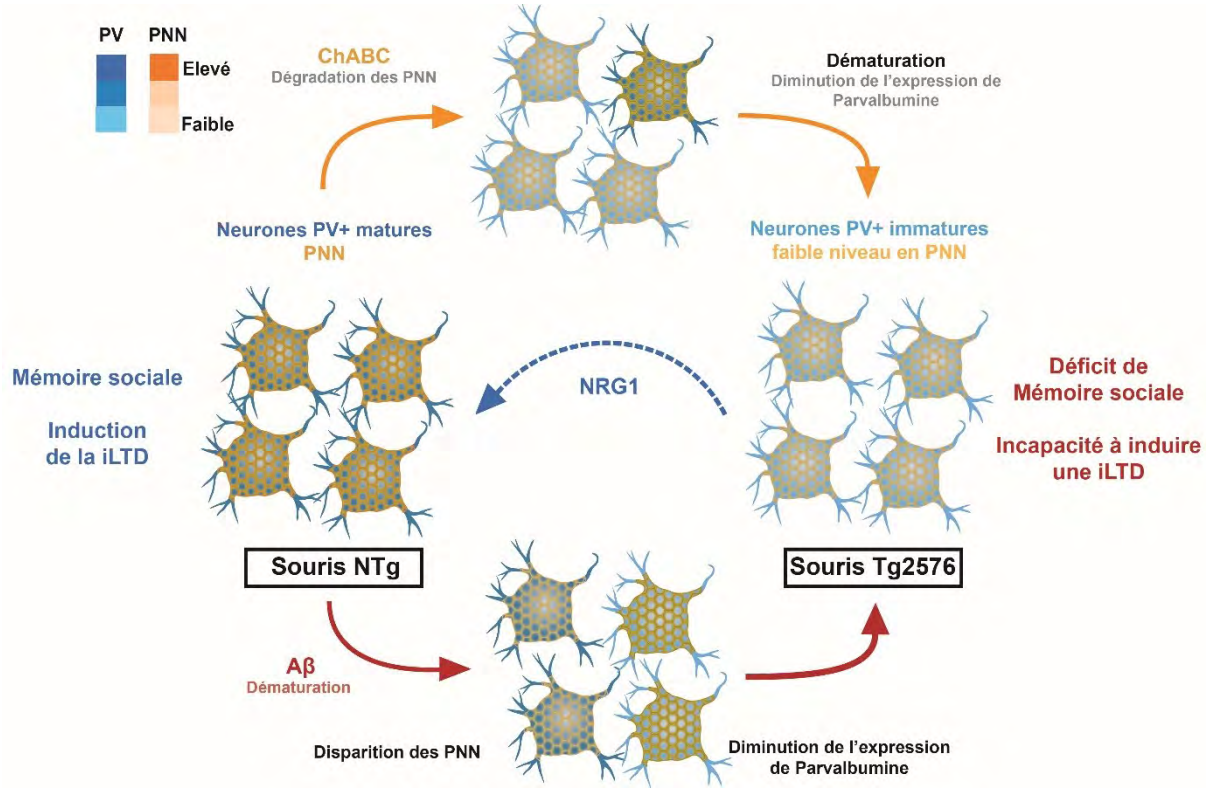


Figure 76 : Représentation synthétique des mécanismes de régulation des interneurones PV et de leur PNN dans l'aire CA2 chez des souris saines et modèles de la MA.
Gauche *: Chez les souris NTg et adultes, on observe des interneurones PV matures entourés de PNN (neurones bleu foncé)dans l'aire CA2.La présence de PNN est associée à la capacité à induire la iLTD dans l'aire CA2 et à former une mémoire sociale.*
Haut *: La dégradation des PNN dans l'aire CA2 par la ChABC (flèches oranges) provoque une dématuration des interneurones PV observable par une diminution de l'expression en parvalbumine dans leur soma (neurones bleu clair), et empêche l'induction de la iLTD et la formation de la mémoire sociale.*
Bas *: En condition pathologique (flèche rouge), l'accumulation d'Aβ induirait une dématuration des interneurones PV observable par une disparition des PNN et une diminution de l'expression somatique en parvalbumine.*
Droite : *L'altération des interneurones PV par la présence d'Aβ provoque une perturbation de la iLTD dans l'aire CA2 et un déficit de mémoire sociale chez les souris Tg2576.*
Centre : *L'injection de NRG1 dans l'aire CA2 (flèche bleu) augmente l'expression en parvalbumine dans les interneurones PV et induit la formation des PNN. L'amélioration des interneurones PV chez les souris Tg2576 est alors associée à une restauration de la mémoire sociale. De plus, la réapparition des PNN autour des interneurones PV suite à l'injection de NRG1 pourrait s'accompagner de la restauration de la capacité à induire la iLTD dans l'aire CA2 des souris Tg2576.*

Modification de la présence des interneurones PV et de leur PNN chez les souris Tg2576 en fonction d'un apprentissage.

Les travaux récents de notre équipe auxquels j'ai pu participer (Cattaud et al., 2018) montrent qu'exposer des souris (Tg2576 ou NTg) à un environnement enrichi ne provoque pas les mêmes effets en fonction du génotype. En effet, les souris Tg2576 présentent une augmentation du nombre d'interneurones PV et de leur PNN après un

séjour dans un environnement enrichi (Cattaud et al., 2018). À l'inverse, l'environnement enrichi provoque chez les souris NTg une diminution des neurones PV détectables et de leur PNN par rapport à des souris élevées en condition standard, comme décrit dans des travaux précédents (Favuzzi et al., 2017 ; Donato et al., 2013). Ces résultats révèlent que les interneurones PV et leur PNN réagissent différemment en fonction de l'apprentissage et en fonction de la condition, pathologique ou non. Chez les souris NTg, la diminution du nombre d'interneurones PV et de leur PNN serait due aux stimulations non spécifiques de l'environnement enrichi. La réouverture de la période critique rendrait les interneurones PV plus facilement recrutables, ce qui faciliterait l'encodage des informations, hypothèse soutenue par des travaux récents (Donato et al., 2013; Favuzzi et al., 2017).

Chez les souris Tg2576, nos données démontrent que l'exposition à l'environnement enrichi induit une augmentation du nombre d'interneurones PV détectables et de leur PNN. Cela suggère que la transition entre un milieu appauvri (cage standard) et un milieu enrichi en stimulations (sociales, cognitives, motrices, sensorielles…) est propice à l'activation des interneurones PV et à la formation de leur PNN (Cattaud et al., 2018). De la même manière, dans l'aire CA2, la stimulation sociale induit l'apparition des PNN autour des interneurones PV. En effet, nos résultats préliminaires suggèrent que l'interaction avec un nouvel individu ou la présentation d'un congénère augmentent le nombre d'interneurones PV entourés de PNN dans l'aire CA2 des souris Tg2576 et NTg. Ces résultats vont dans l'idée que l'interaction sociale peut être en mesure de provoquer une augmentation de la plasticité synaptique en favorisant l'activité des interneurones PV. D'autres études montrent le même phénomène dans l'aire CA1 et CA3 après un conditionnement de peur. En effet, des souris soumises à un conditionnement de peur présentent une augmentation de la proportion des neurones « high-PV », associée à une augmentation de la présence de PNN autour d'eux (Donato et al., 2013 ; Sigal et al., 2019). Il est possible que les interneurones PV dans l'aire CA2 soient plus sensibles à une stimulation sociale ; la compréhension de ce mécanisme pourrait être clé à la compréhension de la mémoire sociale.

Origine des PNN autour des interneurones PV et du marquage diffus dans l'aire CA2.

La forte densité en interneurones PV dans l'aire CA2 est associée à une forte présence en PNN. Cependant, l'aire CA2 présente dans la couche pyramidale une présence

diffuse de PNN qui est sujette à controverse. En effet, certaines études montrent que les PNN dans l'aire CA2 sont localisés autour des neurones pyramidaux (Carstens et al., 2016). Notre étude semble au contraire indiquer que ces marquages sont localisés sur la partie terminale des axones des interneurones PV contactant les neurones pyramidaux de l'aire CA2 (Dominguez et al., 2019). Une façon de déterminer si ces PNN sont associés aux neurones excitateurs ou inhibiteurs de CA2 serait d'identifier quels neurones produisent les molécules qui forment les PNN. Or, il apparaît que les composants des PNN sont à l'origine produits par les interneurones PV et les cellules astrocytaires (Giamanco et Matthews, 2012 ; Favuzzi et al., 2017). Plus spécifiquement, il est probable que les PNN périsomatiques des interneurones PV sont issus de composants produits par les neurones PV eux-mêmes, alors que le marquage diffus observé dans l'aire CA2 pourrait provenir de composants produits par les astrocytes (Favuzzi et al., 2017). Dans notre étude, nous avons fait l'observation que l'injection de NRG1 provoque une réapparition de PNN autour des interneurones PV. En revanche, le marquage diffus reste faible voire absent chez les souris Tg2576, malgré l'injection de NRG1. Ainsi, ces deux formes de PNN seraient issues de mécanismes fonctionnels différents. Il est possible que NRG1 provoque la présence de PNN en provoquant l'activation des interneurones PV *via* l'interaction avec son récepteur ErbB4 (Bean et al., 2014 ; Fazzari et al., 2010) ; en revanche, NRG1 n'a pas d'impact sur la formation des PNN diffus, issus de régulation par les astrocytes. D'autre part, nos résultats préliminaires indiquent que la stimulation sociale provoque les mêmes effets que NRG1 sur les PNN. En effet, l'aire CA2 des souris Tg2576 présentent un plus grand nombre d'interneurones PV entourés de PNN après une stimulation sociale, alors que l'expression du marquage diffus n'est pas modifiée. En revanche, le passage des souris Tg2576 dans un environnement enrichi restaure les PNN périsomatiques, et augmente aussi significativement le marquage diffus de PNN par rapport aux conditions standards ; cependant, malgré cette augmentation, la présence de PNN diffus reste bien moins importante que ce qui est observé chez les souris NTg (Cattaud et al., 2018). Il est possible que la formation des PNN autour des somas des interneurones PV soit un événement précoce, pouvant apparaitre directement après une stimulation sociale. En revanche, la mise en place des PNN diffus serait plus lente et sa formation demanderait des stimulations plus soutenues à long terme. Il semble donc que l'expression des PNN dans l'aire CA2 varie en fonction de la tâche cognitive et recrutant possiblement des populations cellulaires différentes.

En conclusion ces travaux de thèse démontrent le rôle majeur des PNN et des interneurones PV de l'aire CA2 dans la formation de la mémoire sociale. D'autre part, l'étude des mécanismes responsables de la perturbation des interneurones PV permettrait d'intervenir même à des stades avancés de la pathologie. En effet, de nombreuses études montrent que palier au déficit d'activation des interneurones PV par l'amélioration de leur capacité de régulation (Verret et al., 2012) ou en favorisant leur stimulation (Iaccarino et al., 2016 ; Cattaud et al., 2018) permettrait de restaurer les fonctions cognitives dans la MA. Il est donc nécessaire de continuer à étudier les mécanismes sous-tendant l'altération des PNN dans la MA afin de développer des stratégies pour limiter leur disparition.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Ajmo, J. M., Eakin, A. K., Hamel, M. G.,Gottschall, P. E., 2008. Discordant localization of WFA reactivity and brevican/ADAMTS-derived fragment in rodent brain. *BMC Neuroscience*, 9: 14.

Alexander, G. M., Farris, S., Pirone, J. R., Zheng, C., Colgin, L. L.,Dudek, S. M., 2016. Social and novel contexts modify hippocampal CA2 representations of space. *Nature Communications*, 7: 10300.

Amilhon, B., Huh, C. Y., Manseau, F., Ducharme, G., Nichol, H., Adamantidis, A.,Williams, S., 2015. Parvalbumin Interneurons of Hippocampus Tune Population Activity at Theta Frequency. *Neuron*, 86: 1277-1289.

Andersen, P., Bliss, T. V., Lomo, T., Olsen, L. I.,Skrede, K. K., 1969. Lamellar organization of hippocampal excitatory pathways. *Acta Physiol Scand*, 76: 4A-5A.

Aranda, L., Santin, L. J., Begega, A., Aguirre, J. A.,Arias, J. L., 2006. Supramammillary and adjacent nuclei lesions impair spatial working memory and induce anxiolitic-like behavior. *Behav Brain Res*, 167: 156-164.

Argiolas, A.,Gessa, G. L., 1991. Central functions of oxytocin. *Neurosci Biobehav Rev*, 15: 217-231.

Avale, M. E., Chabout, J., Pons, S., Serreau, P., De Chaumont, F., Olivo-Marin, J. C., Bourgeois, J. P., Maskos, U., Changeux, J. P.,Granon, S., 2011. Prefrontal nicotinic receptors control novel social interaction between mice. *FASEB J*, 25: 2145-2155.

Babiloni, C., Binetti, G., Cassetta, E., Cerboneschi, D., Dal Forno, G., Del Percio, C., Ferreri, F., Ferri, R., Lanuzza, B., Miniussi, C., Moretti, D. V., Nobili, F., Pascual-Marqui, R. D., Rodriguez, G., Romani, G. L., Salinari, S., Tecchio, F., Vitali, P., Zanetti, O., Zappasodi, F.,Rossini, P. M., 2004. Mapping distributed sources of cortical rhythms in mild Alzheimer's disease. A multicentric EEG study. *Neuroimage*, 22: 57-67.

Baig, S., Wilcock, G. K.,Love, S., 2005. Loss of perineuronal net N-acetylgalactosamine in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathologica*, 110: 393-401.

Bakkour, A., Morris, J. C.,Dickerson, B. C., 2009. The cortical signature of prodromal AD: regional thinning predicts mild AD dementia. *Neurology*, 72: 1048-1055.

Bandarabadi, Mojtaba, Boyce, Richard, Herrera, Carolina Gutierrez, Bassetti, Claudio, Williams, Sylvain, Schindler, Kaspar,Adamantidis, Antoine. 2017. Dynamical modulation of theta-gamma coupling during REM sleep. *bioRxiv*.

Banerjee, S. B., Gutzeit, V. A., Baman, J., Aoued, H. S., Doshi, N. K., Liu, R. C.,Ressler, K. J., 2017. Perineuronal Nets in the Adult Sensory Cortex Are Necessary for Fear Learning. *Neuron*, 95: 169-179 e163.

Barnes, D. E.,Yaffe, K., 2011. The projected effect of risk factor reduction on Alzheimer's disease prevalence. *Lancet Neurol*, 10: 819-828.

Beach, T. G., Sue, L. I., Walker, D. G., Roher, A. E., Lue, L. F., Vedders, L., Connor, D. J., Sabbagh, M. N.,Rogers, J., 2008. The Sun Health Research Institute Brain Donation Program: Description and experience, 1987-2007. *Cell and Tissue Banking*, 9: 229-245.

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

Beck, C. H.,Fibiger, H. C., 1995. Conditioned fear-induced changes in behavior and in the expression of the immediate early gene c-fos: with and without diazepam pretreatment. *The Journal of Neuroscience*, 15: 709-720.

Bediou, B., Ryff, I., Mercier, B., Milliery, M., Henaff, M. A., D'Amato, T., Bonnefoy, M., Vighetto, A.,Krolak-Salmon, P., 2009. Impaired social cognition in mild Alzheimer disease. *J Geriatr Psychiatry Neurol*, 22: 130-140.

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

Bezzina, C., 2015. L'hypersynchronie neuronale chez les souris Tg2576 modèles de la maladie d'Alzheimer et sa modulation par l'enrichissement environnemental. Thèse.

Bezzina, C., Halley, H., Rampon, C., Verret, L.,Dahan, L., En préparation. Early increase in oscillatory activity in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease.

Bezzina, C., Verret, L., Juan, C., Remaud, J., Halley, H., Rampon, C.,Dahan, L., 2015. Early onset of hypersynchronous network activity and expression of a marker of chronic seizures in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *PLoS One*, 10: e0119910.

Bicks, L. K., Koike, H., Akbarian, S.,Morishita, H., 2015. Prefrontal Cortex and Social Cognition in Mouse and Man. *Front Psychol*, 6: 1805.

Bienkowski, M. S., Bowman, I., Song, M. Y., Gou, L., Ard, T., Cotter, K., Zhu, M., Benavidez, N. L., Yamashita, S., Abu-Jaber, J., Azam, S., Lo, D., Foster, N. N., Hintiryan, H.,Dong, H. W., 2018. Integration of gene expression and brain-wide connectivity reveals the multiscale organization of mouse hippocampal networks. *Nature Neuroscience*, 21: 1628-1643.

Blakemore, S. J., 2008. Development of the social brain during adolescence. *Q J Exp Psychol (Hove)*, 61: 40-49.

Borhegyi, Z.,Leranth, C., 1997. Substance P innervation of the rat hippocampal formation. *J Comp Neurol*, 384: 41-58.

Botcher, N. A., Falck, J. E., Thomson, A. M.,Mercer, A., 2014. Distribution of interneurons in the CA2 region of the rat hippocampus. *Front Neuroanat*, 8: 104.

Bott, J. B., Muller, M. A., Jackson, J., Aubert, J., Cassel, J. C., Mathis, C.,Goutagny, R., 2016. Spatial Reference Memory is Associated with Modulation of Theta-Gamma Coupling in the Dentate Gyrus. *Cereb Cortex*, 26: 3744-3753.

Boyce, R., Glasgow, S. D., Williams, S.,Adamantidis, A., 2016. Causal evidence for the role of REM sleep theta rhythm in contextual memory consolidation. *Science*, 352: 812-816.

Braak, H.,Braak, E., 1991. Neuropathological stageing of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol*, 82: 239-259.

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

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

Bruckner, G., Brauer, K., Hartig, W., Wolff, J. R., Rickmann, M. J., Derouiche, A., Delpech, B., Girard, N., Oertel, W. H.,Reichenbach, A., 1993. Perineuronal nets provide a polyanionic, glia-

associated form of microenvironment around certain neurons in many parts of the rat brain. *Glia*, 8: 183-200.

Bruckner, G., Bringmann, A., Hartig, W., Koppe, 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.

Bruckner, G., Grosche, J., Hartlage-Rubsamen, M., Schmidt, S.,Schachner, M., 2003. Region and lamina-specific distribution of extracellular matrix proteoglycans, hyaluronan and tenascin-R in the mouse hippocampal formation. *J Chem Neuroanat*, 26: 37-50.

Bruckner, G., Hausen, D., Hartig, W., Drlicek, M., Arendt, T.,Brauer, K., 1999. Cortical areas abundant in extracellular matrix chondroitin sulphate proteoglycans are less affected by cytoskeletal changes in Alzheimer's disease. *Neuroscience*, 92: 791-805.

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

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

Buzsaki, G.,Draguhn, A., 2004. Neuronal oscillations in cortical networks. *Science*, 304: 1926-1929.

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

Cabungcal, J. H., Steullet, P., Kraftsik, R., Cuenod, M.,Do, K. Q., 2013. Early-life insults impair parvalbumin interneurons via oxidative stress: reversal by N-acetylcysteine. *Biol Psychiatry*, 73: 574-582.

Cabungcal, J. H., Steullet, P., Morishita, H., Kraftsik, R., Cuenod, M., Hensch, T. K.,Do, K. Q., 2013. Perineuronal nets protect fast-spiking interneurons against oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110: 9130-9135.

Cardin, J. A., 2018. Inhibitory Interneurons Regulate Temporal Precision and Correlations in Cortical Circuits. *Trends in Neurosciences*, 41: 689-700.

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

Cardin, J. A., Kumbhani, R. D., Contreras, D.,Palmer, L. A., 2010. Cellular Mechanisms of Temporal Sensitivity in Visual Cortex Neurons. *The Journal of Neuroscience*, 30: 3652-3662.

Caroni, P., 2015. Inhibitory microcircuit modules in hippocampal learning. *Curr Opin Neurobiol*, 35: 66-73.

Carstens, K. E., Phillips, M. L., Pozzo-Miller, L., Weinberg, R. J.,Dudek, S. M., 2016. Perineuronal Nets Suppress Plasticity of Excitatory Synapses on CA2 Pyramidal Neurons. *The Journal of Neuroscience*, 36: 6312-6320.

Cattaud, V., Bezzina, C., Rey, C. C., Lejards, C., Dahan, L.,Verret, L., 2018. Early disruption of parvalbumin expression and perineuronal nets in the hippocampus of the Tg2576 mouse

model of Alzheimer's disease can be rescued by enriched environment. *Neurobiology of Aging*, 72: 147-158.

Celio, M. R., 1993. Perineuronal nets of extracellular matrix around parvalbumin-containing neurons of the hippocampus. *Hippocampus*, 3 Spec No: 55-60.

Celio, M. R., Spreafico, R., De Biasi, S.,Vitellaro-Zuccarello, L., 1998. Perineuronal nets: past and present. *Trends in Neurosciences*, 21: 510-515.

Chamberland, S.,Topolnik, L., 2012. Inhibitory control of hippocampal inhibitory neurons. *Frontiers in Neuroscience*, 6.

Chaudhury, A. R., Gerecke, K. M., Wyss, J. M., Morgan, D. G., Gordon, M. N.,Carroll, S. L., 2003. Neuregulin-1 and ErbB4 immunoreactivity is associated with neuritic plaques in Alzheimer disease brain and in a transgenic model of Alzheimer disease. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 62: 42-54.

Chen, C. M., Stanford, A. D., Mao, X., Abi-Dargham, A., Shungu, D. C., Lisanby, S. H., Schroeder, C. E.,Kegeles, L. S., 2014. GABA level, gamma oscillation, and working memory performance in schizophrenia. *Neuroimage Clin*, 4: 531-539.

Chen, Q., Panksepp, J. B.,Lahvis, G. P., 2009. Empathy is moderated by genetic background in mice. *PLoS One*, 4: e4387.

Chen, Y. J., Zhang, M., Yin, D. M., Wen, L., Ting, A., Wang, P., Lu, Y. S., Zhu, X. H., Li, S. J., Wu, C. Y., Wang, X. M., Lai, C., Xiong, W. C., Mei, L.,Gao, T. M., 2010. ErbB4 in parvalbumin-positive interneurons is critical for neuregulin 1 regulation of long-term potentiation. *PNAS*, 107: 21818-21823.

Chevaleyre, V.,Siegelbaum, S. A., 2010. Strong CA2 pyramidal neuron synapses define a powerful disynaptic cortico-hippocampal loop. *Neuron*, 66: 560-572.

Cho, H., Lee, H. S., Choi, J. Y., Lee, J. H., Ryu, Y. H., Lee, M. S.,Lyoo, C. H., 2018. Predicted sequence of cortical tau and amyloid-beta deposition in Alzheimer disease spectrum. *Neurobiology of Aging*, 68: 76-84.

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

Coben, L. A., Chi, D., Snyder, A. Z.,Storandt, M., 1990. Replication of a study of frequency analysis of the resting awake EEG in mild probable Alzheimer's disease. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, 75: 148-154.

Colliot, O., Chetelat, G., Chupin, M., Desgranges, B., Magnin, B., Benali, H., Dubois, B., Garnero, L., Eustache, F.,Lehericy, S., 2008. Discrimination between Alzheimer disease, mild cognitive impairment, and normal aging by using automated segmentation of the hippocampus. *Radiology*, 248: 194-201.

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

Crain, B. J., Chang, K. J.,Mcnamara, J. O., 1986. Quantitative Autoradiographic Analysis of Mu-Opioid and Delta-Opioid Binding-Sites in the Rat Hippocampal-Formation. *Journal of Comparative Neurology*, 246: 170-180.

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

Crawley, J. N., Chen, T., Puri, A., Washburn, R., Sullivan, T. L., Hill, J. M., Young, N. B., Nadler, J. J., Moy, S. S., Young, L. J., Caldwell, H. K.,Young, W. S., 2007. Social approach behaviors in oxytocin knockout mice: comparison of two independent lines tested in different laboratory environments. *Neuropeptides*, 41: 145-163.

Cui, Z., Gerfen, C. R.,Young, W. S., 3rd. 2013. Hypothalamic and other connections with dorsal CA2 area of the mouse hippocampus. *The Journal of Comparative Neurology*, 521: 1844-1866.

Day, A. J.,Prestwich, G. D., 2002. Hyaluronan-binding proteins: tying up the giant. *J Biol Chem*, 277: 4585-4588.

De Wied, D., 1965. The Influence of the Posterior and Intermediate Lobe of the Pituitary and Pituitary Peptides on the Maintenance of a Conditioned Avoidance Response in Rats. *Int J Neuropharmacol*, 4: 157-167.

Deacon, R. M., Koros, E., Bornemann, K. D.,Rawlins, J. N., 2009. Aged Tg2576 mice are impaired on social memory and open field habituation tests. *Behav Brain Res*, 197: 466-468.

Del Rio, M. R.,DeFelipe, J., 1994. A study of SMI 32-stained pyramidal cells, parvalbumin-immunoreactive chandelier cells, and presumptive thalamocortical axons in the human temporal neocortex. *The Journal of Comparative Neurology*, 342: 389-408.

Dick, G., Tan, C. L., Alves, J. N., Ehlert, E. M., Miller, G. M., Hsieh-Wilson, L. C., Sugahara, K., Oosterhof, A., van Kuppevelt, T. H., Verhaagen, J., Fawcett, J. W.,Kwok, J. C., 2013. Semaphorin 3A binds to the perineuronal nets via chondroitin sulfate type E motifs in rodent brains. *J Biol Chem*, 288: 27384-27395.

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

Dluzen, D. E., Muraoka, S., Engelmann, M.,Landgraf, R., 1998. The effects of infusion of arginine vasopressin, oxytocin, or their antagonists into the olfactory bulb upon social recognition responses in male rats. *Peptides*, 19: 999-1005.

Dominguez, S., Rey, C. C., Therreau, L., Fanton, A., Massotte, D., Verret, L., Piskorowski, R. A.,Chevaleyre, V., 2019. Maturation of PNN and ErbB4 Signaling in Area CA2 during Adolescence Underlies the Emergence of PV Interneuron Plasticity and Social Memory. *Cell Reports*, 29: 1099-1112 e1094.

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

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

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

Erbs, E., Faget, L., Scherrer, G., Kessler, P., Hentsch, D., Vonesch, J. L., Matifas, A., Kieffer, B. L.,Massotte, D., 2012. Distribution of Delta Opioid Receptor-Expressing Neurons in the Mouse Hippocampus. *Neuroscience*, 221: 203-213.

Evans, P. R., Lee, S. E., Smith, Y.,Hepler, J. R., 2014. Postnatal Developmental Expression of Regulator of G Protein Signaling 14 (RGS14) in the Mouse Brain. *Journal of Comparative Neurology*, 522: 186-203.

Favuzzi, E., Marques-Smith, A., Deogracias, R., Winterflood, C. M., Sanchez-Aguilera, A., Mantoan, L., Maeso, P., Fernandes, C., Ewers, H.,Rico, B., 2017. Activity-Dependent Gating of Parvalbumin Interneuron Function by the Perineuronal Net Protein Brevican. *Neuron*, 95: 639-655 e610.

Fazzari, P., Paternain, A. V., Valiente, M., Pla, R., Lujan, R., Lloyd, K., Lerma, J., Marin, O.,Rico, B., 2010. Control of cortical GABA circuitry development by Nrg1 and ErbB4 signalling. *Nature*, 464: 1376-1380.

Feldman, H. H., Van Baelen, B., Kavanagh, S. M.,Torfs, K. E., 2005. Cognition, function, and caregiving time patterns in patients with mild-to-moderate Alzheimer disease: a 12-month analysis. *Alzheimer Dis Assoc Disord*, 19: 29-36.

Feldman, H. H.,Woodward, M., 2005. The staging and assessment of moderate to severe Alzheimer disease. *Neurology*, 65: S10-S17.

Ferguson, J. N., Young, L. J., Hearn, E. F., Matzuk, M. M., Insel, T. R.,Winslow, J. T., 2000. Social amnesia in mice lacking the oxytocin gene. *Nature Genetic*, 25: 284-288.

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

Fratiglioni, L., Wang, H. X., Ericsson, K., Maytan, M.,Winblad, B., 2000. Influence of social network on occurrence of dementia: a community-based longitudinal study. *Lancet*, 355: 1315-1319.

Freund, T. F.,Antal, M., 1988. GABA-containing neurons in the septum control inhibitory interneurons in the hippocampus. *Nature*, 336: 170-173.

Freund, T. F.,Katona, I., 2007. Perisomatic inhibition. *Neuron*, 56: 33-42.

Frischknecht, R., Heine, M., Perrais, D., Seidenbecher, C. I., Choquet, D.,Gundelfinger, E. D., 2009. Brain extracellular matrix affects AMPA receptor lateral mobility and short-term synaptic plasticity. *Nature Neuroscience*, 12: 897-904.

Frith, C. D., 2008. Social cognition. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 363: 2033-2039.

Frith, C. D.,Frith, U., 2008. Implicit and explicit processes in social cognition. *Neuron*, 60: 503-510.

Frith, C.,Frith, U., 2005. Theory of mind. *Curr Biol*, 15: R644-646.

Fuchs, A. R., Behrens, O., Maschek, H., Kupsch, E.,Einspanier, A., 1998. Oxytocin and vasopressin receptors in human and uterine myomas during menstrual cycle and early pregnancy. *Hum Reprod Update*, 4: 594-604.

Gainer, H., 1998. Cell-specific gene expression in oxytocin and vasopressin magnocellular neurons. *Adv Exp Med Biol*, 449: 15-27.

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

Gimpl, G.,Fahrenholz, F., 2001. The oxytocin receptor system: structure, function, and regulation. *Physiol Rev*, 81: 629-683.

Gogolla, N., Caroni, P., Luthi, A.,Herry, C., 2009. Perineuronal nets protect fear memories from erasure. *Science*, 325: 1258-1261.

Gonchar, Y., Wang, Q.,Burkhalter, A., 2007. Multiple distinct subtypes of GABAergic neurons in mouse visual cortex identified by triple immunostaining. *Front Neuroanat*, 1: 3.

Gotz, J., Bodea, L. G.,Goedert, M., 2018. Rodent models for Alzheimer disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 19: 583-598.

Gu, Y., Tran, T., Murase, S., Borrell, A., Kirkwood, A.,Quinlan, E. M., 2016. Neuregulin-Dependent Regulation of Fast-Spiking Interneuron Excitability Controls the Timing of the Critical Period. *The Journal of Neuroscience*, 36: 10285-10295.

Guimaraes, A., Zaremba, S.,Hockfield, S., 1990. Molecular and morphological changes in the cat lateral geniculate nucleus and visual cortex induced by visual deprivation are revealed by monoclonal antibodies Cat-304 and Cat-301. *The Journal of Neuroscience*, 10: 3014-3024.

Hamm, V., Heraud, C., Bott, J. B., Herbeaux, K., Strittmatter, C., Mathis, C.,Goutagny, R., 2017. Differential contribution of APP metabolites to early cognitive deficits in a TgCRND8 mouse model of Alzheimer's disease. *Sci Adv*, 3: e1601068.

Hamm, V., Heraud, C., Cassel, J. C., Mathis, C.,Goutagny, R., 2015. Precocious Alterations of Brain Oscillatory Activity in Alzheimer's Disease: A Window of Opportunity for Early Diagnosis and Treatment. *Front Cell Neurosci*, 9: 491.

Hardy, J. A.,Higgins, G. A., 1992. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science*, 256: 184-185.

Hartig, W., Derouiche, A., Welt, K., Brauer, K., Grosche, J., Mader, M., Reichenbach, A.,Bruckner, G., 1999. Cortical neurons immunoreactive for the potassium channel Kv3.1b subunit are predominantly surrounded by perineuronal nets presumed as a buffering system for cations. *Brain Res*, 842: 15-29.

Hatanpaa, K. J., Raisanen, J. M., Herndon, E., Burns, D. K., Foong, C., Habib, A. A.,White, C. L., 2014. Hippocampal Sclerosis in Dementia, Epilepsy, and Ischemic Injury: Differential Vulnerability of Hippocampal Subfields. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 73: 136-142.

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. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 12.

Hehman, J. A., German, T. P.,Klein, S. B., 2005. Impaired self-recognition from recent photographs in a case of late-stage Alzheimer's disease. *Social Cognition*, 23: 118-124.

Hensch, T. K., 2005. Critical period plasticity in local cortical circuits. *Nature Reviews Neuroscience*, 6: 877-888.

Hernando, F., Schoots, O., Lolait, S. J.,Burbach, J. P., 2001. Immunohistochemical localization of the vasopressin V1b receptor in the rat brain and pituitary gland: anatomical support for its involvement in the central effects of vasopressin. *Endocrinology*, 142: 1659-1668.

Herrmann, C. S.,Demiralp, T., 2005. Human EEG gamma oscillations in neuropsychiatric disorders. *Clin Neurophysiol*, 116: 2719-2733.

Higley, M. J.,Contreras, D., 2006. Balanced excitation and inhibition determine spike timing during frequency adaptation. *The Journal of Neuroscience*, 26: 448-457.

Hirokawa, N., Shiomura, Y.,Okabe, S., 1988. Tau proteins: the molecular structure and mode of binding on microtubules. *J Cell Biol*, 107: 1449-1459.

Hitti, F. L.,Siegelbaum, S. A., 2014. The hippocampal CA2 region is essential for social memory. *Nature*, 508: 88-92.

Hodges, J. R., Salmon, D. P.,Butters, N., 1993. Recognition and naming of famous faces in Alzheimer's disease: a cognitive analysis. *Neuropsychologia*, 31: 775-788.

Hofer, S. B., Ko, H., Pichler, B., Vogelstein, J., Ros, H., Zeng, H. K., Lein, E., Lesica, N. A.,Mrsic-Flogel, T. D., 2011. Differential connectivity and response dynamics of excitatory and inhibitory neurons in visual cortex. *Nature Neuroscience*, 14: 1045-U1146.

Holcomb, L., Gordon, M. N., McGowan, E., Yu, X., Benkovic, S., Jantzen, P., Wright, K., Saad, I., Mueller, R., Morgan, D., Sanders, S., Zehr, C., O'Campo, K., Hardy, J., Prada, C. M., Eckman, C., Younkin, S., Hsiao, K.,Duff, K., 1998. Accelerated Alzheimer-type phenotype in transgenic mice carrying both mutant amyloid precursor protein and presenilin 1 transgenes. *Nature Medicin*, 4: 97-100.

Hollnagel, J. O., Elzoheiry, S., Gorgas, K., Kins, S., Beretta, C. A., Kirsch, J., Kuhse, J., Kann, O.,Kiss, E., 2019. Early alterations in hippocampal perisomatic GABAergic synapses and network oscillations in a mouse model of Alzheimer's disease amyloidosis. *PLoS One*, 14: e0209228.

Horii-Hayashi, N., Sasagawa, T., Matsunaga, W.,Nishi, M., 2015. Development and Structural Variety of the Chondroitin Sulfate Proteoglycans-Contained Extracellular Matrix in the Mouse Brain. *Neural Plasticity*, 2015: 256389.

Howell, M. D., Bailey, L. A., Cozart, M. A., Gannon, B. M.,Gottschall, P. E., 2015. Hippocampal administration of chondroitinase ABC increases plaque-adjacent synaptic marker and diminishes amyloid burden in aged APPswe/PS1dE9 mice. *Acta Neuropathol Commun*, 3: 54.

Hsiao, K., Chapman, P., Nilsen, S., Eckman, C., Harigaya, Y., Younkin, S., Yang, F.,Cole, G., 1996. Correlative memory deficits, Abeta elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science*, 274: 99-102.

Hu, H., Gan, J.,Jonas, P., 2014. Fast-spiking, parvalbumin(+) GABAergic interneurons: From cellular design to microcircuit function. *Science*, 345: 529-543.

Huh, S., Baek, SJ., Lee, KH., 2016. The reemergence of long-term potentiation in aged Alzheimer's disease mouse model. *Scientific Reports*, 6: 29152.

Iaccarino, H. F., Singer, A. C., Martorell, A. J., Rudenko, A., Gao, F., Gillingham, T. Z., Mathys, H., Seo, J., Kritskiy, O., Abdurrob, F., Adaikkan, C., Canter, R. G., Rueda, R., Brown, E. N., Boyden, E. S.,Tsai, L. H., 2016. Gamma frequency entrainment attenuates amyloid load and modifies microglia. *Nature*, 540: 230-235.

Ishizuka, N., Cowan, W. M.,Amaral, D. G., 1995. A Quantitative-Analysis of the Dendritic Organization of Pyramidal Cells in the Rat Hippocampus. *Journal of Comparative Neurology*, 362: 17-45.

Ittner, A.A., Gladbach, A., Bertz, J., Suh, L.S., Ittner, L.M., 2014. p38 MAP kinase-mediated NMDA receptor-dependent suppression of hippocampal hypersynchronicity in a mouse model of Alzheimer's disease. Acta Neuropathologica Communications 2, 149.

Ito, M., Shirao, T., Doya, K.,Sekino, Y., 2009. Three-dimensional distribution of Fos-positive neurons in the supramammillary nucleus of the rat exposed to novel environment. *Neurosci Res*, 64: 397-402.

Jacobsen, J. S., Wu, C. C., Redwine, J. M., Comery, T. A., Arias, R., Bowlby, M., Martone, R., Morrison, J. H., Pangalos, M. N., Reinhart, P. H.,Bloom, F. E., 2006. Early-onset behavioral and synaptic deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *PNAS*, 103: 5161-5166.

Joliot, A.,Prochiantz, A., 2004. Transduction peptides: from technology to physiology. *Nature Cell Biology*, 6: 189-196.

Kammesheidt, A., Boyce, F. M., Spanoyannis, A. F., Cummings, B. J., Ortegon, M., Cotman, C., Vaught, J. L.,Neve, R. L., 1992. Deposition of Beta/A4 Immunoreactivity and Neuronal Pathology in Transgenic Mice Expressing the Carboxyl-Terminal Fragment of the Alzheimer Amyloid Precursor in the Brain. *PNAS*, 89: 10857-10861.

Kawarabayashi, T., Younkin, L. H., Saido, T. C., Shoji, M., Ashe, K. H.,Younkin, S. G., 2001. Age-dependent changes in brain, CSF, and plasma amyloid (beta) protein in the Tg2576 transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *The Journal of Neuroscience*, 21: 372-381.

Kent, B. A., Strittmatter, S. M.,Nygaard, H. B., 2018. Sleep and EEG Power Spectral Analysis in Three Transgenic Mouse Models of Alzheimer's Disease: APP/PS1, 3xTgAD, and Tg2576. *J Alzheimers Dis*, 64: 1325-1336.

Khlistunova, I., Biernat, J., Wang, Y., Pickhardt, M., von Bergen, M., Gazova, Z., Mandelkow, E.,Mandelkow, E. M., 2006. Inducible expression of Tau repeat domain in cell models of tauopathy: aggregation is toxic to cells but can be reversed by inhibitor drugs. *J Biol Chem*, 281: 1205-1214.

Kim, S., Matyas, F., Lee, S., Acsady, L.,Shin, H. S., 2012. Lateralization of observational fear learning at the cortical but not thalamic level in mice. *PNAS*, 109: 15497-15501.

Kim, Y. J., Yoo, J. Y., Kim, O. S., Kim, H. B., Ryu, J., Kim, H. S., Lee, J. H., Yoo, H. I., Song, D. Y., Baik, T. K.,Woo, R. S., 2018. Neuregulin 1 regulates amyloid precursor protein cell surface expression and non-amyloidogenic processing. *J Pharmacol Sci*, 137: 146-153.

King, D. L., Arendash, G. W., Crawford, F., Sterk, T., Menendez, J.,Mullan, M. J., 1999. Progressive and gender-dependent cognitive impairment in the APP(SW) transgenic mouse model for Alzheimer's disease. *Behav Brain Res*, 103: 145-162.

Kirk, I. J., 1998. Frequency modulation of hippocampal theta by the supramammillary nucleus, and other hypothalamo-hippocampal interactions: mechanisms and functional implications. *Neurosci Biobehav Rev*, 22: 291-302.

Klausberger, T.,Somogyi, P., 2008. Neuronal diversity and temporal dynamics: the unity of hippocampal circuit operations. *Science*, 321: 53-57.

Kobayashi, K., Emson, P. C.,Mountjoy, C. Q., 1989. Vicia villosa lectin-positive neurones in human cerebral cortex. Loss in Alzheimer-type dementia. *Brain Res*, 498: 170-174.

Kogan, J. H., Frankland, P. W.,Silva, A. J., 2000. Long-term memory underlying hippocampus-dependent social recognition in mice. *Hippocampus*, 10: 47-56.

Kohara, K., Pignatelli, M., Rivest, A. J., Jung, H. Y., Kitamura, T., Suh, J., Frank, D., Kajikawa, K., Mise, N., Obata, Y., Wickersham, I. R.,Tonegawa, S., 2014. Cell type-specific genetic and optogenetic tools reveal hippocampal CA2 circuits. *Nature Neuroscience*, 17: 269-279.

Kohler, C. G., Anselmo-Gallagher, G., Bilker, W., Karlawish, J., Gur, R. E.,Clark, C. M., 2005. Emotion-discrimination deficits in mild Alzheimer disease. *Am J Geriatr Psychiatry*, 13: 926-933.

Korotkova, T., Fuchs, E. C., Ponomarenko, A., von Engelhardt, J.,Monyer, H., 2010. NMDA receptor ablation on parvalbumin-positive interneurons impairs hippocampal synchrony, spatial representations, and working memory. *Neuron*, 68: 557-569.

Kullmann, D. M.,Lamsa, K. P., 2007. Long-term synaptic plasticity in hippocampal interneurons. *Nature Reviews Neuroscience*, 8: 687-699.

Kurth, S., Moyse, E., Bahri, M. A., Salmon, E.,Bastin, C., 2015. Recognition of personally familiar faces and functional connectivity in Alzheimer's disease. *Cortex*, 67: 59-73.

Kwok, J. C., Carulli, D.,Fawcett, J. W., 2010. In vitro modeling of perineuronal nets: hyaluronan synthase and link protein are necessary for their formation and integrity. *Journal of Neurochemistry*, 114: 1447-1459.

Kwok, J. C., Dick, G., Wang, D.,Fawcett, J. W., 2011. Extracellular matrix and perineuronal nets in CNS repair. *Dev Neurobiol*, 71: 1073-1089.

Langford, D. J., Crager, S. E., Shehzad, Z., Smith, S. B., Sotocinal, S. G., Levenstadt, J. S., Chanda, M. L., Levitin, D. J.,Mogil, J. S., 2006. Social modulation of pain as evidence for empathy in mice. *Science*, 312: 1967-1970.

Lapray, D., Bergeler, J.,Luhmann, H. J., 2009. Stimulus-induced gamma activity in the electrocorticogram of freely moving rats: the neuronal signature of novelty detection. *Behav Brain Res*, 199: 350-354.

Lee, S. E., Simons, S. B., Heldt, S. A., Zhao, M. L., Schroeder, J. P., Vellano, C. P., Cowan, D. P., Ramineni, S., Yates, C. K., Feng, Y., Smith, Y., Sweatt, D., Weinshenker, D., Ressler, K. J., Dudek, S. M.,Hepler, J. R., 2010. RGS14 is a natural suppressor of both synaptic plasticity in CA2 neurons and hippocampal-based learning and memory. *PNAS*, 107: 16994-16998.

Lein, E. S., Hawrylycz, M. J., Ao, N., Ayres, M., Bensinger, A., Bernard, A., Boe, A. F., Boguski, M. S., Brockway, K. S., Byrnes, E. J., Chen, L., Chen, L., Chen, T. M., Chin, M. C., Chong, J., Crook, B. E., Czaplinska, A., Dang, C. N., Datta, S., Dee, N. R., Desaki, A. L., Desta, T., Diep, E., Dolbeare, T. A., Donelan, M. J., Dong, H. W., Dougherty, J. G., Duncan, B. J., Ebbert, A. J., Eichele, G., Estin, L. K., Faber, C., Facer, B. A., Fields, R., Fischer, S. R., Fliss, T. P., Frensley, C., Gates, S. N., Glattfelder, K. J., Halverson, K. R., Hart, M. R., Hohmann, J. G., Howell, M. P., Jeung, D. P., Johnson, R. A., Karr, P. T., Kawal, R., Kidney, J. M., Knapik, R. H., Kuan, C. L., Lake, J. H., Laramee, A. R., Larsen, K. D., Lau, C., Lemon, T. A., Liang, A. J., Liu, Y., Luong, L. T., Michaels, J., Morgan, J. J., Morgan, R. J., Mortrud, M. T., Mosqueda, N. F., Ng, L. L., Ng, R., Orta, G. J., Overly, C. C., Pak, T. H., Parry, S. E., Pathak, S. D., Pearson, O. C., Puchalski, R. B., Riley, Z. L., Rockett, H. R., Rowland, S. A., Royall, J. J., Ruiz, M. J., Sarno, N. R., Schaffnit, K., Shapovalova, N. V., Sivisay, T., Slaughterbeck, C. R., Smith, S. C., Smith, K. A., Smith, B. I., Sodt, A. J., Stewart, N. N., Stumpf, K. R., Sunkin, S. M., Sutram, M., Tam, A., Teemer, C. D., Thaller, C., Thompson, C. L., Varnam, L. R., Visel, A., Whitlock, R. M., Wohnoutka, P. E., Wolkey, C. K., Wong, V. Y., Wood, M., Yaylaoglu, M. B., Young, R. C., Youngstrom, B. L., Yuan, X. F., Zhang, B., Zwingman, T. A.,Jones, A. R., 2007. Genome-wide atlas of gene expression in the adult mouse brain. *Nature*, 445: 168-176.

Lendvai, D., Morawski, M., Negyessy, L., Gati, G., Jager, C., Baksa, G., Glasz, T., Attems, J., Tanila, H., Arendt, T., Harkany, T.,Alpar, A., 2013. Neurochemical mapping of the human hippocampus reveals perisynaptic matrix around functional synapses in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol*, 125: 215-229.

Leranth, C.,Ribak, C. E., 1991. Calcium-Binding Proteins Are Concentrated in the Ca2 Field of the Monkey Hippocampus - a Possible Key to This Regions Resistance to Epileptic Damage. *Experimental Brain Research*, 85: 129-136.

Leroy, F., Brann, D. H., Meira, T.,Siegelbaum, S. A., 2017. Input-Timing-Dependent Plasticity in the Hippocampal CA2 Region and Its Potential Role in Social Memory. *Neuron*, 95: 1089-1102 e1085.

Leroy, F., Park, J., Asok, A., Brann, D. H., Meira, T., Boyle, L. M., Buss, E. W., Kandel, E. R.,Siegelbaum, S. A., 2018. A circuit from hippocampal CA2 to lateral septum disinhibits social aggression. *Nature*, 564: 213-+.

Lesne, S., Koh, M. T., Kotilinek, L., Kayed, R., Glabe, C. G., Yang, A., Gallagher, M.,Ashe, K. H., 2006. A specific amyloid-beta protein assembly in the brain impairs memory. *Nature*, 440: 352-357.

Levy, D. R., Tamir, T., Kaufman, M., Parabucki, A., Weissbrod, A., Schneidman, E.,Yizhar, O., 2019. Dynamics of social representation in the mouse prefrontal cortex. *Nature Neuroscience*, 22: 2013-2022.

Lolait, S. J., O'Carroll, A. M.,Brownstein, M. J., 1995. Molecular biology of vasopressin receptors. *Ann N Y Acad Sci*, 771: 273-292.

Lorente de Nò, R. 1934. Studies on the Structure of the Cerebral Cortex II. Continuation of the Study of the Ammonic System. *Journal für Psychologie und Neurologie*, 46: 113-177.

Lu, L., Igarashi, K. M., Witter, M. P., Moser, E. I.,Moser, M. B., 2015. Topography of Place Maps along the CA3-to-CA2 Axis of the Hippocampus. *Neuron*, 87: 1078-1092.

Lu, Y., Sun, X. D., Hou, F. Q., Bi, L. L., Yin, D. M., Liu, F., Chen, Y. J., Bean, J. C., Jiao, H. F., Liu, X., Li, B. M., Xiong, W. C., Gao, T. M.,Mei, L., 2014. Maintenance of GABAergic activity by neuregulin 1-ErbB4 in amygdala for fear memory. *Neuron*, 84: 835-846.

Lundell, A., Olin, A. I., Morgelin, M., al-Karadaghi, S., Aspberg, A.,Logan, D. T., 2004. Structural basis for interactions between tenascins and lectican C-type lectin domains: Evidence for a crosslinking role for tenascins. *Structure*, 12: 1495-1506.

Maccaferri, G.,Lacaille, J. C., 2003. Interneuron Diversity series: Hippocampal interneuron classifications - making things as simple as possible, not simpler. *Trends in Neurosciences*, 26: 564-571.

Magloczky, Z., Acsady, L.,Freund, T. F., 1994. Principal cells are the postsynaptic targets of supramammillary afferents in the hippocampus of the rat. *Hippocampus*, 4: 322-334.

Maguirezeiss, K. A., Li, Z. W., Shimoda, L. M. N.,Hamill, R. W., 1995. Calbindin D28k Messenger-Rna in Hippocampus, Superior Temporal Gyrus and Cerebellum - Comparison between Control and Alzheimer-Disease Subjects. *Molecular Brain Research*, 30: 362-366.

Maki, Y., Yoshida, H., Yamaguchi, T.,Yamaguchi, H., 2013. Relative preservation of the recognition of positive facial expression "happiness" in Alzheimer disease. *Int Psychogeriatr*, 25: 105-110.

Mankin, E. A., Diehl, G. W., Sparks, F. T., Leutgeb, S.,Leutgeb, J. K., 2015. Hippocampal CA2 activity patterns change over time to a larger extent than between spatial contexts. *Neuron*, 85: 190-201.

Marin, O., 2013. Cellular and molecular mechanisms controlling the migration of neocortical interneurons. *European Journal of Neuroscience*, 38: 2019-2029.

Martinez-Losa, M., Tracy, T. E., Ma, K., Verret, L., Clemente-Perez, A., Khan, A. S., Cobos, I., Ho, K., Gan, L., Mucke, L., Alvarez-Dolado, M.,Palop, J. J., 2018. Nav1.1-Overexpressing Interneuron Transplants Restore Brain Rhythms and Cognition in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Neuron*, 98: 75-89 e75.

Martorell, A. J., Paulson, A. L., Suk, H. J., Abdurrob, F., Drummond, G. T., Guan, W., Young, J. Z., Kim, D. N., Kritskiy, O., Barker, S. J., Mangena, V., Prince, S. M., Brown, E. N., Chung, K., Boyden, E. S., Singer, A. C.,Tsai, L. H., 2019. Multi-sensory Gamma Stimulation Ameliorates Alzheimer's-Associated Pathology and Improves Cognition. *Cell*, 177: 256-271 e222.

Mayeux, R., 2003. Epidemiology of neurodegeneration. *Annual Review of Neuroscience*, 26: 81-104.

McRae, P. A., Rocco, M. M., Kelly, G., Brumberg, J. C.,Matthews, R. T., 2007. Sensory deprivation alters aggrecan and perineuronal net expression in the mouse barrel cortex. *The Journal of Neuroscience*, 27: 5405-5413.

Mei, L.,Nave, K. A., 2014. Neuregulin-ERBB signaling in the nervous system and neuropsychiatric diseases. *Neuron*, 83: 27-49.

Mei, L.,Xiong, W. C., 2008. Neuregulin 1 in neural development, synaptic plasticity and schizophrenia. *Nature Reviews Neuroscience*, 9: 437-452.

Meira, T., Leroy, F., Buss, E. W., Oliva, A., Park, J.,Siegelbaum, S. A., 2018. A hippocampal circuit linking dorsal CA2 to ventral CA1 critical for social memory dynamics. *Nature Communications*, 9.

Mercer, A., Eastlake, K., Trigg, H. L.,Thomson, A. M., 2012. Local circuitry involving parvalbumin-positive basket cells in the CA2 region of the hippocampus. *Hippocampus*, 22: 43-56.

Min, S. S., An, J., Lee, J. H., Seol, G. H., Im, J. H., Kim, H. S., Baik, T. K.,Woo, R. S., 2011. Neuregulin-1 prevents amyloid beta-induced impairment of long-term potentiation in hippocampal slices via ErbB4. *Neurosci Lett*, 505: 6-9.

Minta, K., Portelius, E., Janelidze, S., Hansson, O., Zetterberg, H., Blennow, K.,Andreasson, U., 2019. Cerebrospinal Fluid Concentrations of Extracellular Matrix Proteins in Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis*, 69: 1213-1220.

Mitre, M., Marlin, B. J., Schiavo, J. K., Morina, E., Norden, S. E., Hackett, T. A., Aoki, C. J., Chao, M. V.,Froemke, R. C., 2016. A Distributed Network for Social Cognition Enriched for Oxytocin Receptors. *The Journal of Neuroscience*, 36: 2517-2535.

Miyata, S., Nishimura, Y.,Nakashima, T., 2007. Perineuronal nets protect against amyloid beta-protein neurotoxicity in cultured cortical neurons. *Brain Res*, 1150: 200-206.

Mizutani, T.,Shimada, H., 1991. Quantitative Study of Neurofibrillary Tangles in Subdivisions of the Hippocampus - Ca2 as a Special Area in Normal Aging and Senile Dementia of the Alzheimer Type. *Acta Pathologica Japonica*, 41: 597-603.

Moller, H. J.,Graeber, M. B., 1998. The case described by Alois Alzheimer in 1911. Historical and conceptual perspectives based on the clinical record and neurohistological sections. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*, 248: 111-122.

Mondragon-Rodriguez, S., Salas-Gallardo, A., Gonzalez-Pereyra, P., Macias, M., Ordaz, B., Pena-Ortega, F., Aguilar-Vazquez, A., Orta-Salazar, E., Diaz-Cintra, S., Perry, G.,Williams, S., 2018. Phosphorylation of Tau protein correlates with changes in hippocampal theta oscillations and reduces hippocampal excitability in Alzheimer's model. *J Biol Chem*, 293: 8462-8472.

Morawski, M., Bruckner, G., Jager, C., Seeger, G.,Arendt, T., 2010. Neurons associated with aggrecan-based perineuronal nets are protected against tau pathology in subcortical regions in Alzheimer's disease. *Neuroscience*, 169: 1347-1363.

Morawski, M., Bruckner, G., Jager, C., Seeger, G., Matthews, R. T.,Arendt, T., 2012. Involvement of perineuronal and perisynaptic extracellular matrix in Alzheimer's disease neuropathology. *Brain Pathol*, 22: 547-561.

Morawski, M., Pavlica, S., Seeger, G., Grosche, J., Kouznetsova, E., Schliebs, R., Bruckner, G.,Arendt, T., 2010. Perineuronal nets are largely unaffected in Alzheimer model Tg2576 mice. *Neurobiology of Aging*, 31: 1254-1256.

Morawski, M., Reinert, T., Meyer-Klaucke, W., Wagner, F. E., Troger, W., Reinert, A., Jager, C., Bruckner, G.,Arendt, T., 2015. Ion exchanger in the brain: Quantitative analysis of perineuronally fixed anionic binding sites suggests diffusion barriers with ion sorting properties. *Sci Rep*, 5: 16471.

Moy, S. S., Nadler, J. J., Perez, A., Barbaro, R. P., Johns, J. M., Magnuson, T. R., Piven, J.,Crawley, J. N., 2004. Sociability and preference for social novelty in five inbred strains: an approach to assess autistic-like behavior in mice. *Genes Brain Behav*, 3: 287-302.

Muller, C.,Remy, S., 2014. Dendritic inhibition mediated by O-LM and bistratified interneurons in the hippocampus. *Front Synaptic Neurosci*, 6: 23.

Nakanishi, K., Saito, H.,Abe, K., 2001. The supramammillary nucleus contributes to associative EPSP-spike potentiation in the rat dentate gyrus in vivo. *European Journal of Neuroscience*, 13: 793-800.

Nasrallah, K., Therreau, L., Robert, V., Huang, A. J. Y., McHugh, T. J., Piskorowski, R. A.,Chevaleyre, V., 2019. Routing Hippocampal Information Flow through Parvalbumin Interneuron Plasticity in Area CA2. *Cell Reports*, 27: 86-98 e83.

Nimmrich, V., Draguhn, A.,Axmacher, N., 2015. Neuronal Network Oscillations in Neurodegenerative Diseases. *Neuromolecular Med*, 17: 270-284.

Ogiwara, I., Miyamoto, H., Morita, N., Atapour, N., Mazaki, E., Inoue, I., Yanagawa, Y., Obata, K., Furuichi, T., Hensch, T. K.,Yamakawa, K., 2007. Nav1.1 predominantly localizes to axons of parvalbumin-positive inhibitory interneurons: a circuit basis for epileptic seizures in Nav1.1-deficient mice. *Neuroscience Research*, 58: S40-S40.

Ognjanovski, N., Schaeffer, S., Wu, J., Mofakham, S., Maruyama, D., Zochowski, M.,Aton, S. J., 2017. Parvalbumin-expressing interneurons coordinate hippocampal network dynamics required for memory consolidation. *Nature Communications*, 8: 15039.

Okuyama, T., Kitamura, T., Roy, D. S., Itohara, S.,Tonegawa, S., 2016. Ventral CA1 neurons store social memory. *Science*, 353: 1536-1541.

Pagani, J. H., Zhao, M., Cui, Z., Avram, S. K., Caruana, D. A., Dudek, S. M.,Young, W. S., 2015. Role of the vasopressin 1b receptor in rodent aggressive behavior and synaptic plasticity in hippocampal area CA2. *Mol Psychiatry*, 20: 490-499.

Pan, W. X.,McNaughton, N., 2002. The role of the medial supramammillary nucleus in the control of hippocampal theta activity and behaviour in rats. *European Journal of Neuroscience*, 16: 1797-1809.

Panzeri, S., Petersen, R. S., Schultz, S. R., Lebedev, M.,Diamond, M. E., 2001. The role of spike timing in the coding of stimulus location in rat somatosensory cortex. *Neuron*, 29: 769-777.

Patz, S., Grabert, J., Gorba, T., Wirth, M. J.,Wahle, P., 2004. Parvalbumin expression in visual cortical interneurons depends on neuronal activity and TrkB ligands during an Early period of postnatal development. *Cereb Cortex*, 14: 342-351.

Pawelzik, H., Hughes, D. I.,Thomson, A. M., 2002. Physiological and morphological diversity of immunocytochemically defined parvalbumin- and cholecystokinin-positive interneurones in CA1 of the adult rat hippocampus. *Journal of Comparative Neurology*, 443: 346-367.

Pedersen, C. A.,Prange, A. J., Jr., 1979. Induction of maternal behavior in virgin rats after intracerebroventricular administration of oxytocin. *PNAS*, 76: 6661-6665.

Perl, Daniel P., 2010. Neuropathology of Alzheimer's Disease. *MOUNT SINAI JOURNAL OF MEDICINE*, 77: 32-42.

Piskorowski, R. A.,Chevaleyre, V., 2012. Synaptic integration by different dendritic compartments of hippocampal CA1 and CA2 pyramidal neurons. *Cell Mol Life Sci*, 69: 75-88.

Piskorowski, R. A.,Chevaleyre, V., 2013. Delta-opioid receptors mediate unique plasticity onto parvalbumin-expressing interneurons in area CA2 of the hippocampus. *The Journal of Neuroscience*, 33: 14567-14578.

Piskorowski, R. A., Nasrallah, K., Diamantopoulou, A., Mukai, J., Hassan, S. I., Siegelbaum, S. A., Gogos, J. A.,Chevaleyre, V., 2016. Age-Dependent Specific Changes in Area CA2 of the Hippocampus and Social Memory Deficit in a Mouse Model of the 22q11.2 Deletion Syndrome. *Neuron*, 89: 163-176.

Pizzorusso, T., Medini, P., Berardi, N., Chierzi, S., Fawcett, J. W.,Maffei, L., 2002. Reactivation of ocular dominance plasticity in the adult visual cortex. *Science*, 298: 1248-1251.

Pizzorusso, T., Medini, P., Landi, S., Baldini, S., Berardi, N.,Maffei, L., 2006. Structural and functional recovery from early monocular deprivation in adult rats. *PNAS*, 103: 8517-8522.

Querfurth, H. W.,LaFerla, F. M., 2010. Alzheimer's disease. *N Engl J Med*, 362: 329-344.

Raam, T., McAvoy, K. M., Besnard, A., Veenema, A. H.,Sahay, A., 2017. Hippocampal oxytocin receptors are necessary for discrimination of social stimuli. *Nature Communications*, 8: 2001.

Ragozzino, M. E., Detrick, S.,Kesner, R. P., 1999. Involvement of the prelimbic-infralimbic areas of the rodent prefrontal cortex in behavioral flexibility for place and response learning. *The Journal of Neuroscience*, 19: 4585-4594.

Renelt, M., Halbach, V. V. B.,Halbach, O. V. B., 2014. Distribution of PCP4 protein in the forebrain of adult mice. *Acta Histochemica*, 116: 1056-1061.

Resulaj, A., Ruediger, S., Olsen, S. R.,Scanziani, M., 2018. First spikes in visual cortex enable perceptual discrimination. *Elife*, 7.

Rey, C. C., Cattaud, V., C., Rampon,L., Verret. 2020. What's New on Alzheimer's Disease? Insights From AD Mouse Models. *Biomedical Sciences*, Encyclopedia of Biomedical Gerontology: 431-442.

Ribak, C. E., Seress, L.,Leranth, C., 1993. Electron microscopic immunocytochemical study of the distribution of parvalbumin-containing neurons and axon terminals in the primate dentate gyrus and Ammon's horn. *The Journal of Comparative Neurology*, 327: 298-321.

Rich, E. L.,Shapiro, M., 2009. Rat prefrontal cortical neurons selectively code strategy switches. *The Journal of Neuroscience*, 29: 7208-7219.

Robert, V., Cassim, S., Chevaleyre, V.,Piskorowski, R. A., 2018. Hippocampal area CA2: properties and contribution to hippocampal function. *Cell and Tissue Research*, 373: 525-540.

Robinson, T. E., Kramis, R. C.,Vanderwolf, C. H., 1977. Two types of cerebral activation during active sleep: relations to behavior. *Brain Res*, 124: 544-549.

Rudebeck, P. H., Walton, M. E., Millette, B. H., Shirley, E., Rushworth, M. F.,Bannerman, D. M., 2007. Distinct contributions of frontal areas to emotion and social behaviour in the rat. *European Journal of Neuroscience*, 26: 2315-2326.

Ryu, J., Hong, B. H., Kim, Y. J., Yang, E. J., Choi, M., Kim, H., Ahn, S., Baik, T. K., Woo, R. S.,Kim, H. S., 2016. Neuregulin-1 attenuates cognitive function impairments in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Cell Death Dis*, 7: e2117.

Ryu, Junghwa, Yu, Ha-Nul, Cho, Harim, Kim, Hye-Sun, Baik, Tai-Kyoung, Lee, Soo-Joo,Woo, Ran-Sook. 2012. Neuregulin-1 Exerts Protective Effects Against Neurotoxicities Induced by C-Terminal Fragments of APP via ErbB4 Receptor. *Journal of Pharmacological Sciences*, 119: 73-81.

Salesse, C., Mueller, C. L., Chamberland, S.,Topolnik, L., 2011. Age-dependent remodelling of inhibitory synapses onto hippocampal CA1 oriens-lacunosum moleculare interneurons. *Journal of Physiology-London*, 589: 4885-4901.

San Antonio, A., Liban, K., Ikrar, T., Tsyganovskiy, E.,Xu, X. M., 2014. Distinct physiological and developmental properties of hippocampal CA2 subfield revealed by using anti-Purkinje cell protein 4 (PCP4) immunostaining. *Journal of Comparative Neurology*, 522: 1333-1354.

Sar, M., Stumpf, W. E., Miller, R. J., Chang, K. J.,Cuatrecasas, P., 1978. Immunohistochemical localization of enkephalin in rat brain and spinal cord. *The Journal of Comparative Neurology*, 182: 17-37.

Schneider, F., Baldauf, K., Wetzel, W.,Reymann, K. G., 2014. Behavioral and EEG changes in male 5xFAD mice. *Physiol Behav*, 135: 25-33.

Scott, L., Feng, J., Kiss, T., Needle, E., Atchison, K., Kawabe, T. T., Milici, A. J., Hajos-Korcsok, E., Riddell, D., Hajos, M., 2012. Age-dependent disruption in hippocampal theta oscillation in amyloid-beta overproducing transgenic mice. *Neurobiology of Aging,* 33: 1481.e1413-1481.e1423.

Sederberg, P. B., Schulze-Bonhage, A., Madsen, J. R., Bromfield, E. B., McCarthy, D. C., Brandt, A., Tully, M. S.,Kahana, M. J., 2007. Hippocampal and neocortical gamma oscillations predict memory formation in humans. *Cereb Cortex*, 17: 1190-1196.

Selkoe, D. J., 1991. The molecular pathology of Alzheimer's disease. *Neuron*, 6: 487-498.

Shi, W., Wei, X. B., Wang, X. F., Du, S. W., Liu, W. X., Song, J.,Wang, Y., 2019. Perineuronal nets protect long-term memory by limiting activity-dependent inhibition from parvalbumin interneurons. *PNAS*, 116: 27063-27073.

Sigal, Y. M., Bae, H., Bogart, L. J., Hensch, T. K.,Zhuang, X. W., 2019. Structural maturation of cortical perineuronal nets and their perforating synapses revealed by superresolution imaging. *PNAS*, 116: 7071-7076.

Simons, S. B., Escobedo, Y., Yasuda, R.,Dudek, S. M., 2009. Regional differences in hippocampal calcium handling provide a cellular mechanism for limiting plasticity. *PNAS*, 106: 14080-14084.

Singh, V., Chertkow, H., Lerch, J. P., Evans, A. C., Dorr, A. E.,Kabani, N. J., 2006. Spatial patterns of cortical thinning in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Brain*, 129: 2885-2893.

Siwek, M. E., Muller, R., Henseler, C., Trog, A., Lundt, A., Wormuth, C., Broich, K., Ehninger, D., Weiergraber, M.,Papazoglou, A., 2015. Altered theta oscillations and aberrant cortical excitatory activity in the 5XFAD model of Alzheimer's disease. *Neural Plasticity*, 2015: 781731.

Sloviter, R. S., 1989. Calcium-Binding Protein (Calbindin-D28k) and Parvalbumin Immunocytochemistry - Localization in the Rat Hippocampus with Specific Reference to the Selective Vulnerability of Hippocampal-Neurons to Seizure Activity. *Journal of Comparative Neurology*, 280: 183-196.

Sloviter, R. S.,Damiano, B. P., 1981. Sustained Electrical-Stimulation of the Perforant Path Duplicates Kainate-Induced Electro-Physiological Effects and Hippocampal Damage in Rats. *Neuroscience Letters*, 24: 279-284.

Small, B. J., Herlitz, A., Fratiglioni, L., Almkvist, O.,Backman, L., 1997. Cognitive predictors of incident Alzheimer's disease: a prospective longitudinal study. *Neuropsychology*, 11: 413-420.

Smith, A. S., Williams Avram, S. K., Cymerblit-Sabba, A., Song, J.,Young, W. S., 2016. Targeted activation of the hippocampal CA2 area strongly enhances social memory. *Mol Psychiatry*.

Sohal, V. S., Zhang, F., Yizhar, O.,Deisseroth, K., 2009. Parvalbumin neurons and gamma rhythms enhance cortical circuit performance. *Nature*, 459: 698-702.

Somogyi, P.,Klausberger, T., 2005. Defined types of cortical interneurone structure space and spike timing in the hippocampus. *J Physiol*, 562: 9-26.

Sorbi, S., Hort, J., Erkinjuntti, T., Fladby, T., Gainotti, G., Gurvit, H., Nacmias, B., Pasquier, F., Popescu, B. O., Rektorova, I., Religa, D., Rusina, R., Rossor, M., Schmidt, R., Stefanova, E., Warren, J. D., Scheltens, P., Dementia, Efns Scientist Panel on,Cognitive, Neurology. 2012. EFNS-ENS Guidelines on the diagnosis and management of disorders associated with dementia. *European Journal of Neuroscience*, 19: 1159-1179.

Spatazza, J., Lee, H. H., Di Nardo, A. A., Tibaldi, L., Joliot, A., Hensch, T. K.,Prochiantz, A., 2013. Choroid-plexus-derived Otx2 homeoprotein constrains adult cortical plasticity. *Cell Reports*, 3: 1815-1823.

Spoletini, I., Marra, C., Di Iulio, F., Gianni, W., Sancesario, G., Giubilei, F., Trequattrini, A., Bria, P., Caltagirone, C.,Spalletta, G., 2008. Facial emotion recognition deficit in amnestic mild cognitive impairment and Alzheimer disease. *Am J Geriatr Psychiatry*, 16: 389-398.

Srinivas, K. V., Buss, E. W., Sun, Q., Santoro, B., Takahashi, H., Nicholson, D. A.,Siegelbaum, S. A., 2017. The Dendrites of CA2 and CA1 Pyramidal Neurons Differentially Regulate

Information Flow in the Cortico-Hippocampal Circuit. *The Journal of Neuroscience*, 37: 3276-3293.

Stevenson, E. L.,Caldwell, H. K., 2014. Lesions to the CA2 region of the hippocampus impair social memory in mice. *European Journal of Neuroscience*, 40: 3294-3301.

Sugiyama, S., Di Nardo, A. A., Aizawa, S., Matsuo, I., Volovitch, M., Prochiantz, A.,Hensch, T. K., 2008. Experience-dependent transfer of Otx2 homeoprotein into the visual cortex activates postnatal plasticity. *Cell*, 134: 508-520.

Sun, Y., Ikrar, T., Davis, M. F., Gong, N., Zheng, X., Luo, Z. D., Lai, C., Mei, L., Holmes, T. C., Gandhi, S. P.,Xu, X., 2016. Neuregulin-1/ErbB4 Signaling Regulates Visual Cortical Plasticity. *Neuron*, 92: 160-173.

Suttkus, A., Holzer, M., Morawski, M.,Arendt, T., 2016. The neuronal extracellular matrix restricts distribution and internalization of aggregated Tau-protein. *Neuroscience*, 313: 225-235.

Swadlow, H. A., 2003. Fast-spike interneurons and feedforward inhibition in awake sensory neocortex. *Cerebral Cortex*, 13: 25-32.

Takayama, N., Iseki, E., Yamamoto, T.,Kosaka, K., 2002. Regional quantitative study of formation process of neurofibrillary tangles in the hippocampus of non-demented elderly brains: Comparison with late-onset Alzheimer's disease brains. *Neuropathology*, 22: 147-153.

Takayanagi, Y., Yoshida, M., Bielsky, I. F., Ross, H. E., Kawamata, M., Onaka, T., Yanagisawa, T., Kimura, T., Matzuk, M. M., Young, L. J.,Nishimori, K., 2005. Pervasive social deficits, but normal parturition, in oxytocin receptor-deficient mice. *PNAS*, 102: 16096-16101.

Talley, E. M., Solorzano, G., Lei, Q., Kim, D.,Bayliss, D. A., 2001. Cns distribution of members of the two-pore-domain (KCNK) potassium channel family. *The Journal of Neuroscience*, 21: 7491-7505.

Tanimizu, T., Kenney, J. W., Okano, E., Kadoma, K., Frankland, P. W.,Kida, S., 2017. Functional Connectivity of Multiple Brain Regions Required for the Consolidation of Social Recognition Memory. *The Journal of Neuroscience*, 37: 4103-4116.

Thor, D. H.,Holloway, W. R., 1982. Social Memory of the Male Laboratory Rat. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 96: 1000-1006.

Ting, A. K., Chen, Y., Wen, L., Yin, D. M., Shen, C., Tao, Y., Liu, X., Xiong, W. C.,Mei, L., 2011. Neuregulin 1 promotes excitatory synapse development and function in GABAergic interneurons. *The Journal of Neuroscience*, 31: 15-25.

Tonegawa, Susumu, Pignatelli, Michele, Roy, Dheeraj S.,Ryan, Tomás J., 2015. Memory engram storage and retrieval. *Current Opinion in Neurobiology*, 35: 101-109.

Torres, B., Santos, R. L., Sousa, M. F., Simoes Neto, J. P., Nogueira, M. M., Belfort, T. T., Dias, R.,Dourado, M. C., 2015. Facial expression recognition in Alzheimer's disease: a longitudinal study. *Arq Neuropsiquiatr*, 73: 383-389.

Tort, A. B., Komorowski, R. W., Manns, J. R., Kopell, N. J.,Eichenbaum, H., 2009. Theta-gamma coupling increases during the learning of item-context associations. *PNAS*, 106: 20942-20947.

Tremblay, R., Lee, S.,Rudy, B., 2016. GABAergic Interneurons in the Neocortex: From Cellular Properties to Circuits. *Neuron*, 91: 260-292.

Tripodi, M., Bhandari, K., Chowdhury, A., Mukherjee, A.,Caroni, P., 2018. Parvalbumin Interneuron Plasticity for Consolidation of Reinforced Learning. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 83: 25-35.

Ueno, H., Suemitsu, S., Murakami, S., Kitamura, N., Wani, K., Okamoto, M., Matsumoto, Y.,Ishihara, T., 2017. Region-specific impairments in parvalbumin interneurons in social isolation-reared mice. *Neuroscience*, 359: 196-208.

Vaccari, C., Lolait, S. J.,Ostrowski, N. L., 1998. Comparative distribution of vasopressin V1b and oxytocin receptor messenger ribonucleic acids in brain. *Endocrinology*, 139: 5015-5033.

van Deursen, J. A., Vuurman, E. F., van Kranen-Mastenbroek, V. H., Verhey, F. R.,Riedel, W. J., 2011. 40-Hz steady state response in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Neurobiology of Aging*, 32: 24-30.

Van Ess, P. J., Pedersen, W. A., Culmsee, C., Mattson, M. P.,Blouin, R. A., 2002. Elevated hepatic and depressed renal cytochrome P450 activity in the Tg2576 transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry*, 80: 571-578.

van Wimersma Greidanus, T. B.,Maigret, C., 1996. The role of limbic vasopressin and oxytocin in social recognition. *Brain Res*, 713: 153-159.

Vanderwolf, C. H., 1969. Hippocampal electrical activity and voluntary movement in the rat. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, 26: 407-418.

Vegh, M. J., Heldring, C. M., Kamphuis, W., Hijazi, S., Timmerman, A. J., Li, K. W., van Nierop, P., Mansvelder, H. D., Hol, E. M., Smit, A. B.,van Kesteren, R. E., 2014. Reducing hippocampal extracellular matrix reverses early memory deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol Commun*, 2: 76.

Vellano, C. P., Lee, S. E., Dudek, S. M.,Hepler, J. R., 2011. RGS14 at the interface of hippocampal signaling and synaptic plasticity. *Trends in Pharmacological Sciences*, 32: 666-674.

Verret, L., Krezymon, A., Halley, H., Trouche, S., Zerwas, M., Lazouret, M., Lassalle, J. M.,Rampon, C., 2013. Transient enriched housing before amyloidosis onset sustains cognitive improvement in Tg2576 mice. *Neurobiology of Aging*, 34: 211-225.

Verret, L., Mann, E. O., Hang, G. B., Barth, A. M., Cobos, I., Ho, K., Devidze, N., Masliah, E., Kreitzer, A. C., Mody, I., Mucke, L.,Palop, J. J., 2012. Inhibitory interneuron deficit links altered network activity and cognitive dysfunction in Alzheimer model. *Cell*, 149: 708-721.

Wang, J., Ikonen, S., Gurevicius, K., van Groen, T., and Tanila, H., 2002. Alteration of cortical EEG in mice carrying mutated human APP transgene, *Brain Research*, 943: 181-190.

Wen, L., Lu, Y. S., Zhu, X. H., Li, X. M., Woo, R. S., Chen, Y. J., Yin, D. M., Lai, C., Terry, A. V., Jr., Vazdarjanova, A., Xiong, W. C.,Mei, L., 2010. Neuregulin 1 regulates pyramidal neuron activity via ErbB4 in parvalbumin-positive interneurons. *PNAS*, 107: 1211-1216.

Wersinger, S. R., Ginns, E. I., O'Carroll, A. M., Lolait, S. J.,Young, W. S., 3rd. 2002. Vasopressin V1b receptor knockout reduces aggressive behavior in male mice. *Mol Psychiatry*, 7: 975-984.

Wersinger, S. R., Kelliher, K. R., Zufall, F., Lolait, S. J., O'Carroll, A. M.,Young, W. S., 3rd. 2004. Social motivation is reduced in vasopressin 1b receptor null mice despite normal performance in an olfactory discrimination task. *Horm Behav*, 46: 638-645.

Wisor, J. P., Edgar, D. M., Yesavage, J., Ryan, H. S., McCormick, C. M., Lapustea, N.,Murphy, G. M., Jr., 2005. Sleep and circadian abnormalities in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease: a role for cholinergic transmission. *Neuroscience*, 131: 375-385.

Wong, L. C., Wang, L., D'Amour, J. A., Yumita, T., Chen, G. H., Yamaguchi, T., Chang, B. C., Bernstein, H., You, X. D., Feng, J. E., Froemke, R. C.,Lin, D. Y., 2016. Effective Modulation of Male Aggression through Lateral Septum to Medial Hypothalamus Projection. *Current Biology*, 26: 593-604.

Woo, R. S., Lee, J. H., Kim, H. S., Baek, C. H., Song, D. Y., Suh, Y. H.,Baik, T. K., 2012. Neuregulin-1 protects against neurotoxicities induced by Swedish amyloid precursor protein via the ErbB4 receptor. *Neuroscience*, 202: 413-423.

Woo, R. S., Lee, J. H., Yu, H. N., Song, D. Y.,Baik, T. K., 2011. Expression of ErbB4 in the neurons of Alzheimer's disease brain and APP/PS1 mice, a model of Alzheimer's disease. *Anat Cell Biol*, 44: 116-127.

Woo, R. S., Li, X. M., Tao, Y., Carpenter-Hyland, E., Huang, Y. Z., Weber, J., Neiswender, H., Dong, X. P., Wu, J., Gassmann, M., Lai, C., Xiong, W. C., Gao, T. M.,Mei, L., 2007. Neuregulin-1 enhances depolarization-induced GABA release. *Neuron*, 54: 599-610.

Yamada, J.,Jinno, S., 2017. Molecular heterogeneity of aggrecan-based perineuronal nets around five subclasses of parvalbumin-expressing neurons in the mouse hippocampus. *The Journal of Comparative Neurology*, 525: 1234-1249.

Yamada, J., Ohgomori, T.,Jinno, S., 2015. Perineuronal nets affect parvalbumin expression in GABAergic neurons of the mouse hippocampus. *European Journal of Neuroscience*, 41: 368-378.

Yamamoto, J., Suh, J., Takeuchi, D.,Tonegawa, S., 2014. Successful execution of working memory linked to synchronized high-frequency gamma oscillations. *Cell*, 157: 845-857.

Yang, M.,Crawley, J. N., 2009. Simple behavioral assessment of mouse olfaction. *Curr Protoc Neurosci*, Chapter 8: Unit 8 24.

Yau, H. J., Wang, H. F., Lai, C.,Liu, F. C., 2003. Neural development of the neuregulin receptor ErbB4 in the cerebral cortex and the hippocampus: preferential expression by interneurons tangentially migrating from the ganglionic eminences. *Cereb Cortex*, 13: 252-264.

Young, W. S., Li, J., Wersinger, S. R.,Palkovits, M., 2006. The vasopressin 1b receptor is prominent in the hippocampal area CA2 where it is unaffected by restraint stress or adrenalectomy. *Neuroscience*, 143: 1031-1039.

Zhang, H., Zhang, L., Zhou, D., He, X., Wang, D., Pan, H., Zhang, X., Mei, Y., Qian, Q., Zheng, T., Jones, F. E.,Sun, B., 2017. Ablating ErbB4 in PV neurons attenuates synaptic and cognitive deficits in an animal model of Alzheimer's disease. *Neurobiology of Disease*, 106: 171-180.

Zhao, M., Choi, Y. S., Obrietan, K.,Dudek, S. M., 2007. Synaptic plasticity (and the lack thereof) in hippocampal CA2 neurons. *The Journal of Neuroscience*, 27: 12025-12032.

Zheng, C., Bieri, K. W., Hsiao, Y. T.,Colgin, L. L., 2016. Spatial Sequence Coding Differs during Slow and Fast Gamma Rhythms in the Hippocampus. *Neuron*, 89: 398-408.

Ziai, M. R., Sangameswaran, L., Hempstead, J. L., Danho, W.,Morgan, J. I., 1988. An Immunochemical Analysis of the Distribution of a Brain-Specific Polypeptide, Pep-19. *Journal of Neurochemistry*, 51: 1771-1776.

ANNEXES

Neurobiology of Aging 72 (2018) 147–158

Contents lists available at ScienceDirect

Neurobiology of Aging

journal homepage: www.elsevier.com/locate/neuaging

Early disruption of parvalbumin expression and perineuronal nets in the hippocampus of the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease can be rescued by enriched environment

Vanessa Cattaud, Charlotte Bezzina, Christophe C. Rey, Camille Lejards, Lionel Dahan, Laure Verret*

Centre de Recherches sur la Cognition Animale, Centre de Biologie Intégrative, Université de Toulouse; CNRS, UPS, France

ARTICLE INFO

Article history:
Received 30 March 2018
Received in revised form 28 August 2018
Accepted 28 August 2018
Available online 5 September 2018

Keywords:
Hippocampus
Parvalbumin-expressing interneuron
Perineuronal net
Alzheimer's disease
Enriched housing

ABSTRACT

Recent findings show that parvalbumin (PV) interneuron function is impaired in Alzheimer's disease (AD), and that this impairment in PV function can be linked to network dysfunction and memory deficits. PV cells are often associated with a specific extracellular matrix, the perineuronal net (PNN). PNNs are believed to protect PV cell integrity, and whether the amyloidopathy affects PNNs remains unclear. Here, we evaluated the number of PV cells with and without PNNs in the hippocampus of the Tg2576 mouse model of AD at different stages of the disease. We show a deficit of PV+ and/or PV+/PNN+ cells in the areas CA1, CA2, and CA3 in Tg2576 as young as 3 months of age. Importantly, transient exposure to an enriched environment, which has proven long-lasting beneficial effects on memory in AD subjects, rescues the PV/PNN cell number deficits. We conclude that cognitive improvements induced by enriched environment in AD mouse models could be supported by a remodeling of hippocampal PV cell network and their PNNs.

© 2018 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Alzheimer's disease (AD) is the most common form of dementia in the elderly. This progressive neurodegenerative disease leads to impairment of learning and retrieval of memories (Lim et al., 2014), which have been linked to the alteration of hippocampal function (Hirjak et al., 2017).

Learning and memory retrieval are supported by information processing that requires a highly coordinated synchronous activity of neuronal assemblies, causing structural, physiological, cellular, and molecular modifications within the hippocampus, and elsewhere (Bontempi et al., 1999; Gould et al., 1999; Hall et al., 2000). During the last decade, it has been shown that both patients and mouse models of AD exhibit spontaneous epileptiform activity reflecting alterations in excitation/inhibition balance and suggesting dysfunction of glutamatergic and/or GABAergic transmissions (Bezzina et al., 2015b; Irizarry et al., 2012; Ittner et al., 2010; Krantic et al., 2012; Kumar-Singh et al., 2000; Minkeviciene et al., 2009; Palop et al., 2007; Vogt et al., 2011; Vossel et al., 2013; Ziyatdinova et al., 2016).

We recently described a link between cognitive impairments and alteration of parvalbumin (PV)-positive cells in AD mice (Verret et al., 2012). PV cells are GABAergic fast-spiking interneurons that are able to synchronize the activity of large populations of excitatory neurons and influence neuronal plasticity of their targets (Chevaleyre and Piskorowski, 2014; Karunakaran et al., 2016; Kim et al., 2016; Yazaki-Sugiyama et al., 2009). Interference of PV cell functioning in the hippocampus of wild-type mice leads to an alteration of spatial representations and working memory, illustrating their contribution to cognitive functions (Korotkova et al., 2010; Mann and Paulsen, 2007). Notably, PV interneurons in both AD mice and patients exhibit decreased levels of the voltage-gated sodium channel subunit Nav1.1; and restoring Nav1.1 levels in AD mice ameliorates PV cell function and cognitive performances (Verret et al., 2012). Thus, PV cells play a pivotal role in the disruption of inhibitory control in the AD brain, leading to major deficits in cognitive function such as learning and memory.

Although PV cell function is largely studied, it is only recently that their specific extracellular matrix called perineuronal net (PNN) reclaimed interest. First described in 19th century (Golgi, 1893), the PNN is a specialized matrix composed of chondroitin sulfate associated with proteoglycans (brevican, neurocan, versican, aggrecan, phosphacan) and enwrapping the surface of the soma and dendrites. Although the functional significance of PNNs has

* Corresponding author at: CNRS Universite de Toulouse, Centre de Recherches sur la Cognition Animale, 118 route de Narbonne, Bat 4R3, 31062 Toulouse cedex 4, France. Tel.: +33 0561556429; fax: +33 0561556154.
E-mail address: laure.verret@univ-tlse3.fr (L. Verret).

0197-4580/$ – see front matter © 2018 Elsevier Inc. All rights reserved.
https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2018.08.024

remained unexplained for over a century, it is now established that PNNs ensure the stabilization of existing synapses and prevent the formation of new ones on mature PV interneurons (Kwok et al., 2011). As PNNs stabilize excitatory inputs, they lead to an increase in the maximum firing rate of PV interneurons, and in PV protein expression (Favuzzi et al., 2017; Yamada et al., 2015). This implication in the regulation of neuronal plasticity suggests a role for PNNs in memory consolidation. PNNs are dynamically regulated by experience. For instance, learning or exposure to an enriched environment (EE) results in a reduced proportion of PV cells surrounded by PNNs in the hippocampus (Favuzzi et al., 2017). This reduction of PNNs around PV cells would allow these neurons to respond to changes of the environment. Indeed, degrading PNNs with the bacterial enzyme chondroitinase ABC promotes assembly of new inhibitory synapses onto PV cells, which would promote new learning (Donato et al., 2013) and even erase consolidated memories (Gogolla et al., 2009). Thus, PNNs regulate the stability of the PV network and therefore participate in stabilizing memories (Yamada and Jinno, 2015).

PNNs also protect PV cells from oxidative stress from which they are very subjected to because of their fast-spiking property (Cabungcal et al., 2013). Because oxidative stress is known to play a detrimental role in AD (Wright et al., 2013; Zhu et al., 2003), PNN disruption could alter PV cell integrity during AD pathology. Some studies document a decrease of PNNs in both patients and mouse models of AD (Baig et al., 2005; Kobayashi et al., 1989; Lendvai et al., 2013). However, these results are challenged by an equal number of studies reporting no alteration of PNNs (Morawski et al., 2010, 2012) or even an upregulation of proteins that form PNNs (Howell et al., 2015; Vegh et al., 2014). These differences may arise from technical issues and from differences in the age and/or stage of the disease. Thus, whether and how PNNs are altered in AD remain unclear. In this context, we first aimed to determine whether PV cells and encapsulating PNNs are affected at different ages, representative of different stages of AD, in the hippocampus of the Tg2576 mouse model.

In humans, the risk of dementia in AD is modulated by environmental factors and educational level, and practice of various leisure activities has been associated with a decreased risk of AD-related dementia (Scarmeas et al., 2001; Stern et al., 1994). Transiently housing a large group of animals in a wide cage filled with objects of different sizes, shapes, colors, and materials that are regularly renewed has been proposed as a way to model cognitive reserve in AD mouse models (Nithianantharajah and Hannan, 2006). Others and we reported that such transient enriched housing improves cognitive performance of AD mouse models (Costa et al., 2007; Montarolo et al., 2013; Verret et al., 2013). The neurobiological basis of this beneficial effect of enriched environment (EE) on cognitive performance remains unknown. Because exposure to EE was shown to modulate PNNs around PV cells in regular mice (Favuzzi et al., 2017), EE might improve cognition in AD mouse models by regulating the presence of their PNNs. Whether and how EE affects PNNs of AD mouse models remain unknown. Thus, our second aim is to determine how PNN presence around PV cells is durably modified by transient EE.

To address these 2 questions, we performed immunostainings for PV-positive cells and PNNs in areas CA1, CA2, and CA3 of the hippocampus of nontransgenic (NTg) and transgenic mice (Tg2576) at different ages, representing different stages of the pathology. The same stainings were performed in another group of Tg2576 and NTg mice that were exposed to EE as previously described (Bezzina et al., 2015a; Verret et al., 2013). Quantification of PV+ cells and PNNs in the hippocampus of Tg2576 mice indicates that PV and PNN disruptions are early events of amyloidopathy. However, following transient stay in EE, the numbers of PV+ and PV+/PNN+ cells in the hippocampus of Tg2576 mice were not different from those of NTg mice after the same EE experience, showing for the first time that cognitive improvements induced by EE in AD mouse models could be supported by a remodeling of hippocampal PV cell network and their PNNs.

2. Methods

2.1. Mouse model

Experiments were performed on 63 female mice of the transgenic line Tg2576 (Hsiao et al., 1996) from our in-house colony. Tg2576 mice overexpress a double mutant form of human APP695 (Lys670-Asn, Met671-Leu [K670N, M671L]), driven by hamster prion protein promoter. Tg2576 males were bred with C57B6/SJL F1 females (Charles River, L'Arbresle, France), and the offspring was genotyped for the hAPP transgene using DNA obtained from post-weaning tail biopsies. Polymerase chain reaction products were analyzed to confirm the presence of hAPP DNA sequence in offspring. Mice were maintained on a 12-hour light/12-hour dark cycle with free access to food and water.

2.2. Enriched environment

Three-month-old Tg2576 and NTg mice were arbitrary divided in 2 groups. One group was housed in standard laboratory cages, by lot of 2–5 mice, until the age of 6 months. The other group was housed in EE, as previously described (Bezzina et al., 2015a; Verret et al., 2013) until mice reached the age of 5.5 months after which they were returned to their standard cages until the age of 6 months when they have been sacrificed. EE was composed of a large box (150 × 80 × 80 cm) containing various objects of different sizes, shapes, colors, and materials (wood, plastic, glass, metal), and no running wheel. Every other day, the spatial configuration of the objects was modified, and new objects were introduced to stimulate mice's exploratory behavior. Mice were exposed to the EE by groups of 7–12 individuals. All the mice were given *ad libitum* access to food and water.

2.3. Tissue preparation and immunohistochemistry

Mice were deeply anesthetized with pentobarbital solution and perfused transcardially with 0.9% saline solution. Brains were removed and postfixed in 4% paraformaldehyde in phosphate buffer (PB) 0.1 M solution for 2 days at 4 °C and then submerged in 30% sucrose solution for 2 more days. Thirty-micrometer-thick sections were cut on a sliding microtome (Leica SM2010R) equipped with a freezing stage, washed in PB with saline and 0.25% Triton-X (PBST) 2 times for 30 minutes then blocked in 10% normal donkey serum for 1 hour. Then, they have been incubated in biotin-conjugated Wisteria floribunda agglutinin (WFA) lectin (1:1000; Sigma, L1516), rabbit anti-PCP4 (1:250; Santa Cruz, sc-74816), and goat anti-PV antibody (1:500; Swant, PVG213) overnight at room temperature. Sections were washed 2 times in PBST during 20 minutes and incubated for 1 hour at room temperature with 1:500 streptavidin coupled with TRITC for PNN (Vector, SA-5549), 1:250 donkey anti-goat A488 for PV cells (Invitrogen, A-11055), and 1:250 donkey anti-rabbit A647 for PCP4 (Invitrogen, A-31573). Sections were then mounted in Mowiol solution and coverslipped.

2.4. Quantification of PV+ and PV+/PNN+ cells

Quantification of PV-immunoreactive (PV+) cells, and PV+ cells with PNN (PV+/PNN+), was conducted from a 1-in-12 series of sections spaced at 360 μm spanning the hippocampus

(approximately at −1.46, −1.70, −2.06, and −2.30 mm from bregma). Slides were coded before analysis, so that the experimenter was blind to group and genotype, until all samples were counted.

For each mouse, quantification of PV+, PNN+, and PV+/PNN+ cells was assessed manually at x20 magnification with a Leica DM6000 B fluorescence microscope with controlled setting. PV-positive cells were identified without any assumptions about the size, shape, and orientation of the objects. The double immunolabeling for PV and PNNs was determined when WFA staining was entirely enveloping the soma of a PV+ cell, even if the staining was low. Changes of focal point were used by the experimenter to erase uncertainty.

The corresponding surface area of hippocampal CA1, CA2, and CA3 sampled for counting was measured using the Mercator stereology system (Explora Nova, La Rochelle, France) at magnification x5. For a better precision in the identification of the area CA2, we use the PCP4 labeling, which, in the hippocampus, is specific to the pyramidal cells of the CA2 area (Dudek et al., 2016). The reference volume for these structures was determined as the sum of the traced areas multiplied by the distance between sampled sections (360 μm). The density of PV+ and PV+/PNN+ cells was then calculated by dividing the number of PV+ and PV+/PNN+ cells by sectional volume (30-μm thick sections). The total number of PV+ and PV+/PNN+ cells was estimated by multiplying these densities by the reference volume (West, 1993).

To avoid experimenter bias for the identification of the PV+ and PV+/PNN+ cells, sections from 4 mice were randomly picked and PV+ and PV+/PNN+ cells were quantified by another experimenter who was also blind to the housing condition and the genotype and who found the same cell numbers as the principal experimenter.

2.5. Quantification of WFA intensity in the CA2 area

The area CA2 of the hippocampus has the particularity to have a strong and diffuse WFA staining compared with other hippocampal structures (Carstens et al., 2016; Celio, 1993; Noguchi et al., 2017). First, images of the area CA2 were acquired with a Leica DM6000 B fluorescence microscope using controlled camera settings (ProgRes CFCool; Jenoptik, Jena, Germany) on 2 sections per animal (−1.70 and −2.06 mm from bregma). The CA2 pyramidal layer was delimited with the polygon tool with ImageJ (NIH) software, and the mean gray value in this zone was measured. All images were analyzed with the same methods of quantification: identification of CA2, delimitation of the pyramidal layer, and extraction of the mean intensity of WFA fluorescence.

2.6. Ethics statement

All experiments were performed in strict accordance with the policies of the European Union (2010/63/EU), the French National Committee of Ethics (87/848 and the modification of February, 1st, 2013), for the care and use of laboratory animals. Animal facility of the Centre de Recherches sur la Cognition Animale is fully accredited by the French Direction of Veterinary Services (D 31–555–11, Sep 13, 2016), and animal surgery and experimentation conducted in this study were authorized by the French Direction of Veterinary Services (#31–11555521, 2002, #02118.02, 2017). All efforts were made to improve animal welfare and minimize animal suffering.

2.7. Statistics

All statistical analyses were performed using the Prism 5 software (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). Two-way ANOVAs, completed with Sidak multiple comparison tests, were used to examine the effect of age and genotype on cell numbers. To display the effects of EE for each genotype and on each structure, cell numbers were normalized to the mean of the corresponding standard housed group and were compared using two-way ANOVA. For this analysis, post hoc tests consisted in one-sample *t*-tests against 100% (with Bonferroni correction). Student's *t*-tests were used to examine the differences in the absolute number of cells between NTg and Tg2576 mice after EE. For all tests, significance was determined by a p value of <0.05.

3. Results

3.1. Early disruption of PV and PNN cells in the hippocampus of Tg2576 mice

Evolution of PV+ and PNN+ cell numbers was evaluated during the course of the amyloid pathology in the Tg2576 mouse model of AD compared with normal aging. To do so, we estimated the numbers of PV+ cells harboring PNNs (PV+/PNN+), and the total number of PV+ cells (i.e., PV+/PNN+ and PV+/PNN−) in the areas CA1, CA2, and CA3 of the hippocampus of Tg2576 mice and NTg littermates at 3 different ages depicting different stages of the disease: at the age of 3 months (n = 5 for NTg, n = 5 for Tg2576), hence before any clear learning and memory deficits (Deacon et al., 2008; Hsiao et al., 1996; King et al., 1999); at the age of 6 months (n = 10 for NTg, n = 6 for Tg2576), just after the onset of learning and memory deficits (Jacobsen et al., 2006; Lesne et al., 2006; Westerman et al., 2002); and at the age of 13-15 months (n = 9 for NTg, n = 10 for Tg2576), when mice exhibit severe memory deficits and senile plaque can be found throughout the neocortex (Verret et al., 2013).

3.1.1. Area CA1

We first examined the presence of PNNs around PV cells (Fig. 1A and B) in the area CA1 of the hippocampus and reported the estimated absolute number of PV+/PNN+ cells in this area for each age and per genotype (Fig. 1C; two-way ANOVA for age: $p = 0.067$; genotype: $p < 0.0001$; interaction: $p = 0.084$). In NTg mice, we found that the number of PV+/PNN+ cells is stable until 6 months of age and then observed a significant drop in 13- to 15-month-old mice (Fig. 1C; post hoc test in NTg mice: 3 mo vs. 13 mo, $p = 0.052$; 6 mo vs. 13–15 mo $p = 0.009$). In Tg2576 mice, the number of PV+/PNN+ cells in the area CA1 remained stable from 3 to 13-15 months of age (Fig. 1C). In consequence, the number of PV cells harboring PNNs in Tg2576 mice resembling early stage of the disease is significantly lower compared with age-matched NTg mice (post hoc test between Tg2576 and NTg mice at 3 mo and 6 mo: $p = 0.024$ and $p = 0.001$, respectively). However, there is no difference in the number of PV+/PNN+ cells in the area CA1 of aged Tg2576 and NTg mice (post hoc test between Tg2576 and NTg mice at 13-15 mo, $p = 0.59$).

As PNN presence is important for PV cell integrity, we investigated whether reduction of PNNs in CA1 was accompanied by a lesser number of PV+ cells during normal and/or pathological aging (Fig. 1D; two-way ANOVA for age: $p = 0.010$, genotype: $p = 0.011$, interaction: $p = 0.139$). Our data in NTg mice reveal the same pattern for total PV+ cell number (with and without PNNs) compared with our observations for PV+/PNN+ cells (Fig. 1D; post hoc test in NTg mice: 3 mo vs. 13–15 mo, $p = 0.019$; 6 mo vs. 13–15 mo, $p = 0.004$). In the CA1 of Tg2576 mice, as observed for PV+/PNN+ cells, the total PV+ cell number remained stable, and rather low, across ages (Fig. 1D). However, in contrast to what was observed for PV+/PNN+ cells, the number of total PV+ cells in CA1 significantly differed from age-matched NTg mice only at the age of

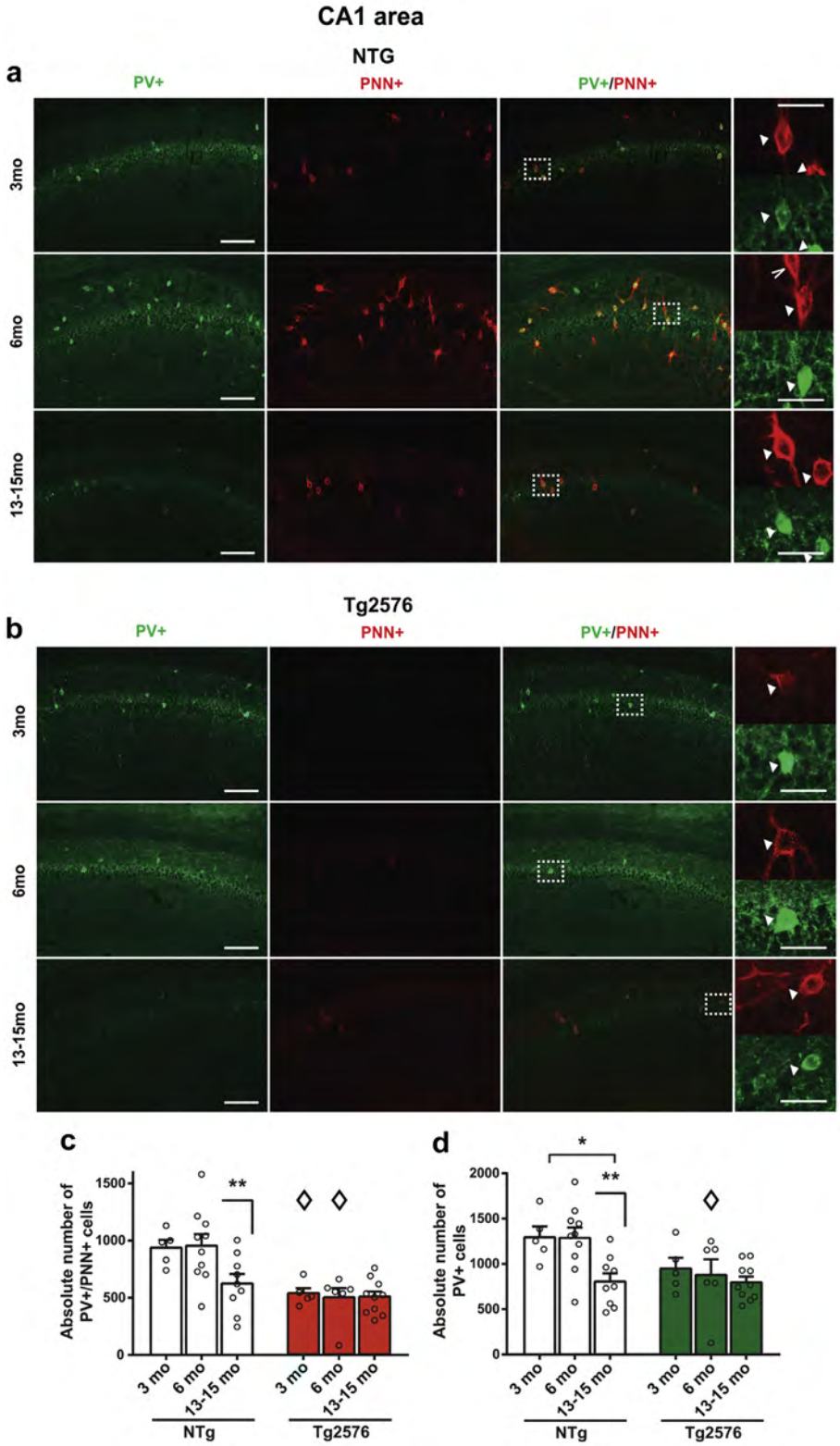


Fig. 1. The numbers of parvalbumin-positive cells with perineuronal net (PV+/PNN+), as well as total PV+ cells, are reduced in the area CA1 of young Tg2576 mice. Microphotographs illustrating PV+ (green) and PNN+ (WFA staining, red) cells in the area CA1 of 3-, 6-, and 13-15-month-old NTg (A) and Tg2576 (B) mice. Right panels are magnifications on which closed arrowheads indicate double-labeled cells, and open arrowheads show single-labeled (PV+ or PNN+) cells. The quantification of PV+/PNN+ cells (C) demonstrates a decrease in the number of these cells at 13–15 months of age compared with younger NTg mice. In contrast, there are less PV+/PNN+ cells in Tg2576 mice than in NTg mice as young as 3 months of age. The same trend is observed for the total number of PV+ cells in NTg and Tg2576 mice (D). Bar graphs represent the mean and error bars the SEM. Open circles show individual data. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ within same genotype; ◇: $p < 0.05$ between age-matched NTg and Tg2576 mice, according to Sidak's post hoc test. No symbol means $p > 0.05$. Scale bars = 50 μm; magnification scale bars = 25 μm. Abbreviations: PV, parvalbumin; PNN, perineuronal net; NTg, nontransgenic; WFA, Wisteria floribunda agglutinin. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

6 months (post hoc test between Tg2576 and NTg mice at 3 mo, $p = 0.224$; at 6 mo, $p = 0.039$). This observation suggests that PNN alteration appears before the reduction of PV cells in Tg2576 mice.

3.1.2. Area CA2

The absolute number of PV+/PNN+ cells in the area CA2 of NTg mice (Fig. 2A and B) shows the same pattern as in the CA1 (Fig. 2C; two-way ANOVA for age: $p = 0.004$; genotype: $p = 0.004$; and interaction: $p = 0.049$). Specifically, it decreases significantly at the age of 13-15 months compared with younger in NTg animals (post hoc test in NTg mice: 3 mo vs. 13–15 mo, $p = 0.026$; 6 mo vs. 13–15 mo, $p = 0.0004$). In Tg2576 mice, the number of PV+/PNN+ cells remained low from 3 months of age, showing a significantly fewer number of these neurons than that in age-matched NTg mice at the age of 6 months (post hoc test between 6 mo Tg2576 and NTg mice, $p = 0.003$).

Apart from the typical PNN presence around PV basket cells, the area CA2 of the hippocampus has the particularity to exhibit a strong and diffuse PNN expression in its pyramidal layer (Celio, 1993) (Fig. 2A and B). Whether or not this staining is around PV or pyramidal cells remains unclear (Carstens et al., 2016; Celio, 1993), and it may reflect the fact that pyramidal cells of the CA2 region are more densely covered by the terminals of PV cells than those of any other hippocampal region (Chevaleyre and Piskorowski, 2016). Although unknown, the functional significance of diffuse PNNs in the area CA2 might differ from that of lattice-like PNNs around PV cells. To address whether diffused PNNs in CA2 were modified by amyloidopathy, we quantified the mean intensity of WFA in the pyramidal layer of the area CA2, delimited with PCP4 staining, of NTg and Tg2576 mice (Fig. 2D; two-way ANOVA for age: $p = 0.506$; genotype, $p < 0.0001$; interaction, $p = 0.798$). No age effect on mean WFA intensity was observed, independent of the genotype. However, WFA intensity in the CA2 pyramidal layer is roughly 3-fold lower in Tg2576 (3 mo: 5.9 ± 0.4 a.u.; 6 mo: 9.13 ± 0.8 a.u.; 13–15 mo: 13.4 ± 1.1 a.u.) than NTg mice (3 mo: 26.1 ± 3.8 a.u.; 6 mo: 29.0 ± 5.4 a.u.; 13–15 mo: 29.0 ± 28.8 a.u.), resulting in a significant difference with control mice at a young age (post hoc test between Tg2576 and NTg mice at 3 mo, $p = 0.018$; at 6 mo, $p = 0.003$; at 13–15 mo, $p = 0.017$).

The number of PV+ cells in the area CA2 (Fig. 2E; two-way ANOVA for age: $p = 0.0004$; genotype: $p = 0.077$; interaction: $p = 0.104$) follows the same pattern as observed in the CA1. In NTg mice, the PV cell number decreases at the age of 13-15 months compared with younger ages (post-hoc test in NTg mice at 3 mo vs. 13–15 mo: $p = 0.005$; and 6 mo vs. 13–15 mo: $p = 0.0007$). In Tg2576 mice, it shows significant decrease compared with NTg age-matched mice only at 6 months of age (post hoc test between 6 mo Tg2576 and NTg mice, $p = 0.039$).

3.1.3. Area CA3

Fig. 3A and B shows a special pattern for PV/PNN staining during aging in the CA3 region of NTg mice (Fig. 3C; two-way ANOVA for age: $p = 0.012$; genotype: $p = 0.002$; interaction: $p = 0.008$). The absolute number of PV+/PNN+ cells is found to be increased between 3 and 6 months of age (post hoc test in NTg mice for 3 mo vs. 6 mo: $p = 0.013$). It then decreased in 13- to 15-month-old animals, as seen in other areas (6 months vs. 13–15 mo: $p < 0.0001$; 3 mo vs. 13–15 mo: $p = 0.716$). In contrast, the number of PV+/PNN+ cells in the area CA3 of Tg2576 mice does not show this age-dependent dynamic, remaining low from 3 to 13-15 months of age (Fig. 3C). The number of PV+/PNN+ cells in CA3 is significantly lower in 6-month-old Tg2576 mice than in age-matched NTg animals (post hoc test between Tg2576 and NTg mice at 6 mo, $p = 0.0001$).

Markedly, this particular age-dependent dynamic of PV+/PNN+ staining in the area CA3 of NTg animals is not observed regarding the total number of PV+ cells (Fig. 3D; two-way ANOVA for age: $p = 0.0008$; genotype: $p = 0.225$; interaction: $p = 0.048$). We found a significant decrease of PV+ cells at 13–15 months of age in NTg mice (post hoc test in NTg mice: 3 mo vs. 6 mo, $p = 0.850$; 3 mo vs. 13–15 mo, $p = 0.037$; 6 mo vs. 13–15 mo: $p = 0.0007$). Moreover, the area CA3 is the only structure where the number of PV+ cells is significantly decreased between young (3-month-old) and old (13- to 15-month-old) Tg2576 individuals (Fig. 3D; post hoc test in Tg2576 mice at 3 mo vs. 13–15 mo, $p = 0.026$). Likewise, the number of PV+ cells is significantly lower in 6-month-old Tg2576 mice than in age-matched NTg animals (post hoc test between 6 mo Tg2576 and NTg mice, $p = 0.020$).

In summary, the number of PNNs around PV+ cells, as well as the total number of PV+ cells, significantly decreases in the hippocampus during normal aging. In contrast, the number of PV+ interneurons in the area CA1 is decreased in Tg2576 mice as young as 3 months of age compared with age-matched control mice. In CA2, the effect of age on PV cell number is less marked and, in the area CA3, the number of PV cells in the hippocampus significantly drops gradually between 3- and 13- to 15-month-old Tg2576 mice. This indicates that PV cells in the area CA1 may be more vulnerable to amyloidopathy, followed by those in the area CA2 and finally those in the area CA3. Altogether, there is a reduction of PV+/PNN+ in Tg2576 mice as young as 3 months of age compared with age-matched NTg mice, which is followed by a decrease of PV+ cell numbers at 6 months of age, suggesting that the decrease of PNNs around PV+ cells precedes the decrease in the number of PV+ cells.

3.2. Transient enriched housing rescues PV/PNN deficits in Tg2576

Enriched housing modulates the presence of PNN around PV+ cells, and PV protein expression in wild-type mice (Favuzzi et al., 2017). We previously demonstrated that a transient stay in an EE occurring between 3 and 5.5 months of age is able to preserve spatial memory of Tg2576 mice at 13 months of age (Verret et al., 2013). Here, we elaborate on these results and show that the numbers of PV+/PNN+ cells and of total PV+ cells are decreased in the areas CA1, CA2, and CA3 of 6-month-old Tg2576 mice compared with NTg ones (Figs. 1-3). We speculated whether the beneficial effect of EE on memory of Tg2576 mice could be sustained by a change in PV/PNN expression following EE. To do so, 3-month-old NTg and Tg2576 mice were placed in an EE for 10 weeks (Bezzina et al., 2015a; Verret et al., 2013). When they were 6 months old, we estimated the numbers of PV+ cells harboring PNNs, and the total number of PV+ cells in the areas CA1, CA2, and CA3 of the hippocampus of these NTg (NTg EE) and Tg2576 (Tg2576 EE) mice.

To display the effect of EE, the number of PV+/PNN+ cells and the total number of PV+ cells, for each genotype and each structure, were counted and expressed as the percentage of the mean observed for the corresponding genotype in mice raised in standard cages (presented in Figs. 1-3). These data are represented in Fig. 4A and B. Two-way ANOVAs reveal a robust effect of the genotype on the effect of EE on both the number of PV+/PNN+ cells and the total number of PV+ cells ($p < 0.001$ for genotype in both cases). There is no influence of the hippocampal subfield studied (ANOVA; $p = 0.23$ for hippocampal area factor on the effect of EE on PV+/PNN+ cells and $p = 0.91$ for total PV+ cells) or any interactions between the genotype and the hippocampal subfield studied ($p = 0.86$ for the interaction factor on the effect of EE on PV+/PNN+ cells and $p = 0.38$ for total PV+ cells). When pooling the data obtained for CA1, CA2, and CA3, EE exposure decreased the number of PV+/PNN+ cells and the number of total PV+ cells in NTg-EE mice to, respectively, $80.2\% \pm 4.4\%$ and $85.1\% \pm 3.8\%$ of the mean number observed in NTg-SH mice. Conversely, in Tg2576-EE, enriched housing increased the same 2 parameters to, respectively, $123.4\% \pm 5.8\%$ and

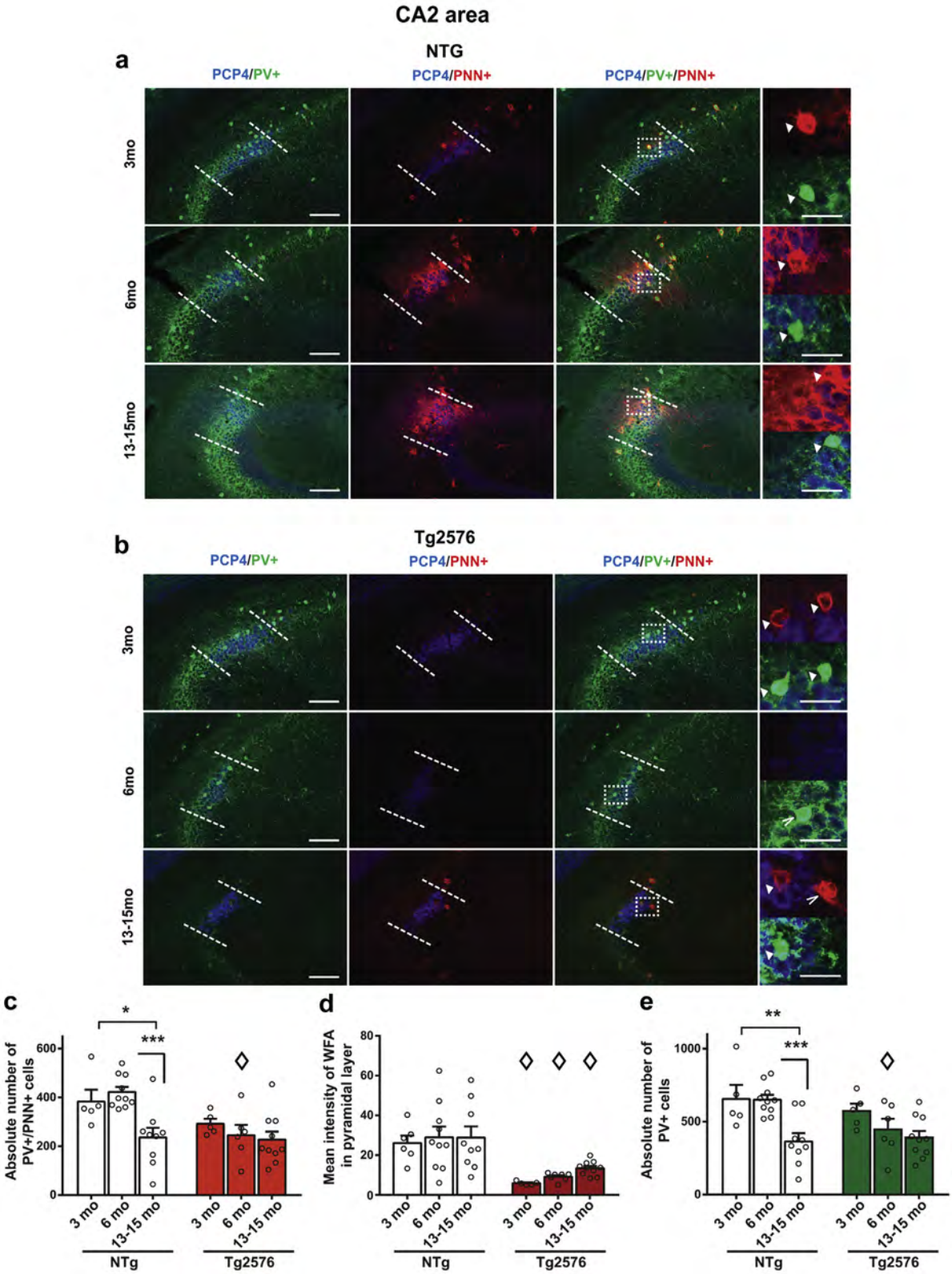


Fig. 2. Decreased numbers of parvalbumin-positive cells with perineuronal net (PV+/PNN+), total PV+ cells, and diffuse WFA staining in the area CA2 of Tg2576 mice. Microphotographs illustrating PV (green), PNN (WFA, red), and PCP4 (blue) staining in the area CA2 of 3-, 6-, and 13- to 15-month-old NTg (A) and Tg2576 (B) mice. On right panels are magnifications on which closed arrowheads indicate double-labeled cells, and open arrowheads show single-labeled (PV+ or PNN+) cells. The quantification of PV+/PNN+ cells (C) shows a decrease in the number of these cells in old NTg mice (13–15 mo). Interestingly, the number of PV+/PNN+ cells remains stable, and rather low, across aging in Tg2576 mice. Regarding the particular diffuse WFA presence in the pyramidal layer of the area CA2 (delimited by PCP4 expression) (D), NTg mice exhibit a stable WFA intensity across ages. In Tg2576 mice, this WFA staining in the pyramidal layer is constantly low and significantly decreased compared with NTg mice. Finally, the number of total PV+ cells in the area CA2 shows the same trend as for PV+/PNN+ staining for both NTg and Tg2576 mice (E). Bar graphs represent the mean and error bars the SEM. Open circles show individual data. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$ within same genotype; ◇: $p < 0.05$ between age-matched NTg and Tg2576 mice, according to Sidak's post hoc test. No symbol means $p > 0.05$. Scale bars = 50 μm; magnification scale bars = 25 μm. Abbreviations: PV, parvalbumin; PNN, perineuronal net; NTg, nontransgenic; WFA, Wisteria floribunda agglutinin. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

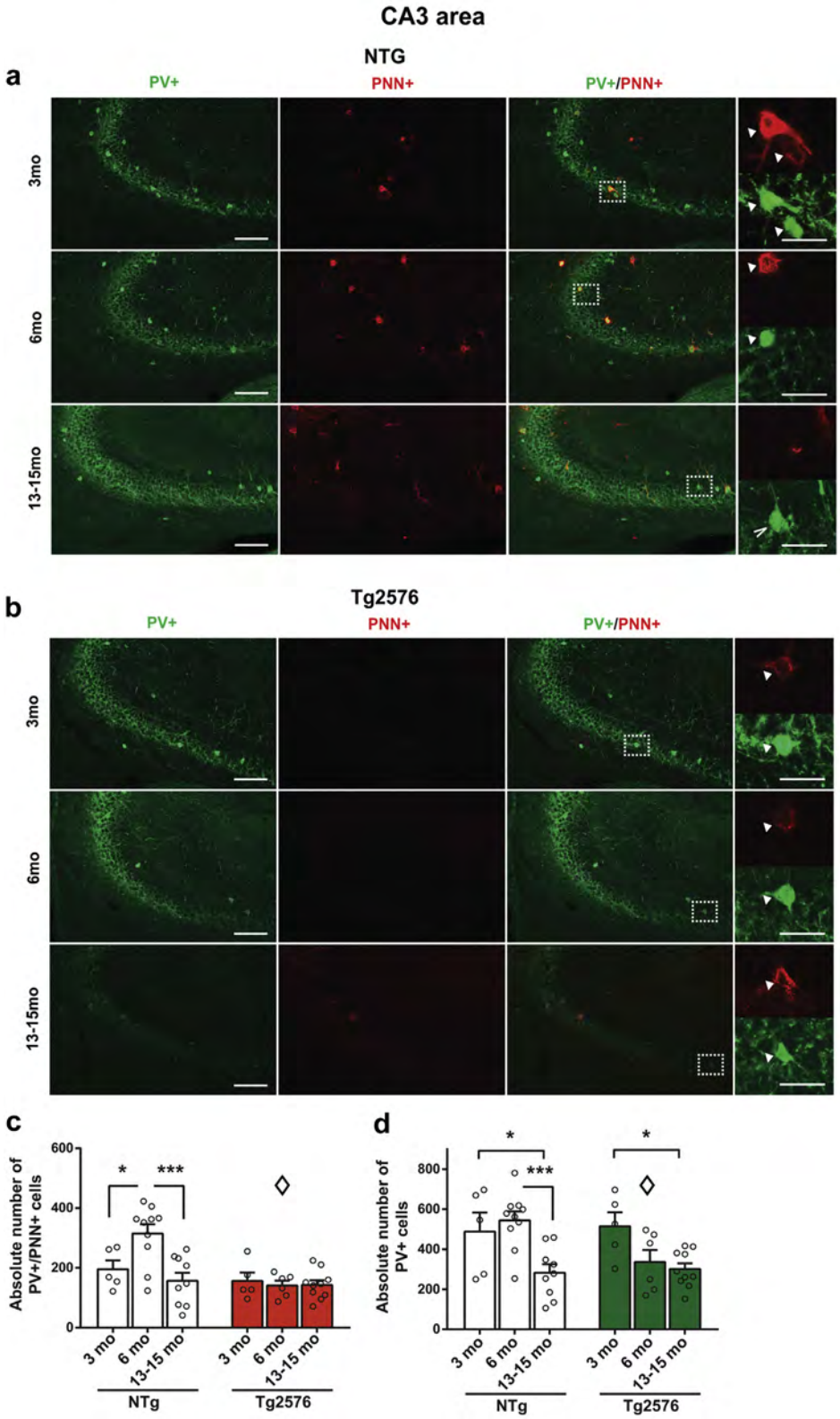


Fig. 3. Decreased numbers of parvalbumin-positive cells with perineuronal net (PV+/PNN+) and total PV+ cells in the area CA3 of Tg2576 mice. Microphotographs illustrating PV+ (green) cells and PNN (WFA, red) in the area CA3 of 3-, 6-, and 13- to 15-month-old NTg (A) and Tg2576 (B) mice. On right panels are magnifications on which closed arrowheads indicate double-labeled cells, and open arrowheads show single-labeled (PV+ or PNN+) cells. The quantification of PV+/PNN+ cells (C) shows an increase in the number of these cells between 3 and 6 months of age, followed by a decrease in old (13–15 mo) NTg mice. In contrast, PV+/PNN+ cell number in the CA3 of Tg2576 mice remains constantly low. Regarding the number of PV+ cells in NTg mice, it does not follow the same pattern as that for PV+/PNN+, showing as for other hippocampal structures a decrease only at 13–15 months of age (D). Interestingly, area CA3 is also the only region where there is an age-dependent reduction of PV+ cells in Tg2576 mice, hence reaching significance only at the age of 6 months when compared with age-matched NTg mice. Bar graphs represent the mean and error bars the SEM. Open circles show individual data. *: $p < 0.05$, ***: $p < 0.001$, within same genotype; and ◇: $p < 0.05$ between age-matched NTg and Tg2576 mice, according to Sidak's post hoc test. No symbol means $p > 0.05$. Scale bars = 50 μm; magnification scale bars = 25 μm. Abbreviations: PV, parvalbumin; PNN, perineuronal net; NTg, nontransgenic; WFA, Wisteria floribunda agglutinin. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

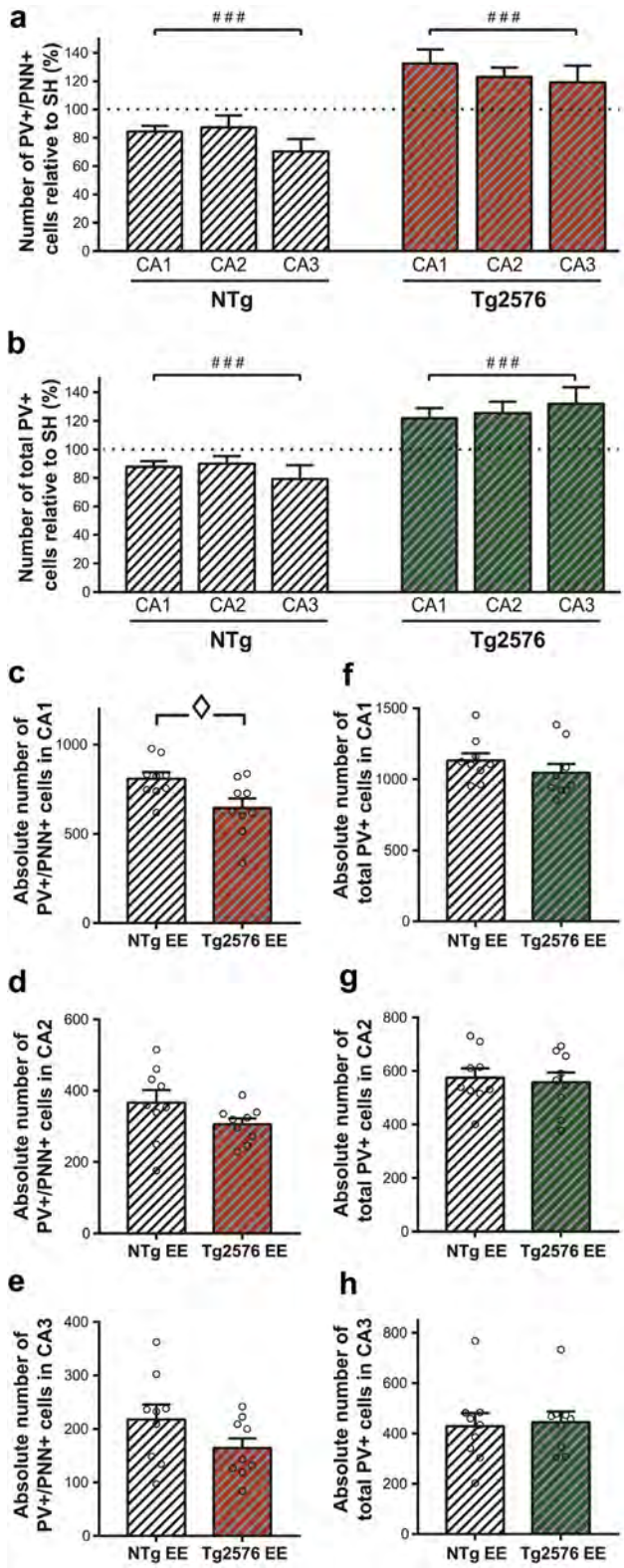


Fig. 4. Transient enriched housing abolishes the differences in the numbers of parvalbumin-positive cells with perineuronal nets (PV+/PNN+) and total PV+ cells between 6-month-old NTg and Tg2576 mice. Nine NTg and 9 Tg2576 mice were exposed to EE for 10 weeks starting at 3 months of age. For each mouse exposed to EE, we expressed the number of PV+/PNN+ cells (A) and the total number of PV+ cells (B) as a percentage of the mean observed in mice of the same genotype and age raised in SH. After a transient stay in EE, the numbers of PV+/PNN+ cells (C–E) and of total PV+ cells (F–H) globally decrease in NTg mice, whereas they increase in Tg2576 mice. This effect was homogeneous among all structures studied. Consequently, the difference observed between NTg and Tg2576 mice raised in SH (illustrated in Figs. 1-3) becomes undetectable, except for PV+/PNN+ in CA1 (C). Bar graphs represent the mean and error bars the SEM. Open circles show individual data. ###: $p < 0.001$ for one-sample t-tests against 100% when pooling all areas. ◇: $p < 0.05$ for two-sample t-test between genotypes. No symbol means $p > 0.05$. Abbreviations: PV, parvalbumin; PNN, perineuronal net; NTg, nontransgenic; WFA, Wisteria floribunda agglutinin; EE, enriched environment; SH, standard housing.

125.5% ± 5.5% of the mean number observed in Tg2576-SH mice ($p < 0.001$ for one-sample t-tests against 100% in each condition).

The difference in the number of PV+/PNN+ cells between genotypes in EE mice remains significant for the area CA1 (Fig. 4C; two-sample t-test: $p = 0.022$), but the differences between genotypes were abolished in CA2 and CA3 after exposure to EE (Fig. 4D and E; two-sample t-test: $p = 0.14$ and 0.13 respectively). Regarding the total number of PV+ cells, there is no differences between genotypes after 10 weeks of enriched housing, in any of the studied structures (Fig. 4F–H; two-sample t-tests: $p = 0.30$ for CA1; 0.73 for CA2; and 0.82 for CA3).

Altogether, transient enriched housing globally impacts PNNs presence around PV cells and total PV+ cell numbers in both NTg and Tg2576 mice. Specifically, transient exposure to EE decreases the number of hippocampal PV+/PNN+ and PV+ cells in NTg mice, whereas it has the opposite effect in Tg2576 mice. Consequently, EE suppresses the differences in PV+/PNN+ and PV+ absolute cell numbers observed between 6-month-old NTg and Tg2576 mice housed in standard conditions.

A different profile was observed for the effect of EE on WFA intensity in the pyramidal layer of the area CA2 (data not shown). This parameter increased in both NTg-EE and Tg2576-EE mice (respectively, 115.9% ± 19.6% and 124.1% ± 9.0% of the mean intensity observed in the corresponding SH mice), but this increase was only significant for the Tg2576-EE group (one-sample t-tests vs. 100%: $p = 0.44$ for NTg and $p = 0.023$ for Tg2576 mice). Because the level of WFA intensity in Tg2576 raised in SH was strikingly low, this increase does not attenuate the difference in WFA intensity between genotypes (NTg EE: 33.6 ± 5.6 a.u.; Tg2576 EE: 11.3 ± 0.8 a.u.; two-sample t-test: $p = 0.0004$).

4. Discussion

The aim of this work was to study the status of hippocampal PV cells and the presence of PNNs during the course of Alzheimer's pathology. We investigated how strongly stimulating cognitive functions by placing the animals in an EE (Nithianantharajah and Hannan, 2006; van Praag et al., 2000) can durably affect PV/PNN network in AD mouse models. Our study reveals that Tg2576 mice have decreased PV+/PNN+ cells that can be detected in the hippocampus of the mice as young as 3 months of age. Strikingly, if Tg2576 mice are transiently placed in EE starting at this age, the number of PV+/PNN+ cells in their hippocampus was rescued. We hypothesize that this increased presence of PNNs around PV cells, and even of PV cells themselves, could contribute to the long-lasting beneficial effects of EE on cognitive functions that were previously observed (Verret et al., 2013).

4.1. Early PV/PNN deficit in Tg2576 mice

The first observation in Tg2576 mice raised in standard housing condition is the strong diminution of the number of PV cells surrounded by PNNs in the whole hippocampus of the Tg2576 mice as young as 3 months of age compared with age-matched NTg mice. Atypical PNN absence in AD condition may compromise the functioning of PV circuits and the associated cognitive controls such as memory retrieval (Donato et al., 2013; Favuzzi et al., 2017; Gogolla

et al., 2009; Yamada et al., 2015). By counting all the detectable PV cells (with and without PNN) in the hippocampus of Tg2576 mice, we also reveal a decrease of PV cell number at the age of 6 months in areas CA2 and CA3, and even earlier in the area CA1. A similar reduction of PV+ cell number was already described in areas CA1-CA2 of very young TgCRND8 mice (Mahar et al., 2016), and even in 6-month-old Tg2576 mice when pooling all the hippocampal CAs (Huh et al., 2016). Furthermore, we noted that the diminution of PNNs around PV cells occurs before the decrease of total PV+ cells in Tg2576 mice. This observation is in accordance with the notion that the PNN protects PV cells against oxidative stress (Cabungcal et al., 2013; Suttkus et al., 2012). As such, our findings suggest that a decreased presence of PNNs around PV cells can trigger the loss of these interneurons. Alternatively, it is known that the absence of PNNs around PV cells leads to decreased excitatory inputs onto them, resulting in lower neuronal activity associated with reduced PV protein content (Donato et al., 2013; Favuzzi et al., 2017; Yamada et al., 2015). Therefore, our work, as corroborated by other studies using the TgCRND8 mouse model of AD (Albuquerque et al., 2015; Krantic et al., 2012; Mahar et al., 2016), suggests that hippocampal PV interneurons are still present in the hippocampus of young and adult Tg2576 mice, but that their PV protein content is not high enough for immunohistochemical detection. Our data obtained after EE support this idea given that transient EE starting at the age of 3 months, when Tg2576 mice already present low levels of PV cells in their hippocampus, results by an increase by about 20% of detectable PV+ interneurons 2 weeks after the end of EE period compared to standard housing condition. This suggests that, in AD condition, EE can provoke higher activity of otherwise understimulated PV cells, perhaps through an increased number of excitatory inputs onto them, favored by PNN restoration (Donato et al., 2013; Favuzzi et al., 2017). However, importantly, it is impossible to determine whether or not PV cells are still present in the hippocampus of Tg2576 animals, particularly in the oldest group of mice, only by using immunohistochemistry directed against PV protein. Further studies would be necessary to address this critical question, for instance by using a phenotypic marker for PV cells that is less linked to synaptic activity of these neurons, such as GAD65 (Chattopadhyaya et al., 2007).

PNN degradation and plasticity can be controlled by many proteases, including matrix metalloproteinases (MMPs) and ADAMTS (Dzwonek et al., 2004; Kelwick et al., 2015; Rossier et al., 2015). The level of these proteases is increased in the brain of AD mouse models (Yin et al., 2006) and patients (Backstrom et al., 1996; Miguel et al., 2005). Interestingly, increased levels of MMP protein and activity are also reported in the hippocampus after seizure activity (Wilczynski et al., 2008), which could participate to the PNN reduction associated with epilepsy (Dubey et al., 2017; Rankin-Gee et al., 2015). It is now well established that AD mouse models present spontaneous abnormal brain activity such as seizure and epileptiform spikes (Bezzina et al., 2015b; Minkeviciene et al., 2009; Palop et al., 2007; Ziyatdinova et al., 2016), and these observations have been since reproduced in AD patients (Vossel et al., 2017). Others and we recently reported that spontaneous epileptiform activity can be detected in Tg2576 mice as young as 1.5 months old (Bezzina et al., 2015b; Kam et al., 2016). It is thus possible that these Aβ-induced abnormal brain activities enhance the MMPs level, consequently degrading PNNs that potentially reduce PV cell activity. Alternatively, absence of PNN by itself may be sufficient to provoke hypersynchrony and hyperexcitability, through disruption of local PV cell networks and excitatory/inhibitory balance. Hence, whether PNN disruption is a cause or a consequence of aberrant network activity remains a key question in the understanding of AD pathology.

4.2. Effect of normal and pathological aging on PNNs in different hippocampal areas

In nontransgenic control subjects, we observed that aging differentially affects hippocampal areas. Specifically, PV and PNN remain stable up to 6 months and then decrease by 13-15 months in the areas CA1 and CA2. In the CA3 area, we observe an increase between 3 and 6 months of age, and then a decline between 6 and 13-15 months of age. These observations are in accordance with a previous study in wild-type mice, showing a decrease of PNN intensity between 2 and 12 months of age in the area CA1, but no changes between these same ages in the area CA3 (Yamada and Jinno, 2013). However, the increase in PNNs around PV cells is increased between 3 and 6 months of age specifically in the area CA3 of NTg mice remains unexplained.

In Tg2576 mice, the more consistent and earliest decrease of PNNs involves the well-described diffuse PNN expression into the pyramidal layer of the area CA2 (Celio, 1993). It is still unclear whether this strong presence of PNNs is due to its localization at PV interneuron terminals, which are particularly high in this hippocampal area (Botcher et al., 2014), or whether they are surrounding CA2 pyramidal neurons per se (Carstens et al., 2016). Interestingly, at the end of EE, the differences between genotypes are still pronounced for this parameter. Although the specific function and origin of diffuse PNN staining in the pyramidal layer of the CA2 remain to be determined, it is now well accepted that the CA2 plays an important, if not crucial, role in the formation of social memory (Hitti and Siegelbaum, 2014). For example, PV cell dysfunction in the CA2 area is associated with abnormal social behaviors (Piskorowski et al., 2016). Although these cognitive functions are strongly altered in AD patients, social memory and recognition have been poorly assessed so far in mouse models of the disease, and whether or not social memory is intact in Tg2576 mice after EE remains an open question.

In addition, our data indicate that the number of PV/PNN cells in the hippocampus of Tg2576 mice remains constantly low during aging. In contrast, in NTg mice, the number of PV/PNN cells declines between 6 and 13–15 months of age, then reaching the same number of PV/PNN cells as in Tg2576 mice. Consequently, and in accordance with a previous report using the same mouse line (Morawski et al., 2010), we did not find evidence for differences between the 2 genotypes at 13-15 months of age, although NTg and Tg2576 mice show different cognitive abilities at this age (Chapman et al., 1999; Lassalle et al., 2008). Some authors have suggested that the decrease of PNN intensity observed in the dorsal CA1 of 12-month-old wild-type mice may precede and participate to age-dependent memory decline (Yamada and Jinno, 2013). Similarly, alteration of PV/PNN function seems to occur before pronounced cognitive impairments in Tg2576 mice, which is around 6 months of age (Hsiao et al., 1996; Lesne et al., 2006; Westerman et al., 2002). This suggests that once the decrease of PV/PNN neurons occurs, it impacts cognitive function only after a certain amount of time both in 13-15-month-old NTg mice and 3-month-old Tg2576 mice.

4.3. Dual effect of transient EE on NTg and Tg2576 mice

Unexpectedly, our findings show an opposite impact of a transient stay in an EE on PNN presence and PV cell numbers in NTg and Tg2576 mice. However, a few weeks after EE, 6-month-old NTg and Tg2576 mice display the same number of PV/PNN and PV cells in their hippocampus (Fig. 5). Moreover, this EE protocol is able to promote long-lasting enhancement of cognitive functions of both NTg and Tg2576 mice (Verret et al., 2013). This suggests that, despite driving opposite effects on numbers of PV and PV/PNN cells depending on the genotype, EE favors the establishment of an

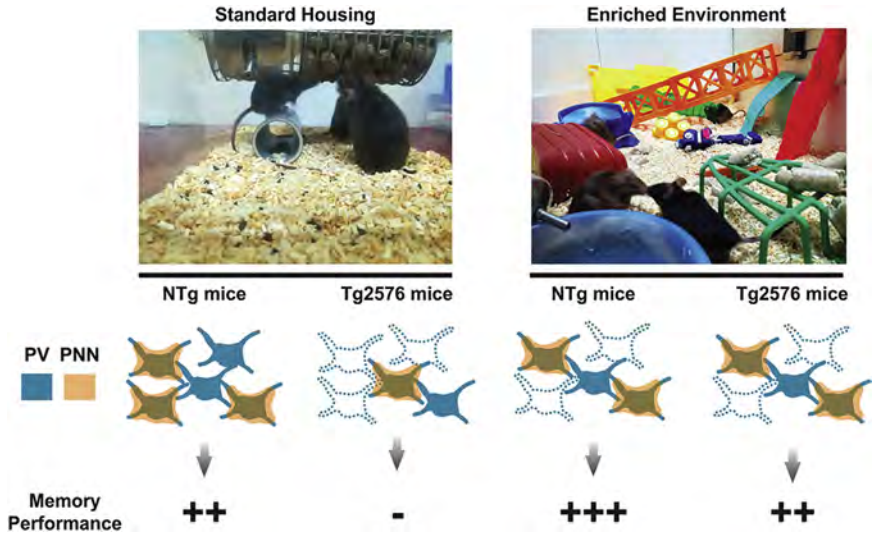


Fig. 5. Summary of the dual effect of EE on parvalbumin-positive (PV+) cells and their perineuronal nets (PNNs) in 6-month-old NTg and Tg2576 mice. At 6 months of age, the number of PNNs around PV+ cells, as well as the total number of PV+ cells, is globally decreased in the hippocampus of standard-housed Tg2576 mice compared with NTg ones. Six-month-old NTg mice that spent 10 weeks in EE exhibit decreased PNN presence around PV+ cells associated with reduction of PV protein in these cells that will favor the establishment of newly acquired hippocampal-dependent memories. In contrast, in the Tg2576 mouse model of AD, enriched housing is increasing the rather low number of hippocampal PV+/PNN+ cells observed with standard housing. This change in PV cell network could result in the long-lasting beneficial impact of EE in AD mouse models previously described (Verret et al., 2013). Abbreviations: PV, parvalbumin; PNN, perineuronal net; NTg, nontransgenic; EE, enriched environment.

"optimal" range for PV/PNN cell numbers in the hippocampus, which allows memory enhancement (Fig. 5).

Indeed, the number of PNN around PV cells and total PV+ cells declines in the hippocampus of nontransgenic animals after EE. These results are in line with recent studies reporting that enriched housing is able to remodel the PV interneuron network by increasing the number of inhibitory synapses onto CA3 PV cells, which results in a shift to low levels of PV protein in these basket cells (Donato et al., 2013; Favuzzi et al., 2017). Moreover, EE has been shown to induce a decrease of brevican, 1 of the major components of PNNs. Interestingly, reduced levels of *Bcan* mRNA can be observed after 4 days of EE, hence, before changes in the number of excitatory synapses or the levels of brevican and PV proteins were seen (Favuzzi et al., 2017). These observations suggest that EE gradually impacts PV cell functioning through regulation of PNN components at least in wild-type animals. Indeed, in NTg mice, decreased PNN presence associated with reduced excitatory drive of PV interneurons after EE would provide disinhibition of hippocampal pyramidal cells and favor the establishment of newly acquired hippocampal-dependent memories (Donato et al., 2013) (Fig. 5). In contrast, in the Tg2576 mouse model of AD, enriched housing while PV/PNN network is already affected by the disease differs from that observed in NTg mice. In AD mice, EE promotes the number of hippocampal PV+/PNN+ cells observed with standard housing. Interestingly, PV cell network in the hippocampus of standard-housed Tg2576 mice, that is, PV cells lacking PNN and presumably with low PV content, remarkably resembles that of juvenile brains (Donato et al., 2013; Horii-Hayashi et al., 2015; Yamada and Jinno, 2013). In young individuals, this state of PV network is accompanied by infantile amnesia and memory erasure following extinction (Gogolla et al., 2009; Guskjolen et al., 2017). This suggests that immature-like PV cell networks in AD mice may impinge on memory retrieval and perhaps even formation of new memories. However, in juvenile brains, experience-dependent non–cell-autonomous maturation of PV cells relies on surrounding GABAergic activity (Hensch et al., 1998) and is often concomitant with PNN formation (Takesian and Hensch, 2013). When juvenile animals, but also other models with low PNNs such as sensory deprived animals, are placed in EE, the maturation of PV cells is accelerated (Bartoletti et al., 2004; Carstens et al., 2016). Similarly, by inducing a sustained involvement of hippocampal network, and in particular PV cells, EE could provoke "maturation" of PV cells in AD mice, associated with higher PV contents and PNN presence. According to our previous work, this change in PV cell network could sustain to the long-lasting beneficial impact of EE in AD mice (Verret et al., 2013) (Fig. 5).

5. Conclusion

Altogether, our work indicates that lack of PNN-enwrapped PV cells could play a critical role in the establishment of dysfunctional hippocampal network and memory deficits of AD mouse models. This eventually supports the critical role of hippocampal PV cell dysfunction in AD pathology (Verret et al., 2012) and underpins the significance of PNNs in memory and cognition (Tsien, 2013). Importantly, albeit the pathology, placing the animals in an EE restores PV cell network by triggering experience-dependent PNN formation around PV cells. This indicates that strategies aiming at enhancing PV cell function through their PNNs may be alternative therapeutic targets in AD.

Disclosure statement

The authors have no actual or potential conflicts of interest.

Acknowledgements

The authors thank Dina N. Arvanitis for critically reading the article, and H. Halley and S. Pech for animal care and technical help. Mice were housed in the ABC Facility of ANEXPLO, Toulouse. This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique, the University of Toulouse, and by grants from the Fondation Fyssen; the Association France Alzheimer and the Institut Universitaire de France. VC was supported by a fellowship from the Fondation Vaincre Alzheimer [grant number 15033, 2015], and CB was supported by the Agence Régionale de Santé. These sponsors

had no involvements in study design, in collection, analysis and interpretation of data, in the writing of the report, or in the decision to submit the article for publication.

References

Albuquerque, M.S., Mahar, I., Davoli, M.A., Chabot, J.G., Mechawar, N., Quirion, R., Krantic, S., 2015. Regional and sub-regional differences in hippocampal GABAergic neuronal vulnerability in the TgCRND8 mouse model of Alzheimer's disease. Front. Aging Neurosci. 7, 30.

Backstrom, J.R., Lim, G.P., Cullen, M.J., Tokes, Z.A., 1996. Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) is synthesized in neurons of the human hippocampus and is capable of degrading the amyloid-beta peptide (1-40). J. Neurosci. 16, 7910–7919.

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

Bartoletti, A., Medini, P., Berardi, N., Maffei, L., 2004. Environmental enrichment prevents effects of dark-rearing in the rat visual cortex. Nat. Neurosci. 7, 215–216.

Bezzina, C., Verret, L., Halley, H., Dahan, L., Rampon, C., 2015a. Environmental enrichment does not influence hypersynchronous network activity in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. Front. Aging Neurosci. 7, 178.

Bezzina, C., Verret, L., Juan, C., Remaud, J., Halley, H., Rampon, C., Dahan, L., 2015b. Early onset of hypersynchronous network activity and expression of a marker of chronic seizures in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. PLoS One 10, e0119910.

Bontempi, B., Laurent-Demir, C., Destrade, C., Jaffard, R., 1999. Time-dependent reorganization of brain circuitry underlying long-term memory storage. Nature 400, 671–675.

Botcher, N.A., Falck, J.E., Thomson, A.M., Mercer, A., 2014. Distribution of interneurons in the CA2 region of the rat hippocampus. Front. Neuroanat. 8, 104.

Cabungcal, J.H., Steullet, P., Morishita, H., Kraftsik, R., Cuenod, M., Hensch, T.K., Do, K.Q., 2013. Perineuronal nets protect fast-spiking interneurons against oxidative stress. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 110, 9130–9135.

Carstens, K.E., Phillips, M.L., Pozzo-Miller, L., Weinberg, R.J., Dudek, S.M., 2016. Perineuronal nets suppress plasticity of excitatory synapses on CA2 pyramidal neurons. J. Neurosci. 36, 6312–6320.

Celio, M.R., 1993. Perineuronal nets of extracellular matrix around parvalbumin-containing neurons of the hippocampus. Hippocampus 55–60, 3 Spec No.

Chapman, P.F., White, G.L., Jones, M.W., Cooper-Blacketer, D., Marshall, V.J., Irizarry, M., Younkin, L., Good, M.A., Bliss, T.V., Hyman, B.T., Younkin, S.G., Hsiao, K.K., 1999. Impaired synaptic plasticity and learning in aged amyloid precursor protein transgenic mice. Nat. Neurosci. 2, 271–276.

Chattopadhyaya, B., Di Cristo, G., Wu, C.Z., Knott, G., Kuhlman, S., Fu, Y., Palmiter, R.D., Huang, Z.J., 2007. GAD67-mediated GABA synthesis and signaling regulate inhibitory synaptic innervation in the visual cortex. Neuron 54, 889–903.

Chevaleyre, V., Piskorowski, R., 2014. Modulating excitation through plasticity at inhibitory synapses. Front. Cell. Neurosci. 8, 93.

Chevaleyre, V., Piskorowski, R.A., 2016. Hippocampal area CA2: an overlooked but promising therapeutic target. Trends Mol. Med. 22, 645–655.

Costa, D.A., Cracchiolo, J.R., Bachstetter, A.D., Hughes, T.F., Bales, K.R., Paul, S.M., Mervis, R.F., Arendash, G.W., Potter, H., 2007. Enrichment improves cognition in AD mice by amyloid-related and unrelated mechanisms. Neurobiol. Aging 28, 831–844.

Deacon, R.M., Cholerton, L.L., Talbot, K., Nair-Roberts, R.G., Sanderson, D.J., Romberg, C., Koros, E., Bornemann, K.D., Rawlins, J.N., 2008. Age-dependent and -independent behavioral deficits in Tg2576 mice. Behavioural brain research 189, 126–138.

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

Dubey, D., McRae, P.A., Rankin-Gee, E.K., Baranov, E., Wandrey, L., Rogers, S., Porter, B.E., 2017. Increased metalloproteinase activity in the hippocampus following status epilepticus. Epilepsy Res. 132, 50–58.

Dudek, S.M., Alexander, G.M., Farris, S., 2016. Rediscovering area CA2: unique properties and functions. Nat. Rev. Neurosci. 17, 89–102.

Dzwonek, J., Rylski, M., Kaczmarek, L., 2004. Matrix metalloproteinases and their endogenous inhibitors in neuronal physiology of the adult brain. FEBS Lett. 567, 129–135.

Favuzzi, E., Marques-Smith, A., Deogracias, R., Winterflood, C.M., Sanchez-Aguilera, A., Mantoan, L., Maeso, P., Fernandes, C., Ewers, H., Rico, B., 2017. Activity-dependent gating of parvalbumin interneuron function by the perineuronal net protein brevican. Neuron 95, 639–655.e10.

Gogolla, N., Caroni, P., Luthi, A., Herry, C., 2009. Perineuronal nets protect fear memories from erasure. Science 325, 1258–1261.

Golgi, C., 1893. Intorno all'origine del quarto nervo cerebrale e una questione istofisiologica che a questo argomento si collega. Rendiconti della Reale Accademia dei Lincei 21, 443–450.

Gould, E., Tanapat, P., Hastings, N.B., Shors, T.J., 1999. Neurogenesis in adulthood: a possible role in learning. Trends Cogn. Sci. 3, 186–192.

Guskjolen, A., Josselyn, S.A., Frankland, P.W., 2017. Age-dependent changes in spatial memory retention and flexibility in mice. Neurobiol. Learn. Mem. 143, 59–66.

Hall, J., Thomas, K.L., Everitt, B.J., 2000. Rapid and selective induction of BDNF expression in the hippocampus during contextual learning. Nat. Neurosci. 3, 533–535.

Hensch, T.K., Fagiolini, M., Mataga, N., Stryker, M.P., Baekkeskov, S., Kash, S.F., 1998. Local GABA circuit control of experience-dependent plasticity in developing visual cortex. Science 282, 1504–1508.

Hirjak, D., Wolf, R.C., Remmele, B., Seidl, U., Thomann, A.K., Kubera, K.M., Schroder, J., Maier-Hein, K.H., Thomann, P.A., 2017. Hippocampal formation alterations differently contribute to autobiographic memory deficits in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. Hippocampus 27, 702–715.

Hitti, F.L., Siegelbaum, S.A., 2014. The hippocampal CA2 region is essential for social memory. Nature 508, 88–92.

Horii-Hayashi, N., Sasagawa, T., Matsunaga, W., Nishi, M., 2015. Development and structural variety of the chondroitin sulfate proteoglycans-contained extracellular matrix in the mouse brain. Neural Plast. 2015, 256389.

Howell, M.D., Bailey, L.A., Cozart, M.A., Gannon, B.M., Gottschall, P.E., 2015. Hippocampal administration of chondroitinase ABC increases plaque-adjacent synaptic marker and diminishes amyloid burden in aged APPswe/PS1dE9 mice. Acta Neuropathol. Commun. 3, 54.

Hsiao, K., Chapman, P., Nilsen, S., Eckman, C., Harigaya, Y., Younkin, S., Yang, F., Cole, G., 1996. Correlative memory deficits, Abeta elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. Science 274, 99–102.

Huh, S., Baek, S.J., Lee, K.H., Whitcomb, D.J., Jo, J., Choi, S.M., Kim, D.H., Park, M.S., Lee, K.H., Kim, B.C., 2016. The reemergence of long-term potentiation in aged Alzheimer's disease mouse model. Sci. Rep. 6, 29152.

Irizarry, M.C., Jin, S., He, F., Emond, J.A., Raman, R., Thomas, R.G., Sano, M., Quinn, J.F., Tariot, P.N., Galasko, D.R., Ishihara, L.S., Weil, J.G., Aisen, P.S., 2012. Incidence of new-onset seizures in mild to moderate Alzheimer disease. Arch. Neurol. 69, 368–372.

Ittner, L.M., Ke, Y.D., Delerue, F., Bi, M., Gladbach, A., van Eersel, J., Wolfing, H., Chieng, B.C., Christie, M.J., Napier, I.A., Eckert, A., Staufenbiel, M., Hardeman, E., Gotz, J., 2010. Dendritic function of tau mediates amyloid-beta toxicity in Alzheimer's disease mouse models. Cell 142, 387–397.

Jacobsen, J.S., Wu, C.C., Redwine, J.M., Comery, T.A., Arias, R., Bowlby, M., Martone, R., Morrison, J.H., Pangalos, M.N., Reinhart, P.H., Bloom, F.E., 2006. Early-onset behavioral and synaptic deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 103, 5161–5166.

Kam, K., Duffy, A.M., Moretto, J., LaFrancois, J.J., Scharfman, H.E., 2016. Interictal spikes during sleep are an early defect in the Tg2576 mouse model of beta-amyloid neuropathology. Sci. Rep. 6, 20119.

Karunakaran, S., Chowdhury, A., Donato, F., Quairiaux, C., Michel, C.M., Caroni, P., 2016. PV plasticity sustained through D1/5 dopamine signaling required for long-term memory consolidation. Nat. Neurosci. 19, 454–464.

Kelwick, R., Desanlis, I., Wheeler, G.N., Edwards, D.R., 2015. The ADAMTS (A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs) family. Genome Biol. 16, 113.

Kim, D., Jeong, H., Lee, J., Ghim, J.W., Her, E.S., Lee, S.H., Jung, M.W., 2016. Distinct roles of parvalbumin- and Somatostatin-expressing interneurons in working memory. Neuron 92, 902–915.

King, D.L., Arendash, G.W., Crawford, F., Sterk, T., Menendez, J., Mullan, M.J., 1999. Progressive and gender dependent cognitive impairment in the APP(SW) transgenic mouse model for Alzheimer's disease. Behavioural brain research 103, 145–162.

Kobayashi, K., Emson, P.C., Mountjoy, C.Q., 1989. Vicia villosa lectin-positive neurones in human cerebral cortex. Loss in Alzheimer-type dementia. Brain Res. 498, 170–174.

Korotkova, T., Fuchs, E.C., Ponomarenko, A., von Engelhardt, J., Monyer, H., 2010. NMDA receptor ablation on parvalbumin-positive interneurons impairs hippocampal synchrony, spatial representations, and working memory. Neuron 68, 557–569.

Krantic, S., Isorce, N., Mechawar, N., Davoli, M.A., Vignault, E., Albuquerque, M., Chabot, J.G., Moyse, E., Chauvin, J.P., Aubert, I., McLaurin, J., Quirion, R., 2012. Hippocampal GABAergic neurons are susceptible to amyloid-beta toxicity in vitro and are decreased in number in the Alzheimer's disease TgCRND8 mouse model. J. Alzheimers Dis. 29, 293–308.

Kumar-Singh, S., Dewachter, I., Moechars, D., Lubke, U., De Jonghe, C., Ceuterick, C., Checler, F., Naidu, A., Cordell, B., Cras, P., Van Broeckhoven, C., Van Leuven, F., 2000. Behavioral disturbances without amyloid deposits in mice overexpressing human amyloid precursor protein with Flemish (A692G) or Dutch (E693Q) mutation. Neurobiol. Dis. 7, 9–22.

Kwok, J.C., Dick, G., Wang, D., Fawcett, J.W., 2011. Extracellular matrix and perineuronal nets in CNS repair. Dev. Neurobiol. 71, 1073–1089.

Lassalle, J.M., Halley, H., Daumas, S., Verret, L., Frances, B., 2008. Effects of the genetic background on cognitive performances of TG2576 mice. Behav. Brain Res. 191, 104–110.

Lendvai, D., Morawski, M., Negyessy, L., Gati, G., Jager, C., Baksa, G., Glasz, T., Attems, J., Tanila, H., Arendt, T., Harkany, T., Alpar, A., 2013. Neurochemical mapping of the human hippocampus reveals perisynaptic matrix around functional synapses in Alzheimer's disease. Acta Neuropathol. 125, 215–229.

Lesne, S., Koh, M.T., Kotilinek, L., Kayed, R., Glabe, C.G., Yang, A., Gallagher, M., Ashe, K.H., 2006. A specific amyloid-beta protein assembly in the brain impairs memory. Nature 440, 352–357.

Lim, Y.Y., Maruff, P., Pietrzak, R.H., Ellis, K.A., Darby, D., Ames, D., Harrington, K., Martins, R.N., Masters, C.L., Szoeke, C., Savage, G., Villemagne, V.L., Rowe, C.C., Group AR, 2014. Abeta and cognitive change: examining the preclinical and prodromal stages of Alzheimer's disease. Alzheimer's & dementia. J. Alzheimer's Assoc. 10, 743–751 e1.

Mahar, I., Albuquerque, M.S., Mondragon-Rodriguez, S., Cavanagh, C., Davoli, M.A., Chabot, J.G., Williams, S., Mechawar, N., Quirion, R., Krantic, S., 2016. Phenotypic alterations in hippocampal NPY- and PV-expressing interneurons in a presymptomatic transgenic mouse model of Alzheimer's disease. Front. Aging Neurosci. 8, 327.

Mann, E.O., Paulsen, O., 2007. Role of GABAergic inhibition in hippocampal network oscillations. Trends Neurosci. 30, 343–349.

Miguel, R.F., Pollak, A., Lubec, G., 2005. Metalloproteinase ADAMTS-1 but not ADAMTS-5 is manifold overexpressed in neurodegenerative disorders as Down syndrome, Alzheimer's and Pick's disease. Brain Res. Mol. Brain Res. 133, 1–5.

Minkeviciene, R., Rheims, S., Dobszay, M.B., Zilberter, M., Hartikainen, J., Fulop, L., Penke, B., Zilberter, Y., Harkany, T., Pitkanen, A., Tanila, H., 2009. Amyloid beta-induced neuronal hyperexcitability triggers progressive epilepsy. J. Neurosci. 29, 3453–3462.

Montarolo, F., Parolisi, R., Hoxha, E., Boda, E., Tempia, F., 2013. Early enriched environment exposure protects spatial memory and accelerates amyloid plaque formation in APP(Swe)/PS1(L166P) mice. PLoS One 8, e69381.

Morawski, M., Bruckner, G., Jager, C., Seeger, G., Matthews, R.T., Arendt, T., 2012. Involvement of perineuronal and perisynaptic extracellular matrix in Alzheimer's disease neuropathology. Brain Pathol. 22, 547–561.

Morawski, M., Pavlica, S., Seeger, G., Grosche, J., Kouznetsova, E., Schliebs, R., Brückner, G., Arendt, T., 2010. Perineuronal nets are largely unaffected in Alzheimer model Tg2576 mice. Neurobiol. Aging 31, 1254–1256.

Nithianantharajah, J., Hannan, A.J., 2006. Enriched environments, experience-dependent plasticity and disorders of the nervous system. Nat. Rev. Neurosci. 7, 697–709.

Noguchi, A., Matsumoto, N., Morikawa, S., Tamura, H., Ikegaya, Y., 2017. Juvenile hippocampal CA2 region expresses aggrecan. Front. Neuroanat. 11, 41.

Palop, J.J., Chin, J., Roberson, E.D., Wang, J., Thwin, M.T., Bien-Ly, N., Yoo, J., Ho, K.O., Yu, G.Q., Kreitzer, A., Finkbeiner, S., Noebels, J.L., Mucke, L., 2007. Aberrant excitatory neuronal activity and compensatory remodeling of inhibitory hippocampal circuits in mouse models of Alzheimer's disease. Neuron 55, 697–711.

Piskorowski, R.A., Nasrallah, K., Diamantopoulou, A., Mukai, J., Hassan, S.I., Siegelbaum, S.A., Gogos, J.A., Chevaleyre, V., 2016. Age-dependent specific changes in area CA2 of the Hippocampus and social memory deficit in a mouse model of the 22q11.2 deletion syndrome. Neuron 89, 163–176.

Rankin-Gee, E.K., McRae, P.A., Baranov, E., Rogers, S., Wandrey, L., Porter, B.E., 2015. Perineuronal net degradation in epilepsy. Epilepsia 56, 1124–1133.

Rossier, J., Bernard, A., Cabungcal, J.H., Perrenoud, Q., Savoye, A., Gallopin, T., Hawrylycz, M., Cuenod, M., Do, K., Urban, A., Lein, E.S., 2015. Cortical fast-spiking parvalbumin interneurons enwrapped in the perineuronal net express the metallopeptidases Adamts8, Adamts15 and Neprilysin. Mol. Psychiatry 20, 154–161.

Scarmeas, N., Levy, G., Tang, M.X., Manly, J., Stern, Y., 2001. Influence of leisure activity on the incidence of Alzheimer's disease. Neurology 57, 2236–2242.

Stern, Y., Gurland, B., Tatemichi, T.K., Tang, M.X., Wilder, D., Mayeux, R., 1994. Influence of education and occupation on the incidence of Alzheimer's disease. JAMA 271, 1004–1010.

Suttkus, A., Rohn, S., Jager, C., Arendt, T., Morawski, M., 2012. Neuroprotection against iron-induced cell death by perineuronal nets - an in vivo analysis of oxidative stress. Am. J. Neurodegener Dis. 1, 122–129.

Takesian, A.E., Hensch, T.K., 2013. Balancing plasticity/stability across brain development. Prog. Brain Res. 207, 3–34.

Tsien, R.Y., 2013. Very long-term memories may be stored in the pattern of holes in the perineuronal net. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 110, 12456–12461.

van Praag, H., Kempermann, G., Gage, F.H., 2000. Neural consequences of environmental enrichment. Nat. Rev. Neurosci. 1, 191–198.

Vegh, M.J., Heldring, C.M., Kamphuis, W., Hijazi, S., Timmerman, A.J., Li, K.W., van Nierop, P., Mansvelder, H.D., Hol, E.M., Smit, A.B., van Kesteren, R.E., 2014. Reducing hippocampal extracellular matrix reverses early memory deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. Acta Neuropathol Commun 2, 76.

Verret, L., Krezymon, A., Halley, H., Trouche, S., Zerwas, M., Lazouret, M., Lassalle, J.M., Rampon, C., 2013. Transient enriched housing before amyloidosis onset sustains cognitive improvement in Tg2576 mice. Neurobiol. Aging 34, 211–225.

Verret, L., Mann, E.O., Hang, G.B., Barth, A.M., Cobos, I., Ho, K., Devidze, N., Masliah, E., Kreitzer, A.C., Mody, I., Mucke, L., Palop, J.J., 2012. Inhibitory interneuron deficit links altered network activity and cognitive dysfunction in Alzheimer model. Cell 149, 708–721.

Vogt, D.L., Thomas, D., Galvan, V., Bredesen, D.E., Lamb, B.T., Pimplikar, S.W., 2011. Abnormal neuronal networks and seizure susceptibility in mice overexpressing the APP intracellular domain. Neurobiol. Aging 32, 1725–1729.

Vossel, K.A., Beagle, A.J., Rabinovici, G.D., Shu, H., Lee, S.E., Naasan, G., Hegde, M., Cornes, S.B., Henry, M.L., Nelson, A.B., Seeley, W.W., Geschwind, M.D., Gorno-Tempini, M.L., Shih, T., Kirsch, H.E., Garcia, P.A., Miller, B.L., Mucke, L., 2013. Seizures and epileptiform activity in the early stages of Alzheimer disease. JAMA Neurol. 70, 1158–1166.

Vossel, K.A., Tartaglia, M.C., Nygaard, H.B., Zeman, A.Z., Miller, B.L., 2017. Epileptic activity in Alzheimer's disease: causes and clinical relevance. Lancet Neurol. 16, 311–322.

West, M.J., 1993. New stereological methods for counting neurons. Neurobiol. Aging 4, 275–285.

Westerman, M.A., Cooper-Blacketer, D., Mariash, A., Kotilinek, L., Kawarabayashi, T., Younkin, L.H., Carlson, G.A., Younkin, S.G., Ashe, K.H., 2002. The relationship between Abeta and memory in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. J. Neurosci. 22, 1858–1867.

Wilczynski, G.M., Konopacki, F.A., Wilczek, E., Lasiecka, Z., Gorlewicz, A., Michaluk, P., Wawrzyniak, M., Malinowska, M., Okulski, P., Kolodziej, L.R., Konopka, W., Duniec, K., Mioduszewska, B., Nikolaev, E., Walczak, A., Owczarek, D., Gorecki, D.C., Zuschratter, W., Ottersen, O.P., Kaczmarek, L., 2008. Important role of matrix metalloproteinase 9 in epileptogenesis. J. Cell Biol. 180, 1021–1035.

Wright, A.L., Zinn, R., Hohensinn, B., Konen, L.M., Beynon, S.B., Tan, R.P., Clark, I.A., Abdipranoto, A., Vissel, B., 2013. Neuroinflammation and neuronal loss precede Abeta plaque deposition in the hAPP-J20 mouse model of Alzheimer's disease. PLoS One 8, e59586.

Yamada, J., Jinno, S., 2013. Spatio-temporal differences in perineuronal net expression in the mouse hippocampus, with reference to parvalbumin. Neuroscience 253, 368–379.

Yamada, J., Jinno, S., 2015. Subclass-specific formation of perineuronal nets around parvalbumin-expressing GABAergic neurons in Ammon's horn of the mouse hippocampus. J. Comp. Neurol. 523, 790–804.

Yamada, J., Ohgomori, T., Jinno, S., 2015. Perineuronal nets affect parvalbumin expression in GABAergic neurons of the mouse hippocampus. Eur. J. Neurosci. 41, 368–378.

Yazaki-Sugiyama, Y., Kang, S., Cateau, H., Fukai, T., Hensch, T.K., 2009. Bidirectional plasticity in fast-spiking GABA circuits by visual experience. Nature 462, 218–221.

Yin, K.J., Cirrito, J.R., Yan, P., Hu, X., Xiao, Q., Pan, X., Bateman, R., Song, H., Hsu, F.F., Turk, J., Xu, J., Hsu, C.Y., Mills, J.C., Holtzman, D.M., Lee, J.M., 2006. Matrix metalloproteinases expressed by astrocytes mediate extracellular amyloid-beta peptide catabolism. J. Neurosci. 26, 10939–10948.

Zhu, X., Raina, A.K., Lee, H.G., Chao, M., Nunomura, A., Tabaton, M., Petersen, R.B., Perry, G., Smith, M.A., 2003. Oxidative stress and neuronal adaptation in Alzheimer disease: the role of SAPK pathways. Antioxid. Redox Signal 5, 571–576.

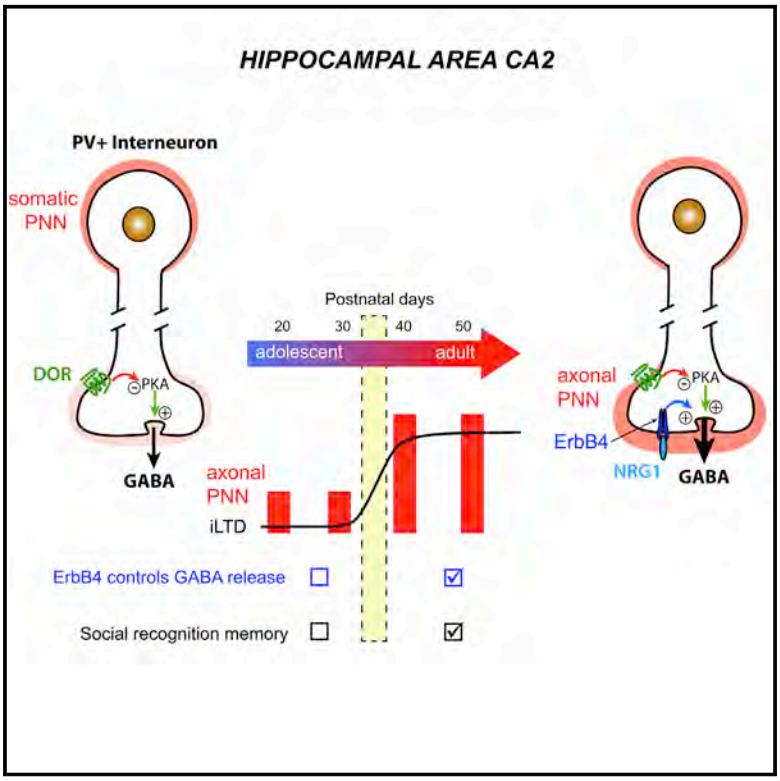
Ziyatdinova, S., Ronnback, A., Gurevicius, K., Miszczuk, D., Graff, C., Winblad, B., Pitkanen, A., Tanila, H., 2016. Increased epileptiform EEG activity and decreased seizure threshold in arctic APP transgenic mouse model of Alzheimer's disease. Curr. Alzheimer Res. 13, 817–830.

Article

Cell Reports

Maturation of PNN and ErbB4 Signaling in Area CA2 during Adolescence Underlies the Emergence of PV Interneuron Plasticity and Social Memory

Graphical Abstract



Authors

Soledad Domínguez, Christophe Clément Rey, Ludivine Therreau, ..., Laure Verret, Rebecca Ann Piskorowski, Vivien Chevaleyre

Correspondence

vivien.chevaleyre@parisdescartes.fr

In Brief

Dominguez et al. describe the mechanisms involved in the emergence of a form of long-term plasticity at inhibitory synapses from parvalbumin-expressing interneurons in mouse hippocampal area CA2. Maturation of this plasticity potentially underlies the emergence of social memory during late adolescence.

Highlights

- Inhibitory plasticity from PV+ interneurons in area CA2 emerges at the end of adolescence
- The control of GABA release by the PNN and ErbB4 matures at the end of adolescence
- Signaling through the PNN via NRG1 and ErbB4 is required for iLTD induction
- Preventing iLTD induction in CA2 *in vivo* impairs social memory formation

Domínguez et al., 2019, Cell Reports *29*, 1099–1112
October 29, 2019 © 2019 The Author(s).
https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.09.044

CellPress

Cell Reports
Article

OPEN ACCESS
CellPress

Maturation of PNN and ErbB4 Signaling in Area CA2 during Adolescence Underlies the Emergence of PV Interneuron Plasticity and Social Memory

Soledad Domínguez,[1] Christophe Clément Rey,[2] Ludivine Therreau,[1,4] Aurélien Fanton,[1] Dominique Massotte,[3] Laure Verret,[2] Rebecca Ann Piskorowski,[1] and Vivien Chevaleyre[1,5,*]
[1]INSERM UMR 1266, Institute of Psychiatry and Neuroscience of Paris, Team Synaptic Plasticity and Neural Networks, 102-108 Rue de la Santé, 75014 Paris, France
[2]Research Center on Animal Cognition, Center for Integrative Biology, Toulouse University, CNRS, UPS, Toulouse, France
[3]Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives, CNRS UPR 3212, 5 Rue Blaise Pascal, 67084 Strasbourg, France
[4]Inovarion, Centre de Recherche en Sciences du Vivant, 251 Rue St Jacques, 75005 Paris, France
[5]Lead Contact
*Correspondence: vivien.chevaleyre@parisdescartes.fr
https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.09.044

SUMMARY

Adolescence is a vulnerable period characterized by major cognitive changes. The mechanisms underlying the emergence of new cognitive functions are poorly understood. We find that a long-term depression of inhibitory transmission (iLTD) from parvalbumin-expressing (PV+) interneurons in the hippocampal area Cornu Ammonis 2 (CA2) is absent in young mice but emerges at the end of adolescence. We demonstrate that the maturation of both the perineuronal net (PNN) and signaling through ErbB4 is required for this plasticity. Furthermore, we demonstrate that social recognition memory displays the same age dependence as iLTD and is impaired by targeted degradation of the PNN or iLTD blockade in area CA2. Our data reveal an unusual developmental rule for plasticity at the PV+ interneuron transmission in area CA2 and indicate that this plasticity is involved in the emergence of higher cognitive function, such as social memory formation, in late adolescence.

INTRODUCTION

The hippocampus is a critical structure for learning and memory formation. Area Cornu Ammonis 2 (CA2) of the hippocampus has emerged as an important region for social memory formation (Hitti and Siegelbaum, 2014; Stevenson and Caldwell, 2014; Wersinger et al., 2002). Furthermore, this region may play an important role in the generation of hippocampal-wide network activity (Kay et al., 2016; Oliva et al., 2016). The cellular composition in area CA2 is unique in that the density of several sub-classes of interneurons, including parvalbumin-expressing (PV+) interneurons (INs), is higher than in the other hippocampal areas (Botcher et al., 2014). The inhibitory transmission from PV+ INs expresses a unique long-term depression (iLTD) onto CA2 pyramidal neurons (PNs) that is mediated by delta opioid receptor (DOR) activation (Piskorowski and Chevaleyre, 2013).

Area CA2 is particularly vulnerable in several psychiatric diseases, including schizophrenia and dementia (Chevaleyre and Piskorowski, 2016). Specifically, the density of PV+ INs in this region has been reported to be decreased in human post-mortem studies of schizophrenic and bipolar patients (Knable et al., 2004). In a mouse model of the 22q11.2 deletion syndrome, we reported a specific decrease in PV+ IN density in area CA2, a decrease in synaptic transmission and plasticity from PV+ INs, and a deficit in social memory (Piskorowski et al., 2016). These changes in PV+ IN properties occurred at the end of adolescence, indicating that PV+ INs in area CA2 undergo developmental changes during this time period. Adolescence is a vulnerable transition period characterized by major behavioral and cognitive changes, and human imaging studies have demonstrated that the brain undergoes considerable structural development and remodeling during this period (Blakemore, 2008; Giedd et al., 1999). However, the cellular and synaptic changes that occur in the hippocampus are not understood.

The perineuronal net (PNN), a dense specialized extracellular matrix, encases PV+ IN soma and dendrites. This structure increases in density during postnatal development and often prohibits plasticity of synaptic inputs onto PV+ INs, contributing to the closure of developmental critical periods (Hensch, 2005; Horii-Hayashi et al., 2015) by regulating PV+ IN signaling (Cabungcal et al., 2013). Furthermore, it has been reported that the loss of this structure in the hippocampus is linked to schizophrenia (Berretta et al., 2015; Bitanihirwe and Woo, 2014). While rare, the PNN has been shown to also surround pyramidal cells in the cortex and hippocampus, where it surrounds CA2 PNs (Brückner et al., 2003). It has been proposed that the PNN surrounding CA2 PNs plays a role in limiting excitatory postsynaptic plasticity during early postnatal development (Carstens et al., 2016). However, the role of the PNN in controlling inhibitory plasticity during later stages of adolescence is not known.

This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

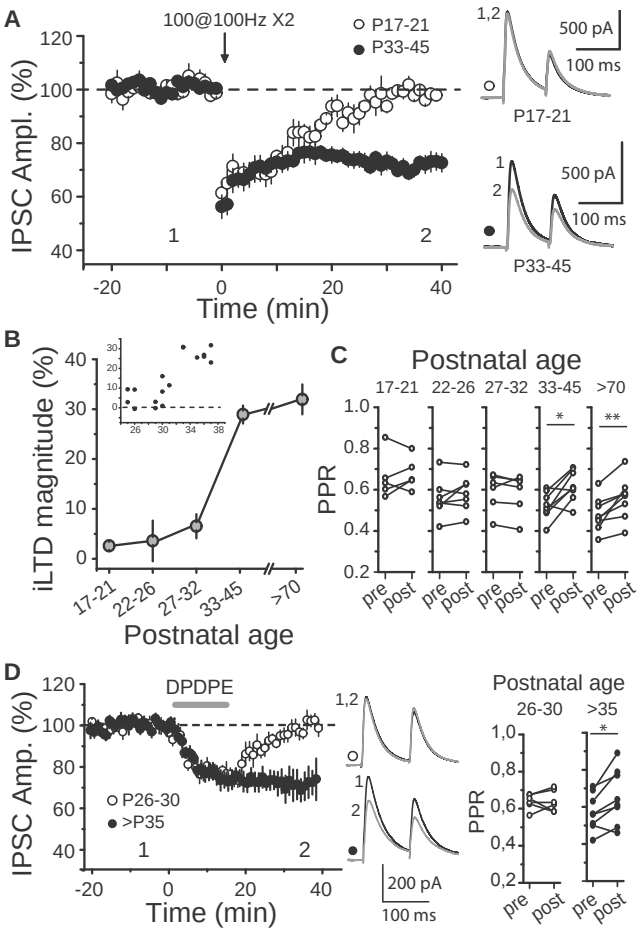


Figure 1. LTD of Inhibitory Transmission in Area CA2 Emerges at the End of Adolescence

(A) Time course of normalized IPSC amplitudes recorded in CA2 PNs evoked by stimulation in the SR in the presence of α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) and N-Methyl-d-aspartate (NMDA) receptor blockers. A high-frequency stimulation (HFS; 100 pulses at 100 Hz repeated twice) triggered an iLTD in slices prepared at postnatal days (P) 33–45 (filled circles, n = 8) but only triggered a transient depression at P17–P21 (open circles, n = 5). Averaged sample traces at the time points indicated are shown on the right.

(B) The summary graph of the averaged iLTD magnitude at different ages shows that the iLTD was not induced with the HFS before P27–P32 but was induced at P33–P45 and remained stable in adulthood.

(C) The HFS triggered a significant increase in the paired pulse ratio (PPR) at P33–P45 (n = 8, p = 0.011) and >P70 (n = 8, p = 0.0058) but not at P17–P21 (n = 5, p = 0.58), P22–P26 (n = 7, p = 0.23), or P27–P32 (n = 6, p = 0.47).

(D) Left: time course of the effect of 15-min application of 5 μM of the selective DOR agonist (DPDPE) on normalized IPSC amplitude at P26–P30 and >P35. In contrast to the lasting depression-mediated DPDPE application after P35 (filled circles, n = 8), DPDPE triggered a transient depression at P26–P30 (open circles, n = 6). Center: averaged sample traces at the time indicated. Right: significant change in the PPR after the HFS at time points over P35 (n = 8, p = 0.014), but not at P26–P30 (n = 6, p = 0.89). Error bars show SEM.

In this study, we aimed to examine the cellular and molecular components that change in area CA2 during late adolescence and to determine if these changes brought about new cognitive abilities.

RESULTS

Plasticity between PV+ INs and CA2 PNs Emerges at the End of Adolescence

The decrease in the density of PV+ INs and in inhibitory transmission and plasticity observed in area CA2 in a mouse model of the 22q11.2 deletion syndrome (Piskorowski et al., 2016) only occurred after the fifth postnatal week, suggesting that changes occur in PV+ IN physiology during this developmental period. Therefore, we asked whether the plasticity of PV+ INs could be developmentally regulated. We performed whole-cell voltage clamp recordings of CA2 PNs to monitor inhibitory post-synaptic currents (IPSCs) evoked by stratum radiatum (SR) stimulation. We applied a high-frequency stimulation (HFS) to induce iLTD in area CA2. During postnatal days (P) 33–45, this stimulus triggered a significant iLTD of similar magnitude to what had been reported (Figure 1A; 70.9% ± 1.5% of baseline, n = 8). In contrast, the same HFS did not trigger iLTD in slices prepared from animals between P17 and P21 (Figure 1A; 97.4% ± 1.1%, n = 5). Furthermore, we found that iLTD could not be induced at P22–P26 or at P27–P32 (Figure 1B; Table S1; P22–P26: n = 7, p = 0.35; P27–P32: n = 6, p = 0.056), then sharply increased in its magnitude between P33 and P45 and remained stable into adulthood (over P70: n = 8, p = 4 10^{-6}). Consistent with the presynaptic location of the iLTD, we found that the HFS resulted in a significant increase in the paired-pulse ratio (PPR) of two consecutive IPSCs at P33–P45 and over P70 (Figure 1C; P33–P45: p = 0.011; >P70: p = 0.0058) but not at earlier time points (P17–P21: p = 0.58; P22–P26: p = 0.23; P27–P32: p = 0.47).

In adult mice, iLTD in area CA2 requires the activation of DORs (Piskorowski and Chevaleyre, 2013). Following a transient application of the selective DOR agonist [D-Pen^2,D-Pen^5]enkephalin (DPDPE; 5 μM), there was a lasting depression of IPSCs after P35 (Figure 1D; 73.5% ± 4.2% of baseline, n = 8). At P26–P30, application of DPDPE induced a depression during the application, but the amplitude of the IPSCs recovered to a level similar to the initial baseline upon washout of DPDPE (Figure 1D; 98.8% ± 2.5%, n = 6, p = 0.31). Consistent with the presynaptic action of DOR activation, the DPDPE application induced a lasting increase in the PPR after P35 (114.1% ± 4.1%, n = 8) but not at P26–P30 (Figure 1D; 100.6% ± 3.2%; n = 6). This result indicates that DORs are expressed at inhibitory synaptic terminals in young mice, but the activation of these receptors does not trigger a lasting depression of gamma-aminobutyric acid (GABA) release. Together, these data show that the iLTD in area CA2 has a late developmental maturation, with a sharp onset during the end of adolescence.

Postnatal Maturation of the PNN and Role in iLTD Induction

The DOR-mediated iLTD in area CA2 occurs at pre-synaptic terminals of PV+ INs (Piskorowski and Chevaleyre, 2013). We used immunohistochemical techniques to determine if there are any corresponding changes associated with PV+ IN density in this region during this developmental time period. Using RGS14 staining to label CA2 pyramidal cells, we examined the density of PV+ INs in areas CA1, CA2, and CA3 at four age

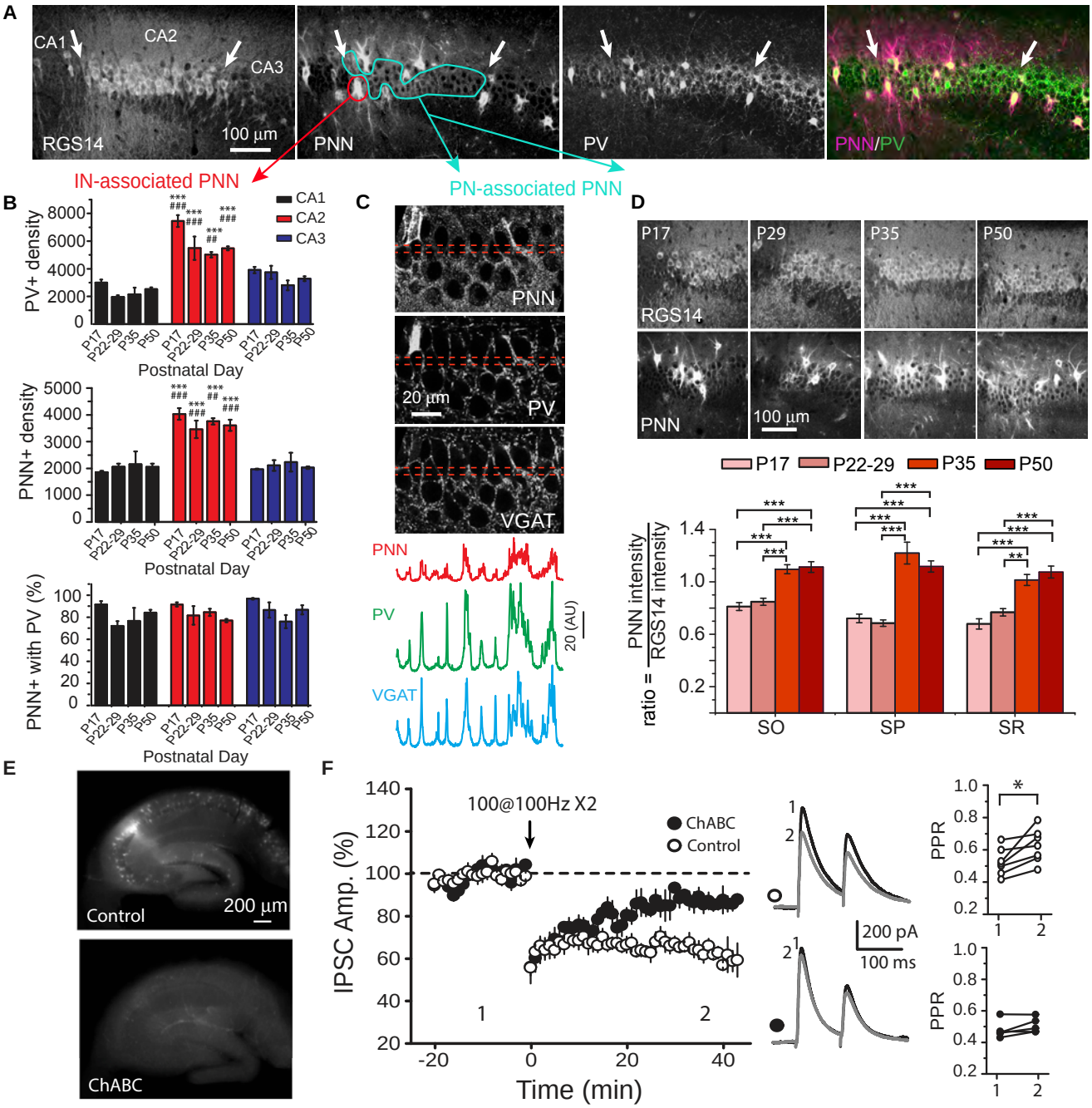


Figure 2. The Density of the PNN Associated with PV+ Synapses in Area CA2 Increases at the End of Adolescence, and Its Integrity Is Required for the iLTD

(A) Area CA2 of a P50 mouse hippocampus stained for CA2 PN marker RGS14, PNN marker Wisteria floribunda agglutinin (WFA), and parvalbumin (PV). Arrows mark the boundaries of area CA2. Far right: overlay of staining for PNN (magenta) and PV (green)

(B) Summary graph of the quantification of PV+ cells and PNN+ INs at different ages, showing that these two populations of cells are highly enriched in area CA2 at all ages studied. The percentage of co-expression between PV and the PNN show that most PNN+ cells also express PV.

(C) Top: high-magnification images of staining for PNN, PV, and VGAT. Bottom: the expression intensity profiles corresponding to the labeled region of interest in the stratum pyramidale (SP) of area CA2, showing that the PNN is in close proximity to inhibitory synapses from PV+ INs.

(D) Staining for the PNN and RGS14 in area CA2 at P17, P29, P35, and P50. Bottom graph: the quantification of the ratio of the mean PNN intensity (excluding PNN+ INs) over RGS14 intensity in area CA2 shows that a large fraction of the PNN surrounding PNs matures after P30.

(legend continued on next page)

ranges. We found that the density of PV+ cells in mice was higher in area CA2, compared to the other hippocampal areas, at all ages (Figures 2A and 2B). The PNN in area CA2 is extremely dense (Celio, 1993). We labeled the PNN with biotin-linked Wisteria floribunda agglutinin (WFA). All hippocampal CA regions contained cells that had soma and dendritic regions that were intensely labeled by WFA. The density of these cells was highest in area CA2, and the majority of the intensely labeled cells were PV+ at all ages (Figure 2B; at P50, CA2: 76.8% ± 2.4%, CA1: 84.1% ± 2.1%, CA3: 86.7% ± 2.3%). These data indicate that the number of PV+ INs surrounded by the PNN does not change during the maturation of the iLTD.

Numerous studies have shown a dense PNN staining around PV+ IN soma and dendrites but also a diffuse labeling around the soma and proximal dendrites of CA2 PNs (Figures 2A and S1A; Carstens et al., 2016; Celio, 1993). The soma of PNs is mostly devoid of excitatory synapses (Megías et al., 2001), and we postulate that in area CA2, the PNN surrounding the PN soma is associated with the basket cell terminals of PV+ INs. Indeed, WFA staining was present surrounding the PV+ basket terminals encircling the soma of CA2 PNs (Figure 2C). To ensure that the PV staining around the soma of CA2 PNs corresponded to synaptic terminals and not to dendritic processes, we also co-stained for the vesicular GABA transporter (VGAT), a marker localized at inhibitory axonal terminals. We found that both PNN and PV staining profiles were very similar to the VGAT expression profile (Figure 2C). These data are consistent with the premise that the diffuse PNN staining surrounding CA2 PNs is associated with basket cell terminals from PV+ INs.

We then examined this diffuse PNN staining surrounding PN soma at different ages. We measured the mean fluorescence intensity in the different hippocampal layers of area CA2, as delimited by RGS14 staining (Figures 2D and S1), and excluded regions immediately surrounding the intensely labeled PNN+ PV+ IN soma. We found that the intensity of this diffuse WFA staining did not change between P17 and P22–P29 (Figures S1A and S1B) but significantly increased at P35 and P50. To ensure that the different PNN intensities did not result from a difference in fixation or antibody penetration at different ages, we performed two additional controls. First, we measured the intensity of the PNN staining in the same slices in area CA1. We found no change in the PNN intensity in this area (Figure S1B). Second, as the expression level of RGS14 is stable in the hippocampus during this developmental period (Evans et al., 2014), we measured the intensity of RGS14 staining at different ages and used these intensity values as an internal control. We found that the PNN density normalized to RGS14 was stable between P17 and P22–P29 but displayed a significant increase at P35 and at P50 (Figure 2D). Therefore, because the emergence of this diffuse staining in area CA2 coincides with the emergence of the iLTD, we postulated that the PNN might play a role in iLTD induction.

We incubated hippocampal slices in Chondroitinase ABC (ChABC), thereby degrading the PNN in the entire slice, as shown by the loss of WFA staining in slices incubated with ChABC for 2 h (Figure 2E). After the ChABC incubation, the HFS induced a small iLTD (Figure 2F; 89.6% ± 4.8%, n = 5) that was significantly smaller than the iLTD obtained in the control slices (64.2% ± 2.6%, n = 7). After the ChABC incubation, the HFS did not trigger any significant change in the PPR, in contrast to the effect of the HFS on the PPR in the control slices (Figure 2F; in control: 119.8% ± 5.9%; in ChABC: 106.3% ± 3.2%). Altogether, these results indicate that the integrity of the PNN surrounding PN soma is likely associated with PV+ IN synapses and is required for iLTD induction in adult mice.

ErbB4 Is Expressed in DOR+ INs and Controls GABA Release in Area CA2

Within the PNN, there are many extracellular or transmembrane signaling molecules that can modulate neurotransmitter release. We postulate that neuregulin 1 (NRG1) and its receptor ErbB4 may play roles in regulating inhibitory transmission and plasticity in area CA2. The activation of ErbB4 by NRG1 has been reported to affect GABA release in several structures (Chen et al., 2010; Woo et al., 2007). ErbB4 is expressed by PV+ INs in the hippocampus, but it is not detected in PNs (Vullhorst et al., 2009). If ErbB4 signaling underlies the dependence on PNN integrity of the iLTD induction, it must be co-expressed by the cells that also express DORs. In the hippocampus, DORs are nearly exclusively detected in PV+ INs; however, only a fraction of PV+ INs (~40%) express DORs (Erbs et al., 2012). Similarly, ErbB4 is detected in only a fraction of PV+ INs (Bean et al., 2014). The PNN is also associated with a fraction of PV+ INs. It is unknown whether the INs that express the DOR also express ErbB4 or the PNN. To detect DORs, we used a transgenic line of knock-in mice with GFP-tagged DORs (Scherrer et al., 2006). As previously reported (Erbs et al., 2012), the vast majority of DOR-expressing neurons were located in the stratum pyramidale (SP) and stratum oriens (SO), and only a small fraction of DOR+ cells were detected in the SR. In these layers, ErbB4+ cells had a very similar localization with DOR+ cells (Figure 3; n = 5 mice). We found that the vast majority of DOR+ cells in the SO and SR co-expressed PNN and ErbB4 (Figures 3A and 3B). Similarly, a very high fraction of ErbB4+ cells in these two layers were co-labeled for the PNN and DOR (Figures 3A and 3B). Together, these data show that the majority of cells that co-express the DOR and ErbB4 are surrounded by the PNN. This finding is consistent with an implication of the PNN in iLTD induction, and it raises the question as to whether signaling through ErbB4 could be involved

(E) Incubation of acute brain slices (>P35) in chondroitinase ABC (ChABC) results in a nearly complete digestion of the PNN. Example images of two acute brain slices stained with WFA following a 2-h incubation in ACSF with vehicle (top) or 2 U/mL ChABC (bottom).

(F) Slices previously incubated in ChABC showed a much smaller iLTD following the HFS (filled circles, n = 5) compared to slices incubated with vehicle (open circles, n = 7). Averaged sample traces at the time points indicated by numbers are in the center panel. Slices pre-treated with ChABC do not undergo a significant change in PPR following HFS (bottom) as compared to controls (top).

Error bars show SEM.

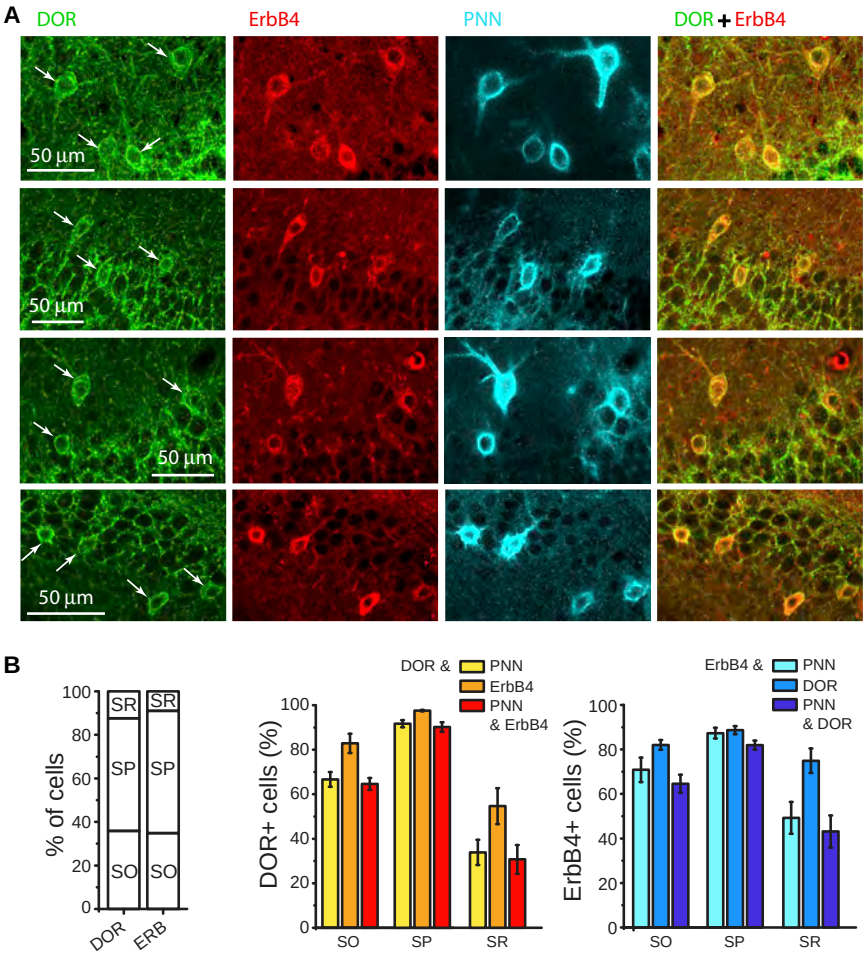


Figure 3. DOR, ErbB4, and PNN Are Co-localized in the Same Cells

(A) Triple staining against DOR-GFP (green), ErbB4 (red), and PNN (cyan) demonstrating the cellular co-localization of these markers.

(B) Left panel: summary graph of the distribution of cells that express the DOR and ErbB4 in the stratum oriens (SO), stratum pyramidale (SP), and stratum radiatum (SR). Middle: graph summarizing the percentage of DOR+ cells that were co-stained for the PNN, ErbB4, or both. Right: graph summarizing the percentage of ErbB4+ cells that were co-stained for the DOR, PNN, or both. Error bars show SEM.

in the control of GABA transmission and plasticity from INs that also express the DOR.

In the cortex and area CA1, activation of ErbB4 by exogenous application of NRG1 was shown to increase GABA release (Chen et al., 2010; Woo et al., 2007). Application of the soluble active form of NRG1 (1 nM) in area CA2 did not alter evoked IPSC amplitudes or the PPR (Figure 4A; IPSC: $p = 0.7$, $n = 5$; PPR: $p = 0.66$). Further, exogenous NRG1 application also had no effect on spontaneous IPSC (sIPSC) amplitude and frequency (Figure 4B; amplitude: $n = 5$, $p = 0.14$; frequency: $p = 0.59$). This result suggests that either ErbB4 does not control GABA release in area CA2, or ErbB4 is already activated by endogenous NRG1. To explore further, we applied the ErbB4 inhibitor AG1478 to determine if basal GABA release in area CA2 is under the control of the endogenous NRG1. Following application of AG1478 (5 μM), we observed a large decrease in evoked IPSCs onto CA2 PNs (67.7% ± 4.6%, $n = 6$), accompanied by a significant increase in the PPR (Figure 4C; $p = 0.036$), indicating that ErbB4 activation directly affects GABA release. To confirm that ErbB4 acts presynaptically on GABA release, we also looked at the effect of the ErbB4 blocker on spontaneous IPSCs. AG1478 application induced a significant decrease in the frequency of spontaneous IPSCs (Figure 4D; $n = 6$, $p = 0.012$). However, in agreement with a lack of postsynaptic effect, the amplitude of spontaneous IPSCs was not altered (Figure 4D; $p = 0.08$). This result indicates that in area CA2 of adult mice, the release of GABA is under the control of ErbB4 and is tonically activated by endogenous NRG1. To ensure that the decrease in IPSC amplitude mediated by the ErbB4 blockade did not result from a decrease in PV+ cell excitability, and to address whether ErbB4 could affect GABA release by directly acting at the synaptic terminals, we examined how inhibiting ErbB4 altered action potential (AP)-independent miniature IPSCs (mIPSCs). Application of AG1478 induced a significant decrease in mIPSC frequency (Figures 4E and 4F; 85.1% ± 3.0%, $n = 5$; $p = 0.023$) without altering the amplitude (96.9% ± 3.8%, $p = 0.47$). With the change in the PPR of evoked IPSCs, these data strongly indicate that ErbB4 is located at PV+ INs' axon terminals and controls GABA release. Altogether, our data show that in contrast to the increase in inhibitory transmission mediated by the application of exogenous NRG1 in area CA1, the positive modulation of GABA release by ErbB4 in area CA2 is already maximal with endogenous NRG1.

We have previously shown that decreasing PV+ IN transmission via DOR activation strongly increases the excitatory drive between CA3 and CA2 via an increase in excitation/inhibition balance, and it results in CA2 PN AP firing (Nasrallah et al., 2015). If ErbB4 controls GABA release from the same population of INs expressing DORs, then blocking ErbB4 should increase the excitatory drive and AP firing in CA2 PNs. Application of the ErbB4 blocker AG1478 induced a large increase in field potential (fPSP) in response to the CA3 input stimulation (Figure S2A; 154.6% ± 11.8%, $n = 5$, $p = 0.009$). This increase in fPSP was abolished in the presence of $GABA_R$ blockers, confirming that it resulted from a dis-inhibitory mechanism. Following application of AG1478, a population spike emerged in area CA2 at both 20- and 30-V stimulation intensities (Figure S2B: $p = 0.024$, $n = 4$). Thus, blocking ErbB4 led to the

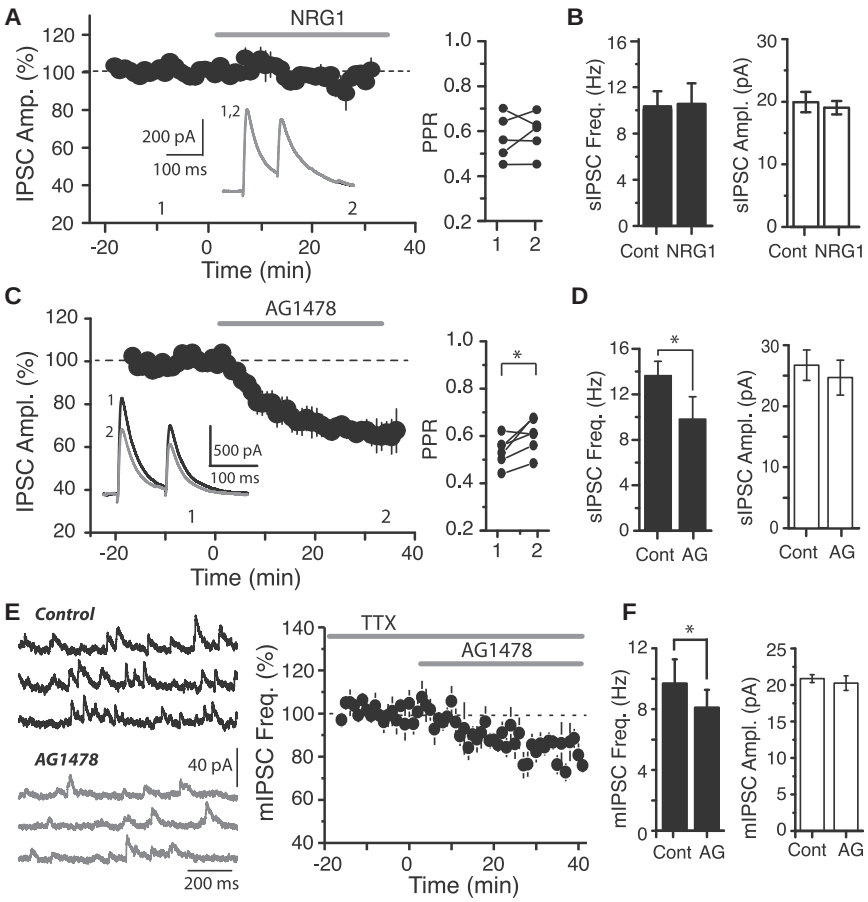


Figure 4. Signaling through ErbB4 Controls GABA Release in Area CA2 of Adult Mice

(A) Summary graph showing the lack of effect of application of the exogenous soluble form of NRG1 (1 nM) on the IPSC amplitude. Inset: averaged sample traces at the indicated time points. Right: the PPR was unchanged by application of exogenous NRG1 (n = 5).

(B) NRG1 application had no effect on the frequency (left) or amplitude (right) of sIPSCs recorded in CA2 PNs (n = 5).

(C) Summary graph of the effect of the ErbB4 inhibitor AG1478 on the amplitude of IPSCs recorded in CA2 PNs (n = 6). Inset: averaged sample traces at the time points indicated. In addition to decreasing IPSC amplitude, AG1478 (5 μM) also triggered a significant increase in the paired pulse ratio (right panel).

(D) The ErbB4 inhibitor AG1478 induced a significant decrease in the frequency (left) but not in the amplitude (right) of spontaneous IPSCs (n = 6).

(E) Left: example traces of miniature IPSCs (mIPSCs) recorded in a CA2 PN in control conditions and after the application of AG1478. Right: summary graph of mIPSC frequency during application of AG1478 (n = 5).

(F) AG1478 induced a significant decrease in mIPSC frequency (left) but did not affect mIPSC amplitude (right) (n = 5). Error bars show SEM.

same change in the excitatory drive and AP firing in CA2 PNs as did activation of the DORs, supporting the idea that these two receptors act on the same inhibitory terminals.

Signaling through NRG1/ErbB4 Is Required for iLTD Induction

Because GABA release in area CA2 is under the control of ErbB4 activation, we tested if signaling through NRG1/ErbB4 might also be involved in the iLTD. We applied the ErbB4 inhibitor AG1478 to slices for 30 min and then applied the HFS. We found that the HFS did not evoke any iLTD in the presence of AG1478 (Figure 5A; n = 7, p = 0.637), whereas the HFS could evoke normal iLTD in interleaved control slices (n = 8, p = 0.00002). Furthermore, the PPR was not changed by the HFS in the presence of AG1478 (Figure 5A; n = 7, p = 0.4) but significantly increased in the control slices (Figure 5A; n = 8; p = 0.0087).

To ensure that the impaired iLTD induction following the blockade of ErbB4 is not due to reduced enkephalin release, we directly activated DORs by DPDPE application. In the presence of AG1478, DPDPE did not trigger iLTD or any lasting change in the PPR (Figure 5B; IPSC: 97.9% ± 1.7%, n = 6, p = 0.11; PPR: 98.1% ± 5.2%, n = 6, p = 0.78). These data are consistent with the fact that inhibition of ErbB4 decreases GABA release from the same neurons that express the DOR; therefore, blocking ErbB4 occluded a further depression by DOR activation.

We also tested whether NRG1 could affect the iLTD. In the presence of the soluble form of NRG1, the HFS was ineffective at inducing the iLTD (Figure 5A; 96.6% ± 1.5% of baseline, n = 5, p = 0.087) and produced no significant change in the PPR (Figure 5A; n = 5, p = 0.091). Therefore, even though exogenous NRG1 application had no effect on the basal transmission because of the endogenous activation of ErbB4 (see Figure 4), the presence of exogenous NRG1 prevented iLTD induction. One possible explanation is that the endogenous activation of ErbB4 is decreased following iLTD induction. Indeed, neuronal activity regulates numerous enzymes in the extracellular matrix (Dzwonek et al., 2004). Therefore, it is possible that a decrease in NRG1 availability or in ErbB4 signaling occurs following the tetanus. To test this, we applied NRG1 5 min after the tetanus. We found that following the NRG1 application, the depression in IPSCs was not maintained, and GABA transmission returned to a value that was significantly different from the depression observed in interleaved control slices (Figure 5C; n = 6 and 6, p = 0.00032). In addition, the change in the PPR at the end of the experiment was also significantly smaller after the NRG1 application (Figure 5C; n = 6 and 6, p = 0.026). These data are consistent with the idea that part of the NRG1-ErbB4 action on GABA release was downregulated after the HFS, and exogenous activation of ErbB4 prevented the maintenance of the iLTD.

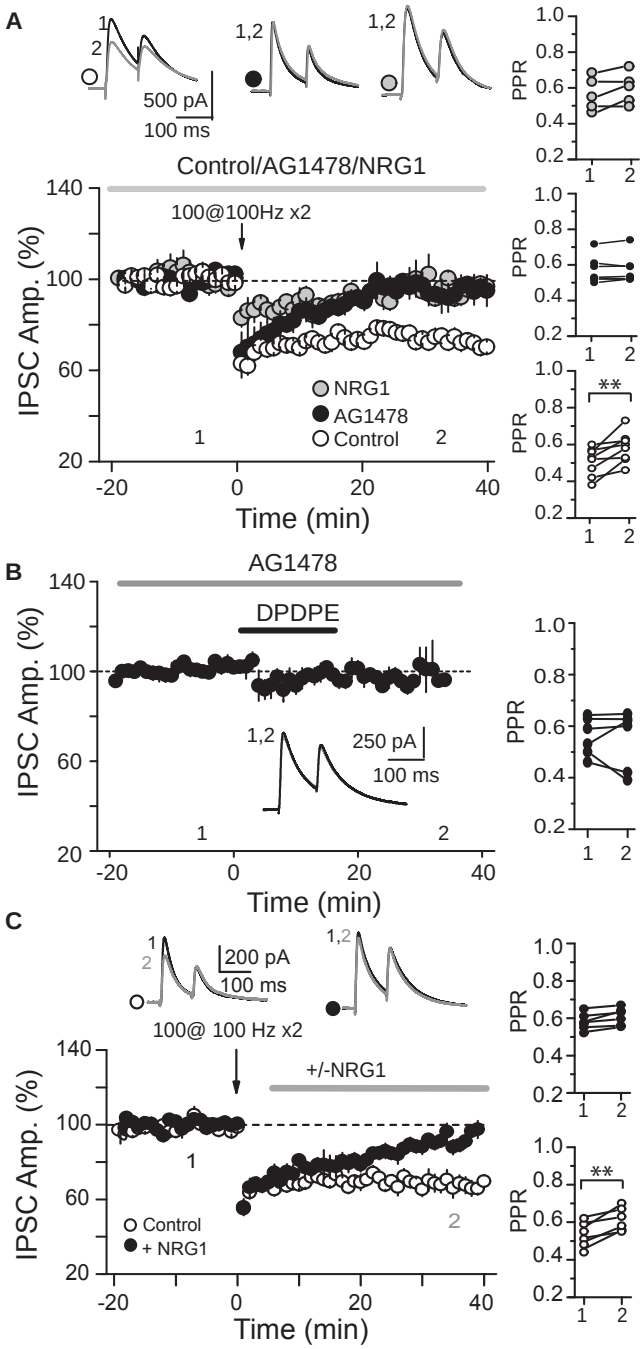


Figure 5. NRG1/ErbB4 Signaling Is Required for DOR-Mediated Plasticity

(A) Incubation of slices in AG1478 (black circles, n = 7) or NRG1 (gray circles, n = 5), followed by continuous application of these drugs, prevented iLTD induction by the HFS. The iLTD was normal in interleaved control slices (white circles, n = 8). Top: averaged sample traces at the time point indicated. The increase in the PPR observed in control slices was also prevented by the presence of AG1478 or NRG1 (right).

(B) Blockade of ErbB4 by AG1478 also prevented the effect of the DOR agonist application on the IPCS amplitude and on the PPR (n = 6). Inset: averaged sample traces at the time point indicated by numbers.

(C) Application of NRG1 5 min after tetanus (black circles, n = 7) reverses the IPSC depression, and an increase in the PPR is observed in control slices (white circles, n = 6). Error bars show SEM.

The Effect of NRG1/ErbB4 Signaling on GABA Release Is Age Dependent

Both ErbB4 and NRG1 are expressed early during development and control several processes such as migration and maturation of PV+ cells (Mei and Xiong, 2008). However, it is unknown whether ErbB4 can control GABA transmission in young animals and if this may underlie the lack of iLTD in young mice. To test this, we examined the effect of AG1478 on inhibitory transmission in P22–P27 mice. In contrast to what we observed in the adult mice, application of AG1478 had no effect on the evoked IPSC amplitude (Figure S3A; n = 6, p = 0.13) or on the PPR (n = 6, p = 0.71). In addition, the AG1478 application did not change the frequency or amplitude of sIPSCs (Figure S3B; frequency: p = 0.66; amplitude: p = 0.84, n = 6). We then asked if the lack of action of the ErbB4 blocker might result from a lack of endogenous activation by NRG1 or from a lack of control of GABA release by ErbB4. We found that exogenous NRG1 (1 nM) application had no effect on the evoked IPSC amplitude (Figure S3C; n = 5, p = 0.29) or on the PPR (p = 0.062) in P22–P27 mice. Furthermore, NRG1 also did not change the frequency or amplitude of sIPSCs at this age (Figure S3D; frequency: p = 0.61; amplitude: p = 0.34, n = 5). We also tested lower (0.1 nM) and higher (10 nM) concentrations of NRG1 and still found no effect on the evoked IPSC amplitude or the PPR (Figures S3E and S3F). Therefore, these data show that the modulation of GABA release by ErbB4 is age dependent. In adult mice, GABA transmission is positively modulated by the endogenous activation of ErbB4. In young mice, endo- or exogenous NRG1 had no action on GABA transmission, suggesting the ErbB4 is not expressed at the synapse and/or is not coupled to GABA release.

DOR and ErbB4 Engage Different Signaling Pathways

Our data indicate that both DORs and ErbB4 are required for iLTD induction. Therefore, we wondered whether these two receptors might use the same signaling pathway. DORs are known to activate G-proteins negatively coupled to adenylyl cyclase (Quock et al., 1999). Thus, we wondered whether the cyclic AMP (cAMP)/protein kinase A (PKA) pathway might be involved in iLTD. We incubated slices for 30 min in the PKA blocker PKI 14–22 amide (PKI; 1 μM) and continuously applied it throughout the plasticity measurement. Following the PKA block, the HFS did not trigger any significant iLTD (Figure 6A; n = 5, p = 0.052) or changes in the PPR (p = 0.59). In contrast, we observed in interleaved control experiments a significant depression of IPSCs (n = 5, p = 0.0004) and a change in PPR (p = 0.028) after the HFS. To ensure that the lack of iLTD did not result from a lack of enkephalin release, we also tested the effect of the DOR agonist DPDPE in the presence of PKI. DPDPE did not induce any depression of the IPSC amplitudes with the PKA blocked (Figure 6B; p = 0.79, n = 5) and also did not affect the PPR (p = 0.18). These data confirm that the PKA is required for the depression of GABA release mediated by

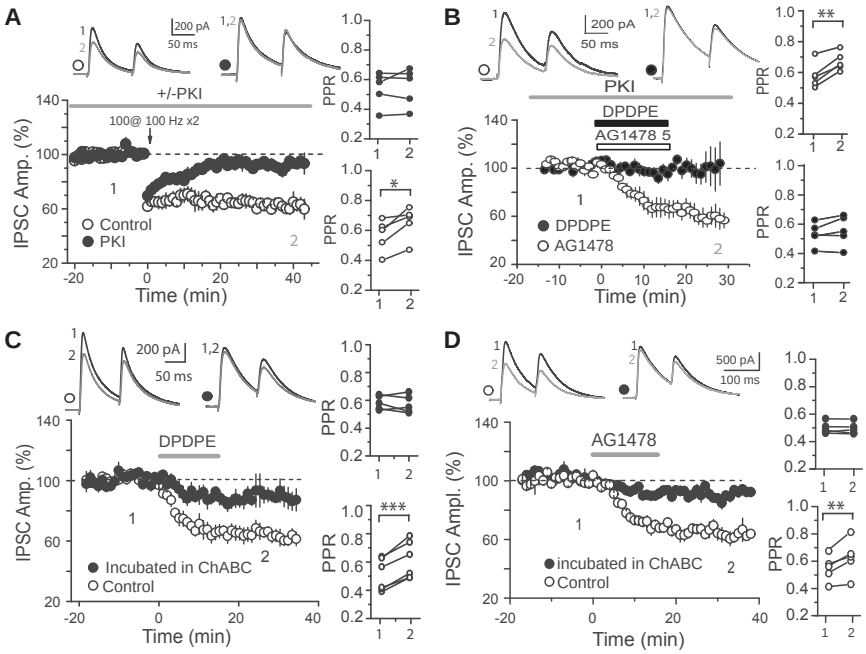


Figure 6. DOR and ErbB4 Engage Different Signaling Pathways, but Their Action on GABA Release Is Dependent on the PNN Integrity

(A) Blockade of PKA with PKI 14–22 amide completely abolished the iLTD induction and change in the PPR induced by a tetanus (black circles, n = 5). Slices were incubated 30 min in PKI and recorded in the continuous presence of PKI.

(B) In the presence of PKI, DOR activation by DPDPE had no effect on GABA transmission (black circles, n = 5). In contrast, the PKA blockade did not affect the depression of IPSCs induced by the ErbB4 blocker AG1478 (white circles, n = 5).

(C) Application of DPDPE resulted in a significantly smaller depression of IPSCs in slices previously incubated in ChABC (filled circles, n = 5) as compared to control slices (open circles, n = 6). Top: averaged sample traces at the time points indicated by numbers. Right: prior treatment by ChABC prevents a significant change in the PPR following DPDPE application.

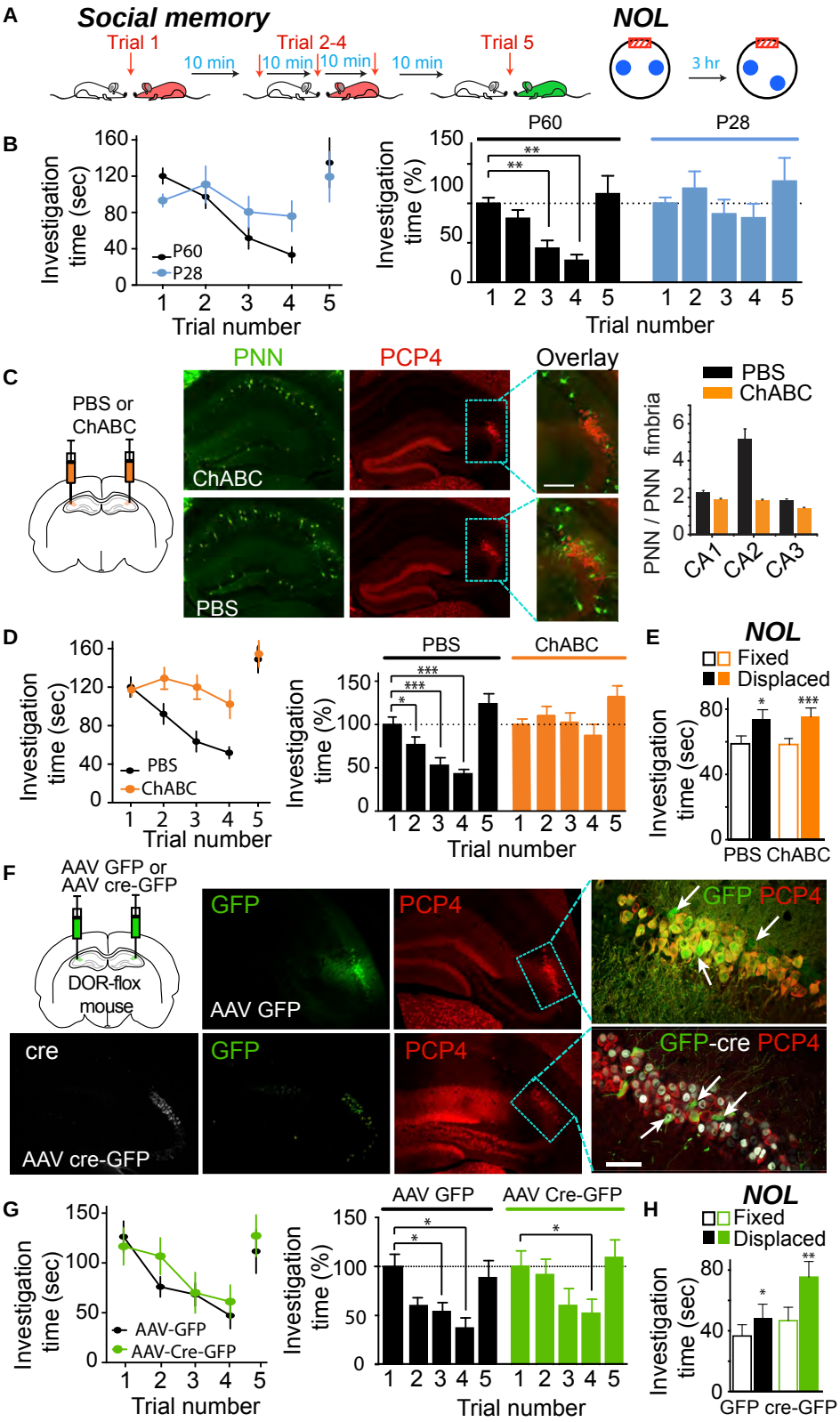
(D) In slices previously incubated in ChABC (black circles, n = 5), blockade of ErbB4 by AG1478 resulted in a significantly smaller depression of IPSCs compared to control slices (white circles, n = 5). The change in the PPR was also prevented by previous incubation in ChABC. Top: averaged sample traces at the time points indicated. Error bars show SEM.

the DOR. Next, we tested whether ErbB4 action on GABA release also involves the PKA. We found that in presence of PKI, AG1478 induced a large depression of the IPSC amplitudes (Figure 6B; p = 0.0012, n = 5) and an increase in the PPR (p = 0.005). Therefore, these data show that the DOR and ErbB4 use different signaling pathways to control GABA release in area CA2.

Next, we asked whether the PNN plays a role in the DOR- and ErbB4-mediated control of GABA release. First, we tested the consequence of PNN degradation on the decrease in GABA release mediated by the DOR activation. In slices incubated with ChABC, DPDPE application had a smaller effect on synaptic transmission (Figure 6C; n = 5) and the PPR, compared to slices incubated in vehicle (n = 6, IPSC: p = 0.003; PPR: p = 0.00011). These data suggest that the PNN is required for the modulation of GABA release by the DOR activation. We also tested the effect of the PNN degradation in area CA1 on the DOR action. In area CA1, the PNN is not detected at basket cell terminals, and activation of the DOR resulted in a transient decrease in inhibitory transmission from PV+ INs (Piskorowski and Chevaleyre, 2013). Application of DPDPE resulted in a transient depression of IPSCs that returned to baseline for both control and ChABC-treated slices (Figure S4; p = 0.92). Furthermore, no lasting change was detected in the PPR for both conditions (control: n = 5, p = 0.59; ChABC: n = 5, p = 0.20). The transient depression of the IPSC amplitude at the end of DPDPE application was identical in both conditions (p = 0.95). Therefore, these data show that degradation of the PNN in area CA1, which primarily surrounds soma and dendrites of INs, did not affect the action of the DOR activation on GABA transmission. We then tested the effect of PNN degradation on the control of GABA release by ErbB4. We found that AG1478 induced a very small depression of IPSCs in ChABC-treated slices (Figure 6D; n = 5), compared to controls (n = 5). AG1478 also had very little effect on the PPR in ChABC-treated slices (Figure 6D; n = 5), compared to controls (n = 5). Therefore, these data indicate that when the PNN is degraded, the positive action of ErbB4 on GABA release is lost, suggesting that PNN integrity is required for the basal activation of ErbB4 by endogenous NRG1.

DOR-Mediated iLTD in CA2 Is Involved in Social Memory Formation

The late emergence of the iLTD suggests that this plasticity may be involved in higher cognitive processes rather than synapse and network establishment. If DOR-mediated iLTD in area CA2 plays a role in social memory formation, one could make the following two predictions. First, the ability of a mouse to form social memories should emerge during development at the same time as the iLTD. Second, disruption of the iLTD in adult mice should also disrupt performance in a social memory task. To test these predictions, we first examined the ability of a mouse to form social memories before and after the onset of iLTD with the five-trial social memory test (Kogan et al., 2000; Figure 7A). In adult control mice, the interaction time was significantly reduced in trials 3 and 4 with the same familiar mouse (Figure 7B; n = 8). When a novel mouse was introduced in trial 5, the subject mouse displayed an expected rebound of interaction time. In 28-day-old mice, there was no significant decrease in the interaction time in trials 2–4, compared to trial 1 (Figure 7B; n = 10). These data indicate that before the emergence of the DOR-mediated iLTD in area CA2, juvenile



(legend on next page)

mice show a performance in this task that is consistent with reduced social memory.

Next, we tested whether disrupting the iLTD specifically in area CA2 would also affect social memory in adult mice. We used two different strategies to test this hypothesis. First, because iLTD is dependent on the PNN integrity, we performed targeted bilateral stereotaxic injections into area CA2 to deliver either a control saline solution or a ChABC solution. Then, 7 days following the injection, we performed the same social memory test on the two groups of animals. Behavioral data were only used from animals that had injection sites properly targeted to area CA2. After the targeted injection of 0.1 μl of ChABC in area CA2, the intensity of the PNN staining was slightly reduced in areas CA1 and CA3 but displayed a much larger decrease in area CA2 (Figure 7C). We found that the initial interaction time between the subject mouse and a novel mouse did not differ between ChABC- and vehicle-injected-mice, suggesting that sociability is not affected by reducing the PNN in area CA2. In mice injected with saline, a significant decrease in the interaction time was observed during trial 2 (Figure 7D; n = 10), and a further decrease was observed in trials 3 and 4. For mice injected with ChABC, no significant decrease in interaction time between the subject mouse and the familiar mouse was observed, even during trial 4 (Figure 7D; n = 12). Therefore, these results indicate that digestion of the PNN in area CA2 is sufficient to prevent social memory formation.

Because we cannot exclude that a small-level PNN degradation in areas CA1 or CA3 could also contribute to the behavior, we performed two hippocampal-dependent but CA2-independent tasks after ChABC injection in area CA2. First, we monitored the distance traveled in an open field and the time spent in the center of the arena. We found that the total distance was not different between saline- and ChABC-injected mice (PBS: n = 6; ChABC: n = 8, p = 0.62). Similarly, the time spent in the center was not different between saline- and ChABC-injected mice (PBS: n = 6; ChABC: n = 8, p = 0.081). These data suggest that both general locomotor activity and anxiety are not altered following PNN degradation in area CA2. Next, we performed a novel object location task. During acquisition of the task, both saline- and ChABC-injected mice spent the same amount of time exploring the two different objects (PBS: n = 6, p = 0.26; ChABC: n = 8, p = 0.28). During the test, both PBS- and ChABC-injected mice spent significantly more time exploring the displaced object compared to the fixed object (Figure 7E; PBS: p = 0.03; ChABC: p = 0.00079). Therefore, this result suggests that the impairment in social memory formation after ChABC injection was the result of the PNN digestion in area CA2 and not in areas CA1 or CA3.

We have shown that PNN integrity in area CA2 is required for iLTD induction. However, we employed a second strategy to target area CA2 in order to rule out alterations of DOR-meditated plasticity in area CA3, as there is a high expression of DORs in inhibitory neurons in area CA3 (Erbs et al., 2012), and CA3 has recently been implicated in the encoding phase of social memory (Chiang et al., 2018). In contrast to a previous study (Leroy et al., 2017), we found that DPDPE application induced a large and significant decrease in inhibitory transmission in CA3 PNs (Figure S5; n = 5, p = 0.005), along with an increase in the PPR (n = 5, p = 0.02), consistent with a presynaptic action of the DOR on GABA release. Our second strategy took advantage of the binding of adeno-associated viruses (AAVs) to glycan regions of host cell receptors (Mietzsch et al., 2014). The PNN present in area CA2 is particularly rich in proteoglycans and sialic acids (Brückner et al., 2003), and we harnessed this aspect of the extracellular matrix to knockout DOR receptors selectively in area CA2. We used a DOR-flox mouse line (Orpd1 $^{fl/fl}$) and performed a very small volume targeted injection to area CA2 of an AAV serotype 5 virus expressing GFP-tagged Cre recombinase (AAV5-cre-GFP) or control virus expressing GFP (AAV5-GFP). Then, 6 weeks after viral injection, we tested the performances of the social memory and novel object location tasks. Following the behavioral testing, the specificity of the viral infection was confirmed post hoc (Figure 7F). Behavioral data were only used from animals that had injections properly targeted to area CA2. The viruses led to GFP expression in PCP4-expressing PNs as well as putative INs in area CA2, as these cells were smaller in size and PCP4 negative, yet located within the PCP4+ region (Figure 7F).

Mice injected with the control virus displayed a learning curve similar to that of the control mice, with a large decrease in interaction time observed during trials 2–4 and a rebound of interaction during trial 5 (Figure 7G; n = 7). In mice injected

Figure 7. Social Memory Matures in Parallel to the iLTD and Requires the PNN Integrity in CA2

(A) Left: illustration of the experimental protocol used to test social memory formation. Right: illustration of the experimental protocol used to perform novel object location task (NOL).

(B) In P60 mice, investigation time decreased during successive exposures and was significantly lower in trials 3 and 4 (n = 8) compared to trial 1. In P28 mice, no significant decrease in interaction time was observed in trials 2–4 (n = 10). Right panel shows the normalized investigation time at P60 and P28.

(C) Staining for the PNN (green) and for the CA2 marker PCP4 (red) in mice injected with ChABC or saline solution (PBS). Right: a large decrease in the PNN staining in area CA2 is observed in mice injected with ChABC. Scale bar: 100 μm.

(D) Mice injected with PBS show a normal decrease in interaction time in trials 2–4 (n = 10). The interaction time did not decrease on trial 2–5 as compared to trial 1 for mice injected with ChABC (n = 12). The normalized values for the interaction time show that a significant decrease in interaction was observed in PBS-injected mice on trials 2–4, whereas no significant change was observed in mice injected with ChABC.

(E) Both PBS- and ChABC-injected mice display a preference for the displaced object in the NOL task.

(F) Staining for GFP (green), PCP4 (red), and Cre (white) in DOR-flox mice injected with AAV GFP or AAV cre-GFP in area CA2. Higher magnifications are shown on the right. Arrows show GFP-positive, PCP4-negative neurons (putative INs). Note the nuclear localization of the cre-GFP signals in AAV cre-GFP-injected mice. Scale bar: 50 μm.

(G) Mice injected with AAV GFP show a large decrease in interaction time in trial 2 and a significant decrease in trials 3 and 4 (n = 7). In contrast, mice injected with AAV cre-GFP (n = 8) only show a significant decrease in interaction time in trial 4, indicating that acquisition of social memory is delayed.

(H) Both AAV GFP- and AAV cre-GFP-injected mice display a preference for the displaced object in the NOL task. Error bars show SEM.

with AAV-cre-GFP, a significant decrease in interaction time between the subject and the familiar mouse was observed only during trial 4 (Figure 7G; n = 9). To ensure that CA2-independent but hippocampal-dependent tasks were not affected by the viral injection, we also looked at the open field and the novel object location tasks. In the open field task, both AAV-cre-GFP and AAV-GFP mice traveled the same distance in the arena (AAV-GFP: n = 7; AAV-cre-GFP: n = 9, p = 0.221) and spent the same amount of time in the center (AAV-GFP: n = 7; AAV-cre-GFP: n = 9, p = 0.397). In the novel object location task, both AAV-cre-GFP and AAV-GFP mice spent similar amounts of time exploring the two novel objects (AAV-GFP: n = 7, p = 0.20; AAV-cre-GFP: n = 9, p = 0.82). Both mice also spent more time exploring the displaced object (Figure 7H; AAV-GFP: p = 0.026; AAV-cre-GFP: p = 0.006). Altogether, these data show that preventing DOR-mediated plasticity in area CA2 did not alter general locomotor activity and anxiety. However, the lack of the DOR in area CA2 delays the acquisition of social recognition memory.

DISCUSSION

In this study, we show that the DOR-mediated plasticity of GABA release from PV+ INs in area CA2 has a reversed developmental profile compared to many forms of plasticity. Its emergence at the end of adolescence coincides with the maturation of the PNN and ErbB4 signaling at PV+ IN synapses, and both the PNN and ErbB4 are required for the induction of the plasticity. Furthermore, we provide evidence that DOR-mediated plasticity plays a facilitatory role in social memory formation and emergence of this memory at the end of adolescence.

Model for DOR-Mediated iLTD at PV+ IN to PN Synapses

We propose the following model for iLTD induction (Figure S6). In juvenile mice, the action of DOR activation is transient, and transmission recovers to basal levels upon washout of the agonist or 10–15 min after tetanus; ErbB4 is either not expressed at the synapse, or it is expressed but its activation is not linked to GABA release. In adult mice, PV+ INs that express DORs also express ErbB4; ErbB4 activation controls GABA release and in basal conditions is activated by endogenous NRG1. After the HFS, GABA release is reduced through the DOR activation. The tetanus also leads to a loss of ErbB4 activation, either through a direct link between the DOR and ErbB4 or through a change in the availability of soluble NRG1. The loss of positive action of ErbB4 can then maintain the depression of GABA release, thus leading to iLTD. Reactivation of ErbB4 with exogenous NRG1 just after the tetanus restores GABA transmission and prevents iLTD. The PNN appears to play a critical role in iLTD induction by allowing ErbB4 to be activated by NRG1. After PNN degradation, blockade of ErbB4 has no effect on GABA transmission, and the iLTD cannot be induced and is likely occluded. Other manipulations that decrease GABA release from PV+ INs, such as the DOR agonist application or direct ErbB4 blockade, also occlude the iLTD. Therefore, these data highlight a critical role of PNN maturation around PV+ IN synapses in the emergence of the iLTD, likely by allowing ErbB4 action on GABA release.

PNN Maturation during Late Adolescence Controls the Emergence of Plasticity at PV+ Synapses in Area CA2

Several studies have reported an increase in the PNN staining during postnatal hippocampal development (Carstens et al., 2016; Horii-Hayashi et al., 2015; Yamada and Jinno, 2013). Here, we report an increase in the PNN likely associated with inhibitory terminals on CA2 PNs during late adolescence. It was initially proposed that the PNN around CA2 PN soma could be associated with inhibitory synapses from basket cells (Celio, 1993). More recently, it was proposed that the PNN around CA2 PNs serves to regulate excitatory transmission and plasticity during early postnatal development (Carstens et al., 2016). The soma of hippocampal PNs is virtually devoid of excitatory synapses and is instead surrounded by inhibitory terminals from basket cells (Megías et al., 2001). In area CA2, the fraction of basket cell terminals from PV+ INs around the soma of PNs is much higher than in areas CA1 or CA3 (Ribak et al., 1993). Therefore, we postulate that the PNN around the soma of CA2 PNs is associated with inhibitory synapses from PV+ cells and, thus, would be able to influence GABA release. In agreement with this idea, we found that degradation of the PNN prevents DOR-mediated iLTD induction, a plasticity known to occur at pre-synaptic terminals of PV+ INs (Piskorowski and Chevaleyre, 2013). DOR receptors are expressed at synaptic terminals of PV+ INs (Rezaï et al., 2012), and we show that PNN degradation strongly reduces the effect of their activation on GABA release. Finally, we found that endogenous activation of ErbB4 is required for iLTD induction and controls both the amplitude of evoked IPSCs and the frequency of mIPSCs. Therefore, these data demonstrate that the PNN-associated signaling through ErbB4 is involved in controlling the release of GABA from PV+ IN terminals.

Inhibitory transmission from PV+ INs onto CA2 PNs displays a long-term depression mediated by DOR activation (Piskorowski and Chevaleyre, 2013). We show that this plasticity is not expressed in juvenile mice but shows a steep increase after P30. These data are in sharp contrast to many forms of plasticity that are prominent during postnatal development but are considered constrained by maturation of the PNN at the end of adolescence. For instance, maturation of the PNN has been shown to be a break for plasticity in the cortex and to control the end of the critical period (Hensch, 2005). Our data suggest that components of the PNN can also have a permissive role for synaptic plasticity by supporting the iLTD induction in area CA2. Several results strongly suggest that maturation of the signaling through the PNN is required for the emergence of iLTD: (1) the intensity of the PNN staining associated with inhibitory basket terminals in area CA2 shows a large increase in intensity after P30; (2) PV+ cells that express the PNN-associated ErbB4 also express DORs; (3) disrupting PNN integrity in adults also disrupts iLTD induction; and (4) signaling through ErbB4/NRG1 controls the probability of GABA release in adults but not in young mice and is required for iLTD induction. Together, these data show that in contrast to many forms of plasticity that are constrained by maturation of the PNN at the end of adolescence, signaling within the PNN can be permissive for the emergence of new plasticity and potentially higher cognitive functions.

The Role of Plasticity at PV+ Synapses in Area CA2 in Social Memory Formation

Area CA2 plays a critical role in social memory formation. This form of memory is impaired when tetanus toxin is expressed in CA2 PNs (Hitti and Siegelbaum, 2014), indicating that transmission from CA2 PNs is required. In agreement, social memory is also impaired in a mouse model of the 22q11.2 deletion syndrome, where excitability of CA2 PNs is strongly reduced (Piskorowski et al., 2016). Normally, CA3 inputs are unable to drive AP firing in CA2 PNs because of the large feed-forward inhibition between areas CA3 and CA2 (Chevaleyre and Siegelbaum, 2010; Kohara et al., 2014; Piskorowski and Chevaleyre, 2013). However, following iLTD induction in area CA2, CA3 inputs are able to drive AP firing in CA2 PNs (Nasrallah et al., 2015). Because excitatory CA3-CA2 inputs do not express activity-dependent long-term-potentiation (LTP) (Zhao et al., 2007), it is likely that plasticity at inhibitory synapses represents a primary means of modulating the excitability of CA2 PNs. Our data provide evidence that iLTD may play an active role in social memory formation. (1) Social memory matures at the same time as the iLTD. The lack of social memory in juvenile mice is not just a generalized inability to learn because mice at this age or even younger have been shown to learn diverse tasks such as spatial memory (Ainge and Langston, 2012) or contextual fear conditioning (Pattwell et al., 2013). These tasks are dependent on the hippocampus, but they are independent of area CA2 (Hitti and Siegelbaum, 2014). (2) We show that localized degradation of the PNN in CA2, a manipulation that impairs iLTD induction, also impairs social memory formation. (3) We provide evidence that selective removal of DORs in area CA2 also affects social memory formation. In contrast to PNN degradation, this manipulation did not fully block social memory. Several explanations can be put forward to explain this difference. In particular, PNN degradation can alter the excitability of PV+ INs (Bozzelli et al., 2018; Hayani et al., 2018) in addition to preventing iLTD induction. Therefore, it is likely that PNN degradation will result in a stronger impairment of PV+ IN physiology than just selective knockout of DORs. The reduced social memory that we observed after the DOR removal is consistent with the decrease observed after the DOR antagonist injection in CA2/CA3 (Leroy et al., 2017). However, using a five-trial social memory test instead of two trials only, we were able to show that the interaction times during the second and third trials were altered, but the interaction time was normal during the fourth trial. Therefore, these data indicate that social learning is slower in mice lacking a DOR in area CA2, but these mice are still able to form normal social memory.

The data presented here are not only relevant for understanding the mechanisms involved in the emergence of new cognitive functions at the end of adolescence, but they also provide valuable insights on potentially relevant alterations occurring during pathologies. Multiple post-mortem studies have demonstrated that area CA2 is particularly susceptible during psychiatric diseases and neurodegenerative disorders (Chevaleyre and Piskorowski, 2016). Furthermore, several studies have reported that the PNN and ErbB4 signaling are altered during schizophrenia and Alzheimer's disease (Berretta et al., 2015; Iwakura and Nawa, 2013; Soleman et al., 2013). The PNN contains neurotrophic factors and is neuroprotective for PV+ INs against oxidative stress (Cabungcal et al., 2013). Therefore, a deficit in signaling through the PNN may underlie the decrease in PV+ IN density observed during these pathologies. In area CA2, we show that the PNN is also likely located between the axon terminal of PV+ INs and the soma of PNs, where it can control synaptic transmission and the plasticity of GABA release. A large fraction of this PNN matures at the end of adolescence in parallel to the control of GABA release mediated by endogenous ErbB4 activation. Therefore, it is possible that an impaired signaling within the PNN may underlie the decrease in inhibitory transmission and plasticity that we observed in a mouse model of the 22q11.2 deletion syndrome, the highest genetic risk factor for developing schizophrenia in humans (Karayiorgou et al., 2010; Piskorowski et al., 2016). In agreement with this, both NRG1 and ErbB4 have been linked to schizophrenia (Buonanno, 2010), and removing ErbB4 from fast-spiking INs is sufficient to cause a schizophrenia-like phenotype (Del Pino et al., 2013). Furthermore, it has been proposed that signaling through NRG1 and ErbB3/4 is involved in social memory (Moy et al., 2009). Our data suggest that this effect could be mediated through plasticity at inhibitory synapses in area CA2, and this pathway might be altered during schizophrenia.

Altogether, our data show that the maturation of the PNN and of ErbB4 signaling is a prerequisite for the emergence of plasticity at PV+ IN synapses in area CA2. Furthermore, the data also provide evidence that the late maturation of inhibitory plasticity in area CA2 might be involved in emergence of higher cognitive processes such as social memory formation.

STAR★METHODS

Detailed methods are provided in the online version of this paper and include the following:

- KEY RESOURCES TABLE
- LEAD CONTACT AND MATERIAL AVAILABILITY
- EXPERIMENTAL MODEL AND SUBJECT DETAILS
  - Electrophysiology experiments
  - Behavioral experiments
  - Immunohistochemistry
- METHOD DETAILS
  - Slice preparation
  - Electrophysiological recordings and analysis
  - Immunohistochemistry
  - Stereotaxic injection
  - Behavioral experiments
  - Post hoc histological analysis
- QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS
- DATA AND CODE AVAILABILITY

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental Information can be found online at https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.09.044.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Agence Nationale de la Recherche ANR-12-BSV4-0021 (V.C.) and ANR-13-JSV4-0002-01 (R.A.P.), the Ville de Paris Programme Emergences (R.A.P.), and the Institut Universitaire de France (L.V.).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conceptualization, V.C., R.A.P., and L.V.; Investigation, S.D., V.C., L.T., A.F., R.A.P., and C.C.R.; Formal Analysis, S.D., C.C.R., L.V., R.A.P., and V.C.; Resources, D.M.; Writing, V.C. and R.A.P., with the help of the other authors.

DECLARATION OF INTERESTS

The authors declare no competing interests.

Received: March 3, 2017
Revised: July 31, 2019
Accepted: September 13, 2019
Published: October 29, 2019

REFERENCES

Ainge, J.A., and Langston, R.F. (2012). Ontogeny of neural circuits underlying spatial memory in the rat. Front. Neural Circuits *6*, 8.

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

Berretta, S., Pantazopoulos, H., Markota, M., Brown, C., and Batzianouli, E.T. (2015). Losing the sugar coating: potential impact of perineuronal net abnormalities on interneurons in schizophrenia. Schizophr. Res. *167*, 18–27.

Bitanihirwe, B.K.Y., and Woo, T.-U.W. (2014). Perineuronal nets and schizophrenia: the importance of neuronal coatings. Neurosci. Biobehav. Rev. *45*, 85–99.

Blakemore, S.-J. (2008). The social brain in adolescence. Nat. Rev. Neurosci. *9*, 267–277.

Botcher, N.A., Falck, J.E., Thomson, A.M., and Mercer, A. (2014). Distribution of interneurons in the CA2 region of the rat hippocampus. Front. Neuroanat. *8*, 104.

Bozzelli, P.L., Alaiyed, S., Kim, E., Villapol, S., and Conant, K. (2018). Proteolytic Remodeling of Perineuronal Nets: Effects on Synaptic Plasticity and Neuronal Population Dynamics. Neural Plast. *2018*, 5735789.

Brückner, G., Grosche, J., Hartlage-Rübsamen, M., Schmidt, S., and Schachner, M. (2003). Region and lamina-specific distribution of extracellular matrix proteoglycans, hyaluronan and tenascin-R in the mouse hippocampal formation. J. Chem. Neuroanat. *26*, 37–50.

Buonanno, A. (2010). The neuregulin signaling pathway and schizophrenia: from genes to synapses and neural circuits. Brain Res. Bull. *83*, 122–131.

Cabungcal, J.-H., Steullet, P., Morishita, H., Kraftsik, R., Cuenod, M., Hensch, T.K., and Do, K.Q. (2013). Perineuronal nets protect fast-spiking interneurons against oxidative stress. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *110*, 9130–9135.

Carstens, K.E., Phillips, M.L., Pozzo-Miller, L., Weinberg, R.J., and Dudek, S.M. (2016). Perineuronal Nets Suppress Plasticity of Excitatory Synapses on CA2 Pyramidal Neurons. J. Neurosci. *36*, 6312–6320.

Celio, M.R. (1993). Perineuronal nets of extracellular matrix around parvalbumin-containing neurons of the hippocampus. Hippocampus *3*, 55–60.

Chen, Y.-J., Zhang, M., Yin, D.-M., Wen, L., Ting, A., Wang, P., Lu, Y.-S., Zhu, X.-H., Li, S.-J., Wu, C.-Y., et al. (2010). ErbB4 in parvalbumin-positive interneurons is critical for neuregulin 1 regulation of long-term potentiation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *107*, 21818–21823.

Chevaleyre, V., and Piskorowski, R.A. (2016). Hippocampal Area CA2: An Overlooked but Promising Therapeutic Target. Trends Mol. Med. *22*, 645–655.

Chevaleyre, V., and Siegelbaum, S.A. (2010). Strong CA2 pyramidal neuron synapses define a powerful disynaptic cortico-hippocampal loop. Neuron *66*, 560–572.

Chiang, M.-C., Huang, A.J.Y., Wintzer, M.E., Ohshima, T., and McHugh, T.J. (2018). A role for CA3 in social recognition memory. Behav. Brain Res. *354*, 22–30.

Del Pino, I., García-Frigola, C., Dehorter, N., Brotons-Mas, J.R., Alvarez-Salvado, E., Martínez de Lagrán, M., Ciceri, G., Gabaldón, M.V., Moratal, D., Dierssen, M., et al. (2013). Erbb4 deletion from fast-spiking interneurons causes schizophrenia-like phenotypes. Neuron *79*, 1152–1168.

Dzwonek, J., Rylski, M., and Kaczmarek, L. (2004). Matrix metalloproteinases and their endogenous inhibitors in neuronal physiology of the adult brain. FEBS Lett. *567*, 129–135.

Erbs, E., Faget, L., Scherrer, G., Kessler, P., Hentsch, D., Vonesch, J.-L., Matifas, A., Kieffer, B.L., and Massotte, D. (2012). Distribution of delta opioid receptor-expressing neurons in the mouse hippocampus. Neuroscience *221*, 203–213.

Evans, P.R., Lee, S.E., Smith, Y., and Hepler, J.R. (2014). Postnatal developmental expression of regulator of G protein signaling 14 (RGS14) in the mouse brain. J. Comp. Neurol. *522*, 186–203.

Giedd, J.N., Blumenthal, J., Jeffries, N.O., Castellanos, F.X., Liu, H., Zijdenbos, A., Paus, T., Evans, A.C., and Rapoport, J.L. (1999). Brain development during childhood and adolescence: a longitudinal MRI study. Nat. Neurosci. *2*, 861–863.

Hayani, H., Song, I., and 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*, 149.

Hensch, T.K. (2005). Critical period plasticity in local cortical circuits. Nat. Rev. Neurosci. *6*, 877–888.

Hitti, F.L., and Siegelbaum, S.A. (2014). The hippocampal CA2 region is essential for social memory. Nature *508*, 88–92.

Horii-Hayashi, N., Sasagawa, T., Matsunaga, W., and Nishi, M. (2015). Development and Structural Variety of the Chondroitin Sulfate Proteoglycans-Contained Extracellular Matrix in the Mouse Brain. Neural Plast. *2015*, 256389.

Iwakura, Y., and Nawa, H. (2013). ErbB1-4-dependent EGF/neuregulin signals and their cross talk in the central nervous system: pathological implications in schizophrenia and Parkinson's disease. Front. Cell. Neurosci. *7*, 4.

Karayiorgou, M., Simon, T.J., and Gogos, J.A. (2010). 22q11.2 microdeletions: linking DNA structural variation to brain dysfunction and schizophrenia. Nat. Rev. Neurosci. *11*, 402–416.

Kay, K., Sosa, M., Chung, J.E., Karlsson, M.P., Larkin, M.C., and Frank, L.M. (2016). A hippocampal network for spatial coding during immobility and sleep. Nature *531*, 185–190.

Knable, M.B., Barci, B.M., Webster, M.J., Meador-Woodruff, J., and Torrey, E.F.; Stanley Neuropathology Consortium (2004). Molecular abnormalities of the hippocampus in severe psychiatric illness: postmortem findings from the Stanley Neuropathology Consortium. Mol. Psychiatry *9*, 609–620.

Kogan, J.H., Frankland, P.W., and Silva, A.J. (2000). Long-term memory underlying hippocampus-dependent social recognition in mice. Hippocampus *10*, 47–56.

Kohara, K., Pignatelli, M., Rivest, A.J., Jung, H.-Y., Kitamura, T., Suh, J., Frank, D., Kajikawa, K., Mise, N., Obata, Y., et al. (2014). Cell type-specific genetic and optogenetic tools reveal hippocampal CA2 circuits. Nat. Neurosci. *17*, 269–279.

Leroy, F., Brann, D.H., Meira, T., and Siegelbaum, S.A. (2017). Input-Timing-Dependent Plasticity in the Hippocampal CA2 Region and Its Potential Role in Social Memory. Neuron *95*, 1089–1102.e5.

Megías, M., Emri, Z., Freund, T.F., and Gulyás, A.I. (2001). Total number and distribution of inhibitory and excitatory synapses on hippocampal CA1 pyramidal cells. Neuroscience *102*, 527–540.

Mei, L., and Xiong, W.-C. (2008). Neuregulin 1 in neural development, synaptic plasticity and schizophrenia. Nat. Rev. Neurosci. *9*, 437–452.

Mietzsch, M., Broecker, F., Reinhardt, A., Seeberger, P.H., and Heilbronn, R. (2014). Differential adeno-associated virus serotype-specific interaction patterns with synthetic heparins and other glycans. J. Virol. *88*, 2991–3003.

Moy, S.S., Ghashghaei, H.T., Nonneman, R.J., Weimer, J.M., Yokota, Y., Lee, D., Lai, C., Threadgill, D.W., and Anton, E.S. (2009). Deficient NRG1-ERBB signaling alters social approach: relevance to genetic mouse models of schizophrenia. J. Neurodev. Disord. *1*, 302–312.

Nasrallah, K., Piskorowski, R.A., and Chevaleyre, V. (2015). Inhibitory Plasticity Permits the Recruitment of CA2 Pyramidal Neurons by CA3. eNeuro *2*, ENEURO.0049-15.2015.

Oliva, A., Fernández-Ruiz, A., Buzsáki, G., and Berényi, A. (2016). Role of Hippocampal CA2 Region in Triggering Sharp-Wave Ripples. Neuron *91*, 1342–1355.

Pattwell, S.S., Lee, F.S., and Casey, B.J. (2013). Fear learning and memory across adolescent development: Hormones and Behavior Special Issue: Puberty and Adolescence. Horm. Behav. *64*, 380–389.

Piskorowski, R.A., and Chevaleyre, V. (2013). Delta-opioid receptors mediate unique plasticity onto parvalbumin-expressing interneurons in area CA2 of the hippocampus. J. Neurosci. *33*, 14567–14578.

Piskorowski, R.A., Nasrallah, K., Diamantopoulou, A., Mukai, J., Hassan, S.I., Siegelbaum, S.A., Gogos, J.A., and Chevaleyre, V. (2016). Age-Dependent Specific Changes in Area CA2 of the Hippocampus and Social Memory Deficit in a Mouse Model of the 22q11.2 Deletion Syndrome. Neuron *89*, 163–176.

Quock, R.M., Burkey, T.H., Varga, E., Hosohata, Y., Hosohata, K., Cowell, S.M., Slate, C.A., Ehlert, F.J., Roeske, W.R., and Yamamura, H.I. (1999). The delta-opioid receptor: molecular pharmacology, signal transduction, and the determination of drug efficacy. Pharmacol. Rev. *51*, 503–532.

Rezaï, X., Faget, L., Bednarek, E., Schwab, Y., Kieffer, B.L., and Massotte, D. (2012). Mouse δ opioid receptors are located on presynaptic afferents to hippocampal pyramidal cells. Cell. Mol. Neurobiol. *32*, 509–516.

Ribak, C.E., Seress, L., and Leranth, C. (1993). Electron microscopic immunocytochemical study of the distribution of parvalbumin-containing neurons and axon terminals in the primate dentate gyrus and Ammon's horn. J. Comp. Neurol. *327*, 298–321.

Scherrer, G., Tryoen-Tóth, P., Filliol, D., Matifas, A., Laustriat, D., Cao, Y.Q., Basbaum, A.I., Dierich, A., Vonesh, J.-L., Gavériaux-Ruff, C., and Kieffer, B.L. (2006). Knockin mice expressing fluorescent delta-opioid receptors uncover G protein-coupled receptor dynamics in vivo. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *103*, 9691–9696.

Soleman, S., Filippov, M.A., Dityatev, A., and Fawcett, J.W. (2013). Targeting the neural extracellular matrix in neurological disorders. Neuroscience *253*, 194–213.

Stevenson, E.L., and Caldwell, H.K. (2014). Lesions to the CA2 region of the hippocampus impair social memory in mice. Eur. J. Neurosci. *40*, 3294–3301.

Vullhorst, D., Neddens, J., Karavanova, I., Tricoire, L., Petralia, R.S., McBain, C.J., and Buonanno, A. (2009). Selective expression of ErbB4 in interneurons, but not pyramidal cells, of the rodent hippocampus. J. Neurosci. *29*, 12255–12264.

Wersinger, S.R., Ginns, E.I., O'Carroll, A.-M., Lolait, S.J., and Young, W.S., 3rd. (2002). Vasopressin V1b receptor knockout reduces aggressive behavior in male mice. Mol. Psychiatry *7*, 975–984.

Woo, R.-S., Li, X.-M., Tao, Y., Carpenter-Hyland, E., Huang, Y.Z., Weber, J., Neiswender, H., Dong, X.-P., Wu, J., Gassmann, M., et al. (2007). Neuregulin-1 enhances depolarization-induced GABA release. Neuron *54*, 599–610.

Yamada, J., and Jinno, S. (2013). Spatio-temporal differences in perineuronal net expression in the mouse hippocampus, with reference to parvalbumin. Neuroscience *253*, 368–379.

Zhao, M., Choi, Y.-S., Obrietan, K., and Dudek, S.M. (2007). Synaptic plasticity (and the lack thereof) in hippocampal CA2 neurons. J. Neurosci. *27*, 12025–12032.

STAR★METHODS

KEY RESOURCES TABLE

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
Antibodies		
Wisteria Floribunda Agglutinin (WFA)-biotinylated	Sigma Aldrich	L1516-2mg lot#SLBL4991V
Rabbit anti-parvalbumin antibody	Swant	PV27; RRID: AB_2631173
Mouse monoclonal HER-4 antibody	Invitrogen	Catalog # MA5-12888 lot#RG2240715; RRID: AB_10986112
Mouse monoclonal anti-RGS14 antibody	Neuromab	catalog # 75-170 (RRID: AB_2179931)
Polyclonal chicken anti-GFP antibody	Abcam	Ab13970, lot:GR236651-10; RRID: AB_300798
Rabbit polyclonal anti-purkinje cell protein 4 (PCP4)	Santa Cruz	Cat# sc-74816; RRID: AB_2236566
Donkey anti-Rabbit IgG (H+L) Highly Cross-Absorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 647	ThermoFisher Scientific	Cat# A-31573; RRID: AB_2536183
Alexa-546 streptavidin conjugate	Life Technologies	S11225 lot#1873983; RRID: AB_2532130
Alexa-647 streptavidin conjugate	Life Technologies	S21374 lot#1596042; RRID: AB_2336066
Dylight 549 Strepavidin	Vector Labs	Cat# SA-5549; RRID: AB_2336408
Cy3 tagged goat anti-rabbit	Jackson ImmunoResearch	RRID: AB_2338000
Alexa-647 goat anti-mouse	Life Technologies	Cat # A21240 lot#1885955; RRID: AB_2335809
Alexa 488 goat anti-chicken	Life Technologies	A11039 lot#1812246; RRID: AB_2534096
Bacterial and Virus Strains		
AAV serotype 5 virus expressing GFP-tagged cre recombinase	University of North Carolina Vector Core	Serotype 5, AAV-CMV-cre-GFP
AAV serotype 5 virus expressing GFP used as control virus expressing GFP	University of North Carolina Vector Core	Serotype 5, AAV-CMV-GFP
Chemicals, Peptides, and Recombinant Proteins		
rhMRG1-β1/HRG1- β1 EGF domain	R&D Systems	Cat# 396-HB/CF lot ACD1514072
Chondroitinase ABC from Proteus vulgaris	Sigma-Aldrich	Cat# C3667
CGP 55845 hydrobromide	Tocris	Cat# 1248 10mg batch: 6A/149745
SR 95531 hydrobromide	Tocris	Cat# 1262 10mg bact:10A/150171
AG1478- ErbB4 antagonist	Tocris	Cat# 1276 lot 2A/191529
PKI 14-22 amide, myristoylated	Tocris	Cat# 2546 batch 6B,C
D-AP5	Hello bio	HB0225-100mg batch:E0267-4-1
DPDPE	TOCRIS	Cat#1431/1mg batch:9A, 10A, 11A,
NBQX	Hello bio	HB0225-100mg batch E0714-4-2
Experimental Models: Organisms/Strains		
Mouse model: C57BL/6J	Janvier Labs	N/A
Mouse model: C57BL/6SJL	Charles River France	N/A
Mouse model: DOR-flox (Orpd1 $^{fl/fl}$) Mouse model: DOR-EGFP	Dominique Massotte, CNRS UPR3212, Team Neuroanatomy, pain & psychopathologies	N/A
Software and Algorithms		
ImageJ- Used for all image analyzing and quantification	ImageJ	https://imagej.net/Welcome
Axograph X software for data acquisition	Axograph	https://axograph.com
pClamp10- data acquisition	Molecular devices	https://www.moleculardevices.com
Origin Pro- data analysis	Origin Lab	https://www.originlab.com
GraphPad Prism version 6.00 for Mac OS	GraphPad Software	https://www.graphpad.com

LEAD CONTACT AND MATERIAL AVAILABILITY

Further information and requests for resources and reagents should be directed to and will be fulfilled by the Lead Contact, Vivien Chevaleyre (vivien.chevaleyre@parisdescartes.fr). This study did not generate new unique reagents.

EXPERIMENTAL MODEL AND SUBJECT DETAILS

Electrophysiology experiments

All experiments were performed on C57B6 male mice.

Behavioral experiments

C57B6J male mice (Charles River, France) were used for behavioral experiments. They were housed in groups of five since weaning at P21 in standard breeding cages with food and water *ad libitum*, and were placed at a constant temperature (23 ± 1°C) under diurnal conditions (light-dark: 8:00AM–8:00PM). Mice were tested during the first half of the light period.

Immunohistochemistry

Histology experiments were performed on wild-type C57BL/6J or on DOR-EGFP mice.

METHOD DETAILS

Slice preparation

400 μm transverse hippocampal slices were prepared from C57BL/6Rj male mice. Animals were euthanized in accordance with institutional regulations under anesthesia with isofluorane. Hippocampi were removed and placed upright into an agar mold and cut with a vibratome (Leica VT1200S, Germany) in ice-cold solution containing (in mM): 10 NaCl, 195 sucrose, 2.5 KCl, 15 glucose, 26 NaHCO3, 1.25 NaH2PO4, 1 CaCl2 and 2 MgCl2). The slices were then transferred to 30°C artificial cerebral spinal fluid (ACSF), (in mM: 125 NaCl, 2.5 KCl, 10 glucose, 26 NaHCO3, 1.25 NaH2PO4, 2 Na Pyruvate, 2 CaCl2 and 1 MgCl2) for 30 min and kept at room temperature for at least 1.5 hr before recording. For experiments using digestion of the PNN, slices were further incubated in a separate chamber with either Chrondroitnase ABC (2 U / mL; Sigma) and 0.1% bovine serum albumin (BSA) in ACSF, or with 0.1% BSA in ACSF for 2 hours. All experiments were performed at 33°C.

Electrophysiological recordings and analysis

Whole-cell recordings were obtained from CA2 PNs in voltage clamp mode with a patch pipette (3–5 MΩ) containing (in mM): 135 CsMethylSulfate, 5 KCl, 0.1 EGTA-Na, 10 HEPES, 2 NaCl, 5 ATP, 0.4 GTP, 10 phosphocreatine; pH 7.2; 280–290 mOsm). Series resistance (typically 12–18 MΩ) was monitored throughout each experiment and cells with more than 15% change were excluded from analysis. Before beginning whole cell experiments, we identified the CA2 PNs by somatic location and size. Furthermore, the cell type was confirmed by several electrophysiological properties as previously described (Chevaleyre and Siegelbaum, 2010). Cells were also filled with biocytin and post hoc labeling of filled cells and imaging was performed to confirm CA2 recording when necessary.

Synaptic currents were evoked by mono-polar stimulation with a patch pipette filled with ACSF and positioned in the middle of CA1 SR. The amplitudes of the IPSCs were normalized to the baseline amplitude. A HFS (100 pulses at 100Hz repeated twice, 20 s apart) was applied following stable baseline. The magnitude of plasticity was estimated by comparing averaged responses at 30-40 min after the induction protocol with baseline-averaged responses from 0 to 10 min before the induction protocol. We used pClamp10 and Axograph X software for data acquisition and Origin Pro for data analysis. Statistical comparisons were performed using Student's t test, ANOVA, Wilcoxon, Mann-Witney or Kruskal-Wallis where appropriate. All drugs were bath-applied following dilution into the external solution from concentrated stock solutions. Results are reported as mean ± SEM.

Immunohistochemistry

For histology experiments, wt C57BL/6J at P17, P22, P29, P35 and P50 were anesthetized according to institutional regulation and transcardially perfused with ice-cold phosphate-buffered saline (PBS) followed by 4% paraformaldehyde in PBS. DOR-EGFP mice were anesthetized with pentobarbital and perfused with ice-cold 4% paraformaldehyde at 20 ml/min for 5 min. The brains were dissected, post-fixed and 30 μm floating coronal sections were prepared with a Leica 1000S vibratome. 8 serial sections were selected spanning bregma −1.8 to −2.1. Sections were permeabilized in PBS + 0.2% Triton, followed by incubation in blocking solution (PBS+0.2% Triton + 3% normal goat serum). Primary antibody incubation was carried out in blocking solution overnight at 4°C. A rabbit anti-parvalbumin antibody (Swant) was used at a dilution of 1:2000, the mouse monoclonal anti-RGS14 antibody (Neuromab) was used at dilution of 1:300. GFP-DOR signal was amplified with a polyclonal chicken anti-GFP (Abcam) at a dilution of 1:10000, and ErbB4 was stained with the mouse monoclonal HER-4 antibody (Invitrogen) at a dilution of 1:300. The PNN was

stained with Wisteria Floribunda Agglutinin (WFA)-biotinylated (Sigma) diluted at 1:1,000 followed by either alexa-555 streptavidin (Life Technologies) or alexa-647 streptavidin (Life Technologies) diluted at 1:500. Secondary antibodies were carried out in block solution for 4 hours. Secondary antibodies were Cy3 tagged goat anti-rabbit (Jackson ImmunoResearch), alexa-647 tagged goat anti-mouse (Life Technologies), Alexa 488 rat anti-chicken (Life Technologies) all diluted at 1:800.

Images were collected with a Zeiss 710 laser-scanning confocal microscope. Z series images consisting of three channels were collected every 0.9 μm over a total distance of 30 μm per slice. RGS14 staining alone was used to define area CA2. All image analysis and quantification was performed with ImageJ.

Stereotaxic injection

For PNN degradation, male mice (7-8 weeks old, Charles River, France) were anaesthetized with isoflurane (2%–5%) and placed in a stereotaxic apparatus (Kopf). Each mouse was submitted to two bilateral injections into the area CA2 of dorsal hippocampus (−1.1 mm anteroposterior, ± 0.6 mm mediolateral and −2.00 mm dorsoventral, and −1.98 mm anteroposterior, ± 2.3 mm mediolateral and −2.05 mm dorsoventral, relative to bregma) of 100 nL of a solution with ChABC (50 U/ml, Sigma, n = 12 mice), or a vehicle solution (phosphate buffer saline 0.1 M, PBS, n = 10 mice). Lidocaine was applied on the flesh before suturing the skin. The animals were then allowed to recover for a week before behavioral testing. To selectively knockout DOR in area CA2, DOR-flox mice (line Orpd1 $^{fl/fl}$, REF) were submitted to two bilateral injections into area CA2 of 100 nL of rAAV5-hSyn-eGFP or rAAV5-hSyn-Cre-eGFP solution. Lidocaine was applied on the flesh before suturing the skin. The animals were submitter to behavioral testing 6 weeks after viral injection.

Behavioral experiments

A total of 40 C57BL/6J male mice (Charles River, France) were used for behavioral experiments. They were housed in groups of five since weaning at P21 in standard breeding cages with food and water *ad libitum*, and were placed at a constant temperature (23 ± 1°C) under diurnal conditions (light-dark: 8:00AM–8:00PM). Mice were tested during the first half of the light period, and the experiments were performed in strict accordance with the recommendations of the European Union (86/609/EEC) and the French National Committee (87/848). For five-trial social memory test (Kogan et al., 2000), each mouse was first placed for 10 min habituation in a large chamber (25x35 cm) with an empty cylindrical small cage placed in the center (8 cm diameter). Then a stimulus mouse, from same age and sex, but never encountered before, was introduced in the small cage for four successive trials of 5 min (ITI 10 min). On the fifth trial, a novel stimulus mouse was introduced. The direct interactions were scored online by the experimenter. All apparatuses and testing chambers were cleaned with 70% ethanol between animals. Mice were sacrificed 3 hours after the social memory test.

Locomotor activity was analyzed during the habituation session of the novel object location task (see below). Each animal was allowed to explore a circular open-field (62 cm diameter, 40 cm-high wall) for 10 minutes. The distance moved in the open field was measured by means of video tracking software (EthoVision XT, Noldus).

The object location test addresses the ability of mice to discriminate between a novel and a familiar spatial location in an open-field with a visual cue (striped pattern). During acquisition, two identical objects were placed in the middle of the open-field. The mice were allowed to explore for 10 min during which the time spent exploring the two objects was recorded. In the test phase held 3 hours later, identical copies of the sample objects were exposed and one of the two objects was moved to a novel location. The position (left or right) of the displaced object was chosen pseudorandomly to reduce bias toward a particular position. Mice were allowed to explore the objects during 10 min. All apparatuses and testing chambers were cleaned with 70% ethanol between animals.

Post hoc histological analysis

Mice were administered pentobarbital before being flush-perfused transcardially with normal saline for 45-60 s. The brains were removed and bisected, then drop-fixed in 4% PFA/PB 0.1M for 48 hours at 4°C, and transferred into a 30% sucrose solution with 0.1% sodium azide for at least 2 days. Coronal sections of 30 μm were prepared with a sliding microtome (Leica SM2010R) equipped with a freezing stage (Physitemp BFS-3MP). A series of free-floating sections, from bregma −0.6 to −3.0 and of 150 μm apart, was used for PCP4 and WFA stainings. Sections were rinsed extensively in PBS with 0.25% Triton X-100 (PBST) before being placed for 15 min in a PBS solution with 3% H2O2 and 10% methanol. After two washes in PBST, the sections were transferred in a 10% normal donkey serum (NDS) in PBST blocking solution for 1 hour. The sections were then incubated overnight at room temperature in a PBST/10% NDS solution containing the rabbit anti-PCP4 antibody (Santa Cruz; 1:250) and the Wisteria Floribunda Agglutinin (WFA)-biotinylated (Sigma; 1:1,000). The next day, sections were incubated for 90 min in a PBST/10% NDS solution with secondary antibody donkey anti-rabbit Alexa 647 (Molecular Probes; 1:250) and streptavidin-TRITC (Molecular Probes; 1:500). For histological control of injections and measurements of PNN degradation, 4 hemi-sections were analyzed per animal. PCP4 staining was used to define area CA2. Images were collected with a Leica DM600B fluorescence microscope, and image analysis and quantification were performed with ImageJ and Fiji plugin.

QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS

We used pClamp10 and Axograph X software for data acquisition and Origin Pro and GraphPad Prism for data analysis. Statistical comparisons were performed using Student's t test and ANOVA. When the distribution was not normal, we used non-parametric test (Wilcoxon and Mann-Whitney test, see Table S1). Statistical significance was set to $p < 0.05$ (*** indicates $p < 0.001$, ** indicates $p < 0.01$, * indicates $p < 0.05$). Data are reported as mean ± SEM. Error bars shown in figures represent SEM.

DATA AND CODE AVAILABILITY

This study did not generate datasets and code.

Author's personal copy

What's New on Alzheimer's Disease? Insights From AD Mouse Models

Christophe C Rey, Vanessa Cattaud, Claire Rampon☆**, and Laure Verret**☆**,** Research Center on Animal Cognition, Center for Integrative Biology, Toulouse University, France; and CNRS, UPS, France

© 2020 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction 431
Design of Alzheimer's Disease Mouse Models 432
First Drug Trials Based on Preclinical Studies With AD Models: Targeting Aβ Species 434
Alzheimer's Disease Patients Also Present Changes in Their Brain Activity 435
Hypersynchrony and Epilepsy in Alzheimer's Disease Mouse Models and Patients 436
Neuronal Mechanisms of Hypersynchrony/Epilepsy in Alzheimer's Disease Mouse Models 436
Using Antiepileptic Drugs Against Alzheimer's Disease? 437
Alteration of Brain Oscillations in Alzheimer's Disease Mouse Models and Patients 438
Conclusion 439
References 439
Further Reading 442
Relevant Websites 442

Nomenclature

AD Alzheimer's disease
AED Antiepileptic drug
APP Amyloid precursor protein
Aβ Beta-amyloid
CSF Cerebrospinal fluid
DMN Default mode network
E/I Excitation/inhibition
EEG Electroencephalogram
FAD Familial forms of Alzheimer's disease
GSI Gamma secretase inhibitor
GSM Gamma secretase modulator
LEV Levetiracetam
MCI Mild cognitive impairment
NSAID Nonsteroidal antiinflammatory drug
PDGF β Platelet derived growth factor β
PET Positron emission tomography
PS1 Presenilin-1
PS2 Presenilin-2
PV Parvalbumin
SOM Somatostatin
VGSC Voltage-gated sodium channel

Introduction

Aging goes with cognitive decline, which sometimes results from pathological insults. Among these insults, Alzheimer's disease (AD) is nowadays certainly the most prevalent neurodegenerative disease among the aging population worldwide. AD was first described by Dr. Alois Alzheimer in 1906. His description included various behavioral disruptions such as memory deficits, disorientation, aphasia and unpredictable behaviors. At the anatomical level, AD patients were found to exhibit a thinning of the cerebral cortex, associated with a widening of the lateral ventricles. Moreover, at the neuropathological level, Dr. Alzheimer reported the

☆Shared-authorship.

Encyclopedia of Biomedical Gerontology, 2020, 431–442

Author's personal copy

presence of extracellular plaques, now known to be formed by the aggregation of the beta-amyloid (Aβ) peptides. Another hallmark of the disease is the formation of neurofibrillary tangles due to the hyperphosphorylation of Tau proteins inside the neurons. Whether and how these anatomical markers can be linked to the associated cognitive deficits observed in AD patients remain key questions to tackle. In this context, the generation and use of mouse models have proven to be highly relevant for testing hypotheses about the physiopathological mechanisms leading to the development of AD. Over the last decades, these models have guided a myriad of research efforts including preclinical studies and clinical trials. However, the successive failures of clinical trials that were designed based on these models, have today precipitated their calling into question. In this article, we present an overview of how these models have contributed to the understanding of the disease, highlighting their limitations but also emphasizing the new and still open opportunities they have provided.

Design of Alzheimer's Disease Mouse Models

There are two types of AD: the familial and the sporadic forms. The sporadic form developed by the vast majority of AD patients, about 95% of the cases, is late-onset, and has a multifactorial origin. The remaining 5% of AD cases exhibit one of the early-onset familial forms of AD (FAD). All FAD cases are caused by either autosomal dominant genetic mutations of *APP*, *PSEN1*, or *PSEN2* genes (Gotz et al., 2018). All of these mutations affect genes involved in the proteolytic pathway of the Amyloid Precursor Protein (APP), resulting in the overproduction of Aβ peptides. Today, more than 33 FAD-mutations have been described on the *APP* gene. *PSEN1* and *PSEN2* genes code for presenilin-1 (PS1) and -2 (PS2), respectively. These proteins are part of the enzymatic complex of the gamma-secretase, which is also involved in the production of Aβ. Indeed, *postmortem* observations of the brain of both sporadic AD or FAD patients show a strong accumulation of amyloid β peptides. These observations led Hardy and Higgin to expose in 1992 the amyloid cascade hypothesis stating that Aβ accumulation is at the origin of the disease, from neuronal dysfunction to dementia (Hardy and Higgins, 1992).

Mouse models of AD are designed based on this amyloid cascade hypothesis. With age, wild-type mice never develop spontaneous AD-like pathology. In fact, murine APP produces lower levels of Aβ and has a lower aggregation capacity even after overexpression of APP (Jankowsky et al., 2007). In contrast, introducing into the mouse genome one or several human *APP*, *PSEN1*, or *PSEN2* genes harboring one or several FAD-linked mutations results in high levels of Aβ peptides associated with changes resembling AD pathology. Thus, mice harboring FAD-linked mutations turn out to exhibit symptoms and signs of the disease. We present below the transgenic lines that have been the most studied because they recapitulate much of the amyloid pathology seen in human AD.

The first transgenic AD mouse model, the PDAPP mouse, was reported in 1995 (Games et al., 1995). These mice overexpress the human *APP* gene (h*APP*) harboring the Indiana mutation involved in FAD. As a result, they produce high Aβ levels from early age on, and display cognitive deficits including recognition memory, working memory (Dodart et al., 1999) and spatial memory (Daumas et al., 2008).

The same year, the Tg2576 model was developed. This model accounts among the most studied AD models during the past two decades (Hsiao et al., 1995). Tg2576 mice express the human APP_{695} gene carrying the FAD-linked Swedish double-mutation (APP_{swe}). Overexpression of this mutated h*APP* induces a slow progression of the pathology comparable to that observed in human patients with sporadic AD, thus allowing to study biological markers at early stages of the pathology. Tg2576 mice develop virtually no neurofibrillary tangles nor significant neuronal loss, and could indeed be considered as a partial model of AD (Westerman et al., 2002). The age-dependent increase of Aβ in the brain of these mice results in the establishment of extracellular amyloid plaques in the cortex and hippocampus at 10–12 months of age (Kawarabayashi et al., 2001). At 18 months of age, these plaques are surrounded by neuronal loss, reactive astrogliosis and hyperphosphorylated tau. At the behavioral level, deficits in spontaneous alteration task and spatial memory were reported in Tg2576 mice by 3 months of age, i.e., long prior to amyloid plaques formation, and progressive age-related cognitive impairments are observed thereafter (King et al., 1999). The Tg2576 model is one of first mouse line which allowed demonstrating that while amyloid plaques define AD, they correlate poorly with the cognitive impairments associated with AD. Instead, it has been demonstrated that the presence of high levels of soluble Aβ species is responsible for memory deficits in Tg2576 mice (Lesne et al., 2006).

Another frequently studied mouse transgenic line is the hAPPJ20 (Mucke et al., 2000). These mice also combine the Swedish and Indiana mutations of the human *APP* gene, but its expression is regulated by the platelet-derived growth factor β (PDGFβ) promoter. Amyloid deposition occurs at 5–7 months of age in the hippocampus and neocortex of hAPPJ20 mice, which exhibit age-related formation of Aβ plaques starting at 8–10 months of age (Mucke et al., 2000). Aberrant behaviors in hAPPJ20 mice such as locomotor hyperactivity and impairments in the object recognition task, have been reported as early as 2–3 months of age (Harris et al., 2010). Interestingly, cognitive impairments of hAPPJ20 mice have been correlated to the reduction of hippocampal neuronal activity, reflected by a depletion of calbindin (Palop et al., 2003). In such, hAPPJ20 mice allowed for the first time to link Aβ accumulation with impaired neuronal activity, pointing out the AD-linked mechanisms of cognitive alterations (Palop et al., 2003).

While a large number of transgenic mouse models of AD bear one or several APP mutations, PS1 mutations are the most commonly recognized causes of early-onset FAD in humans. In fact, PS1 mutations cause APP processing to be shunted toward amyloidogenic pathway (Vetrivel et al., 2006) (**Fig. 1**). While transgenic mice expressing human presenilin variants display no overt pathology, they present the advantage of substantially accelerating and potentiating plaque deposition once crossed with

Author's personal copy

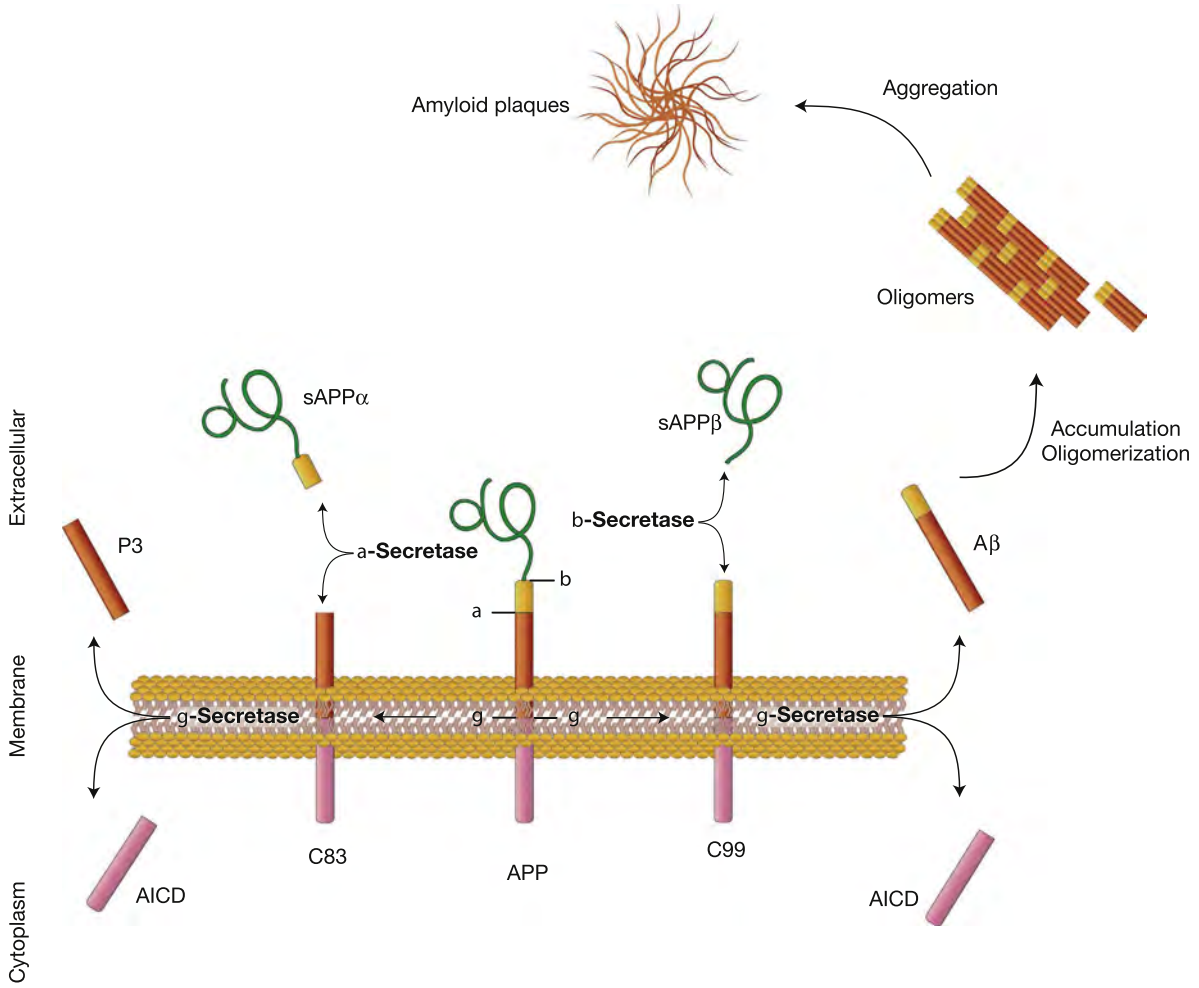


Fig. 1 Schematic illustration of the amyloidogenic and nonamyloidogenic pathways. (Center) The amyloid-β precursor protein (APP) is the target of serial proteolytic cleavages. (Left) The α-secretase is implicated in the neuroprotective, nonamyloidogenic pathway. Its cleavage of APP generates sAPP-α and the C83 fragment (83-residue C-terminal APP). The proteolysis of the C83 fragment by the gamma-secretase releases the APP intracellular (AICD) and a short fragment called P3. (Right) In the amyloidogenic pathway, the β-secretase cleaves APP to generate sAPP-β and the C99 fragment (99-residue C-terminal APP). Then, the cleavage of C99 by the gamma-secretase produces the Aβ fragment and the AICD. The accumulation of Aβ leads to its oligomerization and later to its aggregation into amyloid plaques.

APP transgenic lines. For example, the APPswe/PS1dE9 mice express the Swedish mutation of APP and a secondary transgene, the exon 9 deletion of PS1 (PS1dE9) (Jankowsky et al., 2001). In APPswe/PS1dE9 mice, the first amyloid plaques appear between 4 and 6 months of age (Jankowsky et al., 2004), and early cognitive disorders are reported at 3 months of age (Vegh et al., 2014).

Several other transgenic mouse models carrying one or several FAD-linked mutations have been generated in order to study the development of the pathology within a relatively short time frame. Most information about the characterization of selected AD mouse models is available (https://www.alzforum.org/research-models:alzheimers-disease).

Although none of these transgenic mice recapitulates the full spectrum of progressive neuropathological and behavioral changes observed in the human disease, they all show age-dependent amyloid deposition and memory loss. In such, they represent valuable in vivo systems to understand the neurobiological basis of AD pathology. Depending on the mutations, the promotor used for the expression of the transgenes, and depending on their number of copies, these mouse models exhibit different time course of the disease. However, they all have increased levels of soluble Aβ and amyloid plaque formation associated with age-dependent cognitive deficits.

Over the past decades, these mice have provided strong evidence for the primacy of *APP* expression and Aβ deposition in AD pathology. Importantly, these animal models have also been relevant tools to evaluate whether pharmacological drugs known to reduce Aβ production and/or reduce its neurotoxicity in vitro, could also be efficient in vivo, a critical step before advancing into clinical trials with AD patients.

Author's personal copy

First Drug Trials Based on Preclinical Studies With AD Models: Targeting Aβ Species

The amyloid cascade hypothesis identified the peptide Aβ as a key player of AD. Studying how Aβ is secreted from APP (**Fig. 1**) has led to the identification of molecular targets for the design of candidate drugs against Aβ species. Thus, antibodies directed against Aβ were designed in an attempt to directly neutralize the peptide. Remarkably, these drugs turned out to be promising in preclinical trials.

Indeed, the first immunization with anti-Aβ antibodies was performed on 6-week-old PDAPP mice, i.e., before the onset of the disease, and PDAPP mice at 11 months of age, when they exhibit strong cognitive deficits and amyloid plaques (Schenk et al., 1999). It was found that immunization against Aβ in young mice basically prevented age-dependent amyloid deposition, while late immunization significantly reduced levels of soluble Aβ levels as well as the amyloid plaque load.

Following this pioneer study, two other groups also performed immunization against Aβ peptide using the APPswe/PS1dE9 (Morgan et al., 2000) and TgCRND8 (Janus et al., 2000) mouse models of AD. In both studies, they reported a halving of the amyloid burden in the brains of immunized mice, associated with a significant improvement of mice cognitive performances, even at advanced stages of the pathology. Altogether these findings supported the hypothesis that abnormal Aβ processing is decisive for AD pathogenesis. Based on these promising data, the first trials in humans were then launched.

Starting in 2000, a phase 1 clinical trial for AN1792 (synthetic Aβ42 with QS-21 adjuvant) demonstrated tolerability and a positive response to immunization in patients (Bayer et al., 2005). The study also stated the safety of AN1792 and the need to enroll larger cohorts of patients to reliably determine the efficacy of the treatment. Hence, a phase 2 study was initiated to evaluate the efficacy of the immunization with AN1792. However, this clinical trial was suspended in 2002, after 6% of immunized patients developed meningoencephalitis (Orgogozo et al., 2003). Following the failure of this phase 2, the subjects engaged in phase 1 were included into a follow up study designed to evaluate the potential long-term effects of Aβ immunization in AD patients. Interestingly, a significant reduction of the amyloid plaque load was found in the immunized AD patients. However, no evidence of cognitive nor survival improvement was found, suggesting that removal of amyloid plaques may not be enough to stop AD progression (Holmes et al., 2008). In parallel, 4.6 years after AN1792 immunization, responder patients exhibited a reduced cognitive decline compared to patients receiving placebo, and no cases of encephalitis were reported (Vellas et al., 2009). This study supported the idea that Aβ immunization induced long term cognitive benefits in AD patients.

Other anti-Aβ strategies have been tested. For instance, Aducanumab (BIIB037), which binds fibrillary and soluble Aβ with high selectivity, was administrated to 22-month-old Tg2576 mice, reflecting an advance stage of the pathology. A very significant reduction of soluble and insoluble Aβ was observed in these mice, as well as a drastic decrease of Aβ plaque load (Sevigny et al., 2016). In the phase 2 of the clinical trial, Aducanumab was demonstrated to reduce Aβ load in AD patient according to a dose- and time-dependent manner (Sevigny et al., 2016). Amyloid plaque reduction was associated with a cognitive stabilization of treated patients, with a tendency toward amelioration (Sevigny et al., 2016). A phase 3 clinical trial was developed to assess the therapeutic effect of Aducanumab for early AD, giving hope for this therapeutic approach. However, the clinical trial had to be stopped because of the lack of efficacy in the interim analysis compared to the expected results.

Other strategies have consisted in decreasing soluble Aβ and amyloid plaque in AD patients. Several preclinical studies have demonstrated the efficacy of gamma-secretase inhibitors (GSI) to decrease the proteolytic cleavage of APP into Aβ. For instance, the use of LY-411575 in Tg2576 (Das et al., 2012) and in APPswe/PS1dE9 mice (Garcia-Alloza et al., 2009) lowered the production of soluble Aβ and reduced amyloid plaque formation. However, the beneficial effect of this GSI is observed only when administrated during the early stages of the disease, hence before amyloid deposition. Another GSI, the Semagacestat was tested in AD patients with the aim to target later stages of the disease. However, Phase 3 of Clinical Trial 3 did not demonstrate any beneficial effects on cognition and higher doses resulted in serious side effects, including a worsening of functional abilities, skin cancer and infections (Doody et al., 2013). These side effects were likely caused by the interruption of the other physiological functions of gamma-secretases. Indeed, beside their role in the cleavage of APP, gamma-secretases are involved in the cleavage of the Notch protein that regulates cell proliferation, differentiation and cell growth (Kopan and Ilagan, 2009). Whilst gamma-secretase inhibitors did not keep promises in clinical studies, epidemiological studies showed a reduced incidence of AD among steady users of nonsteroidal antiinflammatory drugs (NSAIDs) have allowed the identification of gamma-secretase modulators (GSM) as putative drug candidates for the treatment of AD. Indeed, it was found in vitro and in vivo that some NSAIDs lower Aβ42 production in favor of less toxic nonaggregating Aβ species (e.g., Aβ37, Aβ38) by modulating gamma-secretase activity and without affecting other APP processing pathways or Notch cleavage (Weggen et al., 2003). The ability of these compounds to reduce Aβ42 selectively has raised hope in the context of the amyloid cascade hypothesis of AD. NSAIDs such as R-flurbiprofen (or Tarenflurbil) have been tested in clinical trials. In young Tg2576 mice mimicking a prodromal stage of AD, chronic administration of R-flurbiprofen improved spatial learning with no significant effect on brain soluble Aβ levels (Kukar et al., 2007). However, when administrated in Tg2576 mice at an advanced stage of the pathology, the drug decreased amyloid plaque load without inducing any spatial learning improvement. Thus, chronic administration of R-flurbiprofen might exert a preventive effect on AD progression (Kukar et al., 2007), but higher doses might be used to lower Aβ42 at later stages of the pathology. However, given the gastrointestinal disturbances induced by NSAIDs, increasing the dose might become a concern. This dose issue was also pointed out in phase 1 of the clinical trial, where R-flurbiprofen, although tested at three different doses, had no effect on Aβ42 levels of healthy subjects (Galasko et al., 2007). In phase 2, R-flurbiprofen demonstrated a beneficial dose-related effect on cognitive and functional outcomes in

Author's personal copy

patients with mild AD (Wilcock et al., 2008). In phase 3, and despite the large cohort of AD patients involved, R-flurbiprofen did not reduce cognitive decline nor enhance patients' daily living activities (Green et al., 2009). More recently, a second generation of GSMs, including NGP 555, has been tested on young prodromal Tg2576 mice. Kounnas and colleagues reported that treatment with NGP 555 induced spatial and working memory improvement and effectively lowered soluble plasmatic and cerebral Aβ in these animals (Kounnas et al., 2017). Importantly, NGP 555 had no effect on Notch signaling nor other critical substrates, indicating a limited risk to induce cancer (Kounnas et al., 2017). In AD patients, a clinical trial in phase 1 was finalized but the results are not yet available (NCT02534480; https://clinicaltrials.gov).

The overall inefficacy of anti-Aβ and other drugs designed to reduce Aβ in AD patients has contributed to discredit the amyloid cascade hypothesis. In fact, the use of anti-Aβ in mouse models of AD resulted in substantial reduction in soluble Aβ and amyloid plaques together with an improvement of cognitive functions in these animal models. However, when administrated to AD patients, these anti-Aβ compounds successfully decreased amyloid plaque load but failed to enhance memory or cognitive functions. The fact that anti-Aβ approaches succeed in limiting the progression of amyloid pathology without ameliorating cognitive function, points out the need to intervene at earlier stages of the disease. In this context, the identification of markers allowing early diagnosis of the pathology has become a priority.

Alzheimer's Disease Patients Also Present Changes in Their Brain Activity

In contrast to the apparent heterogeneity in the progression of amyloidopathy and cognitive deficits in AD patients, one phenomenon has proven to be remarkably consistent, particularly in the early stages of the disease: the alteration of the default mode network (DMN), as revealed by functional MRI (fMRI). This DMN corresponds to the activation of specific brain structures, including the precuneus, the posterior cingulate cortex, and the lateral and inferior parietal cortex, during inwardly oriented mental activity, such as introspection, mind wandering, and daydreaming. In contrast, this network is deactivated during outwardly mental tasks such as the acquisition and encoding of new information (Raichle et al., 2001). In fact, the task-induced deactivation of DMN components is critical for encoding and restitution of memory (Sperling et al., 2010). Hence, alteration of DMN activation and deactivation could participate to the cognitive deficits observed in AD patients. Indeed, fMRI studies revealed hippocampal hyperactivation and reduced deactivation of DMN during memory encoding in carriers of FAD-related mutations at presymptomatic stage (Quiroz et al., 2010), as well as in subjects with mild cognitive impairment (MCI) (Bakker et al., 2012). In contrast, during later stages of AD, the hippocampal formation is hypoactive, deactivation of DMN components is reduced during learning, and the shift from "resting" to "active" mode is slower (Celone et al., 2006).

For long, hippocampal hyperactivation in prodromal AD and MCI patients has been interpreted as a compensatory mechanism to counteract emerging cognitive deficits (Putcha et al., 2011). Today, accumulating evidence indicates that this hippocampal hyperactivation is pathogenic by itself, and might directly impair learning and memory processes (Bakker et al., 2012). These observations led to the idea that this hyperactivity could reflect events of neuronal hypersynchrony. This hypersynchrony reflects excessive synchronization of activity of local neuronal populations, resulting in rhythmic discharges of large amplitude that can be observed on electroencephalographic (EEG) recordings (Fig. 2).

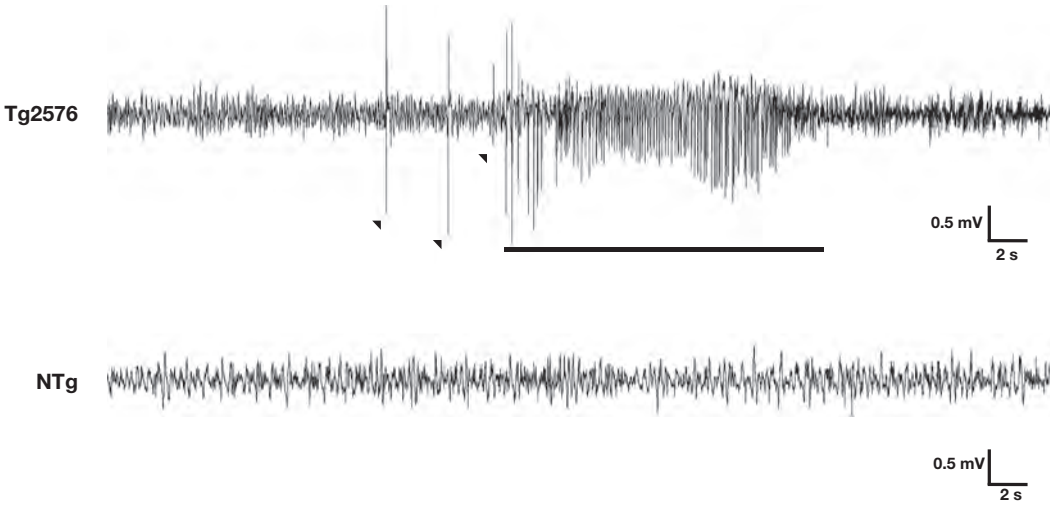


Fig. 2 Representative electroencephalographic (EEG) traces from a transgenic mouse modeling AD (Tg2576, top), and a nontransgenic mouse (NTg, bottom). On this EEG segment, the Tg2576 individual displays interictal spikes (*black arrows*), followed by a seizure (*black line*) characterized by high amplitude and high frequency oscillations lasting several seconds, followed by regular low-amplitude oscillations.

Author's personal copy

Hypersynchrony and Epilepsy in Alzheimer's Disease Mouse Models and Patients

The modification of the DMN is only one of the many disturbances of brain activity in AD patients (Sperling et al., 2009). Indeed, AD condition is strongly associated with aberrant brain network activity, including hypersynchrony and epileptiform activity. In this context, mouse models of AD have proven to be highly relevant for the understanding of brain network abnormalities and neuronal dysfunction induced by amyloidopathy.

At first, epileptic phenotype was reported from opportunistic observations of tonic-clonic seizures or myoclonic movements in AD animals while running behavioral tests. For example, 41% of 24-month-old APP23 mice exhibit tonico-clonic seizures, and 23% of them present myoclonic movements (Lalonde et al., 2005). Spontaneous epileptic seizures were also observed in the Tg2576 mouse line (**Fig. 2**), associated with aberrant behavior, such as repetitive movements, hyperactivity or myoclonic jerks (Hsiao et al., 1995) (Westmark et al., 2008). These reports were indeed strong cues that AD mice were experiencing dramatic modification of their brain activity.

The first EEG recordings providing indisputable evidence for epileptic activity in AD mouse models were conducted in the hAPPJ20 line that bears the Swedish and Indiana FAD-linked mutations of h*APP* (*Palop* et al., *2007*). These observations led to the idea that epileptic seizures and/or the remodeling of hippocampal networks induced by these aberrant activities may underlie AD-associated cognitive decline (Palop and Mucke, 2010). It also suggested that the epileptic phenotype was so far rather underestimated in mouse models of AD. Indeed, these findings encouraged longer EEG recordings, leading to the observation that 5–10% of hAPPJ20 mice have at least one epileptic seizure over 24 h recording period (Verret et al., 2012). Following 2-weeks recording of 3-month-old APPswe/PS1dE9 mice, 25% of the mice were found to display epileptic seizures; this proportion reached 55% at the age of 4.5 months (Minkeviciene et al., 2009).

Apart from epileptic seizures, EEG recordings of AD mouse models have revealed the presence of epileptiform activity, called interictal spikes (when detected in individuals with seizures) or subclinical epileptiform activity (when detected in individuals without known seizures). These events are defined as paroxysmal sharp waveforms visible on EEG and lasting 20–200 ms, which disrupt background activity and are associated with a subsequent slow wave oscillations. So far, these epileptic events have been found in all mouse models of AD that have been submitted to EEG recording, including hAPPJ20 (Palop et al., 2007; Verret et al., 2012), Tg2576 (Bezzina et al., 2015; Kam et al., 2016) (**Fig. 2**), APPswe/PS1dE9 (Minkeviciene et al., 2009), and APP23 (Ittner et al., 2014). Interestingly, these epileptic events are observed as early as 5–6 weeks of age in Tg2576 mice (Bezzina et al., 2015; Kam et al., 2016). This observation prompted the field to consider detection of epileptiform activity in human subjects as a putative early marker for the disease.

Interestingly, early-onset AD in patients bearing FAD-linked mutations is well known to be associated with epileptic seizures (Larner and Doran, 2006; Cabrejo et al., 2006). In contrast, although the incidence of epileptic seizures in patients with late-onset AD is clearly higher than in age-matched controls (Amatniek et al., 2006), frank convulsive seizures are observed in only 5–20% of patients with sporadic AD. Hence, the risk of seizures as compared to age-matched control population is higher in patients with familial AD than in sporadic AD (30–60 vs. 6–10 respectively) (Pandis and Scarmeas, 2012).

However, it is likely that the occurrence of complex partial seizures in sporadic AD is largely underestimated because long-term video-EEG monitoring and/or magnetoencephalography (MEG) are not routinely used in these patients. Indeed, a recent retrospective study revealed that in patients with video-EEG confirmation, complex partial seizures may represent the most common seizure type at early stage of AD (Vossel et al., 2013), highlighting the fact that this monitoring should be performed for accurate diagnosis of epilepsy in AD. To date, information regarding the occurrence of subclinical epileptiform activity in AD patients remains limited. Long-term video-EEG of 54 patients with MCI or AD revealed the presence of epileptiform activity (spikes or sharp waves) in 62% of patients already diagnosed with seizures, and in 6% of patients without detected seizures (Vossel et al., 2013). In a subsequent study performed by the same group, epileptiform activity was detected in 42.4% of AD patients (with or without previously detected epilepsy) (Vossel et al., 2016). Interestingly, these patients had no specific features (i.e., clinical, or demographic) that distinguished them from those without subclinical epileptiform activity. However, patients with interictal epileptic discharges had symptoms of cognitive decline 5.5 years earlier than patients without subclinical epileptiform activity (Vossel et al., 2016). This suggests that disease course is more aggressive in AD patients with subclinical epileptiform activity than in patients free of such brain network activity.

To summarize, seminal works using transgenic FAD mouse models have shown that increased Aβ levels are sufficient to elicit epileptiform activity and seizures, even at early stages of the disease, and in the absence of neuronal loss. These observations indicate that imbalance between excitation and inhibition might be a robust hallmark of early stage AD, and that cognitive decline might be, at least in part, related to aberrant brain activity. Importantly, studies using mouse models of AD have raised the possibility that epileptic seizures, and especially epileptiform activity, may remain largely underdiagnosed in AD patients. Today, screening for epileptiform activity is starting to be used in clinic for identifying patients who may decline more rapidly. Additionally, outcomes from long-term EEG and MEG/EEG recordings could enhance precision in future clinical trials.

Neuronal Mechanisms of Hypersynchrony/Epilepsy in Alzheimer's Disease Mouse Models

Understanding the mechanisms behind the original alterations in neuronal network activities might be crucial to define the link between Aβ overproduction and cognitive dysfunction. Furthermore, identifying the key players underlying these aberrant activities could provide new therapeutic targets.

Author's personal copy

Epileptic activity is well known to trigger inhibitory compensatory responses in the hippocampus, which may counteract the imbalance between excitation and inhibition, both in epileptic patients (Nagerl et al., 2000), and in animal models with hyperexcitability/epilepsy (Tonder et al., 1994). Although these compensatory inhibitory mechanisms may be efficiently reducing aberrant network hyperexcitability and hypersynchrony, they can also interfere with normal hippocampal network functions required for learning and memory processes (Palop et al., 2006). Interestingly, several of these modifications have also been observed in AD patients (Palop et al., 2003).

In AD mouse models, epileptiform activity is associated with alterations in several activity-related proteins in the dentate gyrus of the hippocampus. Specifically, a decrease in the expression of the calbindin protein involved in the regulation of calcium influx and neuronal excitability has been reported in several mouse lines such as hAPPJ20 (Palop et al., 2003, 2007), Tg2576 (Corbett et al., 2013; Krezymon et al., 2013; Verret et al., 2013), and APPswe/PS1dE9 (Minkeviciene et al., 2009). Strikingly, calbindin depletion has also been observed in the dentate gyrus of AD patients, with the most striking reductions seen in the most severely demented cases (Palop et al., 2003). Furthermore, some activity-dependent proteins known to be critical for synaptic plasticity and memory formation are down regulated in the hippocampus of mouse models of AD, particularly in the granular layer of the dentate gyrus. For instance, learning-induced Fos expression is reduced in Tg2576 (Corbett et al., 2017), hAPPJ20 (Corbett et al., 2017; Palop et al., 2005), and TgCRND8 mice (Hamm et al., 2017). Another specific hallmark of compensatory remodeling of hippocampal circuits due to Aβ-induced epileptic activity is the sprouting of inhibitory axonal terminals in the molecular layer of the dentate gyrus (Palop et al., 2007; Verret et al., 2013). Noticeably, these alterations have been shown to correlate with each other and with learning and memory deficits (Palop et al., 2003), suggesting that these compensatory inhibitory responses could be causally linked to cognitive decline. Moreover, the reorganization of inhibitory hippocampal circuits prompted the field to study if and how populations of inhibitory neurons were affected by AD pathology.

Indeed, reduced numbers of parvalbumin- (PV) (Brady and Mufson, 1997) and somatostatin- (SOM) containing inhibitory interneurons (Davies et al., 1980) have been reported in *postmortem* brains of AD patients. The decrease of these GABAergic neuronal populations, which are strongly involved in the organization of brain activity (Cardin, 2018), is also observed in mouse models of the disease. For instance, SOM-expressing interneurons are reduced in the hippocampus of Tg2576 (Perez-Cruz et al., 2011) and TgCRND8 (Albuquerque et al., 2015) mice around 6 months of age. Moreover, PV-expressing interneurons are reduced as early as 6 months of age in the hippocampus of Tg2576 mice (Cattaud et al., 2018), and even at younger age (2 months) in TgCRND8 mice (Hamm et al., 2017).

PV cells are widely distributed and abundant GABAergic fast-spiking inhibitory interneurons able to synchronize the activity of large populations of excitatory neurons (Hu et al., 2014). As a result, they play major roles in regulating local ensemble activities, including theta and gamma oscillations. Interference with PV cell functioning in the hippocampus of wild-type mice leads to altered memory, illustrating their contribution to cognitive functions (Mann and Paulsen, 2007). Detailed investigations using AD mouse models have revealed functional impairment of PV interneurons. Indeed, PV cells have reduced perineuronal net (PNN) onto their soma and proximal neuritis in the hippocampus of prodromal (3-month-old) Tg2576 mice (Cattaud et al., 2018). This PV-specific form of extracellular matrix is involved in the stabilization of synapses onto PV cells, and loss of PNNs in the hippocampus is associated with epileptiform activity (Rankin-Gee et al., 2015). Hence, atypical PNN absence in AD condition may compromise the functioning of PV circuits and the associated cognitive controls such as memory retrieval (Favuzzi et al., 2017). Moreover, PV cells show reduced levels of voltage-gated sodium channel (VGSC) subunit Nav1.1 in hAPPJ20 (Verret et al., 2012), Tg2576 (Corbett et al., 2013), and TgCRND8 (Hamm et al., 2017) mice. These decreased Nav1.1 levels in PV cells, which can be found also in AD patients, are directly linked to altered network activity, i.e., depressed gamma oscillations, epileptiform activity, and memory deficits (Verret et al., 2012). Notably, restoring Nav1.1 level in hAPPJ20 mice by genetic manipulation (Verret et al., 2012), or transplantation of embryonic interneurons overexpressing Nav1.1 (Martinez-Losa et al., 2018), was sufficient to increase inhibitory synaptic activity and reduce network hypersynchrony. Thus, PV cells play a pivotal role in the disruption of inhibitory control in the AD brain, leading to major deficits in cognitive functions such as learning and memory.

Using Antiepileptic Drugs Against Alzheimer's Disease?

The aforementioned recent failure of clinical trials using anti-Aβ compounds has prompted the field to consider alternative strategies to fight AD. The high prevalence of epileptic seizures and neuronal hyperexcitability in AD patients suggested that antiepileptic drugs (AEDs) could be used to treat the pathology.

Because of their direct influence on neuronal activity and subsequent glutamate release, VGSCs are the molecular targets of numerous AEDs. Among VGSC-blockers, phenytoin was first described in 1938 for efficiently reducing convulsive seizures both in epileptic patients and animal models of epilepsy (Bialer and White, 2010). Paradoxically, phenytoin exacerbates epileptiform activity in the hAPPJ20 mouse model of AD (Verret et al., 2012), but not in the APPswe/PS1dE9 mice (Ziyatdinova et al., 2011). The detrimental impact of phenytoin both on seizures and cognitive performance in hAPPJ20 mice might be linked to the reduced presence of Nav1.1 in PV interneurons. In this context, blocking Nav1.1 activity with phenytoin could reduce the activity of these Nav1.1-expressing inhibitory neurons and provoke the hyperexcitability of pyramidal neurons, resulting in exacerbation of hypersynchrony and epilepsy. Interestingly, a retrospective study of clinical data from AD and MCI patients who were treated with AEDs for diagnosed epilepsy revealed that phenytoin was less efficient for reducing epilepsy, and also less tolerated than other AEDs (Vossel et al., 2013).

Author's personal copy

The same study also revealed that levetiracetam (LEV) was among the most efficient AEDs for reducing epileptiform activity in MCI and AD patients, and that it was also well tolerated in this specific clinical context (Vossel et al., 2013). In contrast to phenytoin, LEV has proven to be beneficial for AD mouse models. Indeed, chronic LEV treatment reduces network hypersynchrony, synaptic deficits, and behavioral abnormalities in the hAPPJ20 mouse model (Sanchez et al., 2012). In addition, LEV injection for 30 days restores spatial memory in 7-month-old APPswe/PS1dE9 mice, associated with decreased Aβ load and increased Aβ clearance (Shi et al., 2013).

Furthermore, it has been shown that chronic treatment with low doses of LEV in amnestic MCI was able to reduce hippocampal hyperactivity and improve performance in hippocampal-dependent pattern separation task (Bakker et al., 2012). Additionally, a recent study compared the impact of low and high LEV doses on brain activity and cognitive performance in AD patients (Musaeus et al., 2017). Although no significant changes in cognitive performance were observed after a single dose of LEV, spectral analysis of EEG recordings revealed decreased coherence in the lower frequency bands (1–4 Hz) and increased coherence in the higher frequency bands (13–30 Hz). These subtle changes in brain oscillatory activity indicate that LEV might be beneficial for patients with AD (Musaeus et al., 2017). Noticeably, several clinical trials aiming at evaluating beneficial impact of LEV on brain activity and cognitive performance of AD patients are currently ongoing (NCT02002819 and NCT01554683, https://clinicaltrials.gov/).

Alteration of Brain Oscillations in Alzheimer's Disease Mouse Models and Patients

The brain relies on oscillatory rhythmic activity, generated by inhibitory interneurons, to organize information flow and to precisely time neuronal firing required for cognitive processing. The simultaneous unit activity of neuronal populations results in brain waves that can oscillate at different frequencies (in hertz-Hz) and whose power on the EEG reflects the behavioral state of the animal. Among brain rhythms, theta (4–12 Hz) and gamma (40–150 Hz) oscillations are involved in network stability, and both perceptual and memory processes.

Theta oscillations are considered critical for memory formation and synchronization between the hippocampus and several other brain structures (Cardin, 2018). Oscillations occurring at gamma frequencies are thought to transiently couple distributed networks that are processing related information. In human subjects, selective increase of gamma oscillations is observed during learning and predicts successful encoding of new memories (Sederberg et al., 2007). Similarly, in rodents, increased gamma activity (Yamamoto et al., 2014), and theta-gamma coupling (Tort et al., 2009) are induced during learning or novelty detection. Theta-gamma coupling reflects the nesting of gamma oscillations within the slower theta oscillations, and this comodulation might play a critical role in memory processes in the hippocampus. Noticeably, it is now known that both theta and gamma oscillatory activities are controlled by the synaptic activity of PV-expressing inhibitory fast-spiking interneurons (Cardin et al., 2009; Amilhon et al., 2015). As discussed above, PV cell function is strongly altered both in AD mouse models and patients. Altogether these observations led to the idea that AD-linked PV dysfunction causes abnormal brain oscillatory activity that might interfere with the intricate processes underlying cognitive deficits.

Indeed, mouse models of AD, which are known to exhibit disrupted PV cells associated with hypersynchrony/epilepsy, are also experiencing abnormal brain oscillations. Abnormal fluctuations in the power of gamma oscillations have been observed in hAPPJ20 mice. Specifically, these mice exhibit brief peaks of increased gamma power and long periods of decreased gamma power, independently of their behavioral state (Verret et al., 2012). Similar abnormal fluctuation in behavior-induced gamma power occurs in 12–14-month-old Tg2576 mice (Cramer et al., 2012). Interestingly, TgCRND8 mice show aberrant oscillatory activity at prodromal stage, i.e., before detectable cognitive deficits and Aβ accumulation. Specifically, although both transgenic and nontransgenic mice display increased theta power in the hippocampus following a sensorial stimulation, preplaque TgCRND8 mice show reduced gamma power on their EEG (Hamm et al., 2017). Furthermore, in vitro recordings from septo-hippocampal preparation of these mice revealed that theta-gamma coupling is impaired before detectable cognitive deficits and amyloidopathy (Goutagny et al., 2013). In the same line, a decrease of theta and gamma powers has been evidenced before disturbances of spatial learning in the 5xFAD mouse model (Schneider et al., 2014).

Characterization of aberrant brain oscillatory in AD mouse models at prodromal or early stage of the pathology has at least two important outcomes. First, the idea that EEG recording could be an easily implementable approach for a precocious detection of AD started to emerge in the field. Importantly, abnormal brain oscillatory activity has also been reported in AD patients and MCI. For instance, AD patients also show aberrant increases of sensory-evoked gamma power, which could be linked to decreased cortical inhibition (van Deursen et al., 2011). Overall, it is well admitted that AD patients typically present an increase in theta power associated with a decrease in relative power of gamma oscillations during resting state (Herrmann and Demiralp, 2005; Nimmrich et al., 2015). This amplitude of theta waves relatively to oscillatory activities of higher frequency has been proposed as an early marker of AD. Indeed, this measure allows the correct classification of 85% of MCI subjects, by making possible to distinguish the subjects who progress into AD from those who remain stable (Jelic et al., 2000). Interestingly, a longitudinal study revealed that subjects with subjective complaints had increased theta power 7 years before decline to MCI and/or conversion to dementia, highlighting the high sensitivity of EEG evaluations as predictors of future cognitive decline (Prichep et al., 2006). However, differences in baseline or resting state EEG can also be detected in other neurological conditions and might not be specific to AD (Herrmann and Demiralp, 2005). Hence, it has been proposed that recording EEG during behavioral tasks would provide higher specificity for AD condition (Hamm et al., 2015). Spatial disorientation is already present at MCI and early AD stages, and spatial navigation depends on theta and gamma oscillations. It has been shown that specific navigational tasks in both virtual and real-world paradigms could

Author's personal copy

predict the risk of conversion from normal aging to MCI, and from MCI to dementia (Kalova et al., 2005; Weniger et al., 2011; Moodley et al., 2015). Therefore, the combination of spatial navigation tasks with EEG recordings may be useful for early and specific detection of AD.

Another major contribution of the study of brain oscillations in AD mouse models is that it promotes the idea that reducing PV cell-dependent aberrant oscillatory activity could contribute to the rescue of cognitive functions in AD condition (Palop and Mucke, 2016). Indeed, restoring PV cell function by overexpressing Nav1.1 is able to reduce gamma oscillations abnormalities, hypersynchrony, and cognitive functions in the hAPPJ20 mouse model of AD (Verret et al., 2012). In a follow-up study, the same group has recently demonstrated that grafting embryonic precursors of interneurons overexpressing Nav1.1 in the brain of adult hAPPJ20 mice induces the same beneficial effects, despite the presence of amyloidopathy (Martinez-Losa et al., 2018). Another study demonstrated that specific stimulation of PV cells at 40 Hz was sufficient to provoke the emergence of sustained gamma oscillations at this same frequency in the brain of 5xFAD mice (Iaccarino et al., 2016). Surprisingly, they also found that inducing gamma waves was initiating changes in gene expression that cause microglia to more efficiently clear extracellular Aβ. In order to determine if these findings can have any therapeutic relevance, they aimed to induce gamma oscillations in a less-invasive way, and they submitted 5xFAD mice to 40-Hz flickering lights. Strikingly, they observed that animals submitted to flickering light an hour a day over a week showed a 67% reduction of plaque load in the visual cortex, associated with reduced tau protein (Iaccarino et al., 2016). Although studies using mouse models of AD clearly demonstrate that promoting 40-Hz oscillations has beneficial impacts in AD condition, whether the same effect will be seen in humans remains to be determined. Indeed, these findings opened the way for safety trials involving multi-sensory stimulation devices (such as glasses, headphones), sometimes associated with transcranial alternating current stimulation, that are able to induce gamma activity in different brain regions of AD patients (NCT03556280, NCT03661034, NCT03543878, NCT03657745, and NCT02663531; https://clinicaltrials.gov/).

Conclusion

Mouse models of AD do not perfectly mimic the disorder, and many therapies that appeared promising in rodents have failed in humans. However, animal models are valuable tools for understanding how AD pathology affects neuronal activity at multiple levels of brain function, and how synaptic, cellular, and network changes trigger cognitive impairment. Experimental data from mouse models of AD continue to provide new knowledge about the pathology, both by allowing the identification of molecular targets pivotal to the disease process and by characterizing biomarkers that can be used for early diagnosis in patients.

References

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

Amatniek, J.C., Hauser, W.A., DelCastillo-Castaneda, C., et al., 2006. Incidence and predictors of seizures in patients with Alzheimer's disease. Epilepsia 47 (5), 867–872.

Amilhon, B., Huh, C.Y., Manseau, F., et al., 2015. Parvalbumin Interneurons of hippocampus tune population activity at theta frequency. Neuron 86 (5), 1277–1289.

Bakker, A., Krauss, G.L., Albert, M.S., et al., 2012. Reduction of hippocampal hyperactivity improves cognition in amnestic mild cognitive impairment. Neuron 74 (3), 467–474.

Bayer, A.J., Bullock, R., Jones, R.W., et al., 2005. Evaluation of the safety and immunogenicity of synthetic Abeta42 (AN1792) in patients with AD. Neurology 64 (1), 94–101.

Bezzina, C., Verret, L., Juan, C., et al., 2015. Early onset of hypersynchronous network activity and expression of a marker of chronic seizures in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. PLoS One 10 (3), e0119910.

Bialer, M., White, H.S., 2010. Key factors in the discovery and development of new antiepileptic drugs. Nature Reviews. Drug Discovery 9 (1), 68–82.

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

Cabrejo, L., Guyant-Marechal, L., Laquerriere, A., et al., 2006. Phenotype associated with APP duplication in five families. Brain 129 (Pt 11), 2966–2976.

Cardin, J.A., 2018. Inhibitory interneurons regulate temporal precision and correlations in cortical circuits. Trends in Neurosciences 41 (10), 689–700.

Cardin, J.A., Carlen, M., Meletis, K., et al., 2009. Driving fast-spiking cells induces gamma rhythm and controls sensory responses. Nature 459 (7247), 663–667.

Cattaud, V., Bezzina, C., Rey, C.C., et al., 2018. Early disruption of parvalbumin expression and perineuronal nets in the hippocampus of the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease can be rescued by enriched environment. Neurobiology of Aging 72, 147–158.

Celone, K.A., Calhoun, V.D., Dickerson, B.C., et al., 2006. Alterations in memory networks in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease: An independent component analysis. The Journal of Neuroscience 26 (40), 10222–10231.

Corbett, B.F., Leiser, S.C., Ling, H.P., et al., 2013. Sodium channel cleavage is associated with aberrant neuronal activity and cognitive deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. The Journal of Neuroscience 33 (16), 7020–7026.

Corbett, B.F., You, J.C., Zhang, X., et al., 2017. DeltaFosB regulates gene expression and cognitive dysfunction in a mouse model of Alzheimer's disease. Cell Reports 20 (2), 344–355.

Cramer, P.E., Cirrito, J.R., Wesson, D.W., et al., 2012. ApoE-directed therapeutics rapidly clear beta-amyloid and reverse deficits in AD mouse models. Science 335 (6075), 1503–1506.

Das, P., Verbeeck, C., Minter, L., et al., 2012. Transient pharmacologic lowering of Abeta production prior to deposition results in sustained reduction of amyloid plaque pathology. Molecular Neurodegeneration 7, 39.

Daumas, S., Sandin, J., Chen, K.S., et al., 2008. Faster forgetting contributes to impaired spatial memory in the PDAPP mouse: Deficit in memory retrieval associated with increased sensitivity to interference? Learning & Memory 15 (9), 625–632.

Davies, P., Katzman, R., Terry, R.D., 1980. Reduced somatostatin-like immunoreactivity in cerebral cortex from cases of Alzheimer disease and Alzheimer senile dementa. Nature 288 (5788), 279–280.

Author's personal copy

Dodart, J.C., Meziane, H., Mathis, C., et al., 1999. Behavioral disturbances in transgenic mice overexpressing the V717F beta-amyloid precursor protein. Behavioral Neuroscience 113 (5), 982–990.
Doody, R.S., Raman, R., Farlow, M., et al., 2013. A phase 3 trial of semagacestat for treatment of Alzheimer's disease. The New England Journal of Medicine 369 (4), 341–350.
Favuzzi, E., Marques-Smith, A., Deogracias, R., et al., 2017. Activity-dependent gating of Parvalbumin interneuron function by the Perineuronal net protein Brevican. Neuron 95 (3), 639-55.e10.
Galasko, D.R., Graff-Radford, N., May, S., et al., 2007. Safety, tolerability, pharmacokinetics, and Abeta levels after short-term administration of R-flurbiprofen in healthy elderly individuals. Alzheimer Disease and Associated Disorders 21 (4), 292–299.
Games, D., Adams, D., Alessandrini, R., et al., 1995. Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F beta-amyloid precursor protein. Nature 373 (6514), 523–527.
Garcia-Alloza, M., Subramanian, M., Thyssen, D., et al., 2009. Existing plaques and neuritic abnormalities in APP:PS1 mice are not affected by administration of the gamma-secretase inhibitor LY-411575. Molecular Neurodegeneration 4, 19.
Gotz, J., Bodea, L.G., Goedert, M., 2018. Alzheimer disease rodent models for Alzheimer disease. Nature Reviews Neuroscience 19 (10), 583–598.
Goutagny, R., Gu, N., Cavanagh, C., et al., 2013. Alterations in hippocampal network oscillations and theta-gamma coupling arise before Abeta overproduction in a mouse model of Alzheimer's disease. The European Journal of Neuroscience 37 (12), 1896–1902.
Green, R.C., Schneider, L.S., Amato, D.A., et al., 2009. Effect of tarenflurbil on cognitive decline and activities of daily living in patients with mild Alzheimer disease: A randomized controlled trial. Journal of the American Medical Association 302 (23), 2557–2564.
Hamm, V., Heraud, C., Cassel, J.C., et al., 2015. Precocious alterations of brain oscillatory activity in Alzheimer's disease: A window of opportunity for early diagnosis and treatment. Frontiers in Cellular Neuroscience 9, 491.
Hamm, V., Heraud, C., Bott, J.B., et al., 2017. Differential contribution of APP metabolites to early cognitive deficits in a TgCRND8 mouse model of Alzheimer's disease. Science Advances 3 (2), e1601068.
Hardy, J.A., Higgins, G.A., 1992. Alzheimer's disease: The amyloid cascade hypothesis. Science 256 (5054), 184–185.
Harris, J.A., Devidze, N., Halabisky, B., et al., 2010. Many neuronal and behavioral impairments in transgenic mouse models of Alzheimer's disease are independent of caspase cleavage of the amyloid precursor protein. The Journal of Neuroscience 30 (1), 372–381.
Herrmann, C.S., Demiralp, T., 2005. Human EEG gamma oscillations in neuropsychiatric disorders. Clinical Neurophysiology 116 (12), 2719–2733.
Holmes, C., Boche, D., Wilkinson, D., et al., 2008. Long-term effects of Abeta42 immunisation in Alzheimer's disease: Follow-up of a randomised, placebo-controlled phase I trial. Lancet 372 (9634), 216–223.
Hsiao, K.K., Borchelt, D.R., Olson, K., et al., 1995. Age-related CNS disorder and early death in transgenic FVB/N mice overexpressing Alzheimer amyloid precursor proteins. Neuron 15 (5), 1203–1218.
Hu, H., Gan, J., Jonas, P., 2014. Interneurons. Fast-spiking, parvalbumin(+) GABAergic interneurons: From cellular design to microcircuit function. Science 345 (6196), 1255263.
Iaccarino, H.F., Singer, A.C., Martorell, A.J., et al., 2016. Gamma frequency entrainment attenuates amyloid load and modifies microglia. Nature 540 (7632), 230–235.
Ittner, A.A., Gladbach, A., Bertz, J., et al., 2014. p38 MAP kinase-mediated NMDA receptor-dependent suppression of hippocampal hypersynchronicity in a mouse model of Alzheimer's disease. Acta Neuropathologica Communications 2, 149.
Jankowsky, J.L., Slunt, H.H., Ratovitski, T., et al., 2001. Co-expression of multiple transgenes in mouse CNS: A comparison of strategies. Biomolecular Engineering 17 (6), 157–165.
Jankowsky, J.L., Fadale, D.J., Anderson, J., et al., 2004. Mutant presenilins specifically elevate the levels of the 42 residue beta-amyloid peptide in vivo: Evidence for augmentation of a 42-specific gamma secretase. Human Molecular Genetics 13 (2), 159–170.
Jankowsky, J.L., Younkin, L.H., Gonzales, V., et al., 2007. Rodent a beta modulates the solubility and distribution of amyloid deposits in transgenic mice. The Journal of Biological Chemistry 282 (31), 22707–22720.
Janus, C., Pearson, J., McLaurin, J., et al., 2000. A beta peptide immunization reduces behavioral impairment and plaques in a model of Alzheimer's disease. Nature 408 (6815), 979–982.
Jelic, V., Johansson, S.E., Almkvist, O., et al., 2000. Quantitative electroencephalography in mild cognitive impairment: Longitudinal changes and possible prediction of Alzheimer's disease. Neurobiology of Aging 21 (4), 533–540.
Kalova, E., Vlcek, K., Jarolimova, E., Bures, J., 2005. Allothetic orientation and sequential ordering of places is impaired in early stages of Alzheimer's disease: Corresponding results in real space tests and computer tests. Behavioural Brain Research 159 (2), 175–186.
Kam, K., Duffy, A.M., Moretto, J., et al., 2016. Interictal spikes during sleep are an early defect in the Tg2576 mouse model of beta-amyloid neuropathology. Scientific Reports 6, 20119.
Kawarabayashi, T., Younkin, L.H., Saido, T.C., et al., 2001. Age-dependent changes in brain, CSF, and plasma amyloid (beta) protein in the Tg2576 transgenic mouse model of Alzheimer's disease. The Journal of Neuroscience 21 (2), 372–381.
King, D.L., Arendash, G.W., Crawford, F., et al., 1999. Progressive and gender-dependent cognitive impairment in the APP(SW) transgenic mouse model for Alzheimer's disease. Behavioural Brain Research 103 (2), 145–162.
Kopan, R., Ilagan, M.X., 2009. The canonical notch signaling pathway: Unfolding the activation mechanism. Cell 137 (2), 216–233.
Kounnas, M.Z., Lane-Donovan, C., Nowakowski, D.W., et al., 2017. NGP 555, a gamma-Secretase modulator, lowers the amyloid biomarker, Abeta42, in cerebrospinal fluid while preventing Alzheimer's disease cognitive decline in rodents. Alzheimers Dement (N Y). 3 (1), 65–73.
Krezymon, A., Richetin, K., Halley, H., et al., 2013. Modifications of hippocampal circuits and early disruption of adult neurogenesis in the tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. PLoS One 8 (9), e76497.
Kukar, T., Prescott, S., Eriksen, J.L., et al., 2007. Chronic administration of R-flurbiprofen attenuates learning impairments in transgenic amyloid precursor protein mice. BMC Neuroscience 8, 54.
Lalonde, R., Dumont, M., Staufenbiel, M., Strazielle, C., 2005. Neurobehavioral characterization of APP23 transgenic mice with the SHIRPA primary screen. Behavioural Brain Research 157 (1), 91–98.
Larner, A.J., Doran, M., 2006. Clinical phenotypic heterogeneity of Alzheimer's disease associated with mutations of the presenilin-1 gene. Journal of Neurology 253 (2), 139–158.
Lesne, S., Koh, M.T., Kotilinek, L., et al., 2006. A specific amyloid-beta protein assembly in the brain impairs memory. Nature 440 (7082), 352–357.
Mann, E.O., Paulsen, O., 2007. Role of GABAergic inhibition in hippocampal network oscillations. Trends in Neurosciences 30 (7), 343–349.
Martinez-Losa, M., Tracy, T.E., Ma, K., et al., 2018. Nav1.1-overexpressing interneuron transplants restore brain rhythms and cognition in a mouse model of Alzheimer's disease. Neuron 98 (1), 75-89.e5.
Minkeviciene, R., Rheims, S., Dobszay, M.B., et al., 2009. Amyloid beta-induced neuronal hyperexcitability triggers progressive epilepsy. The Journal of Neuroscience 29 (11), 3453–3462.
Moodley, K., Minati, L., Contarino, V., et al., 2015. Diagnostic differentiation of mild cognitive impairment due to Alzheimer's disease using a hippocampus-dependent test of spatial memory. Hippocampus 25 (8), 939–951.
Morgan, D., Diamond, D.M., Gottschall, P.E., et al., 2000. A beta peptide vaccination prevents memory loss in an animal model of Alzheimer's disease. Nature 408 (6815), 982–985.

Author's personal copy

Mucke, L., Masliah, E., Yu, G.Q., et al., 2000. High-level neuronal expression of abeta 1-42 in wild-type human amyloid protein precursor transgenic mice: Synaptotoxicity without plaque formation. The Journal of Neuroscience 20 (11), 4050–4058.
Musaeus, C.S., Shafi, M.M., Santarnecchi, E., et al., 2017. Levetiracetam alters oscillatory connectivity in Alzheimer's disease. Journal of Alzheimer's Disease 58 (4), 1065–1076.
Nagerl, U.V., Mody, I., Jeub, M., et al., 2000. Surviving granule cells of the sclerotic human hippocampus have reduced Ca(2+) influx because of a loss of calbindin-D(28k) in temporal lobe epilepsy. The Journal of Neuroscience 20 (5), 1831–1836.
Nimmrich, V., Draguhn, A., Axmacher, N., 2015. Neuronal network oscillations in neurodegenerative diseases. Neuromolecular Medicine 17 (3), 270–284.
Orgogozo, J.M., Gilman, S., Dartigues, J.F., et al., 2003. Subacute meningoencephalitis in a subset of patients with AD after Abeta42 immunization. Neurology 61 (1), 46–54.
Palop, J.J., Mucke, L., 2010. Amyloid-beta-induced neuronal dysfunction in Alzheimer's disease: From synapses toward neural networks. Nature Neuroscience 13 (7), 812–818.
Palop, J.J., Mucke, L., 2016. Network abnormalities and interneuron dysfunction in Alzheimer disease. Nature Reviews. Neuroscience 17 (12), 777–792.
Palop, J.J., Jones, B., Kekonius, L., et al., 2003. Neuronal depletion of calcium-dependent proteins in the dentate gyrus is tightly linked to Alzheimer's disease-related cognitive deficits. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 100 (16), 9572–9577.
Palop, J.J., Chin, J., Bien-Ly, N., et al., 2005. Vulnerability of dentate granule cells to disruption of arc expression in human amyloid precursor protein transgenic mice. The Journal of Neuroscience 25 (42), 9686–9693.
Palop, J.J., Chin, J., Mucke, L., 2006. A network dysfunction perspective on neurodegenerative diseases. Nature 443 (7113), 768–773.
Palop, J.J., Chin, J., Roberson, E.D., et al., 2007. Aberrant excitatory neuronal activity and compensatory remodeling of inhibitory hippocampal circuits in mouse models of Alzheimer's disease. Neuron 55 (5), 697–711.
Pandis, D., Scarmeas, N., 2012. Seizures in Alzheimer disease: Clinical and epidemiological data. Epilepsy Currents 12 (5), 184–187.
Perez-Cruz, C., Nolte, M.W., van Gaalen, M.M., et al., 2011. Reduced spine density in specific regions of CA1 pyramidal neurons in two transgenic mouse models of Alzheimer's disease. The Journal of Neuroscience 31 (10), 3926–3934.
Prichep, L.S., John, E.R., Ferris, S.H., et al., 2006. Prediction of longitudinal cognitive decline in normal elderly with subjective complaints using electrophysiological imaging. Neurobiology of Aging 27 (3), 471–481.
Putcha, D., Brickhouse, M., O'Keefe, K., et al., 2011. Hippocampal hyperactivation associated with cortical thinning in Alzheimer's disease signature regions in non-demented elderly adults. The Journal of Neuroscience 31 (48), 17680–17688.
Quiroz, Y.T., Budson, A.E., Celone, K., et al., 2010. Hippocampal hyperactivation in presymptomatic familial Alzheimer's disease. Annals of Neurology 68 (6), 865–875.
Raichle, M.E., MacLeod, A.M., Snyder, A.Z., et al., 2001. A default mode of brain function. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 98 (2), 676–682.
Rankin-Gee, E.K., McRae, P.A., Baranov, E., et al., 2015. Perineuronal net degradation in epilepsy. Epilepsia 56 (7), 1124–1133.
Sanchez, P.E., Zhu, L., Verret, L., et al., 2012. Levetiracetam suppresses neuronal network dysfunction and reverses synaptic and cognitive deficits in an Alzheimer's disease model. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 109 (42), E2895–E2903.
Schenk, D., Barbour, R., Dunn, W., et al., 1999. Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. Nature 400 (6740), 173–177.
Schneider, F., Baldauf, K., Wetzel, W., Reymann, K.G., 2014. Behavioral and EEG changes in male 5xFAD mice. Physiology & Behavior 135, 25–33.
Sederberg, P.B., Schulze-Bonhage, A., Madsen, J.R., et al., 2007. Hippocampal and neocortical gamma oscillations predict memory formation in humans. Cerebral Cortex 17 (5), 1190–1196.
Sevigny, J., Chiao, P., Bussiere, T., et al., 2016. The antibody aducanumab reduces Abeta plaques in Alzheimer's disease. Nature 537 (7618), 50–56.
Shi, J.Q., Wang, B.R., Tian, Y.Y., et al., 2013. Antiepileptics topiramate and levetiracetam alleviate behavioral deficits and reduce neuropathology in APPswe/PS1dE9 transgenic mice. CNS Neuroscience & Therapeutics 19 (11), 871–881.
Sperling, R.A., Laviolette, P.S., O'Keefe, K., et al., 2009. Amyloid deposition is associated with impaired default network function in older persons without dementia. Neuron 63 (2), 178–188.
Sperling, R.A., Dickerson, B.C., Pihlajamaki, M., et al., 2010. Functional alterations in memory networks in early Alzheimer's disease. Neuromolecular Medicine 12 (1), 27–43.
Tonder, N., Kragh, J., Finsen, B.R., et al., 1994. Kindling induces transient changes in neuronal expression of somatostatin, neuropeptide Y, and calbindin in adult rat hippocampus and fascia dentata. Epilepsia 35 (6), 1299–1308.
Tort, A.B., Komorowski, R.W., Manns, J.R., et al., 2009. Theta-gamma coupling increases during the learning of item-context associations. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 106 (49), 20942–20947.
van Deursen, J.A., Vuurman, E.F., van Kranen-Mastenbroek, V.H., et al., 2011. 40-Hz steady state response in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. Neurobiology of Aging 32 (1), 24–30.
Vegh, M.J., Heldring, C.M., Kamphuis, W., et al., 2014. Reducing hippocampal extracellular matrix reverses early memory deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. Acta Neuropathologica Communications 2, 76.
Vellas, B., Black, R., Thal, L.J., et al., 2009. Long-term follow-up of patients immunized with AN1792: Reduced functional decline in antibody responders. Current Alzheimer Research 6 (2), 144–151.
Verret, L., Mann, E.O., Hang, G.B., et al., 2012. Inhibitory interneuron deficit links altered network activity and cognitive dysfunction in Alzheimer model. Cell 149 (3), 708–721.
Verret, L., Krezymon, A., Halley, H., et al., 2013. Transient enriched housing before amyloidosis onset sustains cognitive improvement in Tg2576 mice. Neurobiology of Aging 34 (1), 211–225.
Vetrivel, K.S., Zhang, Y.W., Xu, H., Thinakaran, G., 2006. Pathological and physiological functions of presenilins. Molecular Neurodegeneration 1, 4.
Vossel, K.A., Beagle, A.J., Rabinovici, G.D., et al., 2013. Seizures and epileptiform activity in the early stages of Alzheimer disease. JAMA Neurology 70 (9), 1158–1166.
Vossel, K.A., Ranasinghe, K.G., Beagle, A.J., et al., 2016. Incidence and impact of subclinical epileptiform activity in Alzheimer's disease. Annals of Neurology 80 (6), 858–870.
Weggen, S., Eriksen, J.L., Sagi, S.A., et al., 2003. Abeta42-lowering nonsteroidal anti-inflammatory drugs preserve intramembrane cleavage of the amyloid precursor protein (APP) and ErbB-4 receptor and signaling through the APP intracellular domain. The Journal of Biological Chemistry 278 (33), 30748–30754.
Weniger, G., Ruhleder, M., Lange, C., et al., 2011. Egocentric and allocentric memory as assessed by virtual reality in individuals with amnestic mild cognitive impairment. Neuropsychologia 49 (3), 518–527.
Westerman, M.A., Cooper-Blacketer, D., Mariash, A., et al., 2002. The relationship between Abeta and memory in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. The Journal of Neuroscience 22 (5), 1858–1867.
Westmark, C.J., Westmark, P.R., Beard, A.M., et al., 2008. Seizure susceptibility and mortality in mice that over-express amyloid precursor protein. International Journal of Clinical and Experimental Pathology 1 (2), 157–168.
Wilcock, G.K., Black, S.E., Hendrix, S.B., et al., 2008. Efficacy and safety of tarenflurbil in mild to moderate Alzheimer's disease: A randomised phase II trial. Lancet Neurology 7 (6), 483–493.
Yamamoto, J., Suh, J., Takeuchi, D., Tonegawa, S., 2014. Successful execution of working memory linked to synchronized high-frequency gamma oscillations. Cell 157 (4), 845–857.
Ziyatdinova, S., Gurevicius, K., Kutchiashvili, N., et al., 2011. Spontaneous epileptiform discharges in a mouse model of Alzheimer's disease are suppressed by antiepileptic drugs that block sodium channels. Epilepsy Research 94 (1–2), 75–85.

Author's personal copy

Further Reading

Born, H.A., 2015. Seizures in Alzheimer's disease. Neuroscience 286, 251–263.
Buzsaki, G., 2002. Theta oscillations in the hippocampus. Neuron 33 (3), 325–340.
Jankowsky, J.L., Zheng, H., 2017. Practical considerations for choosing a mouse model of Alzheimer's disease. Molecular Neurodegeneration 12 (1), 89.
McDermott, B., Porter, E., Hughes, D., et al., 2018. Gamma band neural stimulation in humans and the promise of a new modality to prevent and treat Alzheimer's disease. Journal of Alzheimer's Disease 65 (2), 363–392.
Nicastro, N., Assal, F., Seeck, M., 2016. From here to epilepsy: The risk of seizure in patients with Alzheimer's disease. Epileptic Disorders 18 (1), 1–12.
Querfurth, H.W., LaFerla, F.M., 2010. Alzheimer's disease. The New England Journal of Medicine 362 (4), 329–344.
Reitz, C., 2012. Alzheimer's disease and the amyloid cascade hypothesis: A critical review. International Journal of Alzheimer's Disease 2012, 369808.
Tang, Y.P., Gershon, E.S., 2003. Genetic studies in Alzheimer's disease. Dialogues in Clinical Neuroscience 5 (1), 17–26.
Verret, L., Rampon, C., 2013. Amyloidogenesis, neurogenesis, learning, and memory in Alzheimer's disease: Lessons from transgenic mouse models. In: Derreumaux, P. (Ed.), Alzheimer's disease: Insights into low molecular weight and cytotoxic aggregates from computer simulations. Imperial College Press.
Wang, D., Fawcett, J., 2012. The perineuronal net and the control of CNS plasticity. Cell and Tissue Research 349 (1), 147–160.

Relevant Websites

https://www.alzforum.org/research-models:alzheimers-disease.
https://clinicaltrials.gov.

Christophe REY

Centre de Recherche sur la Cognition Animale,

Centre de Biologie Intégrative, Université de Toulouse
(UMR 5169, UPS-CNRS)
118 route de Narbonne, 31062 Toulouse Cedex 4, France

DYSFUNCTION OF HIPPOCAMPAL CA2 AREA AND SOCIAL MEMORY DEFICITS IN A MOUSE MODEL OF ALZHEIMER'S DISEASE

One of the most excruciating cognitive problems observed in patients with Alzheimer's disease (AD) is their inability to recognize others. To date, the neural mechanisms underlying this form of memory, called social memory, are partly unknown. This cognitive function requires the integration of numerous sensory information and elaborated memory processes, suggesting that the hippocampal circuit may be involved. Very recently, the area CA2 sub-region of the hippocampus, has aroused a great deal of interest, particularly in its major involvement in the processing of social memory. For the hippocampus to function properly, the balance between excitation and inhibition is essential. The area CA2 has the particularity of exhibiting a very high density of inhibitory parvalbumin (PV) interneurons which express unique properties. In patients and mouse models (Tg2576) of AD, dysfunction of PV interneurons leads to abnormal activity of the hippocampal neural network. Furthermore, this alteration of PV interneurons in the CA2 area is associated with the reduction of their extracellular matrix called perineuronal net (PNN).

In this thesis, we hypothesized that PNNs around PV neurons are necessary for social memory and that their disappearance in the area CA2 is responsible for the social memory deficit observed in AD. Indeed, we show that the alteration of PNN around PV neurons in the area CA2 is sufficient to induce specific alterations in social memory in healthy mice. On the other hand, a specific improvement of social memory capacities is obtained in AD mice by stimulating the formation of PNNs in the area CA2. Finally, we report that Tg2576 mice exhibit an aberrant brain activity during a social task and this perturbation may be dependent on the disappearance of PNNs in the area CA2.

Thus, our results reveal that the area CA2 of the hippocampus plays a major role in the social memory deficits associated with AD. Our work also identifies PV neurons and their extracellular matrix, the PNN, as crucial elements in the formation of social memory.

KEYWORDS : CA2 hippocampal area, Alzheimer's Disease, social memory, Tg2576 mice, parvalbumin interneurons, perineuronal net

AUTEUR : Christophe REY

DIRECTRICES DE THESE : Claire RAMPON & Laure VERRET

DATE ET LIEU DE SOUTENANCE : Toulouse, le 26 mars 2020

DISCIPLINE : Neurosciences

LABORATOIRE : Centre de Recherche sur la Cognition Animale, Centre de Biologie Intégrative, Université de Toulouse
(UMR 5169, UPS-CNRS)
118 route de Narbonne, 31062 Toulouse Cedex 4, France

DYSFONCTIONNEMENT DE L'AIRE CA2 DE L'HIPPOCAMPE ET DÉFICITS DE MÉMOIRE SOCIALE DANS UN MODÈLE MURIN DE LA MALADIE D'ALZHEIMER

Parmi les troubles cognitifs observés chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer (MA), l'un des plus perturbant est leur incapacité à reconnaître leurs proches. À ce jour, les mécanismes neuronaux qui sous-tendent cette forme de mémoire, la mémoire sociale, sont en partie méconnus. Cette fonction cognitive nécessite l'intégration de nombreuses informations sensorielles et des processus mnésiques élaborés, suggérant que le circuit hippocampique pourrait être impliqué. Très récemment, l'aire CA2, une sous-région hippocampique a suscité beaucoup d'intérêt notamment dans son implication majeure dans la mémoire sociale. Pour que l'hippocampe fonctionne correctement, l'équilibre entre excitation et inhibition est essentiel. L'aire CA2 a la particularité de posséder une très forte densité d'interneurones inhibiteurs à parvalbumine (PV) qui présentent des propriétés uniques. Chez les patients et des souris modèles (Tg2576) de la MA, le dysfonctionnement des interneurones PV conduit à une activité anormale du réseau neuronal hippocampique.

Par ailleurs, cette altération des interneurones PV dans l'aire CA2 est associée à la réduction de leur matrice extracellulaire ou perineuronal net (PNN). Au cours de cette thèse, nous avons testé l'hypothèse selon laquelle les PNN autour des neurones PV de l'aire CA2 seraient nécessaires à la mémoire sociale et que leur disparition participerait aux déficits observés dans la MA.

Dans ce travail, nous montrons que l'altération des PNN autour des neurones PV de l'aire CA2 suffit à induire des altérations spécifiques de la mémoire sociale chez des souris saines. D'autre part, une amélioration spécifique des capacités de mémoire sociale est obtenue chez les souris modèles de la MA en stimulant la formation des PNN dans l'aire CA2. Enfin, nous rapportons que les souris Tg2576 présentent une activité cérébrale aberrante lors d'une tâche sociale, et cette perturbation semble être dépendante de la disparition des PNN de l'aire CA2.

Ainsi, nos résultats révèlent que l'aire CA2 de l'hippocampe joue un rôle prépondérant dans les déficits de mémoire sociale associés à la MA. Nos travaux identifient également les neurones PV et leur matrice extracellulaire, le PNN, comme des éléments cruciaux de la formation de la mémoire sociale.

MOTS-CLEFS : Aire CA2 de l'hippocampe, maladie d'Alzheimer, mémoire sociale, souris Tg2576, interneurones à parvalbumine, perineuronal net

AUTEUR : Christophe REY

DIRECTRICES DE THESE : Claire RAMPON & Laure VERRET

DATE ET LIEU DE SOUTENANCE : Toulouse, le 26 mars 2020

DISCIPLINE : Neurosciences

LABORATOIRE : Centre de Recherche sur la Cognition Animale, Centre de Biologie Intégrative, Université de Toulouse
(UMR 5169, UPS-CNRS)
118 route de Narbonne, 31062 Toulouse Cedex 4, France

DYSFONCTIONNEMENT DE L'AIRE CA2 DE L'HIPPOCAMPE ET DÉFICITS DE MÉMOIRE SOCIALE DANS UN MODÈLE MURIN DE LA MALADIE D'ALZHEIMER

Parmi les troubles cognitifs observés chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer (MA), l'un des plus perturbant est leur incapacité à reconnaître leurs proches. À ce jour, les mécanismes neuronaux qui sous-tendent cette forme de mémoire, la mémoire sociale, sont en partie méconnus. Cette fonction cognitive nécessite l'intégration de nombreuses informations sensorielles et des processus mnésiques élaborés, suggérant que le circuit hippocampique pourrait être impliqué. Très récemment, l'aire CA2, une sous-région hippocampique a suscité beaucoup d'intérêt notamment dans son implication majeure dans la mémoire sociale. Pour que l'hippocampe fonctionne correctement, l'équilibre entre excitation et inhibition est essentiel. L'aire CA2 a la particularité de posséder une très forte densité d'interneurones inhibiteurs à parvalbumine (PV) qui présentent des propriétés uniques. Chez les patients et des souris modèles (Tg2576) de la MA, le dysfonctionnement des interneurones PV conduit à une activité anormale du réseau neuronal hippocampique.

Par ailleurs, cette altération des interneurones PV dans l'aire CA2 est associée à la réduction de leur matrice extracellulaire ou perineuronal net (PNN). Au cours de cette thèse, nous avons testé l'hypothèse selon laquelle les PNN autour des neurones PV de l'aire CA2 seraient nécessaires à la mémoire sociale et que leur disparition participerait aux déficits observés dans la MA.

Dans ce travail, nous montrons que l'altération des PNN autour des neurones PV de l'aire CA2 suffit à induire des altérations spécifiques de la mémoire sociale chez des souris saines. D'autre part, une amélioration spécifique des capacités de mémoire sociale est obtenue chez les souris modèles de la MA en stimulant la formation des PNN dans l'aire CA2. Enfin, nous rapportons que les souris Tg2576 présentent une activité cérébrale aberrante lors d'une tâche sociale, et cette perturbation semble être dépendante de la disparition des PNN de l'aire CA2.

Ainsi, nos résultats révèlent que l'aire CA2 de l'hippocampe joue un rôle prépondérant dans les déficits de mémoire sociale associés à la MA. Nos travaux identifient également les neurones PV et leur matrice extracellulaire, le PNN, comme des éléments cruciaux de la formation de la mémoire sociale.

MOTS-CLEFS : Aire CA2 de l'hippocampe, maladie d'Alzheimer, mémoire sociale, souris Tg2576, interneurones à parvalbumine, perineuronal net