



HAL
open science

Olfaction : marqueur et outil pour bien vieillir

Juliette Greco

► **To cite this version:**

Juliette Greco. Olfaction : marqueur et outil pour bien vieillir. Neurosciences. Université de Lyon, 2021. Français. NNT : 2021LYSE1223 . tel-03662622

HAL Id: tel-03662622

<https://theses.hal.science/tel-03662622v1>

Submitted on 9 May 2022

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.



N°d'ordre NNT : 2021LYSE1223

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON

opérée au sein de
l'Université Claude Bernard Lyon 1

**Ecole Doctorale N° 476
(ED Neurosciences et Cognition)**

Spécialité de doctorat : Neurosciences

Soutenue publiquement le 21/10/2021, par :
Juliette Greco

Olfaction : marqueur et outil pour bien vieillir

Devant le jury composé de :

Devaud Jean-Marc	Professeur des Universités	Université Toulouse III	Rapporteur
Koehl Muriel	Chargée de Recherche	CNRS Bordeaux	Rapporteuse
Coutureau Etienne	Directeur de Recherche	CNRS Bordeaux	Examinateur
Krolak-Salmon Pierre	Professeur des Universités – Praticien Hospitalier	Université Lyon 1	Examinateur
Didier Anne	Professeure des Universités	Université Lyon 1	Directrice de thèse
Richard Marion	Maitre de Conférences	Université Lyon 1	Co-directrice de thèse

Université Claude Bernard – LYON 1

Président de l'Université	M. Frédéric FLEURY
Président du Conseil Académique	M. Hamda BEN HADID
Vice-Président du Conseil d'Administration	M. Didier REVEL
Vice-Président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire	M. Philippe CHEVALLIER
Vice-Président de la Commission de Recherche	M. Petru MIRONESCU
Directeur Général des Services	M. Pierre ROLLAND

COMPOSANTES SANTE

Département de Formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine	Directrice : Mme Anne-Marie SCHOTT
Faculté d'Odontologie	Doyenne : Mme Dominique SEUX
Faculté de Médecine et Maïeutique Lyon Sud - Charles Mérieux	Doyenne : Mme Carole BURILLON
Faculté de Médecine Lyon-Est	Doyen : M. Gilles RODE
Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation (ISTR)	Directeur : M. Xavier PERROT
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques (ISBP)	Directrice : Mme Christine VINCIGUERRA

COMPOSANTES & DEPARTEMENTS DE SCIENCES & TECHNOLOGIE

Département Génie Electrique et des Procédés (GEP)	Directrice : Mme Rosaria FERRIGNO
Département Informatique	Directeur : M. Behzad SHARIAT
Département Mécanique	Directeur M. Marc BUFFAT
Ecole Supérieure de Chimie, Physique, Electronique (CPE Lyon)	Directeur : Gérard PIGNAULT
Institut de Science Financière et d'Assurances (ISFA)	Directeur : M. Nicolas LEBOISNE
Institut National du Professorat et de l'Education	Administrateur Provisoire : M. Pierre CHAREYRON
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1	Directeur : M. Christophe VITON
Observatoire de Lyon	Directrice : Mme Isabelle DANIEL
Polytechnique Lyon	Directeur : Emmanuel PERRIN
UFR Biosciences	Administratrice provisoire : Mme Kathrin GIESELER
UFR des Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives (STAPS)	Directeur : M. Yannick VANPOULLE
UFR Faculté des Sciences	Directeur : M. Bruno ANDRIOLETTI

REMERCIEMENTS

Après ces 3 années intenses me voilà en train d'écrire la partie la plus difficile de ce manuscrit : les remerciements. Mais par où commencer ? Par qui ?

Tout d'abord je remercie les membres du jury qui ont accepté d'évaluer mon travail de thèse. Merci au **Dr Muriel Koehl** et au **Pr Jean-Marc Devaud** de s'être rendus disponibles pour être rapporteurs de ma thèse. Merci également au **Dr Etienne Coutureau** et au **Pr Pierre Krolak-Salmon** d'avoir consenti à être examinateurs de mon travail de thèse.

Ensuite, je tiens à remercier la **Fondation Edmond Roudnitska** pour avoir financé ce projet. Sans votre soutien, rien de tout ça ne serait arrivé.

Mes remerciements vont ensuite tout naturellement à l'**équipe Neuropop** qui m'a accueillie déjà bien avant ma thèse, lors de mon premier stage en licence. Je ne sais pas si aujourd'hui je serai en train d'écrire des remerciements de thèse si je n'avais pas fait mes premiers pas en recherche avec vous. La qualité de la recherche mais aussi la bonne ambiance et la bonne humeur qui règnent dans cette équipe font revenir de nombreux étudiants, moi y compris. Alors merci !

Plus particulièrement, j'adresse un énorme MERCI à Marion et Anne, mes deux incroyables directrices de thèse. **Marion**, merci pour tout. Je me rappelle encore la première fois que je suis arrivée au labo en licence, toute timide et vraiment pas sûre de moi. Pourtant tu as cru en moi en me laissant réaliser l'ensemble des expériences de tout un projet pendant 6 mois. Ton encadrement, ta rigueur, ta pédagogie et ta bienveillance sont sans aucun doute ce qui m'a donné envie de revenir travailler avec toi en master. Tu as ensuite mis tout ton cœur pour m'aider à obtenir une bourse doctorale, alors pour ça aussi je te remercie. Merci aussi pour ton écoute tout au long de ma thèse, pour avoir su me rassurer dans les moments de doutes et canaliser mon stress. Merci d'avoir été très présente durant toutes ces années de travail passées ensemble et de m'avoir tant appris.

Parce-qu'une directrice de thèse c'est très bien, mais deux c'est encore mieux... **Anne**, merci parce-que si j'en suis là aujourd'hui c'est aussi grâce à toi. Tu as su trouver des moments pour moi malgré ton emploi du temps très chargé et l'encadrement de la thèse de Matthias en parallèle de la mienne. J'ai appris beaucoup de choses à tes côtés et pour cela je te remercie aussi. Merci de m'avoir accompagnée dans la dernière ligne droite, ton aide et tes petits mots d'encouragement m'ont permis de tenir jusqu'au bout.

Merci aussi à tous les autres « grands » de l'équipe. **Nathalie**, merci pour ton aide et tes conseils toujours avisés tout au long de ma thèse. **Marc**, merci pour tous les supers logiciels que tu as créés et qui nous ont permis de réaliser la plupart des jolies analyses de nos thèses. Merci aussi à **Camille, Christelle, Ounsa, Catherine, Nicola, Arnaud, Moustafa, Bénédicte** et **Joëlle** pour ces discussions que l'on a pu avoir, scientifiques mais pas seulement. Travailler avec vous a été un réel plaisir.

Un énorme merci à la top team des doctorants et post-doctorants : **Maëlle, Matthias, Inès, Stéphane, Marylou, Morgane, Christophe, Laura, Marine, Lucile** et **Kenza**. Vous avez plus que grandement participé à la bonne ambiance au labo et en dehors. Ces années de thèse n'auraient pas été les mêmes sans vous ! Je vais commencer par remercier **les JIMM**

Tonic, mes 3 rayons de soleil du labo, mais aussi en dehors. On ne va pas se mentir, si on m'entend autant rire, c'est grâce à vous (pas réussi à faire plus de rimes...) ! **Inès**, avec toi on voit la vie en rose. Bien plus qu'une collègue de bureau, toujours là pour me soutenir « comment est-ce que je peux t'aider ? » et particulièrement en cette fin de rédaction. C'est dommage qu'on ait eu l'idée de se faire ces petits après-midi « lac-bronzette » si tardivement, mais rien n'est perdu on va se rattraper ! Merci aussi pour toutes ces séances (pas toujours réussies...) de chasse aux moustiques dans le bureau. Je pense qu'il est grand tant qu'on concrétise en start-up cette tapette à moustique électrique, un peu style taser, mais pour moustique. **Maëlle**, toujours pétillante, souriante et présente pour remotiver les troupes ! Il n'y avait que toi pour nous motiver Inès, Matthias et moi à faire avec toi ce concours intense sur une journée visant à apporter de nouvelles solutions pédagogiques en utilisant l'intelligence artificielle (rien que ça !). Je ne peux que regretter que la situation sanitaire t'ait éloignée du labo, parce-que sans toi, ce n'est pas pareil. **Matthias**, que dire ? Je ne sais même pas par quoi commencer tellement on a vécu de choses tous les deux ! Il faut dire que cela fait 52 594,92 heures qu'on se connaît (oui il fallait bien que le monde sache que nous sommes les « Toujours plus, jamais trop ! »). Inséparables dans les meilleurs moments, comme dans les moins bons, et ce, depuis le tout début à Gerland. Je ne suis pas sûre qu'un « merci » suffira pour exprimer la reconnaissance que j'ai envers toi. Tu m'as sauvée plus d'une fois en me donnant un coup de main avec les manip, mais pas que. Tu es quelqu'un sur qui on peut toujours compter, et ne plus t'avoir avec moi au travail va beaucoup me manquer. Je vais m'arrêter là parce-que je pourrai continuer sur des pages et des pages mais tu sais tout ça. **Stéphane**, j'espère que ton caféier se remettra de mon absence, et je compte sur toi pour que le python commence sa mue et devienne comme il aurait toujours dû être : doré avec des paillettes et des yeux en diamants (**Laura** tu confirmes ?). **Marylou**, nous avons eu la chance de partager les joies de la rédaction (et surtout du rendu, yiiiipiii !). On ne te l'a peut-être pas assez dit, mais merci d'assurer à la perfection le montage de toutes les vidéos de thèse ! Un petit mot aussi pour **Lucile**, notre Neuropopienne d'adoption. Courage tu arrives au bout toi aussi !

Avant de passer aux stagiaires, merci aussi aux deux nouvelles recrues doctorantes, **Anna** et **Valentine**, qui viennent assurer la relève. Bravo les filles, je suis vraiment contente pour vous que vous puissiez vivre cette belle aventure qu'est la thèse. **Anna**, je pense que la digne place de distributeur de gommettes te revient, je compte sur toi pour les répartir équitablement !

Enfin un grand merci à tous mes stagiaires qui ont été d'une aide précieuse durant ces 3 années. **Marie**, la première, **Mina**, juste ensuite, **William** et **Erwan** qui sont arrivés en force à 2, **Antoine** et enfin, **Sabrina**, la Pookie.

Un très grand merci aussi à tous les autres membres du CRNL : le service info, le pôle des secrétaires et gestionnaires. Spéciale dédicace à **Hervé** qui nous sauve la vie en résolvant tous nos problèmes informatiques (et électriques) super rapidement. Merci aussi pour le pain au chocolat. Tu es la première personne (et la seule ?) que je connaisse qui offre quelque chose à des personnes que tu apprécies les jours où tu sais que tu vas passer une journée difficile. Pour tout ça merci, et bien-sûr je te tiendrai au courant quand mes descendants feront du kite surf sur les anneaux de Saturne !!

Je mesure la chance que j'ai eue de pouvoir travailler avec vous tous, dans cet environnement qui m'a permis de m'épanouir au travail. C'est grâce à chacun de vous que j'arrive avec le sourire le matin. MERCI.

Je ne peux pas terminer mes remerciements sans remercier **ma famille** et plus particulièrement **mes parents**, tout simplement parce-que sans leur soutien je n'en serai pas là aujourd'hui. Vous m'avez toujours suivie dans mes choix, sans jamais m'imposer quoi que ce soit. Je sais que quoi qu'il arrive vous êtes là pour m'écouter, me soutenir, m'encourager et me rebooster. Je sais à quel point vous êtes fiers de mon parcours et je sais aussi que tout ça c'est grâce à vous. **Maman, Papa** : MERCI.

Enfin, un énormissime merci à mon chéri, **Morgan**, qui a été d'un soutien sans faille toutes ces années. Je sais à quel point ça n'a pas été toujours facile de gérer toutes les émotions par lesquelles je suis passée tout au long de cette thèse, mais tu as toujours tout fait pour me rendre la vie la plus facile possible. Merci pour ta patience, ta gentillesse et toutes tes attentions au quotidien. J'ai beaucoup de chance de t'avoir à mes côtés.

Je n'oublie pas non plus le reste de **ma famille** et de **mes amis** pour les bons moments que vous m'avez fait passer en dehors du labo et qui ont contribué à me changer les idées, me permettant de retourner à ma thèse en pleine forme !

Table des matières

RESUME	1
ABSTRACT	3
LISTE DES ABREVIATIONS	4
INTRODUCTION.....	5
1. De la molécule odorante à la perception olfactive : organisation et plasticité du système olfactif	6
1.1. L'entrée sensorielle	6
1.1.1. Organisation de l'épithélium olfactif	6
1.1.2. Diversité et sélectivité des récepteurs moléculaires aux odeurs	7
1.1.3. Transduction et transfert de l'information olfactive vers le bulbe olfactif.....	8
1.1.4. Plasticité de l'entrée sensorielle	8
1.2. Le bulbe olfactif : premier relai cortical de l'information olfactive	9
1.2.1. Transmission de l'information sensorielle aux cellules relais du bulbe olfactif.....	10
1.2.2. Modulation du message olfactif par les interneurons bulbaires	10
1.2.3. Plasticité du traitement bulbaire	12
1.2.4. La neurogenèse adulte, une forme de plasticité supplémentaire dans le bulbe olfactif.....	13
1.2.5. Le bulbe olfactif est la cible de nombreuses afférences neuromodulatrices.....	20
1.3. Traitement de l'information olfactive par un vaste réseau cortical	23
1.3.1. Projections primaires du bulbe olfactif.....	23
1.3.2. Communication avec les aires olfactives secondaires	28
2. Les déficits olfactifs : un marqueur du vieillissement ?	30
2.1. Déficits olfactifs liés au vieillissement chez l'humain.....	30
2.1.1. Altération de tous les aspects de la perception olfactive	30
2.1.2. Conséquences des déficits olfactifs sur la qualité de vie et la santé	32
2.1.3. Causes possibles des pertes olfactives liées au vieillissement	33
2.2. Le rongeur : un modèle d'étude du vieillissement olfactif permettant l'accès aux bases cellulaires.....	35
2.2.1. Le rongeur âgé présente des déficits fonctionnels olfactifs similaires à l'humain. 36	
2.2.2. Altérations structurales pouvant sous-tendre les déficits olfactifs au cours du vieillissement	38
2.3. Association entre les déficits olfactifs et les altérations cognitives observées au cours du vieillissement	42
2.3.1. Troubles de mémoire	43
2.3.2. Troubles de flexibilité cognitive	45
2.3.3. Vieillesse olfactif, indicateur de l'intégrité du cerveau vieillissant ?	46
3. La stimulation olfactive comme outil de remédiation face au vieillissement.....	48
3.1. Efficacité partielle des solutions classiques de traitement des déficits olfactifs.....	48
3.2. Bénéfices de l'entraînement olfactif sur les performances olfactives	48
3.3. Booster la réserve cognitive avec une stimulation olfactive	51
3.3.1. Le concept de réserve cognitive	51
3.3.2. Les bases neurales de la réserve cognitive sont encore largement méconnues ..	52
3.3.3. La noradrénaline : support de la construction de la réserve cognitive ?.....	56
3.3.4. Les stimulations odorantes ont des bénéfices en dehors de la sphère olfactive ..	62

OBJECTIFS ET HYPOTHESES DE TRAVAIL.....	65
RESULTATS	68
Etude 1.....	69
Etude 2.....	102
DISCUSSION	170
1. Effets du vieillissement sur les performances olfactives et cognitives, et mécanismes sous-jacents.....	172
1.1. Dégradation progressive des performances olfactives et cognitives au cours du vieillissement.....	172
1.2. Bases cellulaires du vieillissement olfactif.....	173
1.2.1. Maintien de l'intégration des nouveaux neurones dans le BO vieillissant	174
1.2.2. Altération de la plasticité structurale des nouveaux neurones bulbaires au cours du vieillissement.....	175
2. L'enrichissement olfactif : une stratégie efficace pour lutter contre le vieillissement olfactif et cognitif.....	177
2.1. Hétérogénéité de la population âgée	177
2.2. L'enrichissement olfactif est efficace chez les souris âgées lorsqu'il est répété tout au long de la vie.....	177
2.3. Bases cellulaires des bienfaits de l'enrichissement olfactif à long terme.....	179
2.3.1. Réserve cérébrale.....	179
2.3.2. Plasticité des réseaux neuronaux : maintenance cérébrale et compensation	180
2.3.3. Théorie noradrénergique de la réserve cognitive.....	181
2.3.4. Est-ce qu'un enrichissement dans une autre modalité pourrait avoir les mêmes bénéfices qu'un enrichissement olfactif ?	183
3. Conclusion générale et perspectives	185
REFERENCES	186
TABLE DES ILLUSTRATIONS.....	221

RESUME

Le vieillissement normal s'accompagne de déficits cognitifs et sensoriels, notamment olfactifs qui affectent la qualité de vie et la santé des individus âgés. Cependant, le vieillissement normal (indépendamment de toute pathologie dégénérative) reste peu étudié et les changements de la structure et du fonctionnement cérébraux qui sous-tendent ces déficits sont encore largement méconnus. Ce manque de connaissances limite la prise en charge des sujets âgés ainsi que le développement de stratégies de remédiation pour lutter contre le vieillissement olfactif et cognitif.

Les objectifs de cette thèse étaient premièrement d'avancer dans la compréhension du vieillissement olfactif et des mécanismes neuronaux qui sous-tendent ces déficits chez la souris, puis dans un second temps, d'améliorer le fonctionnement du cerveau vieillissant.

Dans une première étude, nous avons utilisé le modèle de l'apprentissage perceptif olfactif pour identifier des mécanismes cellulaires sous-tendant le vieillissement olfactif en conditions basales et dans des conditions sollicitant la plasticité. Cet apprentissage permet l'amélioration de la discrimination de deux odorants proches d'un point de vue perceptif, après une exposition répétée à ceux-ci. Chez le rongeur, il nécessite l'apport de nouveaux neurones dans le bulbe olfactif adulte. Nous avons étudié finement la cinétique d'apparition des déficits d'apprentissage perceptif olfactif au cours de la vie de la souris (de 2 à 18 mois) et révélé que la rétention à long terme de l'apprentissage perceptif olfactif est altérée dès l'âge de 12 mois, avant la perte totale des capacités d'apprentissage à 18 mois. Ces déficits de rétention sont associés à une altération de la plasticité structurale des nouveaux neurones granulaires du bulbe olfactif.

Dans une deuxième étude, nous avons développé une stratégie de remédiation du vieillissement olfactif et cognitif, basée sur une stimulation olfactive avec une nouvelle odeur chaque jour (enrichissement). Des sessions d'enrichissement olfactif ont été répétées tout au long de la vie de l'animal afin de permettre la constitution d'une réserve cognitive. Ce concept est associé chez l'humain à un niveau de stimulation cognitive élevé et à une résistance face aux effets délétères du vieillissement sur les performances cognitives et pourrait constituer une stratégie efficace pour promouvoir le bien-vieillir. Les souris soumises à un tel enrichissement olfactif présentent de meilleures performances de discrimination olfactive à un âge avancé, ainsi que de mémoire spatiale et de flexibilité cognitive, indiquant que les bénéfices d'un enrichissement olfactif tout au long de la vie s'étendent au-delà de la sphère olfactive et incluent des bénéfices cognitifs plus larges. Au niveau cellulaire, nous n'avons pas observé de modifications de la neurogenèse adulte bulbaire, un mécanisme connu pour sous-tendre l'apprentissage et la mémoire olfactifs dans le bulbe olfactif jeune adulte. En revanche, nous révélons une augmentation de l'innervation noradrénergique qui corrèle avec les performances comportementales. Enfin, nous mettons en évidence des remaniements des réseaux cérébraux mis en jeu par les tâches comportementales, qui pourraient sous-tendre l'amélioration des performances cognitives chez les souris âgées soumises à l'enrichissement olfactif tout au long de la vie.

Dans l'ensemble, nos données contribuent à approfondir notre connaissance des altérations des mécanismes de plasticité cérébrale liées au vieillissement et leur implication dans les déficits d'apprentissage et de mémoire. De plus, ce travail propose l'enrichissement olfactif répété tout au long de la vie comme une stratégie efficace de lutte

contre le vieillissement non seulement olfactif, mais cognitif en général, induisant des remaniements structuraux et fonctionnels dans le cerveau des souris âgées.

ABSTRACT

Normal aging is accompanied by cognitive and sensory deficits, including olfactory deficits, which affect the quality of life and health of elderly subjects. However, normal aging (independently of any degenerative pathology) is poorly explored and the cellular mechanisms underlying these deficits remain largely unknown. This lack of knowledge limits the care of elderly subjects as well as the development of remediation strategies to counteract olfactory and cognitive aging.

The objectives of this thesis were first to improve the understanding of olfactory aging and the neural mechanisms underlying these deficits in mice, and second to improve the functioning of the aging brain.

In a first study, we used the olfactory perceptual learning model to identify the cellular mechanisms underlying olfactory aging under basal and plasticity-requiring conditions. This learning improves discrimination between two perceptually similar odorants following repeated exposure to these odorants. In rodents, it requires the contribution of adult-born neurons in the olfactory bulb. We finely studied the kinetics of the appearance of olfactory perceptual learning deficits over the mouse lifespan (from 2 to 18 months) and revealed that the long-term retention of olfactory perceptual learning is impaired as early as 12 months of age, before the total loss of learning abilities at 18 months. These learning retention deficits are associated with an alteration of the structural plasticity of adult-born granule cells in the olfactory bulb.

In a second study, we developed a remediation strategy to improve olfactory and cognitive aging, based on olfactory stimulation with a new odor every day (enrichment). These olfactory enrichment sessions were repeated throughout the life of the animal to allow the constitution of a cognitive reserve. This concept is associated in humans with a high level of cognitive stimulation and resistance to the deleterious effects of aging on cognitive performances and could be an effective strategy to promote better aging. Mice subjected to such olfactory enrichment displayed improved olfactory discrimination performance at late ages, as well as spatial memory and cognitive flexibility, indicating that the benefits of lifelong olfactory enrichment extend beyond the olfactory sphere and include broader cognitive benefits. At the cellular level, we did not observe any changes in adult neurogenesis in the olfactory bulb, a mechanism known to underlie olfactory learning and memory in the young adult. However, we revealed an increase in noradrenergic innervation that correlates with behavioral performances. Finally, we identified remodeling of brain networks implicated in behavioral tasks, which may underlie the improvement of cognitive performances in aged mice subjected to long-run olfactory enrichment.

Overall, our data contribute to deepen our understanding of age-related alterations in brain plasticity mechanisms and their implication in learning and memory deficits. Moreover, this work proposes repeated olfactory enrichment throughout life as an effective strategy to promote better aging by improving not only olfactory, but also cognitive aging in general, inducing structural and functional remodeling in the brains of aged mice.

LISTE DES ABREVIATIONS

AMPA : α -amino-3-hydroxy-5-méthylisoxazol-4-propionate
BO : Bulbe Olfactif
BrdU : Bromo-déoxyUridine
CA : Corne d'Ammon
CG : Cellule Granulaire
COF : cortex orbitofrontal
DBH : Dopamine- β -Hydroxylase
Dpi : jours après l'infection rétrovirale (days post-injection)
EE : Environnement Enrichi
EEG : EléctroEncéphaloGraphie
EO : Épithélium Olfactif
ETOC : test de capacités olfactives Européen (European Test of Olfactory Capabilities)
GABA : acide γ -aminobutyrique
IRM(f) : Imagerie par Résonance Magnétique (fonctionnelle)
LC : *Locus Coeruleus*
LTD : dépression à long terme (Long Term Depression)
LTP : potentialisation à long terme (Long Term Potentiation)
NA : NorAdrénaline
NET : transporteur présynaptique de la noradrénaline (NorEpinephrine Transporter)
NMDA : N-méthyl-D-aspartate
NSO : Neurone Sensoriel Olfactif
PG : cellule PériGlomérulaire
RC : Réserve Cognitive
TEP : Tomographie par Emission de Positons
UPSIT : test d'identification olfactive de l'Université de Pennsylvanie (University of Pennsylvania Smell Identification Test)

INTRODUCTION

La population mondiale vieillit à un rythme sans précédent. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, le nombre de sujets âgés de plus de 60 ans devrait doubler et dépasser les 20% de la population d'ici 2050. Bien que l'augmentation de l'espérance de vie soit un signe de progrès pour les sociétés, le vieillissement, phénomène biologique complexe et inévitable, s'accompagne de détériorations de la qualité de vie et de la santé des personnes âgées. Malgré les enjeux majeurs de santé publique, économique et humain qu'il représente, le vieillissement normal est peu étudié comparativement au vieillissement pathologique.

Des changements cognitifs sont observés chez les sujets âgés sains (Toepper, 2017) et plus particulièrement des déficits des fonctions exécutives ainsi que des déficits de mémoire. En plus de ces déficits cognitifs, des troubles majeurs de la perception apparaissent dans les modalités auditive, visuelle et olfactive en particulier (Barsz et al., 2002; Desai et al., 2001; Doty and Kamath, 2014). Dans cette thèse, ce sont aux déficits olfactifs que nous allons plus particulièrement nous intéresser. En effet, ces derniers ne sont pas anecdotiques mais majeurs en termes de prévalence, de sévérité et de conséquences (Croy et al., 2014; Doty and Kamath, 2014). Plusieurs pathologies, dont la rhinosinusite chronique, l'infection virale, le traumatisme crânien et la prise de médicaments toxiques, sont associées au développement d'un dysfonctionnement olfactif (Doty, 2019; Hummel et al., 2017; Nordin and Brämerson, 2008). Avec ces pathologies, l'âge est le facteur le plus important associé aux dysfonctions olfactives (Attems et al., 2015; Doty and Kamath, 2014; Kondo et al., 2020; Mobley et al., 2014). En effet, alors que seuls 3 à 6% de la population globale présentent une dysosmie (i.e. des troubles de l'odorat), la prévalence augmente à plus de 50% des sujets entre 65 et 80 ans et dépasse 75% chez les plus de 80 ans (Doty and Kamath, 2014; Lafreniere and Mann, 2009).

Bien que les altérations fonctionnelles olfactives soient largement décrites chez l'humain, les bases neurales qui sous-tendent ces altérations restent peu connues, ce qui limite la prise en charge du vieillissement sensoriel et cognitif ainsi que le développement de moyens de lutte. De plus, comprendre les mécanismes neuronaux sous-jacents aux vieillissements sensoriel et cognitif normaux permettrait d'appréhender le versant pathologique qui s'opère souvent dans les mêmes régions cérébrales que celles qui sont susceptibles au vieillissement normal (Jagust, 2013). Par exemple, des difficultés à ne pas reconnaître des odeurs familières pourraient être un signe avant-coureur de dégénérescence cérébrale. La dysosmie pourrait alors être utilisée comme un marqueur précoce probable de certaines pathologies neurodégénératives telles qu'Alzheimer ou Parkinson (Bowman, 2017).

Dans cette introduction, nous commencerons par rappeler l'organisation anatomo-fonctionnelle du système olfactif. Nous détaillerons ensuite les déficits olfactifs observés au cours du vieillissement chez l'humain et chez le rongeur ainsi que ce que l'on sait des bases neurales sous-jacentes et de leur lien avec le vieillissement cognitif. Nous terminerons en montrant comment l'entraînement olfactif se révèle être une stratégie de remédiation intéressante pour lutter contre le vieillissement olfactif mais également cognitif.

1. De la molécule odorante à la perception olfactive : organisation et plasticité du système olfactif

Chez l'humain, l'olfaction est souvent considérée comme le moins aigu des sens. Pourtant, cette assumption reste débattue (Meister, 2015) et le nez humain serait capable de distinguer plus de mille milliards d'odorants différents (Bushdid et al., 2014), dépassant de loin les autres sens (discrimination de deux à huit millions de couleurs (Nickerson and Newhall, 1943; Pointer and Attridge, 1998) et moins de cinq cent mille tonalités (Stevens and Davis, 1938)). S'il est entraîné, un humain peut même utiliser ses capacités olfactives pour flairer et suivre une trace odorante sur de longues distances (Porter et al., 2007).

L'odeur résulte de la mise en jeu de mécanismes neuronaux par de petites molécules organiques volatiles, principalement liposolubles, dont le poids moléculaire est compris entre 26 et 300 Da (Mori and Yoshihara, 1995). Le système olfactif permet leur détection, leur identification, leur discrimination, ainsi que leur mise en mémoire. Il comprend trois niveaux d'organisation biologique : l'épithélium olfactif (étage périphérique permettant l'entrée sensorielle), le bulbe olfactif (premier relai cortical de traitement de l'information olfactive) et les structures corticales olfactives supérieures.

1.1. L'entrée sensorielle

1.1.1. Organisation de l'épithélium olfactif

La transduction du stimulus olfactif a lieu dans l'épithélium olfactif (EO) qui tapisse la partie postéro-dorsale de la cavité nasale. Cette dernière a une forme repliée ce qui lui permet d'augmenter considérablement sa surface. Le reste de la cavité nasale est tapissé par un épithélium respiratoire ayant pour fonction d'humidifier l'air inspiré et de servir de barrière immunitaire qui protège la cavité nasale de l'irritation et de l'infection (Purves et al., 2019). L'EO repose sur une couche de tissu conjonctif appelée la *lamina propria*. Directement au contact du milieu extérieur, il est protégé par un mucus aqueux sécrété par les glandes de Bowman situées dans la *lamina propria*.

L'EO est un épithélium pseudostratifié constitué de trois types de cellules : les cellules de soutien qui permettent la cohésion de l'EO, les neurones sensoriels olfactifs (NSO) qui réceptionnent et transmettent l'information olfactive et les cellules basales qui sont des cellules souches permettant le renouvellement des NSO (Figure 1). Les NSO, estimés à 12 millions chez l'humain et 20 millions chez la souris (Breer, 2003; Moran et al., 1982), ont la particularité d'être les seuls neurones en contact avec l'extérieur. De ce fait, ils ont une durée de vie très limitée, d'un à trois mois, selon l'espèce et en fonction des agressions extérieures (Graziadei et al., 1978; Mackay-Sim and Kittel, 1991). Pour pallier cette vulnérabilité, les NSO sont remplacés tout au long de la vie : parmi les cellules basales de l'EO, une population de cellules souches neurales, les cellules horizontales, se divise pour donner naissance à de nouveaux NSO. Les cellules horizontales, se multiplient et donnent naissance aux cellules globulaires, qui à leur tour produiront des NSO immatures (Schwob et al., 2017). Chez le rongeur, il faut 6 à 8 semaines pour renouveler l'ensemble des NSO (Graziadei et al., 1978; Mackay-Sim and Kittel, 1991). La durée de cette régénération complète n'est pas connue chez l'humain. Les NSO matures sont des

neurones bipolaires qui assurent la transduction des informations olfactives et leur acheminement vers le bulbe olfactif. A leur pôle apical, ils émettent un prolongement dendritique unique, porteur de nombreux cils olfactifs inclus dans le mucus. Ces cils sont riches en récepteurs moléculaires aux odeurs. A leur pôle basal, les NSO émettent un axone non myélinisé qui se projette sur le bulbe olfactif (BO).

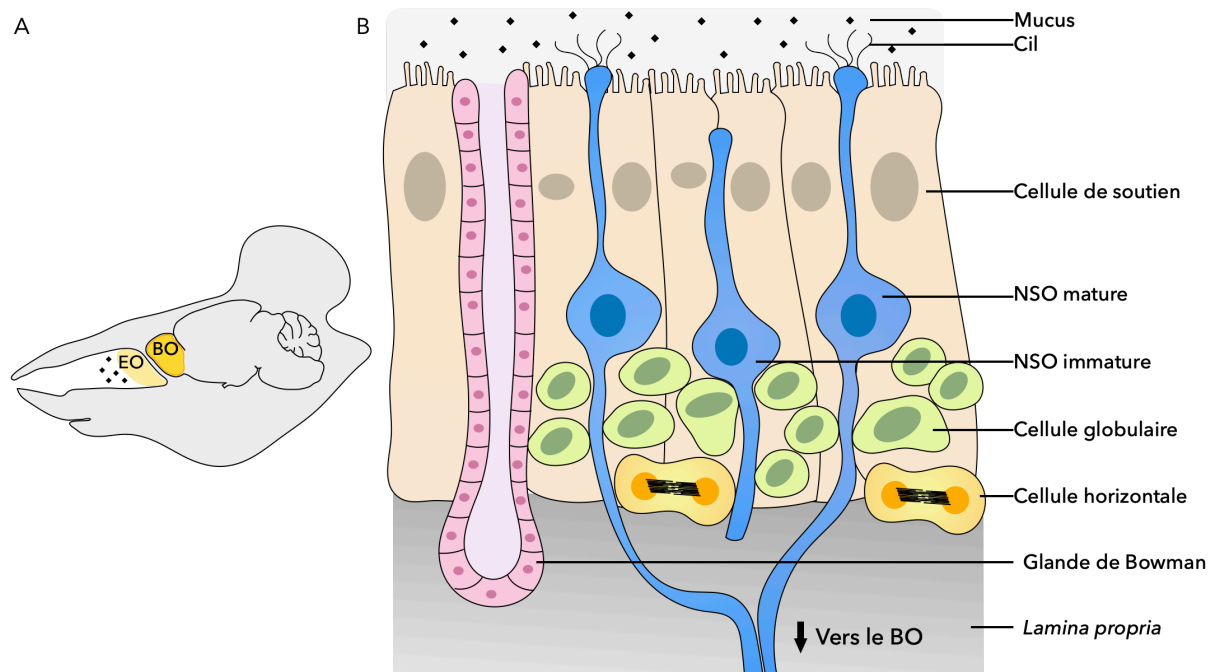


Figure 1. Organisation de l'épithélium olfactif.

(A) Coupe sagittale d'une tête de rongeur permettant de localiser l'épithélium olfactif (EO) et le bulbe olfactif (BO). (B) Représentation schématique de l'épithélium de rongeur en coupe transversale. Les molécules odorantes (losanges) arrivent au niveau de l'épithélium olfactif via le flux d'air entrant dans la cavité nasale. A ce niveau, elles interagissent avec les récepteurs olfactifs des neurones sensoriels olfactifs qui projettent vers le bulbe olfactif. D'après Purves et al., 2019; Schwob et al., 2017.

1.1.2. Diversité et sélectivité des récepteurs moléculaires aux odeurs

La capacité du système olfactif à détecter et à distinguer un large spectre de molécules odorantes avec une très bonne sensibilité repose en partie sur la grande diversité de récepteurs olfactifs (ou récepteurs moléculaires aux odeurs). Leur identification, réalisée par Buck and Axel (1991) (prix Nobel en 2004), a permis une grande avancée sur la compréhension du codage des informations olfactives. Ces récepteurs sont des protéines avec 7 domaines transmembranaires, couplées aux protéines G. Chez les mammifères, les gènes des récepteurs olfactifs sont en nombre important puisqu'ils constituent entre 3 et 5% du génome et codent pour un nombre de protéines fonctionnelles aux alentours de 400 chez l'humain et 1 200 chez la souris. Parmi ce large répertoire, chaque NSO n'exprime qu'un seul des gènes des récepteurs olfactifs (Mombaerts et al., 1996).

L'espace perceptif des odeurs chez les vertébrés est défini par un code combinatoire résultant du fait qu'un récepteur moléculaire aux odeurs puisse reconnaître plusieurs odorants et qu'un odorant puisse être reconnu par plusieurs récepteurs, en fonction des traits moléculaires qui le composent (Bushdid et al., 2014; Duchamp-Viret et al., 1999; Malnic et al., 1999; Meister, 2015). Identifier le répertoire complet des récepteurs

olfactifs activés par un odorant donné est un enjeu important de recherche en olfaction puisque cela représenterait une étape importante dans la compréhension des capacités d'identification et de discrimination olfactive. Cette identification est toujours en cours (Jiang et al., 2015; von der Weid et al., 2015).

1.1.3. Transduction et transfert de l'information olfactive vers le bulbe olfactif

La transduction commence lorsque les molécules odorantes se fixent aux récepteurs olfactifs situés au niveau des cils des NSO. L'interaction de la molécule odorante et du récepteur olfactif conduit à l'activation d'une protéine G spécifique de l'olfaction appelée G_{olf} activant ensuite une adénylyl cyclase propre à l'olfaction, l'adénylyl cyclase III qui va produire de l'AMP cyclique (Chan et al., 2011; Kleene, 2008). L'AMP cyclique se fixe sur un canal sensible aux nucléotides cycliques (appelé CNG pour Cyclic nucleotide-gated channel), ce qui entraîne un flux entrant de sodium et de calcium, dépolarisant le neurone (Imai and Sakano, 2008). L'augmentation du calcium provoque l'ouverture d'un canal chlore contrôlé par le calcium, ce qui contribue à dépolariser encore plus le neurone et forme le potentiel de récepteur. Si la sommation des différents courants dépolarisants dépasse le seuil d'excitation du NSO, un train de potentiel d'action sera généré et propagé le long de l'axone pour atteindre le BO.

1.1.4. Plasticité de l'entrée sensorielle

L'épithélium olfactif n'est pas seulement le lieu de la transduction du stimulus olfactif. La survie et la sensibilité des NSO varie en fonction des conditions environnementales et des apprentissages, ce qui contribue à l'adaptation du comportement olfactif pour la détection des odorants par les NSO (Bryche et al., 2021).

L'expression d'un certain type de récepteur par un NSO détermine l'identité fonctionnelle du NSO et l'abondance de chaque sous-type de NSO est régulée par l'expérience olfactive. Par exemple, l'association d'un choc à la patte avec un odorant entraîne une augmentation du nombre de NSO qui expriment des récepteurs olfactifs sensibles à cet odorant (Jones et al., 2008; Morrison et al., 2015). L'extinction de ce conditionnement de peur inverse cette augmentation du nombre de NSO (Morrison et al., 2015). De la même façon, une autre étude ayant quantifié les taux d'ARNm des récepteurs olfactifs par RNAseq comme indicateur de la diversité des sous-types de NSO a montré que les souris vivant dans des environnements chimiques stables maintiennent des taux de NSO stables. Cependant, l'exposition à certains odorants augmente le nombre de NSO exprimant certains sous-types de récepteurs olfactifs. Cette augmentation est réversible puisque l'arrêt de la stimulation olfactive entraîne une diminution de ces NSO (Ibarra-Soria et al., 2017). Probablement en lien avec la plasticité de l'expression des récepteurs, des souris anosmiques exposées de manière répétée à un odorant voient augmenter la réponse électrique globale dans l'épithélium olfactif comparées aux contrôles (Wang et al., 1993).

Enfin, certains apprentissages tels qu'un conditionnement de peur à l'odeur (Kass et al., 2013) et un entraînement olfactif dans une tâche de go/no-go (Abraham et al., 2014) induisent également une plasticité fonctionnelle des NSO. En effet, la mesure de l'activité des terminaisons synaptiques des NSO par imagerie optique a révélé que la réponse des

NSO à l'odeur apprise était augmentée après apprentissage (Abraham et al., 2014; Kass et al., 2013).

1.2. Le bulbe olfactif : premier relai cortical de l'information olfactive

Le système olfactif occupe une place à part parmi les systèmes sensoriels. En effet, il n'y a pas de relais thalamique entre l'étage récepteur et les régions corticales traitant les informations sensorielles (Purves et al., 2019). Les axones des neurones olfactifs rassemblés dans le nerf olfactif projettent directement et de manière ipsilatérale sur le BO.

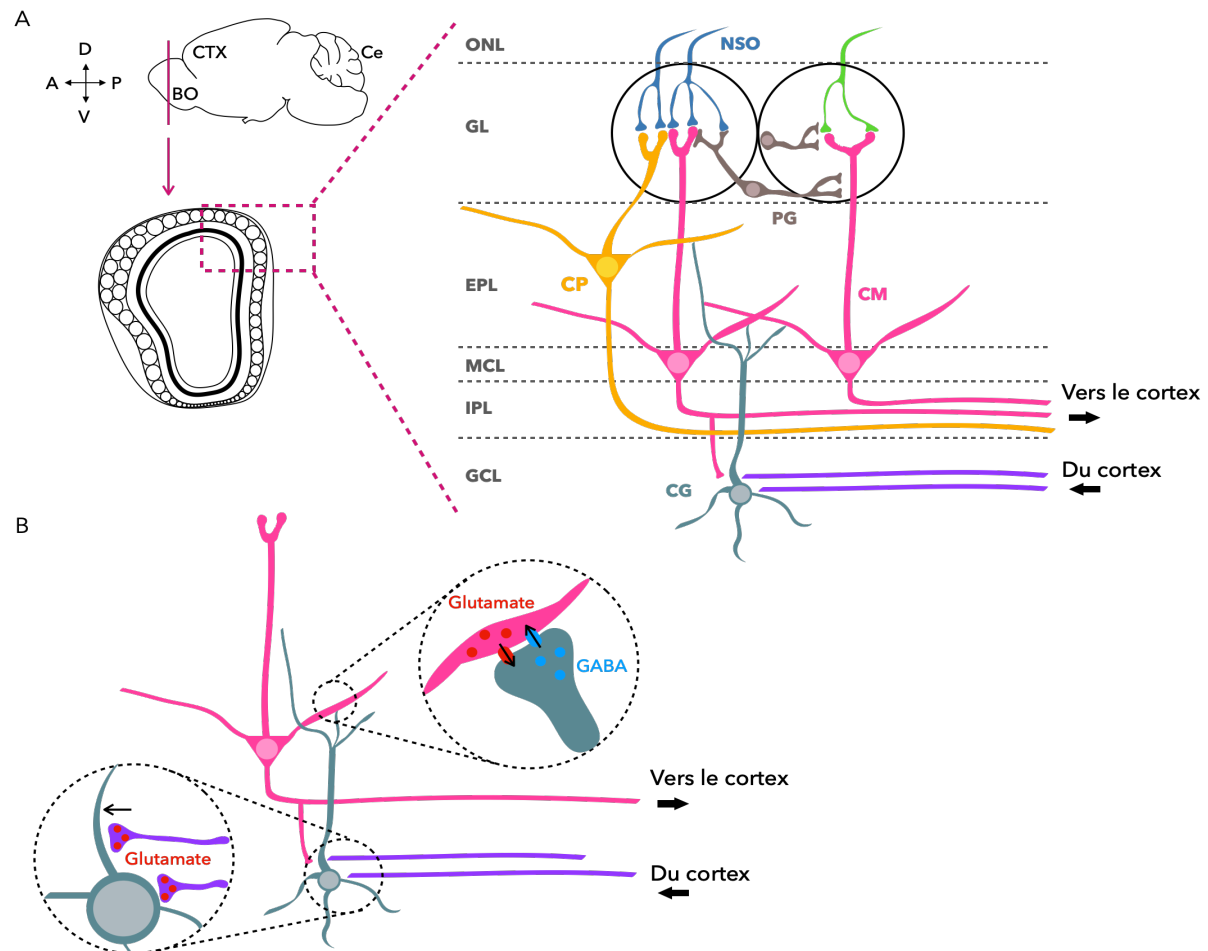


Figure 2. Organisation du réseau neuronal du bulbe olfactif.

(A) Représentation schématique des six couches formant le BO en coupe transversale. Les axones des neurones sensoriels olfactifs forment des contacts glutamatergiques excitateurs avec les dendrites apicales des cellules mitrales et à panache au sein d'un glomérule, ainsi qu'avec les dendrites des cellules périglomérulaires. Les cellules périglomérulaires modulent l'information à l'entrée du BO, tandis que les cellules granulaires modulent la sortie de l'information en établissant des contacts dendro-dendritiques réciproques avec les dendrites latérales des cellules mitrales. (B) Détail des connexions synaptiques établies sur et par les cellules granulaires. Les synapses dendro-dendritiques consistent en une synapse d'entrée glutamatergique des cellules mitrales sur les CG et une synapse de sortie GABAergique de la CG sur la même cellule mitrale, au niveau de la même épine dendritique. Les CG reçoivent également des contacts glutamatergiques en provenance de diverses structures corticales. ONL : couche des nerfs olfactifs, GL : couche glomérulaire, EPL : couche plexiforme externe, MCL : couche des cellules mitrales (CM), IPL : couche plexiforme interne, GCL : couche des cellules granulaires (CG). Adapté de Kelsch et al., 2010.

Le BO, situé dans la partie antérieure du cerveau est une structure d'origine télencéphalique. Il repose sur la lame criblée de l'éthmoïde qui le sépare de la cavité nasale et donc de l'EO. C'est un paléocortex constitué de 6 couches (Figure 2), au sein duquel des neurones de projection (cellules mitrales et à panache) reçoivent l'information en provenance de l'EO et la transmettent ensuite aux structures olfactives dites supérieures. L'activité de ces neurones de projection est modulée par différentes populations d'interneurones au sein du BO.

1.2.1. Transmission de l'information sensorielle aux cellules relais du bulbe olfactif

Le BO reçoit les informations olfactives des axones des NSO qui, après avoir traversé la lame criblée de l'éthmoïde, se rassemblent dans la couche des nerfs et se terminent dans la couche glomérulaire. Les glomérules sont des structures sphériques de 100 à 200 µm de diamètre dans lesquels se constitue le premier contact synaptique de la voie olfactive, formé par les afférences sensorielles des NSO avec les cellules relais du BO, les cellules mitrales et les cellules à panache (« tufted cells »). Les informations olfactives détectées par les NSO sont donc d'abord traitées dans les glomérules. Les NSO exprimant un type donné de récepteur olfactif projettent leur axone vers un nombre limité de glomérules (2-3), l'un en position médiane et l'autre en position latérale (Imai, 2014; Mombaerts et al., 1996). Chaque glomérule reçoit des milliers d'axones mais tous en provenance d'un seul type de NSO défini par le récepteur moléculaire aux odorants exprimé, on parle de convergence homotypique. Ainsi, l'information arrivant dans un glomérule donné provient d'un type spécifique de récepteur moléculaire aux odorants (Klenoff and Greer, 1998). Le fort degré de convergence permettrait d'améliorer considérablement la sensibilité en augmentant le ratio signal sur bruit (Cleland et al., 2007).

Les cellules mitrales et les cellules à panache étendent leur unique dendrite apicale dans un seul et unique glomérule (Figure 2) où elles reçoivent des contacts synaptiques excitateurs glutamatergiques des axones olfactifs. En raison de ce schéma de connexions synaptiques et de la convergence homotypique, un glomérule et les cellules mitrales et granulaires qui lui sont associées définissent une unité fonctionnelle nommée "colonne d'activité", de manière analogue aux colonnes de dominance et d'orientation oculaires du cortex visuel (Shepherd, 2004). Chaque colonne d'odeurs traite l'information sensorielle portée par un récepteur olfactif donné. Il y a donc une représentation topographique de l'identité de l'odeur au sein du BO, on parle de chimiotopie. Cette organisation chimiotopique est prédictive de la discrimination des odorants. En effet, quand les cartes chimiotopiques de deux odorants se ressemblent beaucoup, les odorants ne sont pas distingués (Linster et al., 2001).

Les axones des cellules mitrales et à panache se rassemblent en un faisceau appelé le tractus olfactif latéral. Ces axones présentent de nombreuses collatérales, si bien qu'une seule cellule va transmettre l'information olfactive à de nombreuses structures corticales olfactives (Nagayama et al., 2010).

1.2.2. Modulation du message olfactif par les interneurones bulbaires

Le BO n'a pas comme unique rôle de relayer l'information olfactive aux centres supérieurs : c'est une structure clé du codage, en participant notamment à la discrimination

et à la mémorisation olfactives. En effet, à ce premier niveau de traitement de l'information olfactive, des interneurons inhibiteurs locaux (cellules périglomérulaires et cellules granulaires) modulent l'activité des cellules mitrales et à panache (Shepherd et al., 2007). Contrairement aux autres régions cérébrales, dans lesquelles une faible population d'interneurons inhibiteurs module l'activité d'un nombre conséquent de neurones de projection, dans le BO, les interneurons GABAergiques sont environ 100 fois plus nombreux que les cellules excitatrices mitrales et à panache (Parrish-Aungst et al., 2007; Sosulski et al., 2011). Cela suggère que le BO raffine le message olfactif avant de le transmettre aux structures corticales olfactives supérieures.

1.2.2.1. Les cellules périglomérulaires modulent le message à l'entrée du bulbe olfactif

La transmission de l'information au sein du BO est modulée dès l'entrée par les cellules périglomérulaires (PG) qui assurent l'inhibition locale au sein des glomérules (Figure 2). Les PG constituent une population hétérogène puisqu'il existe différentes catégories de PG qui se distinguent selon leur morphologie (présence ou absence d'axone), leur localisation dans la couche glomérulaire, ainsi que selon leur profil neurochimique (Kosaka and Kosaka, 2011; Nagayama et al., 2014; Parrish-Aungst et al., 2007). Certaines PG peuvent co-exprimer en plus du GABA, de la dopamine, de la calrétinine, de la neurocalcine, de la calbindine ou de la parvalbumine. Les PG peuvent également être classées en fonction de leur connectivité synaptique (Nagayama et al., 2014). Les PG de type I établissent des contacts synaptiques réciproques dendro-axoniques avec les terminaisons des NSO : les NSO activent par libération de glutamate les PG qui les inhibent en retour (Ennis et al., 2001). Ces PG établissent également des synapses dendro-dendritiques réciproques avec la dendrite apicale des cellules mitrales et à panache. Les PG de type II quant à elles, ne reçoivent pas d'entrée directe des NSO (Nagayama et al., 2014). Les projections des axones et dendrites de certaines PG peuvent également s'étendre latéralement sur plusieurs glomérules, modulant ainsi l'activité de plusieurs colonnes d'activité bulbaires (Aungst et al., 2003; Cleland and Sethupathy, 2006; Nagayama et al., 2014). Du fait de ces différences, les sous-populations de PG ont vraisemblablement des rôles différents dans la modulation du message d'entrée de l'information olfactive, mais le rôle exact de chacune d'entre elles n'est pas encore bien connu (Linster and Cleland, 2009).

1.2.2.2. Les cellules granulaires modulent le message en sortie du bulbe olfactif

Les cellules granulaires (CG) sont situées dans la couche granulaire, la couche la plus profonde du BO (Figure 2). Ce sont des interneurons dépourvus d'axones, présentant plusieurs dendrites basales et une unique dendrite apicale qui se ramifie dans la couche plexiforme externe et établit des contacts dendro-dendritiques réciproques avec les dendrites latérales des cellules relais. Les CG sont dépolarisées par le glutamate libéré par les cellules mitrales. En retour, elles inhibent les cellules mitrales par libération de GABA, formant ainsi une boucle d'interaction réciproque (Shepherd et al., 2007). Une CG établit des synapses avec les dendrites de plusieurs cellules mitrales et à panache, ce qui forme des circuits locaux d'inhibition latérale (Burton, 2017; Mori and Yoshihara, 1995; Shepherd

et al., 2007). Ainsi, les CG contribuent à l'activité du réseau bulbaire en régulant de manière spatiale et temporelle l'activité des cellules mitrales, notamment leur synchronisation, et en facilitant les oscillations du réseau (Bathellier et al., 2006; Lagier et al., 2007; Lazarini and Lledo, 2011). Cette inhibition des CG sur les cellules mitrales joue un rôle central dans le traitement des odeurs puisqu'elle est essentielle à la discrimination des odeurs et à l'apprentissage perceptif. En réponse à des motifs d'activation d'entrée glomérulaire très similaires, l'inhibition par les CG permet la mise en place de patrons d'activation des cellules relais qui sont distincts et spécifiques pour chaque odorant, et ainsi un processus de ségrégation de pattern (Abraham et al., 2010; Cleland and Linster, 2005; Mandairon et al., 2008).

Dans la couche granulaire, les CG reçoivent des contacts synaptiques supplémentaires au niveau de leur corps cellulaire et de leurs dendrites basales. Ces synapses axo-dendritiques proviennent des collatérales d'axones des cellules mitrales et à panache (contacts glutamatergiques), ainsi que de fibres centrifuges provenant de diverses régions cérébrales, telles que le cortex piriforme (contacts glutamatergiques) et des systèmes neuromodulateurs (noradrénergique, cholinergique et sérotoninergique) ce qui permet de moduler l'activité des CG (Fletcher and Chen, 2010; Linster and Escanilla, 2019).

Les CG du BO font partie, avec les PG, des rares catégories de neurones à être remplacés tout au long de la vie. Ce renouvellement constitue une forme de plasticité supplémentaire dans le BO et engendre des modifications de traitement de l'information olfactive.

1.2.3. Plasticité du traitement bulbaire

L'activité du BO en réponse à l'odeur évolue en fonction de l'expérience de l'individu.

L'exposition répétée à un odorant, qui constitue un apprentissage perceptif implicite, modifie le réseau bulbaire et entraîne la diminution du nombre de cellules mitrales répondant à cet odorant, ce qui suggère une augmentation de l'inhibition exercée sur les cellules mitrales (Buonviso and Chaput, 1999). Plus récemment, il a été montré que l'apprentissage perceptif olfactif, au cours duquel l'animal apprend à discriminer deux odorants perceptivement similaires après exposition répétée à ces deux odorants, améliore la séparation des patrons d'activation de l'ensemble des cellules mitrales qui répondent aux odeurs apprises (Chu et al., 2016). Avant l'apprentissage, les patrons d'activation des cellules mitrales en réponse aux deux odorants se confondent. L'apprentissage perceptif conduit à une séparation de ces patrons d'activation, ce qui affine la représentation des odeurs apprises dans le BO et permet leur discrimination (Chu et al., 2016). Cette séparation pourrait être permise par une augmentation de l'inhibition exercée par les cellules granulaires sur les cellules mitrales. En effet, au cours de l'apprentissage perceptif olfactif, l'activité des CG est augmentée renforçant l'inhibition des cellules mitrales (Mandairon et al., 2018; Moreno et al., 2009). La réponse du BO est également modulée par d'autres formes d'apprentissage. En effet, à la suite d'un apprentissage associatif olfactif au cours duquel l'animal apprend à associer une odeur à une récompense, la mesure du potentiel de champ local révèle une modification de la synchronisation des cellules mitrales avec une diminution de la puissance des oscillations γ et une augmentation de la puissance des oscillations β dans le BO (Martin et al., 2004).

1.2.4. La neurogenèse adulte, une forme de plasticité supplémentaire dans le bulbe olfactif

Au sein du système nerveux central des rongeurs, deux foyers neurogéniques principaux qui fournissent des neurones tout au long de la vie ont été identifiés : la zone sous-granulaire du gyrus denté de l'hippocampe et la zone sous-ventriculaire qui borde la paroi des ventricules latéraux (Ming and Song, 2011) qui fournit des nouveaux neurones au BO (Figure 3).

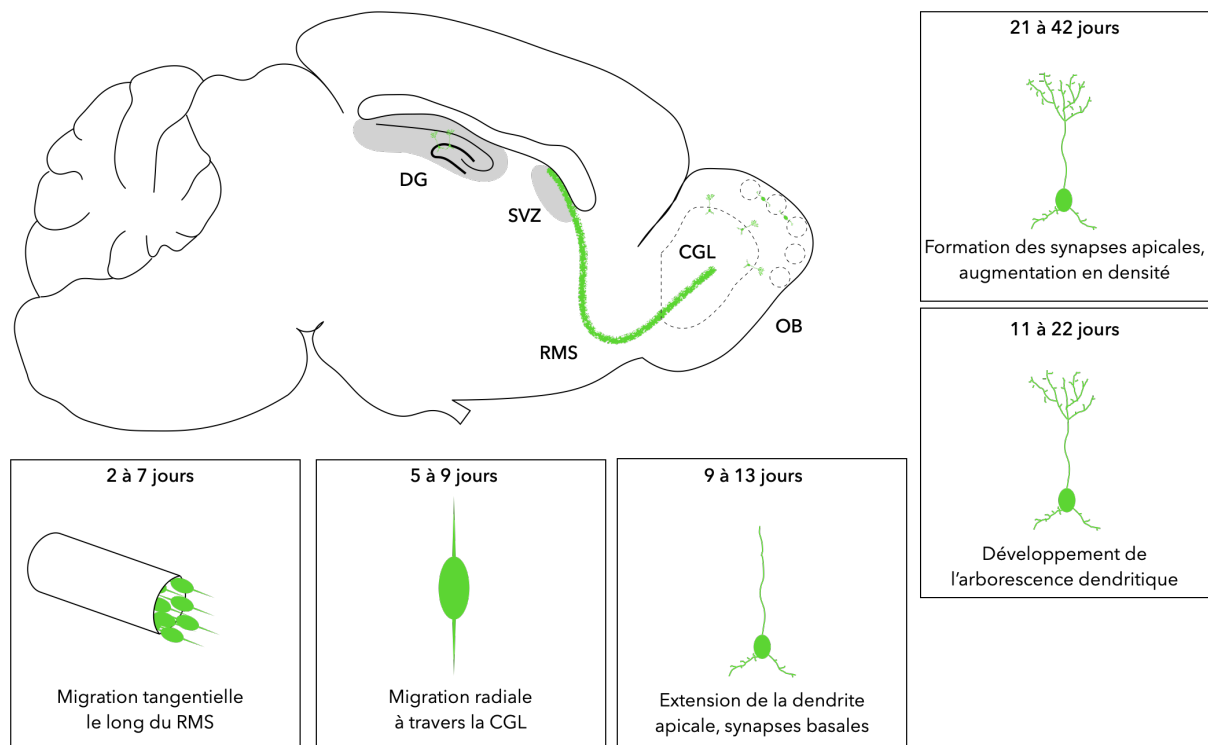


Figure 3. Les différentes étapes du processus de neurogenèse adulte dans le bulbe olfactif.

Représentation schématique des stades de développement des cellules granulaires néoformées : de la naissance dans la zone sous-ventriculaire, à la migration par le flux rostral migratoire et à la maturation progressive du nouveau neurone granulaire. DG : gyrus denté, SVZ : zone sous-ventriculaire, RMS : flux rostral migratoire, OB : bulbe olfactif, CGL : couche granulaire. Adapté de Whitman and Greer, 2009.

Dans la zone sous-ventriculaire, les cellules souches neurales adultes se divisent et donnent naissance à des cellules d'amplification transitoire qui se différencient en neuroblastes (Ming and Song, 2011). Bien que la zone sous-ventriculaire borde toute la paroi du ventricule latéral, on peut distinguer différentes régions qui vont donner naissance à des types cellulaires spécifiques. La région dorsale donnera naissance à des PG dopaminergiques, tandis que les régions ventrale et médiale vont respectivement principalement générer des PG positives à la calbindine et à la calrétinine. Chacune de ces régions donne naissance à des CG, mais les régions dorsales ont tendance à générer des CG superficielles et les régions ventrales principalement des CG profondes (Fiorelli et al., 2015; Lledo et al., 2008; Obernier et al., 2014). Quelle que soit la région de la zone sous-ventriculaire d'où proviennent les neuroblastes, ces derniers migrent ensuite le long d'une

route anatomiquement bien définie appelée le flux rostral migratoire vers le BO sur une distance de 2 à 3 mm chez la souris (Kaneko et al., 2017; Whitman and Greer, 2009). Après avoir atteint le BO en 8 à 10 jours, les nouveaux neurones se différencient morphologiquement et fonctionnellement pour intégrer le réseau neuronal préexistant principalement en tant que CG (95%) et, dans une moindre mesure, en tant que PG (5%). On estime que près de 10 000 nouveaux neurones atteignent chaque jour le BO chez la souris (Lledo and Saghatelian, 2005).

1.2.4.1. Intégration progressive des nouveaux neurones au sein du réseau bulbaire

La maturation morphologique des CG peut être suivie au cours du temps après avoir infecté ces cellules à leur naissance dans la zone sous-ventriculaire avec un rétrovirus qui code pour une protéine rapportrice (GFP ou phosphatase alcaline) (Bardy et al., 2010; Petreanu and Alvarez-Buylla, 2002; Whitman and Greer, 2007). 5 stades de maturation des nouvelles CG ont été initialement décrits selon des critères morphologiques (Petreanu and Alvarez-Buylla, 2002), auxquels ont ensuite été rajoutées des précisions sur l'activité électrique et l'intégration synaptique au sein du réseau neuronal bulbaire.

Au stade 1 (2 à 7 jours après l'infection rétrovirale (dpi) dans la zone sous-ventriculaire), les neuroblastes sont en cours de migration dans le flux rostral migratoire. Ces cellules présentent un soma rond ou allongé avec un cône de croissance proéminent.

Au stade 2 (5-9 dpi), les neuroblastes se détachent du flux rostral migratoire et migrent radialement vers les couches superficielles du BO. A partir de ce moment, ils entament leur différenciation et commencent à étendre leurs premiers prolongements dendritiques. Durant ces deux premiers stades, les cellules présentent une résistance membranaire relativement élevée et aucun courant postsynaptique spontané n'a été enregistré, indiquant que ces cellules ne sont pas encore intégrées fonctionnellement dans le réseau bulbaire (Carleton et al., 2003). Toutefois, ces nouvelles cellules granulaires expriment des récepteurs GABAergiques fonctionnels et sont sensibles au GABA ambiant, ce qui va contribuer à réguler leur développement et leur maturation (Carleton et al., 2003).

Au stade 3 (9-13 dpi), la dendrite apicale continue de croître vers la couche plexiforme externe et les dendrites basales se développent.

Au stade 4 (11-22 dpi), les CG commencent à présenter une arborisation dendritique apicale (Carleton et al., 2003). Contrairement aux CG formées au cours de l'ontogenèse, les nouvelles CG générées chez l'adulte reçoivent d'abord des entrées synaptiques inhibitrices au cours du stade 3 (enregistrement de courants synaptiques inhibiteurs spontanés), puis des entrées excitatrices au cours du stade 4 (enregistrements de courants synaptiques excitateurs) probablement en provenance des collatérales de cellules mitrales et des fibres centrifuges (Carleton et al., 2003). Ces contacts afférents se font d'abord seulement sur la dendrite proximale, avant le développement de la plupart des synapses efférentes et avant que les nouveaux neurones acquièrent la capacité de former des potentiels d'action (Kelsch et al., 2008). On dit qu'ils "écoutent" avant de pouvoir "parler" au sein du réseau synaptique bulbaire (Figure 4) (Kelsch et al., 2010).

Ce n'est qu'à partir de 4 semaines après leur naissance, au stade 5 (25-30 dpi), que les CG présentent des caractéristiques morphologiques matures, avec une densité d'épines dendritiques sur leurs dendrites basales et apicales, similaire à celle des CG nées au cours

du développement (Kelsch et al., 2010; Petreanu and Alvarez-Buylla, 2002; Whitman and Greer, 2007). A ce moment, les CG commencent à établir des contacts synaptiques dendro-dendritiques avec les cellules mitrales (Kelsch et al., 2008) ce qui leur permet de terminer leur intégration dans le réseau bulbaire préexistant. Les CG sont alors matures, capables d'émettre des potentiels d'action et ainsi de moduler l'activité des cellules mitrales (Bardy et al., 2010; Breton-Provencher et al., 2009; Kelsch et al., 2008).

Une production surnuméraire d'épines dendritiques a lieu au cours de la phase d'intégration, suivie d'une élimination sélective de certaines épines. En effet, la densité d'épines apicales augmente jusqu'à 42 jours puis diminue à 56 jours (Whitman and Greer, 2007). Une fois intégrées, les nouvelles CG gardent un certain niveau de plasticité puisqu'elles sont capables d'élongation et de rétraction dendritiques, mais également de formation et suppression d'épines apicales jusqu'à 90 jours après leur naissance (Mizrahi, 2007). Les nouvelles CG sont également très plastiques au niveau fonctionnel. En effet, les synapses excitatrices formées par les fibres centrifuges sur les nouvelles CG sont susceptibles de faire de la potentialisation à long-terme ou LTP (Gao and Strowbridge, 2009; Nissant et al., 2009). La LTP est plus forte dans les CG aux premiers stades de leur maturation (14 dpi) (Nissant et al., 2009). La capacité à présenter de la LTP s'estompe ensuite et disparaît complètement au bout de 3 mois. Cette forme de plasticité est accrue dans les nouveaux neurones puisqu'il est possible de déclencher une LTP pour des seuils de stimulation plus faibles chez les nouveaux neurones par rapport aux neurones préexistants (Nissant et al., 2009).

Entre 15 et 45 jours après leur génération, 50 % des CG meurent par apoptose (Petreanu and Alvarez-Buylla, 2002). Cette période coïncide avec une fenêtre temporelle (période critique) au cours de laquelle les CG sont très sensibles aux entrées olfactives pour leur survie et leur intégration (Mandairon et al., 2006a; Nissant and Pallotto, 2011; Yamaguchi and Mori, 2005).

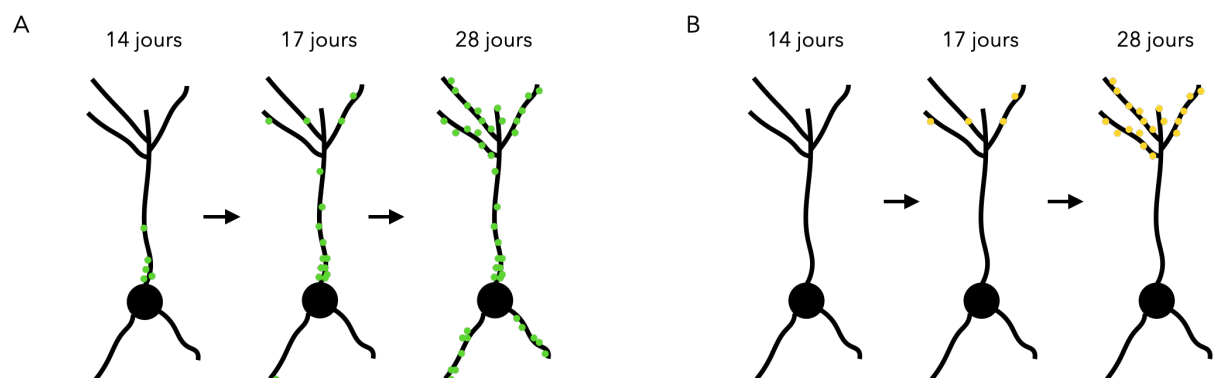


Figure 4. Chronologie du développement des contacts synaptiques des nouveaux neurones granulaires dans le bulbe olfactif.

Représentation schématique du développement des synapses (A) excitatrices (vert) reçues sur les nouveaux neurones et (B) des synapses inhibitrices (jaune) émises par les nouveaux neurones âgés de 14, 17 et 28 jours. On note le développement plus précoce des synapses afférentes, comparées aux synapses efférentes. Adapté de Kelsch et al., 2008.

1.2.4.2. Modulation de la survie et de l'intégration des nouveaux neurones bulbaires

La méthode classiquement utilisée pour suivre le devenir des cellules nouvellement formées consiste à injecter de la Bromo-déoxyUridine (BrdU), un analogue de la thymidine qui prend la place de cette dernière lors de la synthèse de l'ADN au cours de la division cellulaire, permettant de marquer les cellules en division. Les animaux peuvent être sacrifiés rapidement après l'injection (quelques minutes à quelques heures) ou après un délai plus long (plusieurs semaines voire mois) pour respectivement déterminer le taux de prolifération des cellules souches et la survie des cellules formées au moment de l'injection. Un double marquage du BrdU avec un marqueur neuronal permet ensuite de confirmer la nature neuronale de la nouvelle cellule générée. Plusieurs études ont ainsi montré que la survie des nouveaux neurones est modulée par l'expérience sensorielle olfactive. En effet, la privation olfactive par obstruction d'une narine diminue le nombre de neurones nouvellement formés dans les couches glomérulaire et granulaire du BO ipsilatéral à la narine obstruée (Mandairon et al., 2006a; Yamaguchi and Mori, 2005). Plus particulièrement, c'est la privation durant les 4 premières semaines suivant la naissance des neurones qui réduit drastiquement leur survie, alors que la même durée de privation effectuée plus tardivement (28^e au 56^e jour) n'a aucun effet significatif sur leur survie (Yamaguchi and Mori, 2005). De plus, cette privation sensorielle précoce entraîne une réduction de la densité d'épines dendritiques sur les nouveaux neurones âgés de 28 jours, suggérant une réduction de leur intégration (Dahlen et al., 2011; Kelsch et al., 2009). A l'inverse, une stimulation sensorielle par exposition quotidienne à un nouvel odorant durant 30 à 40 jours augmente la survie des nouveaux neurones, accompagnée d'une amélioration des performances de mémoire olfactive à court terme (Rey et al., 2012; Rochefort et al., 2002). L'effet de cette stimulation sensorielle s'exerce uniquement sur la survie des nouveaux neurones car le taux de prolifération des cellules souches dans la zone sous-ventriculaire et le taux de différenciation des progéniteurs en neurones ne sont pas affectés. De plus, cet effet est temporaire puisque 30 jours après la fin de l'enrichissement, la densité de nouveaux neurones retrouve son niveau basal (Rochefort and Lledo, 2005).

La survie des nouveaux neurones peut également être modulée par différents apprentissages olfactifs (e.g. Alonso et al., 2006; Mandairon et al., 2011; Moreno et al., 2009; Mouret et al., 2008; Sultan et al., 2010). C'est notamment le cas de l'apprentissage perceptif olfactif qui, pour rappel, consiste en une amélioration des capacités de discrimination entre deux odorants perceptivement similaires à la suite de l'exposition répétée à ceux-ci (Forest et al., 2019; Moreno et al., 2009). L'apprentissage perceptif olfactif améliore la survie et le recrutement des nouveaux neurones granulaires nés 8 jours avant le début de l'apprentissage (Forest et al., 2020; Moreno et al., 2009) sans affecter le nombre de PG dans la couche glomérulaire (Moreno et al., 2009). Lorsque l'apprentissage se complexifie, le taux de recrutement des nouveaux neurones, mesuré par l'expression d'un gène précoce en réponse à l'odeur apprise, augmente (Forest et al., 2020). Le maintien en mémoire de cet apprentissage se poursuit tant que ces nouveaux neurones restent présents (Forest et al., 2019). L'apprentissage associatif olfactif (association d'une odeur à une récompense) permet également d'améliorer la survie et le recrutement des nouveaux neurones (Mandairon et al., 2018; Sultan et al., 2010). De plus, sur ce modèle, il a été montré que l'effet de l'apprentissage olfactif sur la neurogenèse dépend de l'âge des neurones au

moment de l'apprentissage. En effet, dans le cas de l'apprentissage associatif, l'apprentissage peut non seulement augmenter la survie des nouveaux neurones âgés de 8 à 30 jours, mais aussi diminuer celle de neurones plus âgés (ayant entre 30 et 38 jours lors de l'apprentissage) ou n'avoir aucun effet au-delà (Mandairon et al., 2006a; Mouret et al., 2008).

Au-delà de la survie des nouveaux neurones, les apprentissages olfactifs engendrent également des modifications de la morphologie et de l'intégration synaptique de ces derniers. En effet, à la suite d'un apprentissage perceptif olfactif, l'arborisation dendritique des nouveaux neurones générés 8 jours avant le début de l'apprentissage est plus développée dans le groupe ayant suivi l'apprentissage que dans le groupe contrôle, de même que la densité des épines dendritiques apicales et basales (Daroles et al., 2016; Forest et al., 2020; Mandairon et al., 2018). Cette augmentation de la densité synaptique apicale sur les nouveaux neurones permet d'augmenter l'inhibition exercée par les CG sur les cellules mitrales ce qui permettrait une meilleure séparation des patterns d'activité (Mandairon et al., 2018). Cet effet est spécifique des nouveaux neurones puisqu'un apprentissage perceptif simple (une ou deux paires d'odorants) n'induit que des changements limités sur les neurones préexistants (formés pendant l'ontogenèse). En revanche, un apprentissage complexe (avec 3 paires d'odorants) sollicite les neurones préexistants et augmente leur densité d'épines apicales (Forest et al., 2020).

De manière intéressante, l'apprentissage associatif utilisant deux odorants perceptivement similaires a des effets opposés à ceux de l'apprentissage perceptif utilisant les mêmes odorants, sur la densité des épines dendritiques apicales des nouveaux neurones puisqu'il entraîne une diminution, suggérant une réduction de l'intégration synaptique (Mandairon et al., 2018). Cette diminution s'accompagne d'une diminution de la fréquence et de l'amplitude des courants post-synaptiques inhibiteurs dans les cellules mitrales. Cette diminution de l'inhibition des cellules mitrales pourrait conduire à une saillance ou une précision plus grande de la représentation bulbaire de l'odeur qui a été renforcée sur le plan comportemental (Aimone et al., 2011). Cette observation souligne le fait qu'une même discrimination olfactive peut être obtenue par deux mécanismes différents : en séparant les patterns par augmentation de l'inhibition sur les cellules mitrales ou par renforcement de la représentation de l'odeur par diminution de l'inhibition (Mandairon et al., 2018). En revanche, l'apprentissage associatif avec utilisation de deux odorants perceptivement différents entraîne également une augmentation de la densité d'épines basales, accompagnée d'une augmentation des entrées excitatrices en provenance des cortex olfactifs (Lepousez et al., 2014). Cela pourrait être le reflet de l'association de l'odeur et de la récompense.

1.2.4.3. Rôle de la neurogenèse adulte bulbaire

De nombreuses études ont maintenant démontré l'implication de la neurogenèse adulte bulbaire dans les phénomènes d'apprentissage et de mémoire olfactifs. Toutefois, la nécessité des nouveaux neurones semble dépendre du type d'apprentissage étudié.

L'ablation de la neurogenèse a un impact sur de multiples aspects de la fonction olfactive (voir Bardy and Pallotto, 2010; Nissant and Pallotto, 2011 pour revues). Par exemple, l'infusion d'AraC, un bloqueur mitotique, dans la zone sous-ventriculaire 10 jours avant le début d'un apprentissage perceptif olfactif diminue drastiquement le nombre de

nouveaux neurones dans le BO et empêche l'acquisition de l'apprentissage (Moreno et al., 2009). Le même résultat est observé si la plasticité structurale des nouveaux neurones est bloquée (Daroles et al., 2016) ou si l'activité électrique des nouveaux neurones est inhibée par une approche optogénétique (Forest et al., 2020). Il est à noter que l'inhibition des nouveaux neurones empêche l'apprentissage perceptif olfactif à la fois simple (une paire d'odeur à apprendre à discriminer) et complexe (6 paires d'odeurs) alors que l'inhibition optogénétique des neurones préexistants n'inhibe que l'apprentissage complexe. Contrairement aux nouveaux neurones qui sont nécessaires et suffisants pour l'acquisition de l'apprentissage perceptif olfactif, les neurones préexistants sont donc quant à eux recrutés pour contribuer à l'apprentissage dans les cas de complexité environnementale (Forest et al., 2020).

La neurogenèse est également nécessaire à la mémoire olfactive. En effet, l'inhibition de la neurogenèse par infusion d'AraC bloque la rétention de la mémoire d'une odeur au-delà de 30 min (Breton-Provencher et al., 2009). Toutefois l'implication de la neurogenèse dans l'apprentissage associatif dépend du fait que l'apprentissage soit opérant ou non (Mandairon et al., 2011). L'ablation génétique de la neurogenèse (Imayoshi et al., 2008) ou par infusion d'AraC (Breton-Provencher et al., 2009) n'a pas d'effet sur la mémoire à long terme dans une tâche associative dans laquelle les animaux ont fait une association non-opérante entre une odeur et une récompense qui étaient simultanément présentes et accessibles aux animaux (Breton-Provencher et al., 2009; Imayoshi et al., 2008). En revanche, l'inhibition de la neurogenèse par irradiation (Lazarini et al., 2009) ou infusion d'AraC (Sultan et al., 2010) altère la rétention à long-terme d'un conditionnement opérant dans lequel les animaux utilisent l'odorant comme indice pour susciter un comportement et obtenir une récompense (Lazarini et al., 2009; Sultan et al., 2010). De plus, la stimulation optogénétique des nouveaux neurones pendant un apprentissage de type go/no-go permet d'accélérer cet apprentissage ainsi que d'améliorer sa rétention à long terme (Alonso et al., 2012). Plus récemment, une étude a montré que les nouveaux neurones sont suffisants pour l'acquisition de cette tâche puisque leur activation optogénétique mime les effets de l'apprentissage (Grelat et al., 2018).

1.2.4.4. Neurogenèse adulte bulbaire et controverse chez l'humain

Alors qu'il est maintenant admis que la neurogenèse adulte existe chez les rongeurs, son existence chez l'humain est toujours matière à controverse (Bergmann et al., 2015; Kempermann et al., 2018; Snyder, 2019).

Les premières démonstrations de l'existence de la neurogenèse adulte chez l'humain ont été faites sur des patients en chimiothérapie (Eriksson et al., 1998). L'analyse post-mortem de ces cerveaux a mis en évidence la présence de cellules doublement marquées BrdU et NeuN, un marqueur neuronal, dans le gyrus denté de l'hippocampe, suggérant donc l'existence de neurones nouvellement formés dans l'hippocampe de ces sujets humains. Cette étude avait également permis de révéler la présence de cellules BrdU positives dans la zone sous-ventriculaire, sans mise en évidence d'un flux rostral migratoire.

Toutefois, quelques années plus tard, la même équipe a mis en évidence un flux rostral migratoire, situé autour d'une extension du ventricule latéral atteignant le BO, par lequel les cellules nouvellement formées dans la zone sous-ventriculaire rejoignent le BO (Curtis et al., 2007). Le long de ce flux, les chercheurs ont mis en évidence des progéniteurs

qui expriment la molécule d'adhésion PSA-NCAM qui est exprimée par les cellules en migration chez le rongeur (Bonfanti, 2006). Dans le BO, ils ont également mis en évidence la présence de cellules doublement marquées BrdU et NeuN, indiquant la présence de nouveaux neurones (Curtis et al., 2007). Toutefois, l'existence de ce flux rostral migratoire et la présence de nouveaux neurones dans le BO sont débattus (Sanai et al., 2011; Wang et al., 2011) car les neuroblastes ne semblent pas former un flux migratoire distinct mais apparaissent sous forme de cellules individuelles et à une fréquence très inférieure à celle de la période périnatale (Sanai et al., 2011) et aucun n'a été observé atteignant le BO (Wang et al., 2011). Cette absence de neurogenèse adulte dans le BO adulte est corroborée par une étude qui a dosé la quantité de carbone 14 dans le noyau des neurones du BO (Bergmann et al., 2012). Le principe de la méthode est que les neurones ont dans leur ADN la quantité de carbone 14 présente dans l'atmosphère au moment de leur naissance (naissance du sujet pour un neurone formé pendant l'ontogenèse, autre date pour un neurone formé chez l'adulte). Alors que dans l'hippocampe il y a une absence de concordance entre la quantité de carbone 14 dans l'atmosphère au moment de la naissance de l'individu et la quantité de carbone dans les neurones au moment de l'analyse (Spalding et al., 2013), indiquant un renouvellement neuronal, ce n'est pas le cas dans le BO (Bergmann et al., 2012). Cela suggère donc l'existence d'une neurogenèse adulte dans l'hippocampe humain mais pas dans le BO. Le même type d'étude a conclu à l'existence d'un renouvellement des neurones dans le striatum adulte chez l'humain et suggère que les neuroblastes qui naissent dans la zone sous ventriculaire chez l'humain migreraient dans le striatum et très peu dans le BO (Ernst et al., 2014). Maintenant, l'enjeu est de comprendre à quoi pourraient servir ces neurones dans le striatum.

Aujourd'hui encore l'existence d'une neurogenèse adulte reste donc controversée chez l'humain, y compris dans l'hippocampe. Deux études récentes ont apporté des conclusions contradictoires à ce sujet (Boldrini et al., 2018; Sorrells et al., 2018). Contrairement à Sorrells et al., Boldrini et al. ont trouvé des cellules immatures DCX-positives dans le gyrus denté de l'hippocampe, co-exprimant d'autres marqueurs de neurogenèse tels que PSA-NCAM. Toutefois les méthodes d'échantillonnage et de quantification différentes utilisées dans ces deux études constituent des éléments clés pour pouvoir mettre en évidence un phénomène rare et cela pourrait expliquer les divergences de conclusion.

En résumé, l'existence d'une neurogenèse adulte chez l'humain est encore débattue mais semble très probable dans l'hippocampe jeune, beaucoup moins probable dans le BO. Des facteurs confondants peuvent influencer ces résultats, notamment l'âge des sujets, le délai entre le décès d'une personne et le prélèvement post-mortem du cerveau, le mode de conservation des cerveaux, le marqueur utilisé pour caractériser la neurogenèse mais également l'état de santé des sujets chez qui le cerveau a été prélevé. De plus, sachant que l'enrichissement olfactif est très efficace pour augmenter la neurogenèse adulte dans le BO chez l'animal, la recherche d'une neurogenèse adulte chez des individus utilisant leur odorat de manière intensive (par profession par exemple), pourrait révéler une neurogenèse mesurable. Ces questions restent en suspens en l'absence de méthodes non invasives permettant de visualiser les neurones néoformés chez l'humain.

1.2.5. Le bulbe olfactif est la cible de nombreuses afférences neuromodulatrices

Tous les circuits sensoriels sont soumis aux influences modulatrices (Jacob and Nienborg, 2018) et le BO n'est pas une exception. Trois principaux systèmes neuromodulateurs projettent sur le BO : le système noradrénergique, le système cholinergique et le système sérotoninergique (voir Brunert and Rothermel, 2021; Harvey and Heinbockel, 2018 pour revues). Ces trois systèmes sont issus de noyaux situés dans des régions cérébrales différentes et présentent une distribution spécifique dans les différentes couches du BO (Figure 5). Cette innervation régionalisée suggère que chaque neuromodulateur puisse contribuer de manière spécifique au traitement de l'information olfactive.

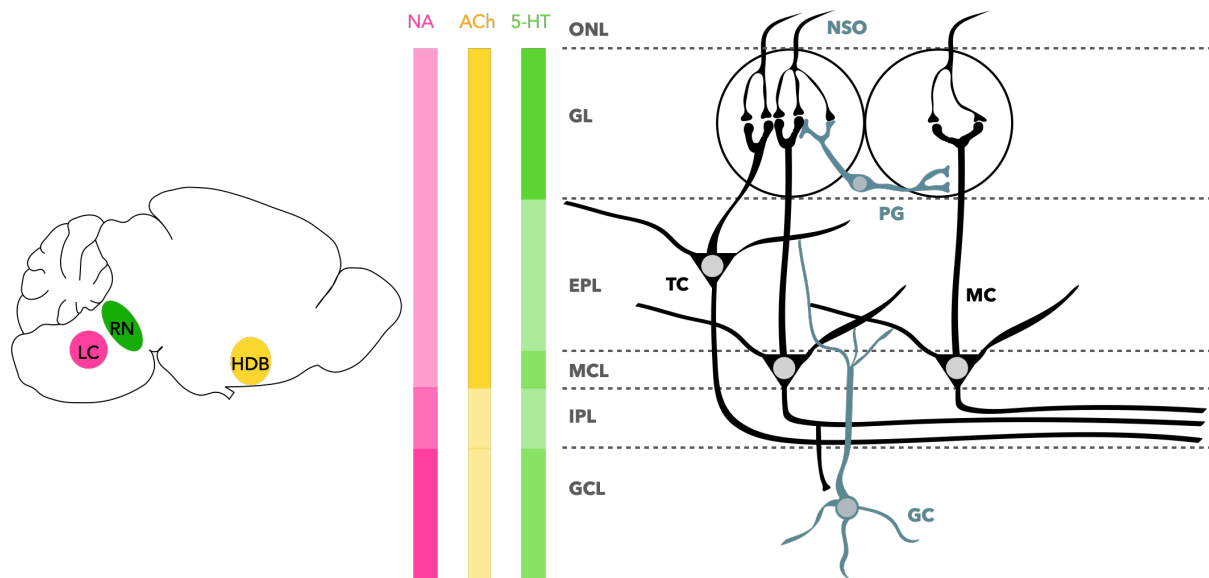


Figure 5. Distribution des projections neuromodulatrices sur le bulbe olfactif.

Le code couleur représente la densité de fibres neuromodulatrices dans chaque couche du BO (couleur claire = faible densité, couleur foncée = forte densité). Les afférences noradrénergiques (rose) issues du *Locus Coeruleus* (LC) innervent principalement la couche granulaire (GCL), les afférences sérotoninergiques (vert) issues du noyau du Raphé (RN) innervent préférentiellement la couche glomérulaire et les afférence cholinergiques (jaune) issues de de la partie horizontale de la bande diagonale de Broca (HDB) innervent majoritairement les couches les plus superficielles du bulbe olfactif. Adapté de Brunert and Rothermel, 2021.

1.2.5.1. Modulation noradrénergique

Le BO reçoit de denses projections noradrénergiques (NA) en provenance du *Locus Coeruleus* (LC), un petit noyau situé dans le tronc cérébral et qui constitue la source majeure de l'innervation noradrénergique du cortex (Aston-Jones and Waterhouse, 2016). Les fibres NA innervent préférentiellement la couche granulaire et dans une moindre mesure la couche des cellules mitrales où elles contactent préférentiellement les cellules granulaires et mitrales (McLean et al., 1989; Shipley et al., 1985). L'action de la NA est médiée par les récepteurs adrénergiques α_1 , α_2 et β . Les cellules mitrales expriment ces trois types de récepteurs alors que les CG n'expriment que α_1 et α_2 (Linster et al., 2011).

En plus d'une excitation directe des mitrales par l'activation des récepteurs α 1-adrénergiques (Ciombor et al., 1999; Hayar et al., 2001), la NA permet une modulation dynamique de l'inhibition GABAergique sur les cellules mitrales en augmentant (via les récepteurs α 1) ou diminuant (via les récepteurs α 2) l'excitabilité des CG (Mouly et al., 1995; Nai et al., 2009, 2010; Zimnik et al., 2013). Cette modulation est provoquée par un changement du potentiel membranaire des CG et donc de leur excitabilité (Li et al., 2015; Nai et al., 2010). De plus, la modulation des cellules mitrales par la NA réduit leur activité spontanée tout en augmentant les réponses de la cellule mitrale à la présentation de l'odeur, ce qui a pour conséquence d'augmenter le ratio signal sur bruit (Manella et al., 2017). L'équilibre entre les différents effets (inhibiteurs et excitateurs) de la NA est déterminé par la concentration de NA : à faible concentration, la NA active uniquement les récepteurs α 2 de forte affinité, tandis qu'à des concentrations plus élevées, les récepteurs α 1 de plus faible affinité, sont également activés (Nai et al., 2009).

En olfaction, la NA apparaît comme un puissant régulateur de la perception en améliorant les seuils de détection olfactive, la mémoire et les capacités de discrimination chez la souris jeune adulte (Doucette et al., 2007; Escanilla et al., 2010; Guérin et al., 2008; Linster, 2019; Veyrac et al., 2007, 2009). La NA est nécessaire à l'apprentissage perceptif olfactif chez les souris jeunes adultes par le biais de sa régulation des nouveaux neurones. En effet, l'infusion pendant 10 jours de labetalol, un antagoniste des récepteurs α 1 et β -adrénergiques, bloque l'apprentissage perceptif olfactif (Moreno et al., 2012; Vinera et al., 2015). A l'inverse, le blocage quotidien du récepteur présynaptique α 2 (augmentant la libération de NA) pendant 10 jours mime l'effet de l'apprentissage perceptif, accompagné d'une augmentation de la survie des nouveaux neurones et de leur réactivité aux odeurs (Moreno et al., 2012). L'ablation de la neurogenèse par un traitement à l'AraC supprime complètement l'effet bénéfique du blocage des récepteurs α 2 sur l'apprentissage de la discrimination (Moreno et al., 2012). C'est donc par son action sur les nouveaux neurones granulaires que la NA permet l'apprentissage perceptif olfactif (Moreno et al., 2014, 2012; Vinera et al., 2015). En revanche l'inhibition pharmacologique ou optogénétique de la transmission NA dans le BO n'a pas d'effet sur l'acquisition d'une tâche d'apprentissage associatif olfactif (association odeur-récompense) (Linster et al., 2020; Vinera et al., 2015). Cependant, quand la règle change quant à l'odeur récompensée (tâche de « reversal learning »), les souris dont les fibres NA sont inhibées dans le BO pendant la première tâche, acquièrent rapidement la nouvelle association odeur/récompense alors que les souris contrôles persévèrent dans la première association. Ces résultats indiquent que la mémoire acquise serait moins persistante chez les animaux inhibés que chez les animaux contrôles et donc que la NA augmenterait la durée et la spécificité du souvenir (Linster et al., 2020). Par ailleurs, la NA contribue à modifier l'activité des cellules mitrales lors d'une tâche d'apprentissage associatif olfactif avec des mélanges d'odorants (pour augmenter la difficulté de la discrimination) (Doucette et al., 2011), puisque le blocage pharmacologique des récepteurs α et β -adrénergiques désynchronise l'activité des cellules mitrales.

1.2.5.2. Modulation cholinergique

En plus des projections noradrénergiques, le BO reçoit des afférences centrifuges en provenance de la partie horizontale de la bande diagonale de Broca (Li et al., 2018; Shipley and Adamek, 1984; Záborszky et al., 1986). Les fibres cholinergiques ciblent les

neurones de tout le BO et sont principalement distribuées dans les couches superficielles, notamment la couche glomérulaire et dans une moindre mesure dans la couche granulaire (Böhm et al., 2020) où elles contactent respectivement les PG et CG (Le Jeune et al., 1995). Les récepteurs muscariniques et nicotiniques sont exprimés dans le BO pour médier l'action de l'acétylcholine (Keiger and Walker, 2000; Le Jeune et al., 1995). Via son action sur les récepteurs nicotiniques, l'acétylcholine renforce l'inhibition exercée par les PG sur les cellules mitrales, et via son action sur les récepteurs muscariniques, elle renforce l'inhibition exercée par les CG sur les cellules mitrales (Linster and Devore, 2012).

Le système cholinergique est hautement impliqué dans le comportement olfactif. Le blocage des récepteurs muscariniques par l'injection intrapéritonéale de scopolamine avant un conditionnement de peur à une odeur empêche son acquisition (Fletcher and Wilson, 2002). L'infusion de scopolamine dans le BO diminue également la mémoire olfactive à court-terme dans une tâche de type « delayed-match-to-sample » ou appariement retardé (Ravel et al., 1994). Le blocage des récepteurs nicotiniques par infusion de mecamlamine abolit la discrimination spontanée entre deux odorants (Mandairon et al., 2006b). En revanche, aucun effet comportemental des antagonistes des récepteurs nicotiniques ou muscariniques n'a été observé lorsque les rats ont été entraînés à une tâche de discrimination olfactive motivée par la récompense (Mandairon et al., 2006b).

L'acétylcholine est également impliquée dans la régulation de la neurogenèse. En effet, l'infusion de l'immuno-toxine 192 IgG-saporine dans le ventricule latéral ayant pour conséquence de léser sélectivement les neurones cholinergiques, diminue le nombre de nouveaux neurones cinq semaines après la lésion dans le BO et le gyrus denté de l'hippocampe (Cooper-Kuhn et al., 2004). A l'inverse, l'injection intrapéritonéale de donepezil, un inhibiteur d'acétylcholinestérase, qui conduit à l'augmentation du taux d'acétylcholine dans la fente synaptique augmente la survie des nouveaux neurones dans le BO et le gyrus denté, sans modifier la prolifération dans les zones sous-granulaire et sous-ventriculaire (Kaneko et al., 2006).

Enfin, l'acétylcholine est requise pour l'apprentissage perceptif olfactif chez la souris jeune adulte via sa régulation des nouveaux neurones (Schilit Nitenson et al., 2019). En effet, la stimulation optogénétique des fibres cholinergiques dans le BO mime les effets de l'apprentissage perceptif. Ces effets sont médiés par l'action de l'acétylcholine sur les nouveaux neurones, puisque la diminution de la neurogenèse par l'infusion d'AraC dans l'un des ventricules latéraux bloque les bénéfices de la stimulation optogénétique (Schilit Nitenson et al., 2019).

1.2.5.3. Modulation sérotoninergique

Enfin, le BO reçoit également une innervation sérotoninergique en provenance des noyaux du Raphé dorsal et médian (Muzerelle et al., 2016). Le noyau du Raphé dorsal projette sur la couche des cellules mitrales et la couche des CG, alors que le noyau du Raphé médian projette exclusivement sur la couche glomérulaire (Muzerelle et al., 2016). Parmi les 14 sous-types connus de récepteurs de la sérotonine, 9 semblent être exprimés dans le BO dont la plupart n'a pas encore été caractérisée fonctionnellement (Gaudry, 2018).

La libération de sérotonine par la stimulation électrique du noyau du Raphé dorsal atténue les réponses provoquées par les odeurs dans les glomérules (Petzold et al., 2009).

Ces effets sont médiés par les récepteurs 5-HT_{2C} puisque la réponse glomérulaire après une stimulation olfactive est atténuée par l'activation des récepteurs 5-HT_{2C} et amplifiée par leur blocage (Petzold et al., 2009). La sérotonine peut également moduler l'activité des cellules mitrales soit en les excitant via les récepteurs 5-HT_{2A} soit en les inhibant via les récepteurs 5-HT₁ (Hardy et al., 2005; Kapoor et al., 2016; McLean et al., 1995).

Malgré ces preuves de la modulation de l'activité cellulaire bulbaire par la sérotonine, la manière dont elle affecte le comportement olfactif n'est pas clairement établie. Une étude a montré que la déplétion des fibres sérotoninergiques par injection d'une neurotoxine directement dans les fibres qui projettent sur le BO induit une perte des capacités de discrimination olfactive (Moriizumi et al., 1994). Cependant, une étude plus récente ayant utilisée une approche génétique pour cibler spécifiquement la tryptophane-hydroxylase, enzyme de synthèse de la sérotonine et ainsi éliminer la quasi-totalité de sérotonine dans le cerveau, n'a pas pu établir d'effet significatif sur les performances olfactives que cela soit en termes d'apprentissage associatif ou de changement de règle quant à l'odeur récompensée (Carlson et al., 2016).

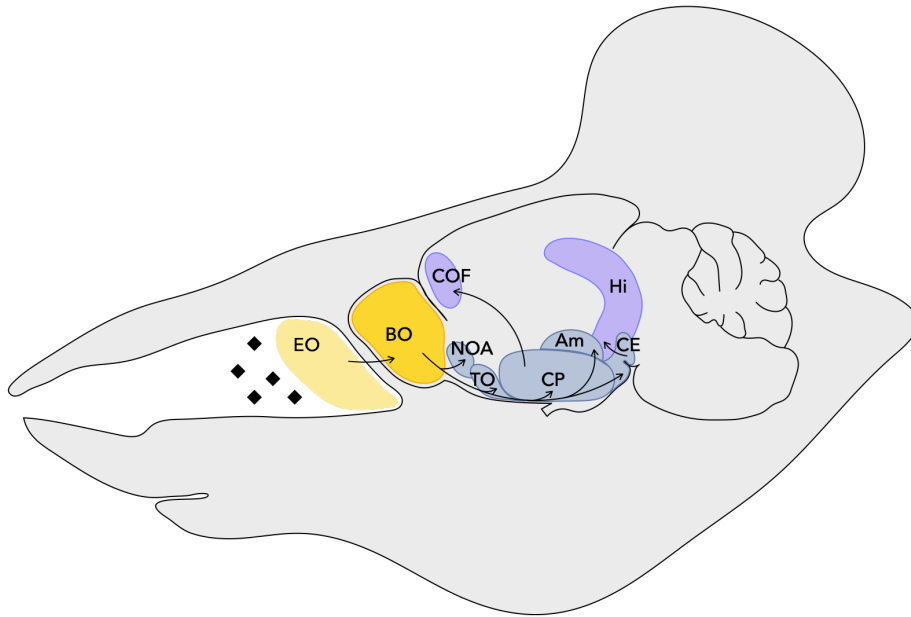
1.3. Traitement de l'information olfactive par un vaste réseau cortical

Les axones des cellules mitrales et à panache se regroupent dans la partie centrale du BO et forment le tractus olfactif latéral jusqu'au cortex olfactif primaire. Une fois l'information arrivée au niveau de ce cortex olfactif primaire, elle sera transmise à différentes régions cérébrales, qualifiées de structures olfactives secondaires (Figure 6).

1.3.1. Projections primaires du bulbe olfactif

Le cortex olfactif primaire est constitué de toutes les régions du cerveau qui reçoivent des projections directes des axones des cellules relais du BO. Cela regroupe le noyau olfactif antérieur, la tenia tecta, le cortex piriforme, le tubercule olfactif, le cortex enthorinal et l'amygdale (voir Lane et al., 2020 pour revue). Il est à noter qu'une différence existe dans le patron d'innervation des structures olfactives primaires : alors que les cellules mitrales innerveraient toutes les structures olfactives primaires, les cellules à panache restreindraient leurs projections aux structures olfactives antérieures telles que le noyau olfactif antérieur, la partie antérieure du cortex piriforme et le tubercule olfactif (Igarashi et al., 2012). En retour, ces régions projettent sur le BO ou entre elles (voir Brunert and Rothermel, 2021; Cleland and Linstner, 2019 pour revues).

A



B

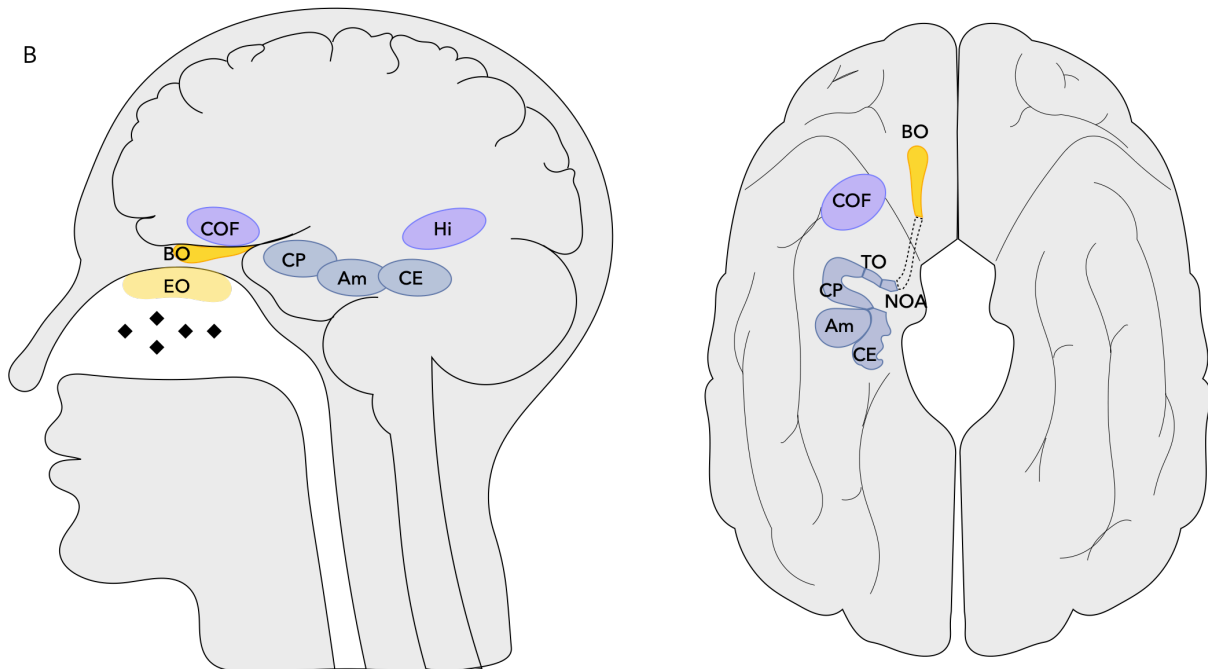


Figure 6. Organisation générale du système olfactif.

Représentation schématique des systèmes olfactifs (A) du rongeur en vue latérale et (B) de l'humain en vue latérale (gauche) et vue ventrale (droite). Les molécules odorantes (losanges) arrivent sur l'épithélium olfactif (jaune clair) via le flux d'air entrant dans la cavité nasale. A ce niveau, elles interagissent avec les récepteurs olfactifs des neurones sensoriels qui projettent vers le bulbe olfactif (jaune). Du bulbe olfactif, l'information est transmise vers les cibles primaires olfactives (bleu) via les cellules mitrales et les cellules à panache. Enfin, les cibles primaires projettent vers d'autres cibles secondaires (violet) qui lient les inputs olfactifs à des systèmes associés avec les émotions, l'apprentissage et la mémoire. EO : épithélium olfactif, BO : bulbe olfactif, NOA : noyau olfactif antérieur, TO : tubercule olfactif, CP : cortex piriforme, Am : amygdale, CE : cortex entorhinal, COF : cortex orbitofrontal, Hi : hippocampe.

1.3.1.1. Cortex piriforme

Le cortex piriforme est un élément majeur du cortex olfactif primaire situé à la jonction médiane des lobes frontaux et pariétaux chez l'humain. Avec le BO, le cortex piriforme constitue la structure la plus étudiée du système olfactif (Linster and Cleland, 2016).

Le cortex piriforme est un paléocortex donc composé de trois couches cellulaires (Bekkers and Suzuki, 2013). La couche la plus superficielle contient les fibres du tractus olfactif latéral en provenance du BO et les dendrites des neurones pyramidaux du cortex piriforme. La couche des cellules denses qui est la couche intermédiaire contient les corps cellulaires des neurones de projection du cortex piriforme. La couche profonde contient également des neurones pyramidaux mais en plus faible quantité. Des interneurons GABAergiques sont également dispersés dans toutes les couches du cortex piriforme, ce qui permet de moduler l'information olfactive.

Dans le cortex piriforme, il n'y a pas d'organisation topographique des projections issues du BO : chaque cellule pyramidale reçoit l'information de plusieurs cellules mitrales et possède des axones collatéraux qui permettent une redistribution de l'activité à l'ensemble de la structure (Ghosh et al., 2011; Iurilli and Datta, 2017). En revanche, il existe une hétérogénéité fonctionnelle entre les parties antérieure et postérieure : la partie antérieure reçoit la majorité des afférences bulbaires (Schwob and Price, 1978; Srinivasan and Stevens, 2018) et la partie postérieure reçoit des projections de la partie antérieure du cortex piriforme, mais également d'autres régions cérébrales telles que le cortex préfrontal, l'amygdale et le cortex entorhinal (Johnson et al., 2000; Yang and Sun, 2015). En retour, le cortex piriforme projette sur ces structures (Chen et al., 2014). Du fait de cette hétérogénéité, le cortex piriforme antérieur jouerait plus un rôle dans la détection des odorants et le codage de leur identité chimique (Gottfried et al., 2006; Penker et al., 2020; Srinivasan and Stevens, 2018; Wilson and Sullivan, 2011). De plus, les ensembles de neurones dans le cortex piriforme antérieur permettent la complétion de pattern (Barnes et al., 2008). En effet, les ensembles de neurones dans le cortex piriforme antérieur continuent de répondre à un mélange d'odorants même si un composant de ce mélange est enlevé, ce qui permet une stabilité perceptive (Barnes et al., 2008). Le cortex piriforme postérieur serait quant à lui impliqué dans des fonctions associatives telles que l'apprentissage, la mémoire ainsi que la qualité et la catégorisation des odeurs (Chen et al., 2014; Choi et al., 2011; Gottfried et al., 2006; Howard et al., 2009; Johnson et al., 2000).

Comme le BO, le cortex piriforme reçoit des inputs centrifuges cholinergiques, sérotoninergiques et noradrénergiques, mais également dopaminergiques (Linster and Cleland, 2016). Les effets de ces différents neuromodulateurs sur l'activité du cortex piriforme sont complexes, dépendent du type de cellules étudié, de la concentration du neuromodulateur et sont médiés par différents types de récepteurs (Fletcher and Chen, 2010; Linster, 2019). Par exemple, la mesure du potentiel de champ de surface évoqué lors d'une stimulation électrique du tractus olfactif latéral révèle qu'à faible concentration, l'application de NA augmente la transmission excitatrice des cellules mitrales sur les cellules pyramidales du cortex piriforme alors qu'à des concentrations plus élevées, la transmission synaptique est diminuée (Collins et al., 1984). De même, *in vivo*, la stimulation électrique du LC entraîne une augmentation d'activité d'une partie des neurones du cortex piriforme en réponse à l'odeur et une diminution d'activité dans une autre partie des neurones du cortex

piriforme (Bouret and Sara, 2002). De plus, les proportions d'augmentation ou de diminution d'activité sont différentes dans le cortex piriforme antérieur et postérieur, suggérant une distribution régionale des récepteurs NA (Bouret and Sara, 2002).

1.3.1.2. Noyau olfactif antérieur

Le noyau olfactif antérieur, situé à l'arrière du BO et en avant du cortex piriforme, est la structure la plus antérieure du cortex olfactif primaire. C'est un noyau très hétérogène en termes d'organisation, de fonction, de morphologie cellulaire et de phénotype chimique (Brunjes et al., 2005). Historiquement, le noyau olfactif antérieur était connu pour être un simple relai entre le BO et le cortex piriforme en régulant le transfert réciproque de l'information olfactive entre ces deux structures (Brunjes et al., 2005).

En permettant une communication entre les deux BO via une portion de la commissure antérieure, il a par la suite été montré que le noyau olfactif antérieur était impliqué dans la localisation spatiale des odeurs chez le rongeur (Kikuta et al., 2010; Rabell et al., 2017). En lien avec l'hippocampe, le noyau olfactif antérieur est impliqué dans l'association d'un stimulus olfactif avec son contexte visuo-spatial (Levinson et al., 2020). L'inhibition du noyau olfactif antérieur ou de l'hippocampe ventral par l'infusion de muscimol, agoniste GABAergique, empêche l'acquisition d'une tâche de discrimination olfactive contextuelle dans laquelle des rats ont été entraînés à associer un stimulus olfactif à une récompense en fonction d'un contexte visuo-spatial. En revanche, l'inhibition du noyau olfactif antérieur ou de l'hippocampe ventral n'a pas d'effet sur une tâche de discrimination olfactive sans contexte visuo-spatial (Levinson et al., 2020). Le noyau olfactif antérieur serait également impliqué dans le codage temporel de la présentation de l'odeur (Tsuji et al., 2019). En effet, certains neurones du noyau olfactif antérieur répondent au moment de la présentation d'une odeur, d'autres après la présentation de l'odeur (Tsuji et al., 2019).

1.3.1.3. Tenia Tecta

La tenia tecta peut-être divisée en deux sous-régions, distinguées selon leur architecture cellulaire et leurs connexions : la tenia tecta ventrale et la tenia tecta dorsale (Haberly and Price, 1978). La tenia tecta ventrale est une structure trilaminaire, typique du cortex olfactif primaire en termes d'organisation, d'architecture cellulaire et de connectivité. La tenia tecta ventrale établit des connexions réciproques avec le BO, le noyau olfactif antérieur, le cortex piriforme et le cortex enthorinal (Haberly and Price, 1978). La tenia tecta dorsale, également appelée le prolongement antérieur de l'hippocampe (McNamara et al., 2004), présente une organisation cellulaire plus proche de celle du gyrus denté de l'hippocampe (Haberly and Price, 1978). Elle reçoit une forte entrée du cortex piriforme et une plus faible du cortex entorhinal latéral. La tenia tecta reste très peu étudiée en olfaction. Toutefois une étude récente a montré qu'une fois que l'apprentissage était acquis (tâche de go/no-go dans laquelle l'animal apprend à associer une odeur à une récompense hydrique), des sous-populations de neurones de la tenia tecta ventrale s'activent sélectivement à différentes étapes de la tâche (lorsque la souris sent l'odeur, ou l'attend, ou pendant qu'elle boit) (Shiotani et al., 2020). Il en était de même dans un autre contexte dans

lequel les animaux devaient manger ou se retenir en fonction de l'odeur qui leur était présentée (Shiotani et al., 2020).

1.3.1.4. Tubercule olfactif

Le tubercule olfactif reçoit des projections directes du BO et indirectes par l'intermédiaire du cortex piriforme. C'est une structure particulière située au carrefour des systèmes olfactif et de la récompense puisqu'avec le noyau accumbens, il constitue le striatum ventral et qu'il établit des connexions avec l'aire tegmentale ventrale. Le tubercule olfactif a été majoritairement étudié pour son rôle dans les comportements motivés (Wesson and Wilson, 2011). Récemment, une étude chez le rongeur a montré que les neurones du tubercule olfactif codent pour des comportements dirigés vers un but et présentent des réponses olfactives accrues lorsque les animaux dirigent leur attention sélectivement vers des odeurs spécifiques (Carlson et al., 2018). De plus, le tubercule olfactif joue un rôle important dans le traitement du caractère récompensant des odeurs chez le rongeur (Midroit et al., 2021).

1.3.1.5. Cortex entorhinal

Le cortex entorhinal, qui fait partie des structures parahippocampiques et du système limbique, est principalement connu pour être impliqué dans la mémoire et la navigation spatiales (Knierim et al., 2014; Nilssen et al., 2019). En plus de ses connexions avec l'hippocampe et de ses rôles dans la mémoire, le cortex entorhinal est également une structure olfactive. En effet, sa partie latérale reçoit des projections du système olfactif, notamment du BO et du cortex piriforme, et projette en retour sur ces structures (Chapuis et al., 2013; Haberly and Price, 1978). De plus, chez les rongeurs, les fibres afférentes provenant des zones olfactives constituent l'entrée dominante du cortex entorhinal latéral (Kerr et al., 2007), qui est alors qualifié de cortex entorhinal olfactif. Le cortex entorhinal latéral est notamment impliqué dans la discrimination olfactive. En effet, l'inhibition réversible bilatérale du cortex entorhinal latéral par infusion de muscimol altère les performances de discrimination lors d'une tâche dite difficile de discrimination de mélanges d'odeurs (Chapuis et al., 2013).

Du fait de ses connexions, le cortex entorhinal constitue une voie d'entrée de l'information olfactive dans l'hippocampe pour leur traitement mnésique. Il a d'ailleurs été montré un couplage de l'activité du cortex entorhinal et de la région CA1 de l'hippocampe dorsal pendant que des rats apprennent à utiliser un indice olfactif pour guider leur comportement de navigation dans une tâche d'apprentissage associatif olfacto-spatial (Igarashi et al., 2014). Le cortex entorhinal latéral intervient également dans l'intégration multisensorielle puisque l'inhibition des récepteurs NMDA dans cette structure empêche l'acquisition d'une tâche associative olfacto-tactile (Boisselier et al., 2014).

1.3.1.6. Amygdale

L'amygdale est une structure du système limbique. C'est un ensemble de plusieurs noyaux rassemblés en 3 principaux groupes sur des bases structurelles et fonctionnelles : l'amygdale basolatérale, centro-médiane et corticale. Chez les rongeurs, le BO envoie des

projections vers plusieurs sous-régions amygdaliennes, notamment l'amygdale corticale antérieure, l'amygdale corticale postérolatérale et le noyau du tractus olfactif latéral (Sosulski et al., 2011).

La plupart des études sur l'amygdale s'est focalisée sur ses rôles dans les émotions négatives et le conditionnement de peur, dont le conditionnement de peur à l'odeur (Baxter and Murray, 2002; Sevelinges et al., 2004). Des études récentes ont montré que les projections du BO vers l'amygdale corticale formeraient un substrat neuronal pour la genèse des comportements innés médiés par l'odeur, tels que l'attrance ou l'évitement d'une source odorante (Iurilli and Datta, 2017; Root et al., 2014).

1.3.2. Communication avec les aires olfactives secondaires

La plupart des structures olfactives primaires décrites plus haut est en lien direct avec d'autres structures corticales et sous-corticales qui lient les entrées olfactives à des systèmes associés avec les émotions, le contrôle exécutif, l'apprentissage et la mémoire. Les régions du cortex olfactif primaire projettent ainsi sur le cortex orbitofrontal postérieur (COF), l'insula agranulaire, l'hippocampe, mais aussi le noyau dorsomédial du thalamus, l'hypothalamus médian et latéral, ainsi que le striatum et le pallidum ventraux (Lundström et al., 2011; Seubert et al., 2013) (Figure 6).

Nous détaillerons ici le COF et l'hippocampe, qui sont des structures qui nous intéresseront plus particulièrement dans la suite de cette introduction pour leur implication respective dans la flexibilité cognitive et la mémoire qui sont également impactées par le vieillissement.

1.3.2.1. Le cortex orbitofrontal lie les inputs olfactifs avec des fonctions cognitives de plus haut niveau

Parmi les structures olfactives secondaires, le COF représente la principale cible corticale du cortex olfactif primaire et est donc considéré comme constituant le cortex olfactif secondaire en tant que tel. Il a été étudié principalement chez l'humain grâce à des approches comportementales couplées à l'imagerie cérébrale. Le COF permet de coder de nombreux aspects de la perception olfactive, dont la valeur hédonique des odeurs (Rolls et al., 2003) et le degré de familiarité (Royet et al., 2001). De plus, une étude chez le singe a montré que l'aire olfactive du COF permettrait une discrimination plus fine et spécifique des odeurs que le cortex piriforme (Tanabe et al., 1975). Le COF reçoit également des informations issues de différentes modalités sensorielles (Rolls and Baylis, 1994; Rolls et al., 2003; Royet et al., 2000), ce qui lui permettrait de jouer un rôle dans l'intégration multisensorielle.

Il existe des variations anatomiques considérables dans l'organisation du COF entre les espèces de mammifères, suggérant qu'il ne sous-tend pas exactement les mêmes comportements chez toutes les espèces. En effet chez le rongeur, le cortex préfrontal est agranulaire, ainsi le COF du rongeur n'est homologue que des parties agranulaires du COF des primates (Schoenbaum et al., 2009; Stalnaker et al., 2015; Wise, 2008). Chez le rongeur, le COF a particulièrement été étudié dans des contextes d'apprentissage associatif avec règle inversée (Banerjee et al., 2020; Izquierdo et al., 2017). Le COF joue un rôle crucial dans l'adaptation du comportement dans des paradigmes d'apprentissage associatif

olfactif avec règle inversée (Roesch et al., 2007; Schoenbaum et al., 2002, 2006, 2009). En effet, dans une tâche d'apprentissage associatif olfactif avec inversion de règle, les neurones du COF et du cortex piriforme répondent sélectivement à l'odeur associée à la récompense. Quand la règle est inversée, seuls les neurones du COF inversent leur préférence de décharge pour la nouvelle odeur associée à la récompense ce qui n'est pas le cas des neurones du cortex piriforme (Roesch et al., 2007; Schoenbaum et al., 2006). De plus la lésion du COF par infusion de NMDA (lésion excitotoxique) empêche les animaux d'acquérir la nouvelle règle (Schoenbaum et al., 2002), ce qui démontre l'implication du COF dans le processus de flexibilité cognitive (la capacité à s'adapter à une nouvelle règle).

1.3.2.2. L'hippocampe lie les informations olfactives avec la mémoire

En plus du COF, l'hippocampe, qui joue un rôle essentiel dans la navigation et la mémoire spatiales ainsi que dans la formation de la mémoire déclarative, reçoit aussi des informations olfactives. Le cortex entorhinal transfère des informations à l'hippocampe via la voie perforante directement dans le gyrus denté, et via la voie temporo-ammonique à la région CA1 de l'hippocampe. Une étude récente en imagerie calcique biphotonique a révélé que l'identité des odeurs est représentée de manière robuste dans le gyrus denté, ce qui permettrait d'encoder les informations olfactives nécessaires à la discrimination de deux odorants dans le contexte d'un conditionnement de peur à l'odeur (Woods et al., 2020). Plus particulièrement, c'est le transfert d'informations olfactives du cortex entorhinal latéral vers les cellules granulaires du gyrus denté qui est nécessaire à l'encodage hippocampique des informations olfactives. De plus, ces représentations des odeurs dans l'hippocampe sont modulées et renforcées par un apprentissage associatif olfactif (avec renforcement positif) (Woods et al., 2020). En effet, après l'apprentissage associatif, les neurones du gyrus denté sont moins susceptibles de répondre à de multiples odorants, réduisant ainsi le chevauchement des représentations d'odeurs différentes. Par ailleurs, la voie directe entre la région latérale du cortex entorhinal et la région dorsale de CA1 de l'hippocampe est nécessaire pour l'apprentissage associatif olfactif (Li et al., 2017). En effet, l'inhibition optogénétique des terminaisons des projections du cortex entorhinal latéral dans la région dorsale de CA1 empêche les animaux d'améliorer leurs performances au cours de l'apprentissage associatif olfactif.

Les odeurs sont donc traitées par un vaste réseau de structures cérébrales, pouvant interagir de manière réciproque. Dans la suite de cette introduction, nous allons voir comment des altérations structurales et fonctionnelles de ces structures olfactives conduisent à des altérations de divers aspects de la perception olfactive au cours du vieillissement. Du fait de son lien privilégié avec les systèmes associés à l'apprentissage et à la mémoire, le système olfactif apparaît comme un modèle pertinent pour accéder aux mécanismes cellulaires et moléculaires des troubles cognitifs liés au vieillissement.

2. Les déficits olfactifs : un marqueur du vieillissement ?

L'effet du vieillissement a été étudié sur de nombreux aspects de la perception olfactive, mais les mécanismes sous-jacents ne sont pas encore tous connus. Des similitudes ont été observées entre l'humain et l'animal en termes de déficits fonctionnels, d'où l'intérêt d'utiliser l'animal pour mieux comprendre les bases cellulaires du vieillissement olfactif. On estime qu'une personne sur deux âgée de plus de 50 ans est atteinte de déficits olfactifs (Doty and Kamath, 2014; Lafreniere and Mann, 2009; Manesse et al., 2021). Cette prévalence augmente à 75 % chez les plus de 80 ans. Ces déficits ne sont donc pas anecdotiques et leurs conséquences sont alarmantes sur la qualité de vie et la santé des sujets âgés.

2.1. Déficits olfactifs liés au vieillissement chez l'humain

La presbyosmie désigne la diminution progressive des fonctions olfactives liée au vieillissement normal (Goncalves and Goldstein, 2016). De nombreuses approches sont disponibles pour identifier la nature et le degré de dysfonctionnement de l'odorat chez les sujets âgés. Elles comprennent des tests psychophysiques (ex : test de détection, d'identification, de discrimination, de mémoire des odeurs), des enregistrements électrophysiologiques (ex : potentiels évoqués à l'odeur) et d'imagerie cérébrale (ex : IRM). Pour chaque paramètre, plusieurs paradigmes de tests psychophysiques existent et tous sont concordants dans la mise en évidence de déficits liés au vieillissement (Croy et al., 2014; Doty and Kamath, 2014).

Les déficits olfactifs sont caractérisés par des troubles quantitatifs qui peuvent aller de l'hyposmie qui est une diminution partielle de l'odorat à l'anosmie qui est une perte totale de l'odorat. Ces troubles quantitatifs sont caractérisés par un seuil de détection des odeurs plus élevé que la moyenne de la population, mais également des difficultés dans la discrimination et l'identification des odeurs. Des troubles de nature qualitative peuvent également apparaître et se caractérisent par une perception erronée de la qualité des odeurs.

2.1.1. Altération de tous les aspects de la perception olfactive

2.1.1.1. Élévation du seuil de détection

Le seuil absolu de détection représente la concentration d'odorant la plus faible qu'une personne puisse détecter. Parmi tous les aspects de la perception olfactive qui sont altérés au cours du vieillissement, le seuil de détection est celui qui est altéré de manière la plus drastique (Hummel et al., 2007). L'ensemble des tests de détection révèle des altérations significatives liées à l'âge et ce dès 30 ans (Hummel et al., 2007). En effet, le seuil de détection augmente fortement avec l'âge puisque les capacités de détection olfactive diminuent de 20% chez les sujets âgés de plus de 55 ans comparés aux jeunes âgés de 16 à 35 ans. Cette augmentation est observée pour les odeurs alimentaires (Schiffman et al., 1976; Schubert et al., 2017a) et non alimentaires (Larsson et al., 2006; Stevens and Cain, 1987) y compris celles à caractère dangereux (Stevens and Cain, 1987; Stevens et al., 1982).

De plus, les seuils de détection mettent en lumière une variabilité au sein et entre les individus, qui est accentuée chez les sujets âgés de 69 à 91 ans comparés aux sujets jeunes âgés de 19 à 26 ans (Stevens and Dadarwala, 1993).

2.1.1.2. Diminution de la capacité d'identification des odeurs

L'identification d'une odeur consiste à reconnaître et nommer cette odeur. Les tests d'identification les plus fréquemment utilisés (Doty and Kamath, 2014) sont l'UPSIT (University of Pennsylvania Smell Identification Test) (Doty et al., 1984) et l'ETOC (European Test of Olfactory Capabilities) plus particulièrement élaboré pour effectuer des études transculturelles et mesurer le déclin des performances olfactives lié à l'âge (Thomas-Danguin et al., 2003). Dans ces tests, une odeur est présentée au participant, qui doit l'identifier parmi une liste de quatre propositions écrites. Ces tests ont révélé que les performances maximales d'identification sont observées entre 16 et 35 ans, puis qu'elles diminuent significativement à partir de 55 ans (Doty et al., 1984; Hummel et al., 2007; Lehrner et al., 1999; Stevens and Cain, 1987). Toutefois, ce déclin de la capacité d'identification olfactive peut dépendre du type d'odorant utilisé puisque l'identification des odorants non plaisants apparaît insensible au vieillissement (Konstantinidis et al., 2006).

2.1.1.3. Réduction de la capacité de discrimination olfactive

La discrimination représente la capacité à différencier deux odorants l'un de l'autre. L'humain peut distinguer des molécules odorantes qui ne diffèrent structurellement que par un seul carbone (Laska and Teubner, 1999). Les performances de discrimination olfactive sont meilleures chez le jeune adulte (16 à 35 ans) que chez l'enfant (moins de 16 ans). Ces performances diminuent ensuite légèrement jusqu'à 55 ans, puis déclinent plus sévèrement au-delà (Hummel et al., 2007). Ces déficits concernent également les odeurs alimentaires (Kaneda et al., 2000; Schiffman and Pasternak, 1979).

2.1.1.4. Altération de la mémoire olfactive

Pour étudier la mémoire olfactive chez l'humain, des tâches de reconnaissance sont utilisées. Lors de l'encodage, un groupe d'odeurs cibles est présenté aux participants qui doivent, lors du rappel, les reconnaître parmi un panel d'odeurs distractrices qui leur est présenté, en indiquant si l'odeur est « nouvelle » ou « ancienne » (faisant partie des odeurs présentées dans la première partie du test). Ces tests, qui permettent d'évaluer la mémoire olfactive épisodique, sont très souvent suivis par des tests d'identification des odeurs qui permettent également d'évaluer la mémoire sémantique des odeurs (capacité à se rappeler des noms d'odeurs). L'ensemble de ces tests a permis d'identifier une diminution des performances de la mémoire olfactive au cours du vieillissement et qui peut commencer dès 40 ans (Choudhury, 2003; Croy et al., 2015; Larsson et al., 2006, 2016; Lehrner et al., 1999; Stevens et al., 1990). Une étude ayant séparé des odeurs familières (ex : tabac, liquide vaisselle) et des odeurs jugées moins familières (ex : feuilles de boulot, huile de rose) n'a pas mis en évidence de différences liées à l'âge pour les odeurs non familières alors que l'identification des odeurs familières est réduite avec l'âge. Cela suggère que les odeurs familières évoqueraient des informations sémantiques et contextuelles dans une plus

grande mesure que les odeurs non familières (Larsson et al., 2006), ce qui rendrait leur identification plus vulnérable au vieillissement.

2.1.2. Conséquences des déficits olfactifs sur la qualité de vie et la santé

Pour les sujets normosmiques (i.e. ayant des capacités olfactives normales), il est difficile d'imaginer ce que c'est que de vivre sans odorat, pourtant les changements de la perception olfactive ont de fortes implications sur les activités de la vie quotidienne.

Dans le règne animal, l'olfaction est nécessaire pour identifier les sources de nourriture, les prédateurs, mais également les partenaires sexuels, ce qui la rend indispensable pour la survie des espèces. Chez l'humain, l'olfaction est toute aussi importante puisqu'elle permet d'évaluer la comestibilité des aliments (Stevenson, 2010), prévenir des dangers (fuite de gaz, incendie, poison) et joue un rôle dans les relations sociales. En effet, les molécules sécrétées par le corps humain pourraient non seulement influencer le choix du partenaire sexuel (Kromer et al., 2016), mais également induire des comportements d'attraction ou d'évitement (Ferdenzi et al., 2016), l'activation du système immunitaire (Olsson et al., 2014) et la contagion émotionnelle (de Groot et al., 2015). Cela est possible parce-que l'humain peut percevoir des informations sur le sexe, l'âge, l'état de santé et l'état émotionnel d'un congénère dans son odeur corporelle (Ferdenzi et al., 2016; de Groot et al., 2015). Ainsi, toutes ces fonctions permises par l'olfaction sont atteintes chez les personnes présentant des déficits olfactifs (Croy et al., 2014), y compris les sujets âgés.

Au-delà de ces gênes dans la vie quotidienne, les troubles olfactifs ont des conséquences encore plus dramatiques sur la santé physique et mentale des individus. En effet, l'olfaction permet non seulement de détecter les sources de nourriture, mais elle permet également d'en apprécier les qualités (Islam et al., 2015; Proserpio et al., 2017). Or ne plus sentir l'odeur des aliments affecte le plaisir de manger et plus généralement le comportement alimentaire (Hummel and Nordin, 2005; Islam et al., 2015). Par exemple, certaines personnes présentant des troubles de l'olfaction consomment de la nourriture plus riche en calories car elle est plus savoureuse (Kershaw and Mattes, 2018) ce qui conduit à une prise de poids, alors que d'autres vont au contraire réduire leur prise alimentaire par manque de plaisir à manger (Aschenbrenner et al., 2008). Chez les sujets âgés, les pertes olfactives ont des répercussions directes sur le poids des individus et représentent un facteur de risque pour les déficiences nutritionnelles et immunitaires (Schiffman and Graham, 2000). Pour aller dans ce sens, une étude récente ayant réalisé une analyse en composante principale a montré une association positive entre les capacités de discrimination olfactive et l'index de masse corporelle chez des sujets âgés de 58 à 85 ans (Aiello et al., 2019).

En plus des troubles de santé physique, de nombreuses études ont établi l'existence de liens étroits entre les troubles olfactifs et les troubles dépressifs (Croy and Hummel, 2017; Croy et al., 2014; Kohli et al., 2016; Rochet et al., 2018). En effet, certaines structures cérébrales olfactives sont impliquées dans l'étiologie de la dépression. Il a ainsi été montré qu'un volume plus faible du bulbe olfactif n'était pas seulement un indicateur d'anosmie, mais également de dépression (Negoiias et al., 2010). Du point de vue comportemental, une étude récente a montré que des patients dépressifs présentaient également des troubles de l'olfaction, notamment une réduction des capacités d'identification des odeurs (Kamath et al., 2018). Par ailleurs, il est important de souligner que les troubles de la qualité

de vie engendrés par les pertes olfactives peuvent entraîner la crainte de subir des accidents domestiques, perturber des activités plaisantes liées aux odeurs chez les personnes concernées et ainsi affecter leur bien-être. Ainsi, les personnes souffrant de déficits olfactifs présentent un risque accru de dépression (Kohli et al., 2016; Rochet et al., 2018).

Enfin, le déclin olfactif est un biomarqueur prédictif de mortalité (Gopinath et al., 2012; Liu et al., 2019a; Schubert et al., 2017b). Cependant, on ne sait pas exactement pourquoi la presbyosmie serait un facteur de risque de mortalité, et des recherches supplémentaires sont nécessaires pour élucider les mécanismes sous-jacents.

En conclusion, au cours du vieillissement, tous les aspects de la perception olfactive sont altérés chez l'humain. Ces déficits sont fréquents et graves en termes de conséquences sur la santé mentale et physique des sujets âgés. Certains changements structuraux ont été mis en évidence dans le système olfactif des sujets âgés et sous-tendraient les altérations fonctionnelles décrites. En effet, un certain nombre d'altérations au niveau de la structure réceptrice et des différentes régions cérébrales impliquées dans le traitement de l'information olfactive a été associé avec des déficits olfactifs (Doty and Kamath, 2014).

2.1.3. Causes possibles des pertes olfactives liées au vieillissement

En raison de la difficulté d'obtenir des échantillons, les informations concernant les changements histologiques liés à l'âge dans l'épithélium olfactif humain et dans les structures plus centrales sont très limitées. Toutefois, de rares études à partir de biopsies ou d'échantillons prélevés post-mortem ont montré des changements liés à l'âge dans la nature et l'intégrité de l'épithélium et du bulbe olfactifs (voir Doty and Kamath, 2014; Kondo et al., 2020 pour revues).

2.1.3.1. Atteintes périphériques

Au niveau périphérique, les atteintes observées pourraient conduire à la diminution du nombre de NSO et ainsi avoir pour conséquence de diminuer la sensibilité olfactive. Une des premières observations vient de Krmpotić-Nemanić en 1969 qui a noté que les individus plus âgés présentent une diminution de la taille et du nombre des orifices de la lame criblée de l'ethmoïde, ce qui provoquerait l'élimination des axones olfactifs rejoignant le BO depuis l'EO (Krmpotić-nemanić, 1969). Par la suite, d'autres études ont observé la raréfaction de l'EO et son remplacement par de l'épithélium respiratoire, ainsi que de nombreuses zones complètement déplétées en NSO (Nakashima et al., 1984; Paik et al., 1992). Cette déplétion en NSO peut s'expliquer par leur dégénérescence, que suggère l'observation de leur cytoplasme fortement vacuolisé (Paik et al., 1992). Toutefois, une étude récente a montré qu'à l'âge moyen (40-50 ans), une importante proportion de NSO immatures reste présente dans l'EO humain suggérant que la production de nouveaux NSO reste maintenue à cet âge (Durante et al., 2020).

Une étude a utilisé l'imagerie calcique sur des biopsies d'épithélium pour étudier la réponse des NSO aux odeurs chez les sujets âgés (Rawson et al., 2012). Les résultats ont révélé que des réponses calciques se produisaient autant dans les NSO des sujets âgés que dans les NSO des sujets jeunes à la suite de l'exposition à des mélanges odorants.

Cependant alors que les NSO des sujets jeunes ne répondaient qu'à un seul des deux mélanges testés, la plupart des NSO des sujets âgés répondaient aux deux mélanges. Ces résultats indiquent que l'amplitude de la réponse des NSO aux odeurs n'est pas affectée par le vieillissement, mais que sa spécificité vis à vis de l'odeur diminuerait avec l'âge (Rawson et al., 2012). Ces changements périphériques pourraient contribuer à de moins bonnes capacités d'identification et de discrimination des odeurs chez les sujets âgés.

En plus de ces changements, une altération du cycle nasal au cours du vieillissement pourrait participer aux pertes olfactives liées à l'âge. Le cycle nasal est défini comme une fluctuation de l'engorgement nasal et du flux d'air sur des périodes de 1 à 5 heures (Mirza et al., 1997). Bien que décrit pour la première fois il y a plus de 100 ans (Kayser, 1895), ce cycle présente de nombreuses caractéristiques méconnues et même son rôle est encore débattu (Kahana-Zweig et al., 2016). Toutefois il a été proposé qu'un débit nasal donné optimiserait la perception d'un ensemble d'odeurs en fonction de la solubilité de l'odeur, optimisant chaque narine pour des odeurs différentes (Scott et al., 2014). Ce flux d'air nasal cyclique est altéré au cours du vieillissement puisque trois quarts des sujets âgés de plus de 50 ans n'ont plus ce cycle, ce qui participerait également à la diminution de la sensibilité olfactive (Doty and Kamath, 2014; Mirza et al., 1997).

2.1.3.2. Atteintes centrales

En plus de ces altérations périphériques, des atteintes centrales ont également été rapportées chez les sujets âgés.

Les analyses morphométriques ont principalement été réalisées dans le BO. Des premières études ont décrit une atrophie de la couche glomérulaire au cours du vieillissement et ont conclu qu'elle serait consécutive à une atrophie de l'EO (Smith, 1942). Par la suite, des analyses post-mortem du BO de femmes âgées de 25 à 102 ans ont montré une diminution statistiquement non significative du volume des couches du BO et, par conséquent, du volume total de ce dernier (Bhatnagar et al., 1987). La diminution du volume du BO a été confirmée par une étude d'imagerie qui montre que son volume augmente jusqu'à 40 ans puis diminue ensuite progressivement en parallèle du score d'identification dans le test de l'UPSIT (Yousem et al., 1998). De plus, une diminution drastique du nombre de glomérules et de cellules mitrales a été observée à raison de 10% tous les 10 ans (Bhatnagar et al., 1987; Meisami et al., 1998). Cette diminution pourrait contribuer aux déficits de détection et d'identification des odeurs au cours du vieillissement. En plus de ces changements morphologiques du BO, des études en imagerie chez des sujets âgés de 20 à 77 ans ont également révélé une diminution de volume de plusieurs autres structures olfactives dont l'amygdale, le cortex entorhinal, et le COF, et que ces changements corrélaient avec les performances olfactives (Segura et al., 2013; Shen et al., 2013). En revanche, aucun changement volumétrique lié à l'âge n'a été observé dans le cortex piriforme (Shen et al., 2013).

Du point de vue fonctionnel, les études d'imagerie ont révélé que l'activation des régions olfactives centrales en réponse à une odeur, y compris le cortex piriforme, le cortex entorhinal, l'amygdale et le COF diminue avec l'âge chez des sujets âgés de 60 à 80 ans par rapport à des sujets jeunes adultes (Cerf-Ducastel and Murphy, 2003; Wang et al., 2005). En revanche, dans une cohorte de sujets âgés de 22 à 64 ans ce déclin fonctionnel lié à l'âge est plus important dans les structures olfactives centrales secondaires et supérieures, telles

que le COF, le cortex préfrontal dorso-latéral et l'insula, que dans le cortex piriforme (Wang et al., 2017).

Enfin, une étude EEG menée sur 140 participants sains âgés de 16 à 79 ans a montré une altération significative de la réponse en potentiels évoqués par l'odeur (Murphy et al., 2000). Plus particulièrement, il a été montré que les ondes N1 et P2 qui représentent le traitement sensoriel du stimulus olfactif, ont des amplitudes plus faibles et des latences plus longues chez les sujets âgés que chez les sujets jeunes (Murphy et al., 2000). Une diminution de l'amplitude et un allongement de latence de l'onde P3 ont également été rapportés, ce qui reflète un déficit de mobilisation des ressources utilisées pour le traitement cognitif de l'odeur chez les sujets âgés (Murphy et al., 2000). Cette dernière observation est cohérente avec la diminution d'activation observée en IRMf dans les cortex olfactifs secondaires et d'ordre supérieur (Cerf-Ducastel and Murphy, 2003; Wang et al., 2005, 2017).

En résumé, les troubles olfactifs liés à l'âge affectent tous les aspects de la perception olfactive chez l'humain et induisent de nombreuses conséquences néfastes qui sont plutôt bien documentées. Malgré cela et malgré la prévalence de ces déficits, leurs bases neurales et cellulaires restent peu connues ce qui limite leur prise en charge ainsi que le développement de stratégies de remédiation face au vieillissement. Par ailleurs, pour étudier l'incidence de ces déficits et les changements individuels, il est nécessaire d'avoir recours à des études longitudinales. Pour toutes ces raisons, le modèle animal apparaît comme pertinent pour étudier les bases cellulaires et neurales du vieillissement olfactif. Le rongeur est particulièrement un bon modèle puisque son système olfactif partage de nombreux traits communs avec celui de l'humain, à commencer par son organisation anatomique, la nature du traitement des informations olfactives aux niveaux moléculaire et synaptique, mais également les aspects comportementaux guidés par les odeurs (Lane et al., 2020; Tzeng et al., 2021).

2.2. Le rongeur : un modèle d'étude du vieillissement olfactif permettant l'accès aux bases cellulaires

Comme chez l'humain, des troubles olfactifs d'ordre quantitatif apparaissent au cours du vieillissement chez le rongeur. Ces troubles concernent à la fois la détection, la discrimination et la mémoire olfactives.

L'espérance de vie est assez courte chez le rongeur puisqu'elle est de 24 mois chez la souris et 36 mois chez le rat en laboratoire. Dans la littérature, il n'y a pas de consensus clair sur ce qu'est un rongeur jeune adulte, un rongeur d'âge moyen et un rongeur âgé. Dans la suite de cette introduction nous considérerons respectivement la souris et le rat comme jeunes adultes à 2 et 2-3 mois, d'âge moyen à 12 mois chez la souris et 18 mois chez le rat, et âgés à partir de 18 mois chez la souris et 24 mois chez le rat.

2.2.1. Le rongeur âgé présente des déficits fonctionnels olfactifs similaires à l'humain

2.2.1.1. Altération des seuils de détection

Chez le rongeur, le test le plus souvent utilisé pour évaluer le seuil de détection d'une odeur est un apprentissage associatif olfactif. Durant la phase de conditionnement, l'animal apprend à associer une odeur présentée de manière supraliminaire avec une récompense alimentaire ou hydrique, versus de l'air non odorisé non récompensé (Kraemer and Apfelbach, 2004; Mandairon et al., 2009; Patel and Larson, 2009; Sultan et al., 2010). Une fois la tâche acquise, la concentration de l'odeur est diminuée progressivement jusqu'à ce que la performance diminue nettement, reflétant une réponse comportementale obéissant au hasard. Le seuil olfactif est alors défini comme étant la concentration la plus faible à laquelle l'animal parvient encore à trouver la récompense.

Un test de détection peut également être utilisé pour définir les seuils (Schilit Nitenson et al., 2015). Dans cette tâche, la présentation d'huile minérale qui n'a pas d'odeur précède la présentation d'un odorant. Lorsque le temps d'investigation de l'odorant augmente par rapport au temps d'investigation de l'huile minérale, cela indique que l'animal détecte l'odorant.

Plusieurs études ont ainsi permis de montrer que les seuils de détection des odorants sont plus élevés chez les souris âgées de 24 mois et les rats âgés de 27 à 32 mois que chez les jeunes adultes (Kraemer and Apfelbach, 2004; Patel and Larson, 2009). En revanche la détection reste possible à des concentrations plus élevées, indiquant que les animaux testés ne sont pas anosmiques.

2.2.1.2. Réduction des capacités de discrimination

Les principales méthodes pour évaluer les capacités de discrimination olfactive chez les rongeurs sont les apprentissages associatifs olfactif ou les tâches d'habituation/déshabituations.

Dans la tâche d'apprentissage associatif olfactif l'animal doit apprendre à associer une odeur à une récompense alors qu'une autre odeur n'est jamais récompensée. Ce type de test nécessite que l'animal apprenne et retienne l'association odeur/récompense, mais également qu'il discrimine les deux odeurs proposées. La tâche d'habituation/déshabituations, quant à elle, consiste en plusieurs présentations successives d'un premier odorant (appelé odorant d'habituation), suivies d'une présentation d'un deuxième odorant test. Le temps d'exploration diminue au cours des premières présentations car l'odorant ne représente plus un stimulus nouveau pour l'animal, qui s'en désintéresse. C'est ce qu'on appelle la phase d'habituation. Lors du dernier essai, une nouvelle odeur est présentée à l'animal. Si le temps d'exploration augmente lors de ce dernier essai par rapport au dernier essai de la phase d'habituation, cela indique que l'animal considère cet odorant comme nouveau et donc le discrimine du premier. Si le temps d'exploration continue de diminuer ou reste stable, l'animal ne discrimine pas les deux odorants.

Quelle que soit la tâche utilisée, il apparaît que les rongeurs âgés (de 18 mois à 23 mois) sont toujours capables de discriminer deux odorants très éloignés d'un point de vue

perceptif, cependant la discrimination de deux odorants perceptivement proches n'est plus possible (Enwere, 2004; Kraemer and Apfelbach, 2004; Moreno et al., 2014; Rey et al., 2012; Schoenbaum et al., 2002; Yoder et al., 2017). Toutefois les résultats liés à la tâche d'apprentissage associatif sont plus difficiles à interpréter car ils pourraient refléter aussi bien un déficit dans la capacité à discriminer les odeurs qu'un déficit dans la capacité de l'animal à associer l'odeur à sa récompense. Ainsi mesurer les capacités de discrimination avec un protocole d'habituation/déshabituation semble plus approprié.

2.2.1.3. Déficiences d'apprentissages et de mémoire olfactifs

Plusieurs paradigmes expérimentaux ont été développés pour évaluer les capacités d'apprentissage et de mémoire olfactifs des rongeurs. Parmi eux, nous nous focaliserons sur l'apprentissage perceptif qui est une forme d'apprentissage implicite sans renforcement qui existe dans toutes les modalités sensorielles (Gilbert et al., 2001). Dans la version olfactive de cet apprentissage, l'animal apprend à discriminer deux odorants perceptivement similaires, non discriminés spontanément, à la suite d'une exposition répétée à ces mêmes odorants (Mandairon et al., 2006a). L'exposition répétée à des odorants pendant 10 jours permet ainsi à des rongeurs jeunes adultes d'acquérir la capacité à discriminer deux odorants similaires sur le plan perceptif. Cependant, cette capacité est perdue chez les souris âgées de 18 mois (Moreno et al., 2014). En revanche, une autre forme d'enrichissement olfactif, consistant en l'exposition à de nouvelles odeurs chaque jour pendant 30 jours permet d'augmenter les capacités de discrimination entre odorants non discriminés spontanément chez les souris jeunes adultes mais également chez les souris âgées de 23 mois (Rey et al., 2012).

Il est également possible de tester la mémoire olfactive avec un test de reconnaissance d'odeurs dans lequel l'animal doit reconnaître une odeur familière après un temps variable de rétention (Rochefort et al., 2002; Veyrac et al., 2009). Ce test a permis de révéler des déficits de mémoire à court terme au cours du vieillissement. En effet, une étude précédente de notre équipe a montré que des souris jeunes adultes pouvaient mémoriser une odeur pendant 15 min, alors que des souris âgées de 23 mois n'en étaient pas capables dans le contexte de l'expérience avec une phase d'acquisition de 2 min (Rey et al., 2012). L'exposition à des odeurs pendant 30 à 40 jours peut multiplier ce temps de rétention par 8 chez la souris jeune adulte et par 2 chez la souris d'âge intermédiaire (10 mois), mais devient inefficace chez la souris âgée de 23 mois (Rey et al., 2012; Rochefort et al., 2002).

Enfin, il est également possible d'utiliser l'apprentissage associatif pour évaluer la mémoire olfactive. Bien que dans la plupart des cas les animaux âgés parviennent à associer une odeur à une récompense (Dardou et al., 2008; Kraemer and Apfelbach, 2004; Patel and Larson, 2009), ces études montrent que la vitesse d'apprentissage des animaux âgés est généralement plus lente que celle des jeunes adultes (Dardou et al., 2008; Patel and Larson, 2009). Dans une étude chez la souris âgée de 24 mois, la rétention de l'apprentissage était identique à celle de jeunes adultes deux semaines après la phase d'apprentissage (Patel and Larson, 2009). Toutefois une étude chez le rat âgé de 23 mois a montré que des déficits de rétention apparaissent dès 72h après l'apprentissage puisqu'à ce délai 25% des rats ne se rappellent pas l'apprentissage (Dardou et al., 2008).

En résumé, les rongeurs présentent des déficits olfactifs fonctionnels similaires à l'humain (Figure 7). Toutefois la plupart des études a effectué des comparaisons entre des âges extrêmes (très âgés versus jeunes adultes) et peu d'entre elles ont caractérisé la chronologie d'apparition de ces déficits, ce qui serait néanmoins important à faire pour mieux comprendre le déclin progressif des déficits olfactifs liés à l'âge et les mécanismes cellulaires sous-jacents. L'organisation du système olfactif des rongeurs étant la même que celle de l'humain, ce modèle va permettre d'étudier plus finement les bases neurales du vieillissement olfactif.

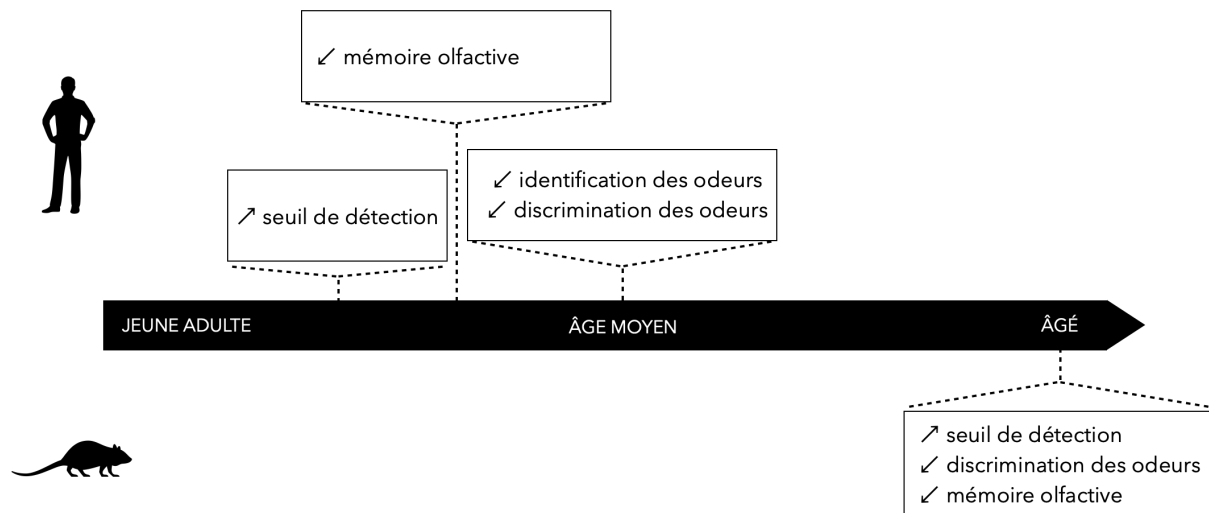


Figure 7. Résumé des déficits olfactifs liés au vieillissement chez l'humain et le rongeur.

Les rongeurs présentent des déficits olfactifs fonctionnels similaires à l'humain. Sur ce graphique, chaque déficit est positionné à l'âge le plus précoce auquel il a été détecté dans la littérature. Alors que ces troubles apparaissent précocement chez l'humain, la chronologie d'apparition de ces déficits est mal connue chez le rongeur car la plupart des tests sont effectués chez les rongeurs âgés voire très âgés.

2.2.2. Altérations structurales pouvant sous-tendre les déficits olfactifs au cours du vieillissement

2.2.2.1. Atteintes périphériques au cours du vieillissement

Comme chez l'humain, des changements liés à l'âge apparaissent dans l'épithélium olfactif des rongeurs, notamment une diminution de son épaisseur accompagnée d'une diminution du nombre de NSO (Conley et al., 2003; Hinds and McNelly, 1981; Lee et al., 2009; Ueha et al., 2018). Si cette diminution semble être due à une augmentation de la mort neuronale chez les rats âgés de 32 mois (Conley et al., 2003), ces résultats n'ont pas été confirmés chez la souris âgée. En effet, une équipe a quantifié le nombre de NSO en apoptose et a montré que ce nombre diminuait chez les souris âgées de 16 mois, suggérant une diminution du renouvellement des NSO dans l'EO des souris âgées comparé aux souris jeunes (Kondo et al., 2010). Par ailleurs, l'observation d'une stabilité du diamètre et du nombre de glomérules dans le BO de souris âgées de 24 mois indique une stabilité des projections des NSO vers les glomérules, ce qui contredit l'idée d'une perte massive de NSO au cours du vieillissement (Richard et al., 2010).

Les études semblent s'accorder sur le fait qu'il y aurait une altération du renouvellement des NSO (Kondo et al., 2010; Li et al., 2020; Ueha et al., 2018; Weiler and Farbman, 1997). Plus précisément, ce serait le nombre de cellules en division, de NSO immatures et matures qui diminuerait au cours du vieillissement alors que le nombre de progéniteurs resterait stable, indiquant un déficit de prolifération (Ueha et al., 2018). Toutefois une étude a montré que la partie postérieure de l'épithélium serait mieux préservée que la partie antérieure suggérant que l'exposition à l'environnement externe contribuerait à la perte neuronale au cours du vieillissement (Loo et al., 1996). Dans la partie postérieure, le nombre de cellules en prolifération et de neurones immatures est diminué alors que la prolifération est très active dans la partie antérieure ce qui permettrait de compenser partiellement la perte neuronale (Loo et al., 1996). Une étude a également montré que l'ablation des NSO par injection intrapéritonéale de methimazole, une drogue induisant la déplétion des NSO, induit un déficit de détection des odeurs jusqu'à ce que le processus de neurogenèse remplace les NSO perdus, un processus moins efficient chez les souris âgées de 16 mois (Suzukawa et al., 2011).

La diminution de la formation de NSO matures dans l'EO est accompagnée d'une altération de la transcription des marqueurs de lignages cellulaires dans l'EO des souris âgées de 25 mois ainsi que d'une atténuation du recrutement de certaines cellules globulaires dans l'EO lésé chez les souris âgées avec une majorité qui reste quiescente (Li et al., 2020). Toutefois, dans un modèle de souris transgéniques d'EO lésé, l'activation de la voie de signalisation de Notch, impliquée dans la détermination du lignage neuronal et glial pendant le développement de l'EO, augmente la genèse de progéniteurs à partir de cellules globulaires dans l'EO de souris âgées au même niveau que chez les jeunes animaux. Cela suggère qu'il est encore possible de réactiver ces cellules dans l'EO âgé (Li et al., 2020).

Chez la souris âgée de 18 mois, il a également été observé que les cellules horizontales de l'épithélium olfactif subissent des changements métaboliques qui les conduisent à maintenir la barrière du tissu épithélial en générant des cellules respiratoires au lieu de cellules olfactives (Håglin et al., 2020). Comme chez l'humain, il apparaît donc que l'épithélium olfactif des rongeurs soit remplacé par de l'épithélium respiratoire au cours du vieillissement.

Ainsi, la dégradation de l'étage d'entrée de l'information sensorielle au cours du vieillissement serait l'un des mécanismes qui expliquerait les déficits olfactifs chez les rongeurs âgés. Cependant une étude a montré que bien que la densité cellulaire des NSO exprimant certains types de récepteurs olfactifs diminue à un âge avancé (24 mois), les NSO individuels peuvent conserver leur sensibilité (Lee et al., 2009). Une autre étude récente menée chez des souris âgées de 6 à 24 mois et qui a visualisé *in vivo* par imagerie optique, la libération de neurotransmetteurs dans les glomérules du BO en réponse à la présentation d'une odeur, a constaté que l'activation par les entrées sensorielles est assez stable au cours du vieillissement (Kass et al., 2018). Plus précisément, les réponses glomérulaires provoquées par les odeurs étaient semblables à tous les âges, et aucun effet de l'âge sur la sensibilité des réponses des NSO aux odeurs ou sur la discriminabilité neuronale des différentes cartes sensorielles n'ont été observés. Ces résultats suggèrent que le BO ne reçoit pas une entrée sensorielle détériorée au cours du vieillissement et que les circuits bulbaires locaux pourraient s'adapter pour maintenir une entrée nerveuse stable (Kass et al., 2018).

2.2.2.2. Altérations subtiles du bulbe olfactif au cours du vieillissement

Alors que les études chez l'humain ont rapporté une diminution des couches et du volume total du BO (Bhatnagar et al., 1987; Meisami et al., 1998; Yousem et al., 1998), les études chez l'animal présentent des résultats plus mitigés.

Une première étude chez le rat a rapporté une augmentation de la taille du BO au cours de la vie adulte, suivie par une diminution drastique du volume de toutes les couches à partir de 24 mois (Hinds and McNelly, 1977). Toutefois les altérations sont plus ou moins importantes selon la lignée de rats étudiée (Hinds and McNelly, 1977, 1981). Chez la souris, une étude a montré que le volume du BO augmente avec l'âge chez trois lignées différentes (Mirich et al., 2002). Cependant, deux études plus récentes ont rapporté un volume stable du BO et de ses couches au cours du vieillissement (Rey et al., 2012; Richard et al., 2010).

Concernant la densité cellulaire, il n'y a pas non plus de consensus clair. Certains auteurs décrivent une diminution du nombre de cellules mitrales entre 24 et 27 mois chez le rat (Hinds and McNelly, 1977), tandis que des données plus récentes indiquent une stabilité de la densité de cellules périglomérulaires, granulaires et mitrales jusqu'à un âge avancé chez la souris (Richard et al., 2010). Bien que la densité d'interneurones périglomérulaires et granulaires apparaisse stable au cours du vieillissement (Richard et al., 2010), leur renouvellement par la neurogenèse adulte apparaît limité (Enwere, 2004; Luo et al., 2006; Maslov et al., 2004; Moreno et al., 2014; Rey et al., 2012). En effet, précocement au cours du vieillissement (dès 10 mois), la prolifération des progéniteurs diminue au sein de la zone sous-ventriculaire (Enwere, 2004; Jin et al., 2003; Maslov et al., 2004; Rey et al., 2012) et la neurogenèse y est restreinte à la partie antéro-dorso latérale (Luo et al., 2006). Aucun effet de l'âge sur la cytoarchitecture du flux rostral migratoire n'a été observé mais la division des neuroblastes pendant leur migration est limitée, bien que l'efficacité de la migration ne semble pas affectée (Mobley et al., 2013). Ces altérations conduisent à une réduction de 65% du nombre de nouveaux neurones formés chez la souris âgée de 10 mois et de près de 80% chez la souris âgée de 23 mois (Enwere, 2004; Moreno et al., 2014; Rey et al., 2012). Tardivement dans le processus de vieillissement, à 23 mois, une diminution du taux de différenciation des nouveaux neurones est également observée (Rey et al., 2012). Ce mismatch entre l'absence de changements liés à l'âge dans le nombre d'interneurones bulbaires et la diminution drastique de l'apport de nouveaux interneurones au cours du vieillissement pourrait s'expliquer par une diminution de la mort neuronale. En accord avec cela, aucun marquage TUNEL, révélant les cellules en apoptose, n'a été observé dans le BO de souris âgées (Mirich et al., 2002). On ne sait cependant pas comment les nouveaux neurones en nombre réduit, s'intègrent dans le BO âgé, ni s'ils sont recrutés lors d'un apprentissage ou présentent le même type de plasticité structurale lors d'un apprentissage que ceux nés dans un BO de jeune adulte (Daroles et al., 2016; Forest et al., 2019; Mandairon et al., 2018).

Bien que le nombre de neurones dans le BO ne semble pas profondément affecté par le vieillissement, une étude a révélé des changements synaptiques dans certaines couches du BO. Ainsi, la densité synaptique diminue entre 2 et 24 mois dans la couche glomérulaire des souris mais pas dans la couche plexiforme externe, ce qui pourrait entraîner un déséquilibre dans les circuits du BO (Richard et al., 2010). Cette diminution pourrait provenir de la réduction de l'arborisation dendritique observée au cours du vieillissement sur les cellules périglomérulaires (Livneh and Mizrahi, 2011).

Plus récemment une étude a confirmé des déficits dans les mécanismes de plasticité dans le BO de souris âgées de 23 mois (Ahnaou et al., 2020). Notamment, dans le BO âgé et particulièrement dans les couches des cellules mitrales et granulaire il a été observé une augmentation des neurones H2AX-positifs, indiquant des dommages dans l'ADN de ces neurones. Il a également été observé des changements dans les oscillations du réseau du BO, notamment une diminution de l'amplitude des oscillations γ et de l'interaction temporelle entre les oscillations γ et la phase θ , reflétant une modification de la synchronisation de l'activité des cellules mitrales (Ahnaou et al., 2020). Cela pourrait contribuer au déclin des performances de discrimination et de mémoire olfactive observées au cours du vieillissement (Ahnaou et al., 2020).

2.2.2.3. Altérations des structures olfactives supérieures au cours du vieillissement

Les données sont particulièrement rares sur les effets du vieillissement normal sur les cortex olfactifs chez le rongeur.

Chez le rat, entre 3 et 33 mois, le volume, la densité cellulaire et la densité axonale apparaissent relativement stables dans le cortex piriforme (Curcio et al., 1985). Cependant, des enregistrements électrophysiologiques ont révélé une réduction des courants post-synaptiques miniatures excitateurs médiés par les récepteurs AMPA dans la partie antérieure du cortex piriforme chez les souris âgées de 24 à 28 mois, ce qui suggère une diminution de l'expression synaptique des récepteurs AMPA. Cela pourrait donc refléter un déclin de la fonction synaptique glutamatergique dans le cortex piriforme au cours du vieillissement (Gocel and Larson, 2013).

D'autres données provenant de la cartographie post-mortem de l'expression des gènes d'activation précoce (tels que *c-fos* ou *egr-1*) ont révélé une diminution de l'expression de la protéine c-Fos induite par l'odeur dans le cortex piriforme et l'amygdale basolatérale de rats âgés de 23 mois (Dardou et al., 2010) comparativement à des animaux jeunes adultes. De manière intéressante, dans une tâche d'apprentissage aversif olfactif, le réseau cérébral activé chez les rats âgés n'est que partiellement similaire à celui des jeunes adultes alors que leurs performances sont similaires. Notamment, alors que l'amygdale et les cortex piriforme et insulaire sont activés à tous les âges, l'hippocampe, le cortex entorhinal et le COF ne sont recrutés que chez l'animal âgé. Ces résultats suggèrent une réorganisation du réseau neuronal traitant l'information olfactive chez les rats âgés afin de lutter contre le vieillissement et préserver les performances comportementales (Dardou et al., 2010).

En résumé, les rongeurs présentent des altérations fonctionnelles olfactives similaires à l'humain au cours du vieillissement (à l'exception de l'identification qui n'est pas directement testable chez l'animal). Les bases cellulaires de ces déficits sont un peu mieux décrites chez le rongeur que chez l'humain mais les résultats sont encore épars et les données parfois contradictoires (Figure 8). Cette synthèse de la littérature souligne la nécessité de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents au vieillissement olfactif normal afin notamment de développer des moyens de lutte contre le vieillissement olfactif et également nous éclairer sur le vieillissement cérébral en général.

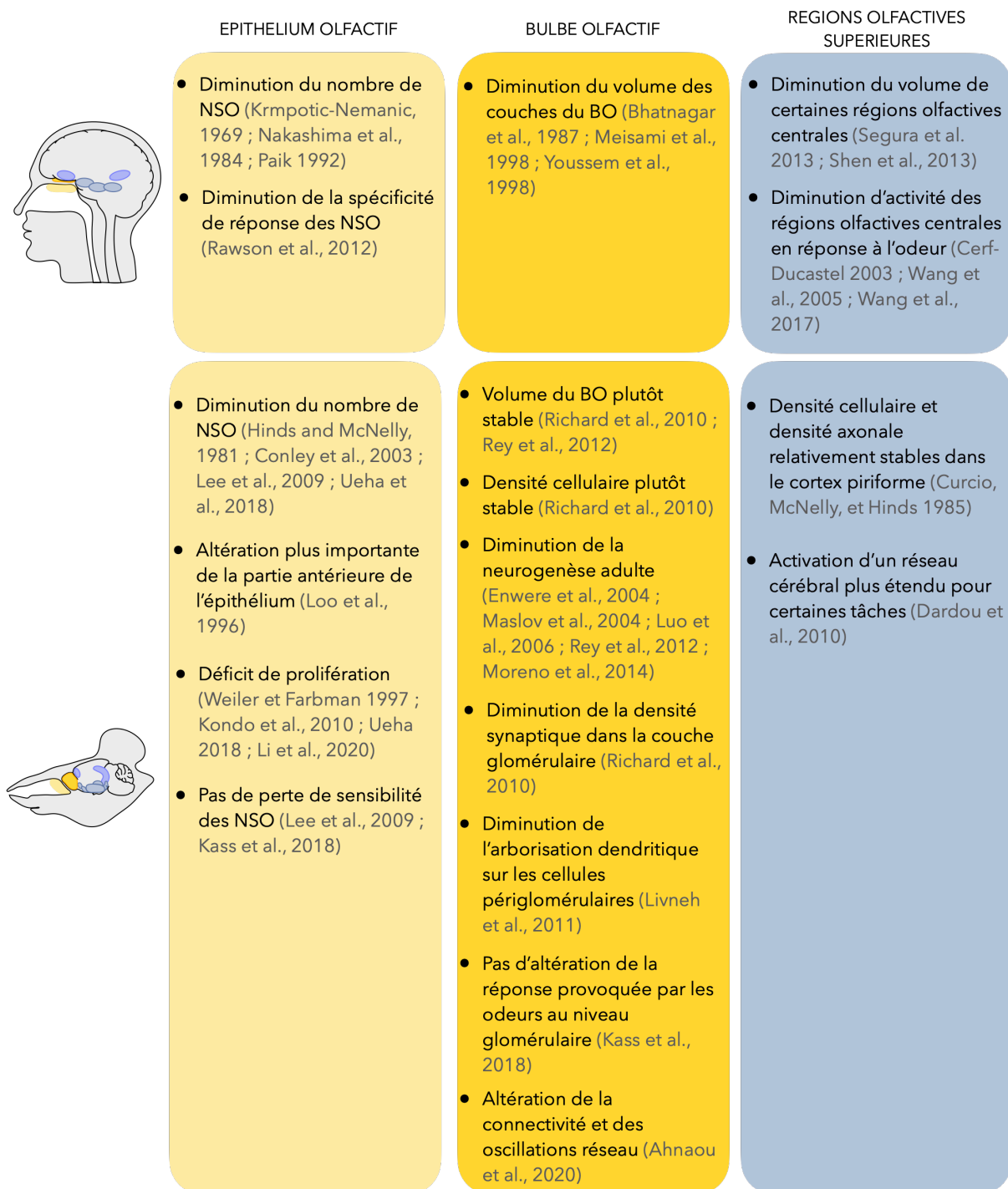


Figure 8. Bases cellulaires du vieillissement olfactif.

Résumé des modifications cellulaires, anatomiques et fonctionnelles observées au cours du vieillissement chez l'humain et chez le rongeur pour l'épithélium olfactif, le bulbe olfactif et les régions olfactives supérieures.

2.3. Association entre les déficits olfactifs et les altérations cognitives observées au cours du vieillissement

Le vieillissement normal s'accompagne d'un déclin progressif des fonctions cognitives au cours du temps (Toepper, 2017). Cela concerne les fonctions exécutives qui représentent l'ensemble des processus cognitifs de haut niveau permettant d'effectuer des

activités telles que la planification, l'organisation et l'élaboration de stratégies (Jurado and Rosselli, 2007). Le vieillissement normal touche également l'ensemble des fonctions de mémoire, notamment la mémoire de travail et la mémoire épisodique à court et long terme (Lester et al., 2017; Moffat, 2009; Nyberg et al., 2003, 2012; Rönnlund et al., 2005; Vieweg et al., 2015), mais aussi la flexibilité cognitive (Dias et al., 2015) qui désigne la capacité à adapter son comportement quand les conditions environnementales changent (Gelfo, 2019). Nous nous focaliserons sur les déficits qui partagent des bases anatomo-fonctionnelles importantes entre l'humain et le rongeur.

2.3.1. Troubles de mémoire

Chez l'humain, la mémoire de travail est particulièrement altérée au cours du vieillissement puisqu'elle déclinerait dès 20 ans (Hultsch et al., 1992; Park et al., 2002; Ziaei et al., 2017). La mémoire de travail fait référence à la capacité d'encoder, de maintenir et de manipuler de manière flexible des informations pendant la réalisation d'une tâche (Bizon et al., 2012), c'est-à-dire pendant un temps relativement court. Chez les humains, on considère que la mémoire de travail est généralement restreinte à quelques secondes, alors que chez les rongeurs, elle est mesurée sur des secondes, des minutes voire des heures (Bizon et al., 2012). De nombreuses études ont mis en évidence que les sujets âgés avaient de moins bonnes performances que les jeunes adultes dans une tâche de mémoire de travail, que cela soit en termes de rapidité de réponse ou de nombre d'erreurs (Nagel et al., 2011; Nissim et al., 2017; Reuter-Lorenz et al., 2000; Ziaei et al., 2017). Bien que la mémoire de travail verbale soit plus étudiée chez l'humain, la mémoire de travail visuo-spatiale est également affectée par le vieillissement (Jenkins et al., 2000; Park et al., 2002). Quel que soit le domaine cognitif, cette diminution des performances est associée à des changements d'activité dans les régions cérébrales impliquées dans la tâche et plus particulièrement dans le cortex préfrontal des sujets âgés comparés aux jeunes adultes (Nagel et al., 2011; Nissim et al., 2017; Reuter-Lorenz et al., 2000; Ziaei et al., 2017). Chez les rongeurs, les manipulations explicites étant irréalisables, les méthodes les plus souvent utilisées pour tester la mémoire de travail utilisent des configurations spatiales et le comportement inné d'exploration de la nouveauté des animaux (Bizon et al., 2012; Dudchenko, 2004; Kraeuter et al., 2019). Comme chez l'humain, la mémoire de travail spatiale fait intervenir le cortex préfrontal des rongeurs et est largement altérée au cours du vieillissement, dès 12 mois chez le rat (Bizon et al., 2012).

En plus des altérations de la mémoire de travail, le vieillissement s'accompagne d'altérations de la mémoire épisodique qui est la mémoire, à court ou long terme, d'évènements personnellement vécus (évènements autobiographiques) et qui englobe le contexte spatio-temporel (Foster et al., 2012; Nyberg et al., 2003, 2012). Chez l'humain, comme chez le rongeur, la plupart des tests utilisés pour évaluer la mémoire épisodique ne prennent en compte qu'une seule dimension. Par exemple, certains tests chez l'humain portent sur le rappel libre de la mémoire à long terme d'une liste de mots pour laquelle il n'est pas nécessaire de se souvenir du contexte spatio-temporel (Dintica et al., 2019; Wilson et al., 2006). A l'inverse chez le rongeur la plupart des tests est basée sur la dimension spatiale et a montré que la composante spatiale de la mémoire épisodique était particulièrement sensible aux effets de l'âge (Foster et al., 2012). Plus récemment, des tests plus écologiques appelés test de mémoire What-Where-When, ont été développés pour

étudier la mémoire épisodique chez l'humain et chez le rongeur (Binder et al., 2015; Mazurek et al., 2015; Veyrac et al., 2015). Bien que ces tests aient mis en évidence des altérations liées à l'âge chez l'humain (Cheke, 2016; Mazurek et al., 2015), aucune information n'est disponible chez le rongeur.

Chez l'humain, l'apprentissage et la mémoire spatiale sont particulièrement vulnérables face au vieillissement (Lester et al., 2017). Notamment, les sujets âgés sont plus lents à apprendre des environnements nouveaux et ont des difficultés pour réutiliser cette information (Iaria et al., 2009). Chez les rongeurs, divers tests de labyrinthes sont utilisés pour évaluer la mémoire spatiale (Foster et al., 2012). Toutefois l'interprétation de ces résultats peut être compliquée par des changements dans l'activité motrice ou dans la réponse au stress qui accompagnent le vieillissement normal (Wimmer et al., 2012). Pour pallier cela, il est possible d'utiliser des tests de localisation d'objets basés sur la tendance innée des rongeurs à explorer les éléments nouveaux dans leur environnement, tout en infligeant peu de stress aux animaux (Wimmer et al., 2012). Dans le test de localisation d'objets, l'animal doit détecter le déplacement de l'un des objets de sa position initiale après un certain délai. Le délai entre la première et la deuxième présentation peut varier pour étudier la mémoire à court terme (délai de quelques minutes) ou la mémoire à long terme (délai plus long, de quelques heures à quelques jours). Une augmentation du temps d'exploration de l'objet déplacé indique que l'animal détecte son déplacement. Pour un délai court (quelques minutes), la détection d'une nouvelle configuration n'est pas affectée chez les souris âgées de 23 mois comparées aux jeunes adultes (Wimmer et al., 2012) alors que la détection d'une nouvelle configuration spatiale est altérée dès que le délai dépasse plusieurs heures chez des souris âgées de 20 mois comparées aux jeunes adultes (Gray et al., 2018; Kwapis et al., 2018; Wimmer et al., 2012). Cela suggère une altération de la mémoire spatiale à long terme et une conservation de la mémoire spatiale à court terme. De plus, la distance de déplacement de l'objet est un paramètre important dans ce test. En effet, les souris âgées de 20 mois ne sont plus capables de détecter le déplacement de moins de 20 cm d'un objet alors qu'elles en sont capables si la distance de l'objet entre les deux configurations est de 35 cm (Cès et al., 2018). Cela suggère donc un déficit de séparation de pattern chez les souris âgées et donc une diminution de leur capacité à discriminer deux scènes proches (Cès et al., 2018).

Les mécanismes neuronaux à l'origine des déficits de l'apprentissage et de la mémoire spatiale liés à l'âge sont encore peu connus. Toutefois, des études ont montré que les cellules de lieu de la région CA3 de l'hippocampe présentent des taux de décharge plus élevés chez les rongeurs et les primates non humains âgés pendant la navigation, et que ces cellules ne parviennent pas à encoder de nouvelles informations lorsque les rats âgés rencontrent de nouveaux environnements (Thomé et al., 2016; Wilson et al., 2005). L'augmentation sélective de ce taux de décharge des neurones de CA3 semble par ailleurs liée au déclin d'une population d'interneurones qui régule l'inhibition du réseau (Thomé et al., 2016). Par ailleurs, les schémas de décharge des cellules de lieu de CA1 sont souvent instables lors de visites répétées du même environnement chez des rats âgés (Barnes et al., 1997). En revanche, des premières études chez l'humain ont mis en évidence une hypoactivation liée à l'âge dans l'hippocampe pendant la navigation spatiale (Konishi et al., 2013; Moffat et al., 2006). Plus récemment, les mécanismes neuronaux de l'apprentissage spatial d'un nouvel environnement ont été étudiés en IRMf chez des sujets jeunes et des sujets âgés de 61 à 72 ans (Diersch et al., 2021). Les résultats comportementaux

ont d'abord montré que lorsqu'on leur demandait de retrouver la disposition spatiale d'un environnement initialement non familier, l'amélioration des performances observée au fil des essais et de la familiarisation avec l'environnement initial, était considérablement réduite chez les sujets âgés comparés aux jeunes. Au niveau neuronal, l'activité dans le cortex cingulaire, le sillon pariéto-occipital et l'hippocampe antérieur a évolué avec l'apprentissage chez les sujets jeunes, alors que ce n'était pas le cas chez les adultes plus âgés. De plus, des analyses de connectivité effective ont révélé que les déficits d'apprentissage spatial liés à l'âge étaient associés à une augmentation de l'excitabilité de l'hippocampe chez les sujets âgés comparés aux jeunes adultes (Diersch et al., 2021).

En conclusion, les troubles de mémoire liés à l'âge sont importants chez l'humain comme chez le rongeur, et particulièrement les troubles de mémoire spatiale. La capacité de maintenir en mémoire les informations précédemment rencontrées dans l'environnement est fondamentale pour répondre avec succès aux stimuli environnementaux. Cependant, la capacité de mettre à jour efficacement les informations retenues en conséquence des changements de l'environnement, autrement dit la flexibilité cognitive est également importante pour s'adapter à son environnement (Bizon et al., 2012).

2.3.2. Troubles de flexibilité cognitive

La flexibilité cognitive désigne la capacité à adapter son comportement quand les conditions environnementales changent (Gelfo, 2019). Chez l'humain, un des tests les plus fréquemment utilisés pour évaluer la flexibilité cognitive est le Wisconsin Card Sorting Test. Dans ce test, les participants doivent classer des cartes selon un critère (couleur, nombre ou forme des symboles sur les cartes) qui ne leur est pas révélé. Dès que les participants identifient le bon critère de tri, ce dernier change et les participants doivent trouver le nouveau critère de tri (Rhodes, 2004). Chez le rongeur, la flexibilité cognitive est souvent testée par un apprentissage où la règle initiale est ensuite changée, le plus souvent inversée. Dans ce test, les rongeurs sont entraînés à faire la distinction entre deux stimuli issus de la même modalité (stimuli visuels, spatiaux ou olfactifs), dont l'un est récompensé chaque fois qu'il est choisi et l'autre non. Une fois que l'apprentissage de la discrimination a été démontré par l'atteinte d'un critère de performance, les réponses associées aux deux stimuli sont inversées et les animaux sont à nouveau entraînés jusqu'à ce qu'ils atteignent à nouveau le critère de performance (Izquierdo et al., 2017). Un autre test souvent utilisé pour étudier la flexibilité cognitive chez le rongeur est l'attentional set-shifting (Bissonette et al., 2013; Tait et al., 2018). Ce test est composé d'une première étape d'association de stimuli de dimensions différentes (ex : couleur et forme) mais un seul des deux porte l'information de la récompense (ex : forme). La deuxième étape consiste en un changement intra-dimensionnel dans lequel c'est toujours la même dimension qui est porteuse de l'information de la récompense mais les différentes paires de stimuli ont changé (nouvelles formes et nouvelles couleurs). Cette deuxième étape permet de renforcer l'apprentissage et de généraliser la règle quant à la dimension récompensée. Quand cette généralisation est faite, les rongeurs sont soumis à une dernière étape de changement extra-dimensionnel, permettant de mesurer la flexibilité cognitive. Dans cette étape, les différentes paires de stimuli ont à nouveau changé et dans cette configuration c'est le stimulus issu de l'autre dimension (dans notre exemple la couleur) qui porte l'information de récompense.

La flexibilité cognitive est associée au fonctionnement du cortex préfrontal (Kesner and Churchwell, 2011; Ridderinkhof et al., 2002). Plus précisément, il a été démontré chez les rongeurs que le COF, et particulièrement sa région latérale, semble soutenir la performance dans les tâches d'apprentissage avec inversion de règle, tandis que les régions du cortex préfrontal médian semblent être impliquées dans l'attentional set-shifting (Banerjee et al., 2020; Bissonette et al., 2013; Dalley et al., 2004; Izquierdo et al., 2017). Cependant, des études récentes ont démontré qu'un circuit plus large est impliqué dans la flexibilité cognitive qui comprend également des connexions avec le striatum et l'amygdale (Izquierdo et al., 2017; Klanker et al., 2013).

Chez l'humain comme chez le rongeur, la flexibilité cognitive se détériore avec l'âge (Dias et al., 2015; Head et al., 2009; Ridderinkhof et al., 2002; Schoenbaum et al., 2002, 2006). En effet, des études montrent que les sujets âgés de 65 à 83 ans persistent beaucoup plus que de jeunes adultes à utiliser l'ancienne règle de tri dans le Wisconsin Card Sorting Test, et ce malgré la présence d'indices suggérant le changement de règle (Ridderinkhof et al., 2002). Les bases neurales des déficits de flexibilité cognitive liés à l'âge restent encore peu connues. Toutefois une étude en électrophysiologie dans le COF latéral a montré que les neurones qui répondaient au changement de règle perdent leur sélectivité chez les rongeurs âgés comparés aux jeunes, ce qui pourrait expliquer leurs déficits de flexibilité cognitive (Schoenbaum et al., 2006).

En conclusion, comme l'humain, le rongeur présente des déficits de flexibilité cognitive au cours du vieillissement qui seraient dus à des altérations du fonctionnement du cortex préfrontal.

Ces déficits de flexibilité cognitive ainsi que les déficits de mémoire liés à l'âge ont été associés aux pertes olfactives au cours du vieillissement.

2.3.3. Vieillesse olfactive, indicateur de l'intégrité du cerveau vieillissant ?

En parallèle de leurs fortes implications dans les activités de la vie quotidienne, les pertes olfactives liées à l'âge sont associées à une diminution globale des performances cognitives chez l'humain.

Une étude longitudinale sur 3 ans chez des participants âgés de 80 ans en moyenne, a montré que l'altération des capacités d'identification des odeurs au cours du vieillissement est associée à un déclin de la vitesse de traitement des informations et de la mémoire épisodique. Ainsi, en moyenne, une personne ayant initialement un faible score d'identification des odeurs a décliné plus de deux fois plus rapidement en vitesse de traitement des informations et en mémoire épisodique qu'une personne ayant un score d'identification olfactive élevé (Wilson et al., 2006). Bien que les personnes présentant des signes de démence au premier test aient été exclues, l'étude explique cette association par une accumulation probable de lésions pathologiques dans les régions du cerveau qui contribuent à la reconnaissance des odeurs familières ainsi qu'à la mémoire épisodique et à la vitesse perceptive. Ces résultats sont corroborés par une étude plus récente ayant suivi des participants ne présentant pas de signe de démence sur 15 ans et qui a constaté que l'altération de la perception olfactive est associée à un déclin cognitif global, et plus particulièrement de la mémoire épisodique (Dintica et al., 2019). De plus, dans cette étude, les participants présentant une déficience olfactive avaient des volumes plus faibles de

l'hippocampe, du cortex entorhinal, du cortex temporal moyen et du gyrus fusiforme par rapport à ceux ayant une fonction olfactive normale, des structures également impliquées dans les processus mnésiques (Dintica et al., 2019). Par ailleurs, ces déficits de perception olfactive pourraient être le signe de changements neuronaux et d'un vieillissement cérébral plus précoces. En effet, une étude menée chez des participants âgés de 21 à 84 ans, et dont 90% avaient moins de 65 ans, a également associé des déficits d'identification des odeurs avec de moins bonnes performances cognitives sur un test permettant d'évaluer la flexibilité, la planification et l'inhibition (Schubert et al., 2017c). Ces études montrent qu'il y aurait un lien entre les déficits olfactifs et plus particulièrement les déficits d'identification des odeurs et l'altération des fonctions cognitives au cours du vieillissement. Cela est confirmé par une étude récente menée sur des sujets âgés en moyenne de 72 ans et qui a montré que la diminution de la fonction cognitive liée à l'âge était associée à une moins bonne identification des odeurs (Xu et al., 2020). Cette relation était plus faible pour la détection des odeurs. Cette plus forte relation entre l'identification des odeurs et la cognition pourrait reposer sur leur lien commun avec les fonctions exécutives, le traitement du langage et la mémoire épisodique verbale (Xu et al., 2020).

Ainsi, le fonctionnement olfactif pourrait être un indicateur de l'intégrité du cerveau vieillissant. Ces résultats sont appuyés par une revue systématique de la littérature ayant analysé 10 articles sur ce sujet et qui a conclu que les pertes olfactives peuvent prédire le futur déclin cognitif parmi une population d'adultes ne présentant pas encore de déclin cognitif (Windon et al., 2020). Toutefois les études faisant le lien entre les déficits olfactifs et le vieillissement cognitif sans démence ou pathologies sont encore peu nombreuses. Par ailleurs, les tests de mémoire épisodique utilisés dans ces études sont essentiellement des tests de rappel et de reconnaissance de listes de mots, sans contexte spatio-temporel, une caractéristique pourtant importante de la mémoire épisodique. De plus la mémoire spatiale qui est particulièrement sensible au vieillissement n'a, à ce jour, pas été associée avec le déclin des performances olfactives au cours du vieillissement. Cependant, un article récent a constaté que l'épaisseur corticale du COF médian gauche et le volume de l'hippocampe droit permettent de prédire à la fois les performances d'identification olfactive et de mémoire spatiale chez l'humain (Dahmani et al., 2018). De plus des déficits dans l'identification olfactive et la mémoire spatiale ont été trouvés chez des patients présentant des lésions du COF médian (Dahmani et al., 2018). Cela suggère que l'identification olfactive et la mémoire spatiale partagent des substrats neuronaux et que les troubles de l'identification des odeurs liés au vieillissement pourraient aussi s'accompagner de déficits de mémoire spatiale. Cela est corroboré par une étude longitudinale menée chez des rats âgés de 6 à 18 mois et qui a montré qu'au cours du vieillissement, les capacités de discrimination olfactive sont positivement associées aux capacités de mémoire spatiale dans une tâche de la piscine de Morris (Yoder et al., 2017).

En conclusion, l'étude des déficits olfactifs chez l'humain et les rongeurs a révélé de nombreuses altérations de la perception olfactive, dont les bases neurales restent encore mal connues. De plus, les déficits olfactifs sont associés aux déficits cognitifs au cours du vieillissement et le système olfactif partage des substrats neuronaux avec d'autres fonctions cognitives également altérées au cours du vieillissement. Nous allons maintenant étudier comment la stimulation olfactive pourrait être utilisée comme moyen de lutte contre le vieillissement olfactif mais également cognitif.

3. La stimulation olfactive comme outil de remédiation face au vieillissement

À l'heure actuelle, les troubles de l'olfaction restent un problème clinique majeur. De multiples études menées au cours des dernières années ont examiné des traitements potentiels, parmi lesquels les solutions médicamenteuses et les approches chirurgicales apparaissent comme principales sources de traitement des déficits olfactifs (Goncalves and Goldstein, 2016; Hummel et al., 2016, 2017). Toutefois, leur efficacité ne reste que partielle et restreinte à des étiologies particulières de troubles olfactifs, leurs effets ne sont pas permanents et peu d'entre eux ont été testés pour remédier aux déficits olfactifs liés à l'âge. D'autres solutions ont donc vu le jour, dont l'entraînement olfactif (Hummel et al., 2009).

3.1. Efficacité partielle des solutions classiques de traitement des déficits olfactifs

La plupart des solutions médicamenteuses vise l'épithélium olfactif. C'est notamment le cas du citrate de sodium et de la pentoxifyline dont le but est d'augmenter la sensibilité des NSO et leur taux de réponse (Gudziol and Hummel, 2009; Panagiotopoulos et al., 2005). Le citrate de sodium agit en diminuant le calcium présent dans le mucus de l'EO afin de diminuer l'influx entrant de calcium dans les NSO et ainsi diminuer le retrocontrôle négatif lié à une trop forte augmentation de calcium et conduisant à la désensibilisation des NSO (Panagiotopoulos et al., 2005). La pentoxifyline quant à elle inhibe la phosphodiesterase dépendante du complexe calcium/calmoduline responsable de la dégradation de l'AMP cyclique, ce qui permet d'augmenter la réponse des NSO (Gudziol and Hummel, 2009). D'autres traitements tels que l'acide alpha-lipoïque, la théophylline et la vitamine A permettraient quant à eux de régénérer de nouveaux NSO (Henkin et al., 2009; Hummel et al., 2002; Reden et al., 2012).

Il existe également des solutions médicamenteuses visant le BO. C'est par exemple le cas de la quinoxaline dérivée de la caroverine, un antagoniste des récepteurs NMDA, qui empêcherait l'activation des CG inhibitrices par les cellules mitrales et à panache, augmentant donc l'excitation dans le BO (Quint et al., 2002).

Bien que l'ensemble de ces traitements pharmacologiques ait montré des effets positifs sur la fonction olfactive, la plupart entraîne des effets secondaires et n'a qu'une efficacité partielle (Hummel et al., 2017). De plus, certains de ces traitements ayant été évalués également chez les sujets âgés s'avèrent moins efficaces pour cette population (Hummel et al., 2002). Des solutions chirurgicales existent également, principalement pour retirer des polypes qui obstruent la cavité nasale. Mais là encore, cette approche a montré des résultats qui ne sont pas toujours efficaces et qui peuvent également parfois entraîner des complications (Kimmelman, 1994).

3.2. Bénéfices de l'entraînement olfactif sur les performances olfactives

L'idée d'un entraînement olfactif a émergé dans les années 1990 avec l'observation que l'exposition à des odorants améliorait les capacités olfactives chez l'humain (Cain et al., 1995; Livermore and Laing, 1996). L'entraînement olfactif consiste en l'exposition quotidienne à des odorants pendant une certaine période. Le premier protocole d'entraînement olfactif sur des patients présentant des pertes olfactives a vu le jour en 2009

(Hummel et al., 2009). Dans cette étude, 4 odorants étaient présentés aux patients matin et soir pendant 12 semaines. Ces 4 odorants perceptivement différents avaient été choisis afin de recouvrir 4 des 6 catégories de l'espace perceptif olfactif représenté par toutes les odeurs, tel que l'a théorisé Henning en 1916, c'est-à-dire : fruité, fleuri, résineux, aromatique, brûlé et fétide (Hummel et al., 2009). Ce traitement, qui a l'avantage d'être simple et non invasif, a permis d'améliorer les seuils de détection de ces odorants chez des patients présentant des troubles olfactifs dus à des étiologies post-infectieuses, post-traumatiques ou idiopathiques (Hummel et al., 2009).

Dès lors, cet entraînement a été utilisé sur différentes populations de patients présentant des étiologies de troubles olfactifs différentes, y compris des sujets âgés (Birte-Antina et al., 2018; Choi et al., 2020; Damm et al., 2014; Fleiner et al., 2012; Geißler et al., 2014; Konstantinidis et al., 2013, 2016; Schriever et al., 2014). Bien que le nombre d'odorants utilisés et le nombre d'expositions quotidiennes n'aient jamais été changés, suivant sa durée (Geißler et al., 2014), s'il a été combiné ou non à des traitements médicamenteux (Fleiner et al., 2012) ou si les concentrations d'odorants ont été augmentées (Damm et al., 2014), les effets de ce traitement apparaissent relativement variables (Tableau 1). Aussi, dans ces études, l'efficacité de cet entraînement varie entre 10 et 80%. Toutefois, ces effets peuvent être relativement persistants puisque les bienfaits d'un entraînement olfactif de 16 semaines sur le score combiné d'identification, détection et discrimination s'observent toujours 40 semaines après la fin de l'entraînement (Konstantinidis et al., 2016). De plus, cet entraînement olfactif semble relativement efficace pour contrecarrer les troubles olfactifs liés à l'âge. En effet, si une première étude réalisée chez des sujets âgés de 55 à 96 ans a montré que 12 semaines d'entraînement olfactif ne permettent pas d'améliorer les performances olfactives au sein du groupe entraîné, leurs performances sont quand même devenues significativement meilleures que celles d'un groupe non entraîné (Schriever et al., 2014). Cela suggère que l'entraînement olfactif peut prévenir le déclin olfactif chez les sujets âgés et qu'une durée plus longue pourrait améliorer les bénéfices de cet entraînement. Ces résultats ont été confirmés par une étude plus récente qui a prolongé l'entraînement olfactif jusqu'à 20 semaines (Birte-Antina et al., 2018) et démontré une amélioration significative des fonctions olfactives, notamment du seuil et des capacités de discrimination, pour les sujets âgés ayant suivi le protocole d'entraînement. A l'âge moyen (50-55 ans), un entraînement olfactif de 12 semaines utilisant 7 odorants perceptivement différents est également efficace pour améliorer l'identification de ces odeurs chez des patients dysosmiques (Manesse et al., 2018).

Malgré les effets positifs de ces entraînements olfactifs sur la perception olfactive, les bases neurales de ces améliorations restent encore largement méconnues. Les premières améliorations comportementales observées étant des améliorations de la sensibilité, il a d'abord été envisagé que l'amélioration des performances était due à des modifications périphériques, et notamment une modification de l'expression de nouveaux récepteurs olfactifs (Hummel et al., 2009). Plus récemment, une étude a montré qu'après entraînement olfactif, le cortex piriforme est connecté à bien moins de structures non olfactives qu'avant entraînement, suggérant une réorganisation des connexions fonctionnelles du cortex piriforme induite par l'entraînement olfactif (Kollndorfer et al., 2014). Pour aller plus loin dans la compréhension de l'effet de l'entraînement olfactif sur les voies de traitement des stimuli chimiosensoriels, la même équipe a montré que les patients anosmiques utilisent les mêmes réseaux que les sujets sains pour traiter des stimuli olfactifs

ayant ou non une composante trigéminal. Après l'entraînement olfactif, la sensibilité à détecter les odeurs a augmenté de manière significative dans le groupe anosmique, une récupération qui s'accompagne d'une augmentation du nombre de connexions fonctionnelles dans les réseaux (Kollndorfer et al., 2015). Ainsi, l'entraînement olfactif induirait plus que des modifications périphériques puisqu'il déclencherait une réorganisation de la connectivité fonctionnelle cérébrale chez les patients anosmiques. Cependant les bases neurales des améliorations de l'entraînement olfactif ne sont pas connues chez les sujets âgés.

ETUDE	ETIOLOGIE	DUREE (Semaines)	EFFETS
Hummel et al., 2009	Post-infectieux Post-traumatique Idiopathique	12	Diminution seuil
Fleiner et al., 2012	Post-infectieux Post-traumatique Idiopathique	16 à 32	Amélioration score TDI quand entraînement olfactif combiné à prise médicamenteuse
Konstantidis et al., 2013	Post-infectieux Post-traumatique	16	Amélioration score TDI
Damm et al., 2014	Post-infectieux	18 à 36	Amélioration score TDI quand odeurs utilisées à plus forte concentration
Geißler et al., 2014	Post-infectieux	32	Amélioration score TDI après 32 semaines
Schriever et al., 2014	Vieillessement	12	Maintien des capacités comparé à un groupe contrôle
Konstantidis et al., 2016	Post-infectieux	16 à 56	Amélioration score TDI dès 16 semaines et effets à long terme
Birte-Antina et al., 2018	Vieillessement	20	Diminution seuil Amélioration identification
Choi et al., 2020	Post-infectieux	12	Amélioration score TDI

Tableau 1. Effets d'un entraînement olfactif sur les performances olfactives.

Différentes études utilisant un enrichissement olfactif de durée variable, sur des populations atteintes de troubles olfactifs dus à des étiologies différentes, montrent des effets variables sur les performances olfactives. TDI = score combiné de détection, identification, discrimination.

De la même façon que chez l'humain, un enrichissement olfactif améliore les performances olfactives chez le rongeur. En effet, un enrichissement olfactif basé sur la nouveauté avec introduction d'une odeur nouvelle chaque jour pendant 20 à 40 jours, a des effets bénéfiques sur la discrimination et la mémoire olfactives chez la souris jeune adulte (Rey et al., 2012; Rochefort et al., 2002; Veyrac et al., 2009). Cette amélioration

s'accompagne d'une augmentation de la neurogenèse adulte dans le BO et serait sous-tendue par le système NA. En effet, la stimulation olfactive induit une augmentation de la quantité de NA dans le BO (Veyrac et al., 2009), et l'enrichissement conduit à une augmentation de l'expression de DBH, enzyme de synthèse de la NA, dans le LC des souris jeunes adultes (Rey et al., 2012). Cependant, cet enrichissement olfactif devient progressivement inefficace au cours du vieillissement puisqu'il permet toujours d'améliorer les capacités de discrimination des animaux âgés de 23 mois mais pas leurs capacités de mémoire olfactive ni le taux de neurogenèse bulbaire (Rey et al., 2012). Comme ce qui a été proposé chez l'humain, un enrichissement olfactif de plus longue durée serait nécessaire et peut-être bénéfique pour améliorer les performances olfactives chez la souris âgée. Un tel enrichissement n'a pas encore été testé.

En résumé, l'entraînement olfactif apparaît prometteur pour lutter contre les effets du vieillissement olfactif. En effet, il améliore les fonctions olfactives, y compris chez les sujets humains âgés avec des effets relativement persistants. Nous allons voir maintenant que cet entraînement olfactif pourrait être utilisé pour améliorer globalement la cognition au cours du vieillissement.

3.3. Booster la réserve cognitive avec une stimulation olfactive

3.3.1. Le concept de réserve cognitive

A l'origine, le concept de réserve cognitive (RC) a été introduit pour tenter d'expliquer les incongruences entre le niveau de pathologie cérébrale d'un individu et les déficits fonctionnels cognitifs associés (Stern, 2002, 2009). Plusieurs études ont en effet rapporté que des sujets âgés ayant de bonnes performances cognitives présentaient des critères histopathologiques caractéristiques de maladies neurodégénératives telles que la démence avec corps de Lewi ou la maladie d'Alzheimer (Ince, 2001; Jagust, 2013; Morris et al., 2010). Cela révèle donc que le degré d'altération cérébrale ne reflète pas forcément celui de la démence.

Cette notion de RC a par la suite été étendue au vieillissement normal : elle expliquerait l'hétérogénéité des performances décrites au cours du vieillissement normal (Morrison and Baxter, 2012; Wilson et al., 2002). Les données épidémiologiques indiquent qu'un niveau plus élevé de stimulation cérébrale à travers le niveau d'éducation, les activités de loisirs ou sociales, est associé à des changements de l'activité et de la connectivité cérébrales, qui, en combinaison ou interaction avec des facteurs génétiques, sont susceptibles de sous-tendre une meilleure efficacité, capacité et flexibilité des réseaux neuraux chez l'humain. Ainsi, augmenter la RC serait un outil potentiellement puissant pour réussir le vieillissement cérébral (Barulli and Stern, 2013; Pernecky et al., 2019).

Le terme de RC se réfère donc à une meilleure efficacité, capacité et flexibilité des processus cognitifs qui aide à expliquer les incongruences entre le niveau de pathologie cérébrale d'un individu et son niveau de performance comportementale (Stern et al., 2020). Bien que la construction de la RC soit un processus dynamique, qui évolue au cours du temps, les méthodes traditionnelles d'inférence de la RC se sont concentrées sur des variables telles que le niveau d'éducation, le niveau d'occupation ou les activités de loisirs stimulant les facultés cognitives. La plupart des études sur la RC se sont concentrées sur un

de ces indicateurs en particulier et ont cherché à savoir comment les individus présentant des niveaux élevés ou faibles de cet indicateur diffèrent dans leur structure ou leur fonction cérébrale (Cabeza et al., 2018). Cependant, ces méthodes de mesure indirecte de la RC ne sont pas optimales pour plusieurs raisons. Premièrement, il existe des variables confondantes. Par exemple, le niveau d'éducation corrèle avec le statut socio-économique, l'accès aux soins et donc à la santé. Ainsi l'éducation peut corrélérer avec la RC sans toutefois la mesurer directement (Reed et al., 2010). Deuxièmement, l'utilisation d'une seule variable ne permet pas de mesurer l'intégralité de la construction de la RC car cette dernière se base sur toutes les expériences de vie qui ne sont pas indexées par le niveau d'éducation. Enfin, certaines de ces variables sont statiques et ne peuvent pas être mesurées au cours de la vie, notamment le niveau d'éducation qui est déterminé très tôt au cours de la vie de l'individu mais est pourtant l'une des variables les plus utilisées pour inférer la RC (Jones et al., 2011; Satz et al., 2011; Zahodne et al., 2015). Plus récemment, une autre approche de la mesure de la RC a été proposée, basée sur la différence entre la fonction cognitive observée et celle attendue, en prenant en compte les variables cérébrales (mesure de l'intégrité cérébrale par imagerie) et les variables démographiques (âge, genre, etc.) (Reed et al., 2010). Cette méthode dite "résiduelle" est plus conforme à la définition de la RC car elle représente l'écart entre les performances observées et les performances attendues. Selon cette méthode, les individus dont les performances sont supérieures à celles prédites par le modèle ont une RC élevée, et les individus dont les performances sont inférieures à celles prédites ont une RC faible (Bettcher et al., 2019; Lee et al., 2019; Reed et al., 2010). Toutefois, avec cette mesure, la RC est influencée par les variables utilisées dans le modèle ainsi différentes mesures de la RC seraient possibles pour une même personne à un instant donné (Reed et al., 2010).

3.3.2. Les bases neurales de la réserve cognitive sont encore largement méconnues

Comme nous l'avons vu plus haut, le vieillissement s'accompagne de changements structuraux et fonctionnels dans le cerveau, associés à divers déficits cognitifs (Grady, 2012; Raz and Daugherty, 2018). Cependant, Il existe une grande variabilité dans le vieillissement cognitif, avec certains sujets âgés qui montrent peu de déclin comparé à de jeunes adultes et d'autres qui présentent un déclin cognitif important ce que pourrait expliquer le concept de RC. Cette variabilité est ainsi le reflet de facteurs environnementaux mais aussi génétiques et dont les effets combinés sont médiés par trois mécanismes constituant les bases neurales de la RC : la réserve cérébrale, la maintenance cérébrale et la compensation (Figure 9) (Cabeza et al., 2018).

3.3.2.1. La réserve cérébrale

La réserve cérébrale représente un capital neuroanatomique, c'est-à-dire l'ensemble des caractéristiques anatomiques et structurales quantitatives du cerveau (taille du cerveau, nombre de neurones, nombre de synapses), qui offre une capacité excédentaire à certains sujets âgés leur permettant de maintenir des fonctions cognitives malgré une perte notable de ces ressources (Barulli and Stern, 2013; Cabeza et al., 2018; Satz et al., 2011; Stern et al., 2019, 2020). La réserve cérébrale permet ainsi d'expliquer la susceptibilité différente à la déficience fonctionnelle en présence d'une pathologie ou d'une insulte neurologique :

certaines personnes ont un cerveau plus gros, avec plus de neurones et de synapses, ce qui peut permettre à leur cerveau de tolérer plus de dommages (perte neuronale, synaptique) avant que leurs fonctions cognitives ne soient affectées (Jagust, 2013; Katzman et al., 1988; Stern et al., 2019). Cette idée a été soutenue par des premières études ayant montré que des individus possédant un cerveau plus grand (mesuré par la circonférence de la tête) étaient moins susceptibles de développer la maladie d'Alzheimer ou alors développaient des formes moins sévères (Graves et al., 1996; Schofield et al., 1997). Comme pour la réserve cognitive, le niveau d'éducation et l'engagement dans des activités de loisirs ont été associées à la réserve cérébrale. En effet, de nombreuses études ont également suggéré que des changements volumétriques se produisent chez les humains après des années de stimulation intellectuelle (Carreiras et al., 2009; Gaser and Schlaug, 2003; Graves et al., 2001). Il a également été montré qu'un entraînement cognitif permet de conserver l'intégrité de la substance blanche chez les sujets âgés et d'augmenter la substance grise chez des individus jeunes et âgés (Engvig et al., 2012; Scholz et al., 2009). Chez le rongeur, l'exposition à un environnement enrichi et qui mime la constitution d'une RC chez l'humain, a été associée à une augmentation de la neurogenèse adulte hippocampique et à la régulation à la hausse du BDNF, ce qui favorise la plasticité neuronale et pourrait conférer une certaine réserve (Gelfo et al., 2018; Phillips, 2017; Valero et al., 2016).

3.3.2.2. La maintenance cérébrale

Alors que la réserve cérébrale fait référence au capital neurobiologique à un instant donné, la maintenance cérébrale désigne la préservation des ressources neuronales, ce qui implique une récupération et un réapprovisionnement continu du cerveau par des mécanismes de réparation, en réponse aux dommages subis (Barulli and Stern, 2013; Cabeza et al., 2018; Nyberg et al., 2012; Stern et al., 2020). La réserve consiste à augmenter les ressources au-delà de leur niveau actuel, alors que la maintenance consiste à les ramener à leur niveau antérieur plus élevé (Cabeza et al., 2018). Ce concept de maintenance cérébrale apparaît complémentaire au concept de réserve cérébrale, mais pour l'instant il n'est pas possible de les différencier expérimentalement (Stern et al., 2020). En effet, pour mesurer la maintenance cérébrale, il faudrait mettre en place des études longitudinales qui démontreraient une relative préservation de la morphologie cérébrale au cours du temps (Stern et al., 2020).

3.3.2.3. La compensation

Au niveau fonctionnel, certains sujets âgés ont la capacité de s'adapter aux altérations structurales en développant et/ou en s'appuyant sur des réseaux compensatoires lorsque les réseaux primaires ne sont plus suffisamment efficaces pour la réalisation d'une certaine tâche (Cabeza et al., 2018; Grady, 2012). Ce constat vient de la tendance des sujets âgés d'activer leur cortex préfrontal de manière bilatérale pour des tâches pour lesquelles les jeunes adultes montraient une activité unilatérale du cortex préfrontal, ce qui a conduit à l'idée que la bilatéralité de l'activation du cortex préfrontal chez les sujets âgés reflèterait un mécanisme compensatoire bénéfique pour la performance cognitive (Cabeza, 2002). Cette augmentation d'activité dans le cortex préfrontal compenserait une réduction d'activité dans le cortex occipital (Davis et al., 2008;

Grady et al., 1994). De même, dans une tâche d'apprentissage de catégories, les sujets âgés ont montré une plus grande activation pariétale bilatérale que les jeunes adultes et cette activité bilatérale a été associée à une meilleure performance (Fera et al., 2005).

Le phénomène de compensation ne se décline pas uniquement par une augmentation de la bilatéralité, mais également par un recrutement de régions cérébrales supplémentaires et/ou différentes chez les sujets âgés comparés aux jeunes (Cabeza et al., 2018). Ces aires cérébrales recrutées chez les sujets âgés seraient moins efficaces pour réaliser la tâche mais leur recrutement demanderait moins d'énergie, alors que les sujets jeunes utiliseraient un circuit neuronal plus performant mais dont le recrutement demanderait plus d'énergie (Cabeza et al., 2018). Une étude en IRMf a par exemple montré que dans une tâche de mémoire de reconnaissance de mots, les sujets âgés présentaient une activité réduite liée au souvenir dans l'hippocampe mais une activité accrue liée à la familiarité dans le cortex rhinal comparés aux jeunes adultes (Daselaar et al., 2006). Il a été conclu que les sujets âgés compensaient la réduction de la mémoire hippocampique qui est un processus optimal mais consommateur d'énergie en s'appuyant davantage sur la familiarité qui repose sur le recrutement du cortex rhinal qui est moins optimal (cette mémoire étant moins précise) mais demande moins d'énergie (Cabeza et al., 2018; Daselaar et al., 2006).

Enfin, il existe également des compensations par une augmentation d'activité (Cabeza et al., 2018). Une étude en IRMf a par exemple montré que dans une tâche de mémoire de travail verbale, les sujets âgés présentaient une plus grande activité dans le cortex préfrontal dorsolatéral droit que les jeunes adultes à des niveaux d'exigence de tâches plus faibles mais obtenaient des performances aussi bonnes. En revanche, lorsque la charge de la mémoire de travail était plus importante, les sujets âgés présentaient moins d'activité dans le cortex préfrontal dorsolatéral droit et avaient des performances réduites comparées à celles des jeunes adultes (Cappell et al., 2010). Toutefois, une étude récente en IRMf a montré qu'à mesure que la difficulté d'une tâche de mémoire de travail augmente, l'intégration du réseau diminue (il y a moins de connexions dans le réseau) chez les sujets jeunes, alors qu'elle augmente chez les sujets âgés. Cette augmentation de l'intégration chez les sujets âgés est due à une augmentation de la connectivité de l'hémisphère droit aux régions corticales droites et gauches. De plus, les sujets âgés ayant les meilleures performances ont un réseau cérébral plus intégré dans la condition de tâche la plus difficile comparé à des sujets âgés performants moins bien (Crowell et al., 2020). Ainsi, cette réorganisation des réseaux chez les sujets âgés pourrait également refléter une forme de compensation supplémentaire pour réaliser la tâche quand cette dernière est plus difficile.

L'ensemble de ces études étaye donc la théorie de compensation qui existerait chez les sujets âgés qui vieillissent mieux (Cabeza et al., 2018; Stern et al., 2019). Un tel phénomène de compensation a également été observé dans la modalité olfactive chez l'animal âgé. Dans une tâche d'aversion à l'odeur, les rats âgés maintiennent des performances similaires aux jeunes adultes, en activant des régions cérébrales supplémentaires que sont l'hippocampe, le cortex entorhinal et le COF (Dardou et al., 2010). Ces résultats suggèrent bien une réorganisation du réseau neuronal traitant l'information olfactive afin de lutter contre le vieillissement et préserver les performances comportementales.

Cependant, d'autres articles ont montré qu'un recrutement plus important n'est pas forcément associé à de meilleures performances. Par exemple, une étude a suivi des sujets

âgés sur 10 ans pour identifier deux groupes de sujets âgés dont les performances sur des tests de mémoire épisodique différaient selon qu'elles restaient stables ou diminuaient (Persson et al., 2006). Dans cette étude, les sujets âgés présentant un déclin cognitif ont montré un recrutement accru des régions frontales comparés aux sujets âgés ne présentant pas de déclin. Cette activation frontale reflèterait donc plutôt un manque d'efficacité dans l'utilisation des ressources neuronales. Ainsi, la RC pourrait non pas consister en la capacité de recruter un plus grand réseau pour exécuter la tâche, mais permettre au circuit dédié de moins se dégrader et de rester plus spécifique. Plus récemment, une autre étude en IRMf ayant utilisé un modèle multivarié Bayésien a montré que le pattern d'activité du cortex préfrontal ne prédit pas le comportement dans une tâche de mémoire chez des sujets âgés (Morcom and Henson, 2018). L'augmentation d'activité observée dans le cortex préfrontal des personnes âgées pour réaliser une tâche de mémoire ne reflèterait pas de la compensation mais pourrait plutôt suggérer un manque de spécificité ou une activité moins efficace (Morcom and Henson, 2018).

Il apparaît que les sujets âgés présentant de meilleures performances cognitives sont également les sujets ayant une meilleure réserve ou maintenance cérébrales et étant capables de remaniements au niveau des réseaux cérébraux pour effectuer une tâche comportementale avec succès. Ainsi, la réserve et la maintenance cérébrales et les mécanismes de compensation constitueraient les mécanismes neuraux qui sous-tendent de meilleures performances cognitives au cours du vieillissement.

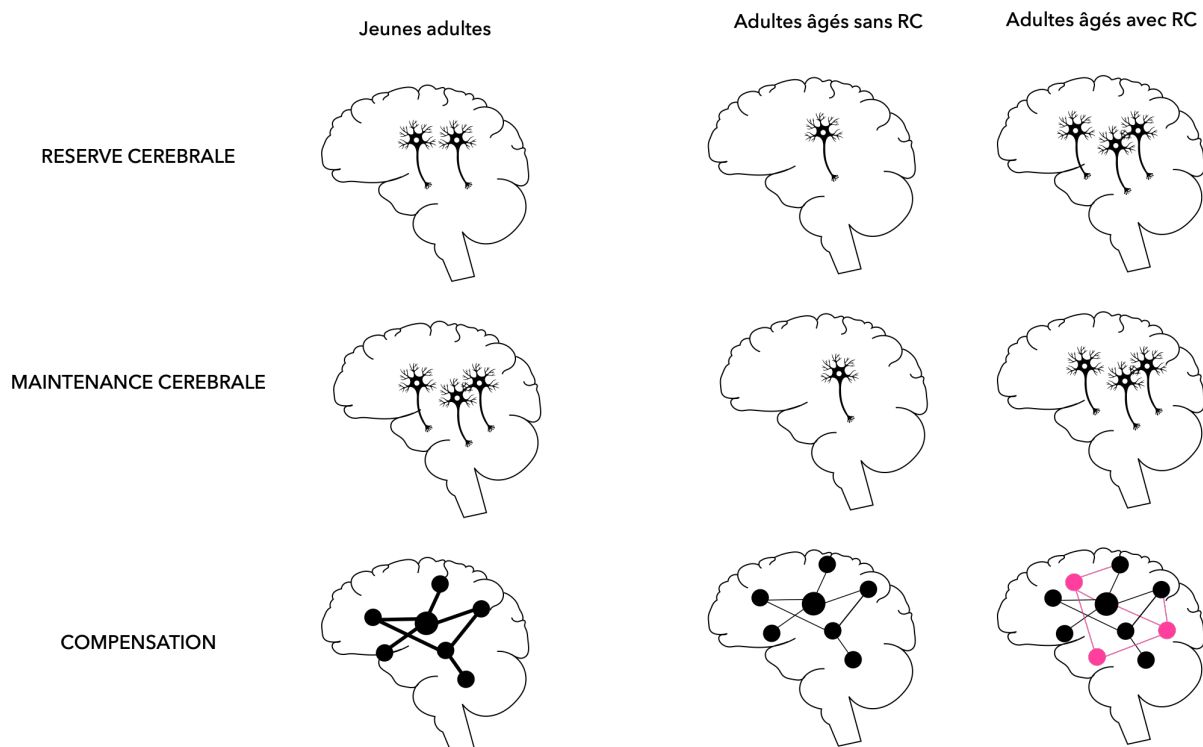


Figure 9. Mécanismes pouvant médier la réserve cognitive (RC).

La réserve cérébrale se définit comme une accumulation au cours du temps de ressources structurales (ex : nombre de neurones, de synapses, etc.). La maintenance cérébrale est un processus complémentaire permettant de préserver les ressources au cours du temps. Pour différencier la réserve de la maintenance cérébrale, il faudrait réaliser des analyses longitudinales. La compensation fait référence au remaniement des réseaux cérébraux pour maintenir les fonctions cognitives, avec notamment le recrutement de régions cérébrales supplémentaires.

En résumé, l'activité cognitive tout au long de la vie (notamment résultant de stimulations environnementales) protège les fonctions cérébrales au cours du vieillissement. Cela s'accompagne de changements structuraux et fonctionnels dans le cerveau des sujets âgés. Cependant, on ne sait pas comment ce processus de RC agit sur la structure et le fonctionnement cérébraux y compris à l'échelle cellulaire pour maintenir les fonctions cognitives pendant le vieillissement. Des études récentes ont proposé que la NA, un neuromodulateur important de la cognition et de la plasticité cérébrale, jouerait un rôle important dans la construction de cette RC.

3.3.3. La noradrénaline : support de la construction de la réserve cognitive ?

La NA joue un rôle clé dans le recrutement des ressources cérébrales pour soutenir les fonctions cognitives et permet la régulation de la plasticité dans l'ensemble du cerveau (Berridge and Waterhouse, 2003; Poe et al., 2020; Sara, 2009; Sara and Bouret, 2012; Waterhouse and Navarra, 2019). De plus le système NA est grandement sensible à l'environnement et à la nouveauté (Berridge and Waterhouse, 2003; Sara and Bouret, 2012) et son intégrité anatomique est associée à de meilleures performances comportementales au cours du vieillissement (Clewett et al., 2016; Dahl et al., 2019; Mather and Harley, 2016; Robertson, 2013; Wilson et al., 2013). Pour tout cela, la NA a été proposée comme candidat pour soutenir les effets bénéfiques de la RC sur le fonctionnement cérébral (Clewett et al., 2016; Robertson, 2013).

3.3.3.1. Anatomie du *Locus Coeruleus*

Le Locus Coeruleus (LC) est un petit noyau contenant environ 1 500 neurones chez le rat et 12 000 chez l'humain. Les axones de ces neurones présentent une arborisation axonale importante et innervent de manière diffuse l'ensemble de l'encéphale (Kebuschull et al., 2016; Schwarz and Luo, 2015a; Schwarz et al., 2015). Les neurones du LC projettent sur les aires corticales sensorielles, les cortex préfrontal et pariétal, ainsi que sur l'hippocampe, le cortex entorhinal, l'amygdale et le cervelet (Figure 10). En retour, le LC reçoit des afférences de nombreuses structures cérébrales (Breton-Provencher and Sur, 2019; Schwarz et al., 2015).

Les neurones du LC constituent une population assez hétérogène puisqu'en plus de synthétiser et libérer de la NA, certains d'entre eux co-expriment une autre substance telle que la galanine, le neuropeptide Y, le BDNF, la somatostatine ou la cholecystokinine (Berridge and Waterhouse, 2003). Récemment, il a également été montré que les neurones du LC peuvent co-libérer de la dopamine dans le cortex, l'hippocampe et le thalamus (Beas et al., 2018; Devoto et al., 2001, 2005; Kempadoo et al., 2016; Takeuchi et al., 2016; Wagatsuma et al., 2018). Cependant, les conditions dans lesquelles ces substances sont libérées et leurs effets physiologiques et comportementaux ne sont pas encore très bien connus (Poe et al., 2020).

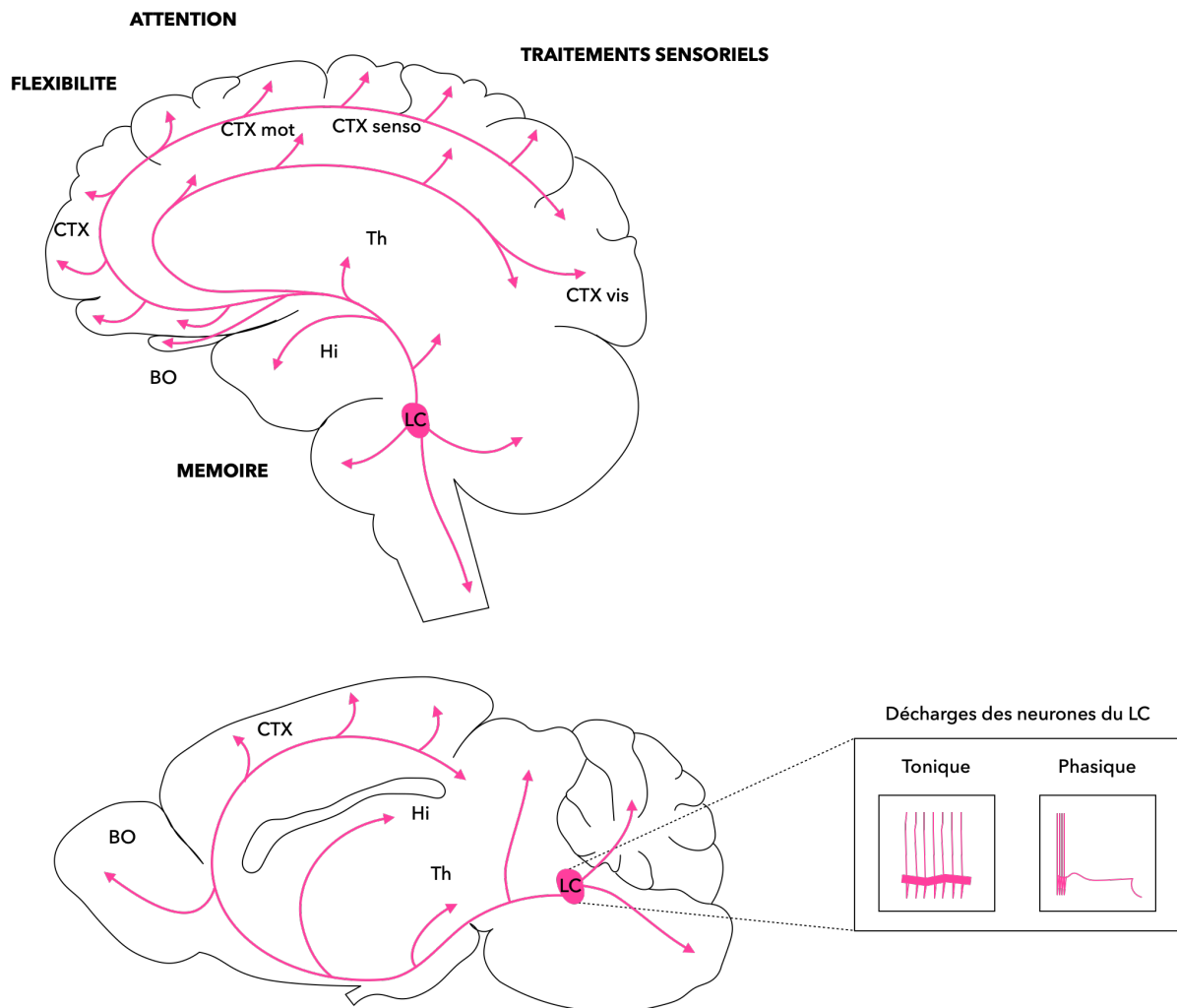


Figure 10. Le Locus Coeruleus, principal noyau noradrénergique du système nerveux.

Les neurones du *Locus Coeruleus* (LC) projettent sur l'ensemble du cerveau, notamment sur le bulbe olfactif (BO), le cortex frontal (CTX) et les structures de la mémoire telles que l'hippocampe (Hi). Ces larges projections expliquent l'implication de la NA dans la modulation de la flexibilité cognitive, la mémoire, l'attention et les traitements sensoriels. Les neurones du LC déchargent selon deux modes d'activité distincts : un mode tonique et un mode phasique. L'activité tonique est caractérisée par une fréquence lente et régulière durant l'éveil. L'activité phasique est observée en réponse à des stimuli nouveaux ou saillants dans l'environnement et correspond à de brèves bouffées de 2 ou 3 potentiels d'action qui sont suivies d'une période de suppression d'activité. D'après Marien et al., 2004; Sara, 2009; Schwarz and Luo, 2015.

3.3.3.2. Activité électrique des neurones du *Locus Coeruleus*

Les propriétés électrophysiologiques des neurones du LC sont connues depuis assez longtemps. Les enregistrements électrophysiologiques ont montré que les neurones du LC étaient plus actifs durant l'éveil et que leur activité diminuait durant le sommeil (Aston-Jones and Bloom, 1981a). Les neurones du LC déchargent selon deux modes d'activité distincts : un mode tonique et un mode phasique (Aston-Jones and Bloom, 1981b; Aston-Jones and Cohen, 2005; Berridge and Waterhouse, 2003). L'activité tonique des neurones du LC est caractérisée par des schémas de décharge lents et réguliers qui représentent l'activité basale du LC. L'activité phasique des neurones du LC est quant à elle caractérisée

par la décharge ponctuelle des neurones du LC. Elle est composée d'une seule salve de 2 à 3 potentiels d'action (10-20 Hz) suivie d'une période de suppression d'activité (Akaike, 1982; Aston-Jones and Bloom, 1981b; Clayton et al., 2004). Les stimuli issus de nombreuses modalités sensorielles (auditifs, visuels, somatosensoriels) qui sont nouveaux ou saillants induisent cette activité phasique dans le LC (Aston-Jones and Bloom, 1981b; Foote et al., 1980; Rasmussen et al., 1986; Sara et al., 1994). L'activité phasique se produit également lorsque les animaux sont engagés dans leur environnement et qu'un changement se produit (Xiang et al., 2019). Les neurones du LC sont activés de manière phasique pour permettre à l'individu de se concentrer sur la réalisation d'une tâche en filtrant les stimuli pertinents de ceux qui ne le sont pas, contribuant ainsi à l'exécution de réponses comportementales adaptatives.

3.3.3.3. Le système noradrénergique est engagé dans de nombreux processus cognitifs

Grâce à ses vastes projections dans l'ensemble du cerveau, et l'alternance de ses deux types d'activité, le LC est impliqué dans la régulation de nombreux comportements. En plus de ses effets sur les états de vigilance (alternance éveil/sommeil) (Berridge et al., 1993; Carter et al., 2010), la NA régule les traitements sensoriels, notamment en olfaction (décrit dans la partie 1.2.6.1 de cette thèse) et contribue à divers aspects de la cognition tels que l'attention, la flexibilité cognitive, ainsi que l'apprentissage et la mémoire (Hansen, 2017; Logue and Gould, 2014; Poe et al., 2020; Sara, 2009; Sara and Bouret, 2012; Waterhouse and Navarra, 2019).

Les projections massives de la NA dans le cortex préfrontal (Agster et al., 2013; Cerpa et al., 2019; Schwarz et al., 2015) lui permettent de moduler de nombreuses fonctions cognitives. Il a notamment été démontré que les manipulations du système NA dans différentes sous-régions du cortex préfrontal sont capables de modifier sélectivement certains aspects de la flexibilité comportementale. Par exemple, les lésions chirurgicales des afférences NA du cortex préfrontal médian altèrent l'attentional set-shifting, un comportement dans lequel les animaux doivent réorienter leur attention vers de nouveaux stimuli pour obtenir une récompense (McGaughy et al., 2008; Newman et al., 2008). Cet effet est spécifique de la NA puisque la lésion des fibres cholinergiques n'affecte pas ce comportement (McGaughy et al., 2008). De plus la lésion des afférences NA dans le cortex préfrontal médian n'affecte pas non plus la flexibilité cognitive dans une tâche d'inversion de règle (Newman et al., 2008), un comportement dépendant du COF (Schoenbaum et al., 2000, 2006). Bien que le COF reçoive de denses afférences en provenance du LC (Cerpa et al., 2019; Schwarz et al., 2015), le rôle exact de la NA dans cette structure reste peu documenté. Toutefois des modélisations suggèrent que le changement de règle déclenche une activité tonique des neurones du LC, ce qui semble nécessaire au comportement de flexibilité sous-tendu par le COF (Sadacca et al., 2017).

Le LC projette également massivement sur l'hippocampe, dans le gyrus denté et les régions CA1 et CA3 où il est notamment impliqué dans la modulation de l'encodage et de la consolidation de la mémoire hippocampo-dépendante (Hansen, 2017; Takeuchi et al., 2016; Wagatsuma et al., 2018). Des premières études ont montré que des lésions bilatérales du LC conduisent à des altérations de l'encodage de la mémoire spatiale, notamment dans le labyrinthe en T (Amaral and Foss, 1975) et la piscine de Morris chez le

rongeur (Compton et al., 1995). L'implication du LC dans l'encodage de la mémoire spatiale a été confirmée plus récemment (Kempadoo et al., 2016). Dans cette étude, la stimulation optogénétique des axones du LC dans l'hippocampe dorsal pendant la phase d'acquisition d'une tâche de localisation d'objets a permis d'améliorer la rétention de la position de l'objet chez les animaux stimulés. Toutefois, cette amélioration dépend de la libération de dopamine par les fibres du LC, et non pas de noradrénaline. En effet, l'injection d'un antagoniste des récepteurs dopaminergiques D1 et D5 combinée avec la stimulation optogénétique du LC empêche cette amélioration (Kempadoo et al., 2016), tandis que les antagonistes noradrénergiques n'ont aucun effet. Une autre étude a également montré que l'inhibition optogénétique des axones du LC dans la région CA3 de l'hippocampe empêchait l'encodage d'informations contextuelles d'un nouvel environnement (Wagatsuma et al., 2018). Dans cette même étude, l'apprentissage contextuel a été bloqué par l'infusion intrahippocampique d'un antagoniste sélectif des récepteurs dopaminergiques de type D1, mais pas par le propranolol, un antagoniste β -adrénergique (Wagatsuma et al., 2018). Enfin, une étude a montré que les projections du LC dans l'hippocampe permettaient de consolider la mémoire (Takeuchi et al., 2016). Dans cette étude, les souris devaient quotidiennement apprendre à retrouver une récompense dont la localisation changeait tous les jours. L'exposition à un environnement nouveau à la suite du dernier apprentissage permet aux souris de se souvenir de l'endroit où était cachée la récompense après un délai de 24h, ce qui n'était pas possible chez les souris non exposées à la nouveauté. Cet effet est dépendant du LC puisque la stimulation optogénétique des neurones du LC après l'apprentissage permet de mimer les effets de l'exposition à la nouveauté. L'amélioration de la mémoire serait due à la libération de dopamine puisque l'application d'un antagoniste dopaminergique bloque les effets bénéfiques de la stimulation du LC, alors que l'application d'un antagoniste β -adrénergique n'a aucun effet (Takeuchi et al., 2016). De nombreuses données dans l'hippocampe indiquent donc que la DA libérée par les fibres du LC joue un rôle essentiel dans la plasticité synaptique pour soutenir la mémoire hippocampe-dépendante.

3.3.3.4. Le système noradrénergique régule la plasticité neuronale

La régulation de la plasticité par le système NA a principalement été étudiée dans l'hippocampe. Un type de plasticité synaptique dans l'hippocampe est la potentialisation à long terme ou LTP, qui est une augmentation de l'efficacité synaptique (Bliss and Lømo, 1973) permettant l'amélioration de l'apprentissage et de la mémoire (Kandel, 2001). La NA, non seulement améliore la formation de la mémoire, mais permet également l'induction de la LTP au niveau des synapses excitatrices dans l'ensemble de l'hippocampe (O'Dell et al., 2010, 2015). Dans la région CA1 de l'hippocampe, l'activation des récepteurs β -adrénergiques facilite l'induction de la LTP lors de stimulations synaptiques plus faibles (Gelinias and Nguyen, 2005). Dans le gyrus denté, des études ont montré que la déplétion des fibres NA par des injections bilatérales de 6-hydroxydopamine dans le LC réduisait considérablement la LTP à la fois *in vitro* (Stanton and Sarvey, 1987) et *in vivo* (Straube et al., 2003). Inversement, l'activation des récepteurs β -adrénergiques facilite l'induction de la LTP dans le gyrus denté (Hansen and Manahan-Vaughan, 2015a). En plus de faciliter la LTP, la NA peut faciliter la dépression synaptique à long terme ou LTD dans la région CA1 de

l'hippocampe (Lemon et al., 2009) et dans le gyrus denté (Hansen and Manahan-Vaughan, 2015b).

Le système NA affecte également une autre forme de plasticité, qui est la neurogenèse hippocampique. Une étude a notamment montré qu'une lésion bilatérale du LC altère la mémoire de travail ainsi que la neurogenèse hippocampique (Coradazzi et al., 2016). Plus particulièrement, la perte des neurones NA était associée à une réduction de la prolifération, mais pas de la survie ou de la différenciation des progéniteurs dans le gyrus denté (Coradazzi et al., 2016). Ces résultats confirment des données plus anciennes qui ont montré que la lésion du LC par injection de N-(2chloroethyl)-N-ethyl-2-bromo-benzylamine hydrochloride induit une diminution de la prolifération des cellules souches présentes dans la zone sous granulaire du gyrus denté, sans affecter la survie des nouveaux neurones (Kulkarni et al., 2002).

Enfin, la NA influence le comportement de manière complexe en modulant l'activité des réseaux. Jusqu'il y a peu, seules les conséquences d'une activation du LC et de la libération de NA dans certaines régions cérébrales avaient été explorées dans diverses conditions comportementales, mais son effet sur les réseaux n'était pas connu (Bouret, 2019). Récemment, une étude sur des souris anesthésiées a montré que l'activation chémogénétique du LC, connue pour induire un comportement de stress en éveil, augmente fortement la connectivité à l'échelle du cerveau entier, avec des effets plus importants dans les réseaux de la saillance et de l'amygdale (Zerbi et al., 2019). De plus, ces effets sont bloqués par l'activation des récepteurs α_2 -adrénergiques présynaptiques inhibiteurs. Les modifications de la connectivité du réseau corrélient également avec la distribution des récepteurs noradrénergiques et dopaminergiques et avec les quantités de NA et de dopamine. Ces résultats ouvrent donc la porte à de futures études visant à mettre en relation les changements de réseau évoqués par l'activation du LC en lien avec le comportement.

3.3.3.5. Théorie noradrénergique de la réserve cognitive

Récemment, des études s'intéressant à l'intégrité du système NA au cours du vieillissement et aux bienfaits de la stimulation environnementale sur les fonctions cognitives ont ouvert la porte à la théorie NA de la RC (Robertson, 2013). Cette théorie propose que la préservation des fonctions cognitives et neurales au cours du vieillissement serait médiée par le système NA. Les stimulations tout au long de la vie par l'éducation, la stimulation mentale et les activités de loisirs qui conduisent à la formation d'une RC solliciteraient et amélioreraient l'efficacité du système NA. Cela permettrait à la NA de déclencher des mécanismes de plasticité synaptique et structurale qui pourraient être à l'origine de la construction de la réserve cognitive (Robertson, 2013).

Pour étudier l'intégrité du LC au cours du vieillissement, les études se sont principalement appuyées sur l'analyse histologique post-mortem de cerveaux humains. Pour quantifier les neurones du LC, diverses études ont compté les cellules pigmentées à la neuromélanine, un marqueur des cellules NA dans le LC. Alors que certaines études n'ont pas observé de différences liées à l'âge dans la densité de neurones (Mouton et al., 1994; Ohm et al., 1997; Theofilas et al., 2017), d'autres ont observé une diminution du nombre de neurones dans le LC dès 64 ans, qui semble spécifique à la partie antérieure du LC (Liu et al., 2019b; Manaye et al., 1995).

Plus récemment, l'intégrité du LC a été reliée à l'état des fonctions cognitives au cours du vieillissement (Clewett et al., 2016; Dahl et al., 2019; Mather and Harley, 2016; Robertson, 2013; Wilson et al., 2013). Une étude a suivi les performances cognitives de participants âgés de plus de 55 ans jusqu'à leur décès et a mesuré la densité de cellules dans le LC, le noyau du Raphé, la substance noire et l'aire tegmentale ventrale à leur décès (Wilson et al., 2013). Les capacités cognitives des participants ont été mesurées avec divers tests de mémoire, de vitesse de traitement et des tests visuo-spatiaux. Les résultats de cette étude ont montré que seule la densité de neurones dans le LC est liée aux performances cognitives puisqu'une densité neuronale plus importante est associée à une diminution plus faible des performances cognitives (Wilson et al., 2013). Une autre étude utilisant la résonance magnétique sensible à la neuromélanine pour identifier le LC a montré que ce dernier est sensible au vieillissement et que son intégrité anatomique est positivement associée au score de RC, ce qui suggère une préservation des fonctions cognitives chez les sujets âgés sains (Clewett et al., 2016). Plus récemment une étude a corrélé plus spécifiquement l'intégrité du LC antérieur avec les performances de mémoire (Dahl et al., 2019).

Chez les rongeurs, on peut également observer une dégradation du système NA liée à l'âge. En effet, une diminution de l'expression de la dopamine- β -hydroxylase (DBH), enzyme qui catalyse l'étape terminale de la synthèse de NA, est observée tardivement à 23 mois dans le LC chez la souris (Rey et al., 2012), suggérant une réduction de la synthèse de NA. Chez le rat âgé de 23 mois, la diminution de l'expression de DBH dans le LC s'accompagne d'une diminution de l'expression de *phox2a* et *phox2b*, deux facteurs de transcription qui contrôlent l'expression de la DBH et sont responsables du phénotype des neurones du LC, ce qui pourrait également refléter une mort neuronale (Zhu et al., 2005). Une diminution des fibres NA est également observée dans le BO des souris âgées de 23 mois (Rey et al., 2012). Chez le rat, une diminution des projections du LC sur l'hippocampe et le cortex frontal est également observée précocement dès 7 mois (Ishida et al., 2000, 2001). Toutefois, un mécanisme compensatoire se mettrait en place à l'âge intermédiaire chez ces animaux en réponse à la diminution de l'innervation NA. En effet, des données électrophysiologiques de mesure de latences antidromiques suggèrent un développement de l'arborisation axonale des neurones du LC (phénomène de « sprouting ») dans l'hippocampe et le cortex frontal des rats âgés de 20 mois, avant une diminution à 27 mois (Ishida et al., 2000). Le système NA semble donc être temporairement capable de compenser la perte d'une partie de ses neurones par le développement de l'arborisation axonale des neurones restants, comme cela a été montré après une lésion neurotoxique du LC par un traitement au DSP4 (Fritschy and Grzanna, 1992).

A ce jour, aucune étude chez l'animal n'a relié l'intégrité du LC à de meilleures performances comportementales. Toutefois, l'exposition des rongeurs à un environnement enrichi (EE), qui pourrait mimer les conditions conduisant à la constitution de la réserve cognitive chez l'humain, entraîne la libération de NA. Cet EE, qui repose sur des stimulations complexes incluant des stimulations multisensorielles renforcées, de l'exercice physique et des interactions sociales, a largement démontré des bénéfices cognitifs notamment sur la mémoire spatiale (Pang and Hannan, 2013), chez les rongeurs jeunes et âgés (Fuchs et al., 2016a, 2016b; Galani et al., 2007; Harati et al., 2013; Kumar et al., 2012; Mora-Gallegos et al., 2015; Simpson and Kelly, 2011). Ces améliorations comportementales sont sous-tendues par des modifications au niveau cellulaire. En effet, l'EE permet d'augmenter la

neurogenèse hippocampique (Kempermann, 2019; Neidl et al., 2016; van Praag et al., 2000) ainsi que la densité des épines dendritiques des neurones pyramidaux de la région CA1 de l'hippocampe (Kondo et al., 2012; Malik and Chattarji, 2012; Neidl et al., 2016; Rampon et al., 2000). L'EE permet également d'augmenter le niveau d'excitabilité des neurones de CA1 et du gyrus denté et facilite le phénomène de LTP (Irvine et al., 2006; Malik and Chattarji, 2012; Stein et al., 2016). Chez la souris âgée de 14 mois, un EE commencé dès l'âge de 6 mois permet également de contrecarrer les modifications de la méthylation de l'ADN normalement observées à cet âge et conduisant à des modifications d'expression des gènes qui régulent la plasticité, la signalisation neuronale et le métabolisme énergétique (Zocher et al., 2021).

Parmi toutes ces stimulations apportées par l'EE, c'est la nouveauté qui semble jouer un rôle plus important puisque le changement journalier des objets dans la cage semble offrir une plus grande protection que l'exercice physique (Li et al., 2013). Dans la modalité olfactive également, il a été montré que seule la présentation d'une odeur nouvelle chaque jour, plutôt que l'exposition à un grand nombre d'odeurs mais les mêmes tous les jours, permettait une amélioration de la mémoire olfactive et augmentait les niveaux de NA dans le BO (Veyrac et al., 2009). L'EE déclenche également la libération de NA dans l'hippocampe (Brenes et al., 2009; Galani et al., 2007), le cortex, le cervelet, et le pont du tronc cérébral (Naka et al., 2002), ce qui suggère qu'il pourrait exercer ses effets positifs par le biais de la libération de NA. Cette hypothèse est soutenue par l'observation de l'amélioration de la LTP de l'hippocampe par l'activation des récepteurs adrénergiques (Li et al., 2013). De plus, cette augmentation est spécifique à la NA puisqu'aucune augmentation en dopamine ou sérotonine n'a été observée dans ces mêmes régions (Naka et al., 2002). Enfin, l'EE et l'exercice physique induisent une plasticité structurale dans les fibres NA (Gómez et al., 2006; Nedelescu et al., 2017), ce qui soutiendrait l'hypothèse d'un effet protecteur d'un environnement enrichi sur le système NA.

En conclusion, l'activation répétée du système NA pourrait être le mécanisme par lequel l'éducation et les stimulations environnementales conduiraient à la constitution d'une RC (Robertson, 2013). Chez le rongeur, un environnement enrichi semble mimer les effets bénéfiques de la constitution d'une RC chez l'humain, en améliorant à la fois les fonctions cognitives et en préservant l'intégrité du cerveau. Dans la modalité olfactive, une session d'enrichissement olfactif basée sur la nouveauté augmente les performances olfactives, et ces effets sont médiés par la NA (Rey et al., 2012; Veyrac et al., 2009). Nous proposons donc que la stimulation olfactive pourrait permettre de booster également la RC, puisque les odeurs ont des effets bénéfiques également en dehors de la sphère olfactive.

3.3.4. Les stimulations odorantes ont des bénéfices en dehors de la sphère olfactive

3.3.4.1. Chez le jeune adulte

Chez l'humain comme chez le rongeur, les odeurs présentes dans les huiles essentielles agiraient sur le système nerveux central pour influencer l'humeur, le bien-être et les états émotionnels (Perry et al., 2012; Tsang and Ho, 2010). Par exemple, une étude a testé l'effet de la diffusion d'odeurs dans un contexte stressant tel qu'un cabinet dentaire

(Lehrner et al., 2005). Dans cette étude, il a été montré que les sujets exposés à une odeur ambiante d'orange ou de lavande présentaient un niveau d'anxiété inférieur à celui des sujets en condition contrôle. Les effets comportementaux provoqués par des odorants agréables et désagréables ont été liés à des modifications de la fréquence cardiaque qui est utilisée comme indice physiologique d'une réponse émotionnelle (Bensafi et al., 2002b, 2002a). De la même façon, l'exposition à certaines huiles essentielles permet de réduire le stress chez les rongeurs (Faturi et al., 2010; Linck et al., 2010). Par exemple, les souris exposées à de l'huile essentielle d'orange passent plus de temps à explorer les bras ouverts du labyrinthe et la chambre éclairée du paradigme lumière/obscurité, ce qui suggère un effet anxiolytique (Faturi et al., 2010).

En plus d'un effet sur l'anxiété, l'exposition à des odeurs plaisantes pourrait permettre l'amélioration de certaines fonctions cognitives. Ainsi, il a été montré que des participants exposés à des odeurs de citron et de fleurs trouvaient plus de mots que des participants non exposés dans une tâche dans laquelle il leur était demandé de trouver des anagrammes (Baron and Thomley, 1994). Ces effets ont été reproduits en utilisant une tâche de construction de mots (Baron and Bronfen, 1994). Une autre étude chez de jeunes participants sains a évalué diverses fonctions cognitives telles que l'attention, la mémoire de travail et la mémoire à long terme à la suite de l'exposition à des huiles essentielles de lavande et de romarin (Moss et al., 2003). En fonction de l'odeur utilisée les effets ne sont pas exactement les mêmes, mais dans leur ensemble les résultats de cette étude ont montré une amélioration de la vigilance, du temps de réaction en réponse aux tâches attentionnelles et mnésiques, ainsi qu'une amélioration de la mémoire. Ces résultats seraient sous-tendus par l'amélioration de l'humeur provoqué par les odeurs. Le même type d'expérience a ensuite été reproduit avec deux autres huiles essentielles menthe poivrée et ylang ylang, avec des résultats similaires sur les performances cognitives (Moss et al., 2008). En revanche, chez l'animal, l'exposition à des odeurs nouvelles pendant 30 jours n'améliore pas la mémoire spatiale des souris jeunes adultes (Rocheffort et al., 2002), toutefois les effets d'une stimulation plus longue n'ont pas été testés.

3.3.4.2. Chez les sujets âgés

Au cours du vieillissement normal, quelques études ont également montré des bénéfices d'une exposition aux odeurs en dehors de la sphère olfactive. L'exposition quotidienne à des odeurs agréables, par application de parfum ou de crème parfumée, améliore l'humeur chez des hommes et femmes âgés de 40 à 65 ans (Abriat et al., 2007; Schiffman et al., 1995a, 1995b). En plus d'améliorer l'humeur, l'exposition à des odeurs pendant 5 jours diminue la sensation de stress de femmes âgées entre 55 et 65 ans (Joussain et al., 2014). Étant donné que le stress joue un rôle clé dans le vieillissement cérébral (Prenderville et al., 2015), non seulement l'exercice mais aussi la stimulation environnementale peuvent contribuer à protéger le cerveau vieillissant contre les facteurs de stress (Garrido, 2011). Plus récemment, il a également été montré qu'en plus d'améliorer le bien-être des sujets âgés, un entraînement olfactif de 20 semaines améliore la fluence verbale (Birte-Antina et al., 2018). De plus, un questionnaire évaluant l'âge que ressent une personne, à quel point elle juge son apparence physique âgée, et si ses activités et intérêts sont similaires à celles des personnes de son âge a montré que l'entraînement olfactif diminue de 6 ans l'âge cognitif des participants (Birte-Antina et al., 2018). Toutefois cela

reste assez subjectif puisque cette évaluation se base sur le jugement des participants. En revanche, aucun effet n'a été observé sur la mémoire à court terme, l'attention et la concentration. Il est à noter également qu'une exposition ponctuelle à une odeur familière et agréable permet d'améliorer la mémoire épisodique des patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Glachet et al., 2018) et permettrait aux patients de mieux se projeter dans le futur (Glachet and El Haj, 2020).

En résumé, l'exposition à un environnement enrichi, et en particulier l'exposition répétée à la nouveauté, entrainerait la libération répétée de NA dans l'ensemble du cerveau. En raison de ses rôles dans le recrutement des ressources cérébrales pour soutenir les fonctions cognitives et dans la régulation de la plasticité dans l'ensemble du cerveau (Berridge and Waterhouse, 2003; Sara, 2009; Sara and Bouret, 2012), la NA est susceptible de médier les effets bénéfiques de l'enrichissement sur le fonctionnement cérébral et soutenir la constitution de la RC. Par ailleurs, un enrichissement olfactif de longue durée améliore la fonction olfactive chez les sujets âgés, et l'exposition à des odeurs a des effets bénéfiques en dehors de la sphère olfactive. L'enrichissement olfactif par exposition à des odeurs nouvelles pourrait ainsi constituer un moyen de booster la RC.

OBJECTIFS ET HYPOTHESES DE TRAVAIL

Le vieillissement normal des populations s'accompagne de déficits cognitifs et sensoriels, notamment olfactifs qui affectent la qualité de vie et la santé des sujets âgés. Cependant, le vieillissement normal reste peu étudié et les mécanismes cellulaires qui sous-tendent ces déficits sont encore largement méconnus. Ce manque de connaissances limite la prise en charge des sujets âgés ainsi que le développement de stratégies de remédiation pour lutter contre le vieillissement olfactif et cognitif.

Concernant la fonction olfactive, l'apprentissage perceptif olfactif, une forme d'apprentissage implicite dans lequel la discrimination entre deux odorants proches sur le plan perceptif est améliorée après une exposition répétée à ces deux odorants, nécessite l'apport continu de nouveaux neurones dans le BO adulte via la neurogenèse adulte. Ce processus de neurogenèse est altéré au cours du vieillissement puisque le nombre de nouveaux neurones est drastiquement réduit dans le BO. Cependant, comment le vieillissement affecte la capacité d'intégration de ces nouveaux neurones dans le BO âgé n'est pas connu. Par ailleurs, cette neurogenèse adulte est altérée précocement mais les conséquences de cette altération sur l'apprentissage à l'âge moyen restent à évaluer. Chez la souris jeune adulte, l'apprentissage perceptif olfactif augmente la survie des nouveaux neurones et leur activation en réponse à l'odeur apprise et induit également une plasticité structurale spécifique dans ces nouveaux neurones en augmentant le nombre d'épines dendritiques. Chez la souris âgée, l'apprentissage perceptif olfactif ne permet plus d'augmenter la survie des nouveaux neurones, en revanche, nous ne connaissons pas son effet sur la plasticité structurale des nouveaux neurones.

Dans une première étude, nous avons cherché à avancer dans la compréhension des mécanismes cellulaires sous-tendant le vieillissement olfactif, en conditions basales et dans des conditions sollicitant la plasticité, à travers le modèle de l'apprentissage perceptif olfactif. Nous avons étudié plus finement la cinétique d'apparition des déficits d'apprentissage perceptif olfactif au cours de la vie de la souris (de 2 à 18 mois) et d'altération de la neurogenèse bulbaire adulte. Nous nous sommes plus particulièrement demandé si les nouveaux neurones pouvaient s'intégrer de manière aussi efficace dans le BO âgé que dans le BO jeune adulte. Pour cela, nous avons étudié la morphologie des nouveaux neurones en conditions basales afin d'appréhender leur développement et leur intégration dans le réseau bulbaire et en condition de plasticité, afin d'évaluer leur capacité à soutenir l'apprentissage par la mise en place d'une plasticité structurale. Étant donné qu'une réduction drastique du nombre de nouveaux neurones dans le BO est observée dès l'âge moyen, à 10 mois, c'est-à-dire bien plus précocement que l'apparition des déficits d'apprentissage perceptif, nous avons également émis l'hypothèse que des mécanismes compensatoires existeraient à l'âge moyen pour maintenir les capacités d'apprentissage perceptif. Les nouveaux neurones, bien que moins nombreux, pourraient augmenter leur nombre de connexions synaptiques pour continuer de moduler l'activité du réseau bulbaire. Ces mécanismes ne seraient ensuite plus efficaces aux âges les plus avancés, ce qui expliquerait la disparition des capacités d'apprentissage à l'âge très avancé.

Le développement de la réserve cognitive semble une stratégie efficace afin de contrecarrer les effets délétères du vieillissement. Ce concept a été proposé pour expliquer

les incongruences observées entre le degré d'altérations cérébrales et les performances cognitives relativement bien préservées de certains sujets âgés. Chez l'humain, le développement de la réserve cérébrale passe par un niveau scolaire élevé et la pratique d'activités de loisirs qui stimulent la cognition. Cependant, les mécanismes cellulaires et neuronaux qui sous-tendent la réserve cognitive sont encore peu connus. Récemment, la noradrénaline a été proposée pour soutenir la construction de la réserve cognitive puisque ce neuromodulateur apparaît comme un élément clé du vieillissement cognitif réussi. Ce neurotransmetteur est en effet impliqué dans la régulation de nombreux comportements et dans la plasticité neuronale et son intégrité anatomique est positivement associée à de meilleures performances cognitives au cours du vieillissement. Le *Locus Coeruleus*, principale source de noradrénaline dans le cerveau, est activé par la nouveauté et les *stimuli* saillants. Dans la modalité olfactive, les stimulations odorantes ont un effet bénéfique hors de la sphère olfactive et pourraient améliorer le fonctionnement cérébral global en préservant l'intégrité du système noradrénergique.

Dans une deuxième étude, nous avons donc développé une stratégie de remédiation du vieillissement olfactif et cérébral. L'exposition à des odeurs diminue le stress, la dépression et l'âge cognitif chez les sujets âgés, démontrant le bénéfice de la stimulation odorante hors de la sphère olfactive chez l'humain également. Nous avons ainsi émis l'hypothèse qu'une stimulation olfactive répétée tout au long de la vie et basée sur un renouvellement des odorants serait un moyen efficace de stimuler les fonctions cognitives et de contrecarrer les effets délétères du vieillissement, via la sollicitation du système noradrénergique et le développement d'une réserve cognitive. Des tests des capacités olfactives, de mémoire spatiale et de flexibilité cognitive ont été réalisés à 2, 12, 15 et 18 mois afin d'établir la chronologie d'apparition du déclin de ces fonctions au cours de la vie de la souris et de caractériser les effets d'une stimulation olfactive débutée à l'âge adulte et maintenue tout au long de la vie sur ces fonctions cognitives. Pour déterminer si un enrichissement débuté plus tardivement dans la vie serait également efficace, un groupe supplémentaire de souris a démarré son enrichissement à l'âge moyen (12 mois) au lieu de l'âge jeune adulte (3 mois). Afin d'identifier les bases cellulaires de l'effet d'un enrichissement olfactif tout au long de la vie chez les souris âgées, nous avons réalisé des analyses histologiques dans des régions du cerveau liées aux performances comportementales évaluées : le bulbe olfactif pour les capacités de discrimination olfactive et la mémoire olfactive associative, le cortex orbitofrontal pour la flexibilité cognitive, et l'hippocampe dorsal pour la mémoire spatiale. Étant donné que la noradrénaline semble essentielle au maintien des fonctions cognitives dans le cerveau vieillissant, et le lien connu entre la neurogenèse adulte et la mémoire, nous avons tout d'abord concentré notre analyse sur le système noradrénergique et la neurogenèse adulte. Enfin, nous nous sommes intéressés aux réseaux cérébraux activés lors de la tâche. L'activation cérébrale est diminuée chez les sujets âgés comparés aux jeunes adultes, mais des phénomènes de compensation peuvent apparaître avec l'âge, permettant le recrutement d'un plus grand nombre de régions cérébrales pour exécuter une tâche pour laquelle les sujets jeunes n'activent que quelques régions spécifiques. Nous avons effectué cette analyse de connectivité fonctionnelle sur 31 régions cérébrales sélectionnées pour leur participation connue au traitement des informations olfactives, à la mémoire spatiale, ou aux systèmes de neuromodulation. Ainsi, nous avons fait l'hypothèse que l'enrichissement olfactif pourrait

permettre de remanier le réseau cérébral activé chez les animaux âgés, soit en permettant de recruter un réseau cérébral plus large, soit en permettant au circuit dédié de moins se dégrader et de rester plus spécifique. Les expériences comportementales de cette seconde étude ont été réalisées par Claire Terrier dans le cadre de sa thèse (soutenue en novembre 2018). J'ai poursuivi ce travail en approfondissant l'analyse des données comportementales et en effectuant toute l'analyse histologique. Ce deuxième article est donc co-signé avec 2 co-premières auteures.

Les résultats sont présentés sous forme de deux articles, l'article 1 sera soumis très prochainement au journal « Neurobiology of Aging », l'article 2 est en préparation.

RESULTATS

Les résultats sont présentés sous forme de deux articles :

- Etude 1 : « **12-month-old is a pivotal age for olfactory perceptual learning and its underlying neuronal plasticity in aging mice** »
 - Etude 2 : « **Long-run olfactory enrichment induces non-olfactory cognitive benefits, noradrenergic plasticity and brain network remodeling in aged mice** »
-

12-month-old is a pivotal age for olfactory perceptual learning and its underlying neuronal plasticity in aging mice

Juliette Greco-Vuilloud ^{1,2,3*}, Maëllie Midroit ^{1,2,3*}, Claire Terrier ^{1,2,3}, Jérémy Forest ^{1,2,3}, Joëlle Sacquet ^{1,2,3}, Nathalie Mandairon ^{1,2,3}, Anne Didier ^{1,2,3} and Marion Richard ^{1,2,3}.

¹ INSERM, U1028; CNRS, UMR5292; Lyon Neuroscience Research Center, Neuroplasticity and Neuropathology of Olfactory Perception Team, Lyon, F-69000, France;

² University of Lyon, F-69000, France;

³ University Lyon 1, Villeurbanne, F-69000, France.

* equal contribution

Corresponding author

Marion Richard, Ph.D.

Centre de Recherche en Neurosciences de Lyon

Centre Hospitalier Le Vinatier - Bâtiment 462 - Neurocampus Michel Jovet

95 boulevard Pinel

69675 Bron Cedex

France

tel: +33 4 81 10 65 20

marion.richard@univ-lyon1.fr

READY FOR SUBMISSION TO “NEUROBIOLOGY OF AGING” JOURNAL

Acknowledgements

This work was supported by CNRS, Inserm, Lyon 1 University, Fondation de France-Fondation Roudnitska (PhD fellowships to M.M and J.G-V) and Région Auvergne-Rhone-Alpes (PhD fellowship to C.T). We would like to thank C. Benetollo from the Neurogenetic and Optogenetic Platform of the Lyon Neuroscience Research Center (CRNL) for lentiviral production and G. Froment, D. Nègre and C. Costa from the lentivector production facility /SFR BioSciences de Lyon (UMS3444/US8).

Abstract

Normal brain aging is associated with deficits in various cognitive processes as well as sensory processing, relying on fine alterations of synaptic contacts and synaptic plasticity. Age-induced alterations might be discrete in basal conditions and revealed only when the system is submitted to a challenging environment requiring cerebral plasticity, such as a learning context. We used the model of olfactory perceptual learning, a non-associative form of learning in which discrimination between perceptually similar odorants is improved following exposure to these odorants, to better understand the cellular bases of olfactory aging in mice. In young adult mice, this learning relies on plasticity occurring within the olfactory bulb and requires adult-born neurons. We first characterized the kinetics of olfactory perceptual learning alteration over mice lifetime by evaluating the learning abilities and memory retention of 2-, 6-, 12- and 18-month-old mice. We identified 12-months as a decisive time point, when memory retention subtly declines before learning becomes totally altered at later ages. We then analyzed the behavioral performances in light of the learning-induced structural plasticity of adult-born granule cells within the olfactory bulb. Our data revealed that the structural plasticity induced by olfactory perceptual learning is specific of adult-born granule cells responding to the learned odorants in young adult mice. Importantly, we showed that this structural plasticity loses its specificity in 12-month-old mice, in parallel with memory impairments. Altogether, our data refine our understanding of aging-related alterations of plasticity mechanisms in the olfactory bulb and their induction of olfactory learning and memory deficits.

Introduction

Age-induced brain functional alterations have long been considered as resulting from massive neuronal cell death. However, the current literature reports a remarkable preservation of neuronal numbers in the aged brain and suggests that structural alterations are restricted to specific brain regions and rely in fine alterations of synaptic contacts and synaptic plasticity (Burke and Barnes, 2006). This observation holds true in the olfactory system, where olfactory functional alterations are accompanied by fine histological modifications in the peripheral and central regions of the olfactory pathway, including reduced neuronal replacement in the olfactory epithelium (Weiler and Farbman, 1997; Ueha et al., 2018), reduced adult neurogenesis and synaptic density in the olfactory bulb (OB) (Mirich et al., 2002; Enwere, 2004; Luo et al., 2006; Richard et al., 2010; Rey et al., 2012; Moreno et al., 2014).

In addition, age-induced alterations can be discrete in basal conditions and revealed only when the system is submitted to a challenging environment requiring cerebral plasticity. In the olfactory system, several studies including ours, support this hypothesis by reporting age-related decrease in olfactory detection and discrimination performances as well as specific deficits in olfactory learning and memory (e.g. (Roman et al., 1996; Enwere, 2004; Kraemer and Apfelbach, 2004; Dardou et al., 2008; Patel and Larson, 2009; Rey et al., 2012; Moreno et al., 2014; Yoder et al., 2017)). Notably, we reported disruption of olfactory perceptual learning in 18-month-old mice (Moreno et al., 2014), a non-associative form of learning in which discrimination between perceptually similar odorants is acquired following exposure to these odorants (Mandairon et al., 2006a, 2006c). However, we still do not know when this learning deficit appears across the mouse lifetime nor whether it is a progressive or more brutal degradation of learning abilities.

Olfactory perceptual learning is dependent on adult neurogenesis in the olfactory bulb (OB), the first cortical relay in the olfactory pathway. Indeed, neuroblasts that are continuously generated in the adult subventricular zone (SVZ), migrate to the OB where 95% of them differentiate into GABAergic interneurons named granule cells (Ming and Song, 2011). Progressive integration of adult-born granule cells is observed into the bulbar network during approximately 6 weeks after their birth (Whitman and Greer, 2007; Panzanelli et al., 2009; Kelsch et al., 2010; Sailor et al., 2016). During this period, migration, survival and synaptic integration of adult-born neurons are modulated by olfactory stimulation from the environment as well as by different forms of learning involving an olfactory stimulus (e.g. (Rocheffort et al., 2002; Alonso et al., 2006; Mandairon et al., 2006b, 2011; Mizrahi, 2007; Sultan et al., 2010; Belnoue et al., 2011; Lepousez et al., 2014)). Notably, olfactory perceptual learning increases the survival and the number of adult-born neurons responding to the learned odorant in young adult mice (Moreno et al., 2009), as well as induces a specific structural plasticity (an increased spine density) in these neurons, that is not displayed by granule cells born during ontogeny (Daroles et al., 2016; Mandairon et al., 2018; Forest et al., 2020). Experimental strategies aiming at blocking adult neurogenesis, interfering with the structural plasticity of adult-born neurons or inhibiting their activity

revealed their crucial implication in olfactory perceptual learning (Moreno et al., 2009; Daroles et al., 2016; Forest et al., 2020). Notably, the presence and survival of adult-born OB neurons are required for the maintenance of olfactory memory after olfactory perceptual learning (Forest et al., 2019).

Olfactory perceptual learning and its underlying structural plasticity of adult-born granule cells are thus well described in young adult mice, as well as the reduced adult neurogenesis in aging mice and inability of 18-month-old mice to perform this learning. However, it remains unknown when this learning deficit appears across the mouse lifetime and how this behavioral alteration relates to the deterioration of neuronal plasticity within the OB. In the current study, we took advantage of the olfactory perceptual learning paradigm to better understand the functional and structural changes occurring during brain aging. We characterized the kinetics of olfactory perceptual learning alteration during lifetime by evaluating the learning abilities of 2-, 6-, 12- and 18-month-old mice and analyzed the learning and memory retention performances in light with the learning-induced structural plasticity of adult-born granule cells within the OB at both short- and long-term after learning.

Material and Methods

Experimental design

In order to characterize the kinetics of olfactory perceptual learning alteration during lifetime, 4 independent groups of mice aged 2, 6, 12 and 18 months at the beginning of the experiment were constituted and tested for olfactory discrimination (pre-test) (Fig.1A). Each age group was subdivided into a “control” and a “learning” subgroup and tested twice after a 10-day olfactory enrichment period (short- and long-term post-tests), in order to evaluate the efficiency of learning and the duration of memory retention after learning. Half of the mice were sacrificed at short-term after learning and the other half at long-term after learning to identify structural changes underlying short-and long-term memory retention. For neuronal structural analysis, mice received an intracerebral injection of lentivirus expressing GFP at D0 to label a cohort of adult-born granule cells starting their integration in the OB at the beginning of learning (Fig.1A). Since the maturation of adult-born neurons lasts around 6 weeks (Whitman and Greer, 2007; Kelsch et al., 2010), adult-born neurons analyzed at the short-term time point were aged 25 days and thus still rather immature, while adult-born neurons analyzed at the long-term time point were aged 60 days and had reached maturity. Finally, a last group of mice aged of 12 months received an injection of a lentivirus expressing DsRed 3 months before the beginning of the experiment to label a cohort of pre-existing neurons, that were fully mature when enrichment started and we analyzed the effect of learning on their morphology (Supp.Fig.2A).

Mice and housing

A total of 159 male C57Bl6/J mice (Charles River, L'Arbresle, France) were used in this study. Mice arrived at 8 weeks and got aged in our animal facility in order to control their olfactory environment

during their entire life. Mice were housed in groups in a controlled environment with food and water *ad libitum* and under a normal light cycle (light phase from 6am to 6pm). Behavioral experiments were all performed in the afternoon. Protocols have been validated by the Lyon 1 University ethical committee and registered by the French Ministry of Research (protocol number DR2013-48). All efforts have been made to reduce the number and suffering of mice used in these experiments, in accordance with the European Directive (2010/63/UE).

Olfactory perceptual learning

Learning

Olfactory perceptual learning consisted in an olfactory enrichment of 1 hour of exposure per day during 10 days to 100 μ l of pure (+) Limonene and (-) Limonene, a pair of odorants that is not spontaneously discriminated by mice (CAS number (+) Lim : 5989-27-5, (-) Lim : 5989-54-8, purity > 97%, Sigma-Aldrich), as previously described (Mandairon et al., 2006c, 2006a; Moreno et al., 2009, 2014; Viner et al., 2015). Control non-enriched mice were exposed to 100 μ l of odorless mineral oil (Sigma-Aldrich). The performances of discrimination between (+) Limonene and (-) Limonene were assessed before (pre-test) and twice after the enrichment period (post-tests), using a habituation/dishabituation task (Fig.1A). The post-tests were performed 5 days after the enrichment period (D22-D23, short-term post-test) to evaluate the mice ability to display the perceptual learning and at 40 days after the enrichment (D58-59, long-term post-test) in order to test the long-term retention of the learning.

Discrimination testing

For the habituation/dishabituation task, (+) Limonene and (-) Limonene were presented in a tea ball (60 μ l of odorant at 1Pa). A session consisted in one 50-second presentation of mineral oil, then four 50-second presentations of the first odorant (OHab1-4) at 5-minute intervals, followed by one 50-second presentation of the second odorant of the pair (OTest). Our group previously reported that such 5 minutes interval between two odorant presentations is efficient to avoid interference of age-induced olfactory memory alterations (Rey et al., 2012). Investigation was defined as active sniffing within 5 cm of the tea ball. (+) Limonene and (-) Limonene were alternatively used as OHab or OTest. For each mouse, the data analyzed correspond to the mean of both configurations ((+) and (-) Limonene as OTest). Another pair of odorants (Dodecanone/Carvone), known to be perceptually dissimilar odorants, was used during the pre-test to ensure that aging mice are still able to discriminate an easy pair of odorants (Supp.Fig.1B).

Statistical analysis

Mice that explored less than 1s during the first odor presentation (OHab1) were excluded from the analysis, as well as mice whose values were over mean+2SD for more than two trials (these exclusions represented 112 trials among a total of 1054 trials). Data were analyzed using R software (stats package).

As the behavioral data did not satisfy to normality and variance equality criteria (assessed with Shapiro-Wilk normality test on residues and Bartlett test of homogeneity of variances), we performed non-parametric tests: a Friedman's ANOVA to test for trial effect (OHab1-4, OTest) followed by unilateral paired Wilcoxon comparisons (OHab1 vs OHab4 to test for odor habituation and OHab4 vs OTest to test for odor discrimination). Significance was set at $p=0.05$.

Evaluation of adult-born granule cells' morphology

Lentivirus injection protocol

Granule cells were transduced at their birth with a lentivirus coding for a fluorescent protein under the ubiquitous phosphoglycerate kinase promoter (Lenti-PGK-GFP, Fig.1A), provided through Addgene #12252 by the Trono Lab. The lentivirus was bilaterally injected in the SVZ at the rate of 150nl/min at the following stereotaxic coordinates (from bregma: AP: +1 mm, ML: ± 1 mm, DV: -2.3 mm; Narishige Scientific Instruments, Japan) under anesthesia (50mg/kg ketamine and 7.5mg/kg xylazine, i.p.). The virus titer was 2×10^9 UI/ml and the injected volume was adapted to obtain an exploitable density of labeled neurons in the different age groups (100nl/side for 2- and 6-month-old, 150nl/side for 12-month-old and 300nl/side for 18-month-old mice). After the surgery, mice received i.p. injection of the Ketoprofen analgesic (2mg/kg in 0.9% NaCl). This treatment was administered during 2-3 days after the surgery to facilitate the mouse recovery. Mice were allowed to recover from surgery during 8 days before the beginning of the olfactory enrichment period. Only the 12-month-old group was used for the morphological analysis and compared to 2-month-old mice, based on the behavioral results identifying this age as a critical time point for learning and memory degradation.

Olfactory stimulation before sacrifice

In order to differentiate neurons responding to the learned odorants from non-responding neurons, we used expression of the immediate early gene Zif268 as a marker of odor-induced neuronal activity (Inaki et al., 2002; Mandairon et al., 2008; Moreno et al., 2009, 2012, 2014; Forest et al., 2020). Mice were housed individually in a clean cage during one hour. Then two tea balls containing (+) Limonene and (-) Limonene as during the enrichment were added to the cage for one hour. Mice were then placed in a new clean cage in order to reach a maximal Zif268 expression level before being sacrificed. Mice were deeply anesthetized (pentobarbital 400mg/kg) and killed by intracardiac perfusion of 4% paraformaldehyde (in phosphate buffer PBS, pH=7.4). Brains were dissected, post-fixed in 4% paraformaldehyde, cryoprotected in 20% sucrose for 4 days and frozen in cooled isopentane. 40 μ m-thick OB sections were made with a Microm HM550 cryostat.

Immunohistochemistry

We performed a GFP/Zif268 double immunostaining to identify adult-born neurons responding to the learned odorants from non-responding neurons. Sections were rehydrated in 1X Phosphate Buffer Saline

(PBS), then permeabilized for 30 min in Triton X-100 (0.5% in 1X PBS) and rinsed 5 min in 1X PBS at room temperature. To block nonspecific binding, sections were incubated at room temperature during 2h in a solution containing goat serum (5%) and Triton X-100 (0.3%) in 1X PBS. They were then incubated with primary antibodies diluted in the blocking solution during 48h at 25°C: chicken anti-GFP (1:1000, Anaspec/Tebu, ref 55423 RRID:AB_1657428) and rabbit anti-Zif268 (1:1000, Erg1, Santa Cruz Biotechnology, ref sc-189 RRID:AB_2231020). After rinsing, sections were incubated for 2h at room temperature with a solution containing goat serum (5%), biotinylated goat anti-rabbit (1:200, Vector, ref BA-1000) and goat anti-chicken Alexa 488 (1:250, Molecular Probes, ref A11039) antibodies in 1X PBS. Sections were rinsed and incubated for 90 min with Streptavidin Alexa 546 (1:1000, Molecular Probes, ref S11225). Finally, after rinsing, sections were coverslipped with a Vectashield medium containing DAPI (Vector Lab).

Image acquisition

Image acquisition was performed by an experimenter that was blind to the age and enrichment status of the animal, as well as to the age of the neuron. Image acquisition was performed with a Zeiss pseudo-confocal microscope (AxioImager.ZI), equipped with an Apotome system and an Axio Vision 4.8 software. Neurons were randomly chosen within the granule cell layer along the entire antero-posterior axis of the OB. The selection criterion was that the neurons should appear complete with its cell body and dendritic arborization. Z-stack were acquired through the region of interest (1 μ m step for the 20x objective, 0.28 μ m for the 40x oil immersion objective and 0.2 μ m for the 100x oil immersion objective).

Morphological analysis

Morphological analysis was performed by an experimenter that was blind to the age and enrichment status of the animal, as well as to the age of the neuron and its immunoreactivity for Zif268. Morphological analysis was performed using NeuronStudio software (Wearne et al., 2005; Rodriguez et al., 2008), allowing to measure total length of the dendritic arborization (sum of all dendritic branches, starting from the first branch point), number of branch points (including the first branch point) and spine density (number of spines per μ m of dendritic length) on both apical and basal dendritic compartments (Fig.2A and Fig.3A), as previously described (Mandairon et al., 2018; Forest et al., 2020).

Statistics

Data were analyzed using R software (stats package and car package for ANOVAs). Data normality and variance equality criteria were assessed respectively using Shapiro-Wilk normality test on residues and Bartlett test of homogeneity of variances. When the necessary hypotheses were verified, parametric statistical tests were used, namely 3- or 4-way ANOVAs (type III ANOVAs with animal age, delay post-learning, learning status and Zif status as factors) and followed by *post-hoc* bilateral unpaired t-tests, corrected for selected multiple comparisons by FDR (Fig.2D, Fig.4A-B). When the necessary

hypotheses were not verified, non-parametric statistical tests were used, namely Wilcoxon bilateral unpaired tests, corrected for multiple comparisons by FDR (Fig.2B-C, Fig.3, Fig.4C-D). Detailed statistical results are provided in Supp. Tables 2, 3 and 4.

Evaluation of pre-existing granule cells' morphology

In order to label a cohort of pre-existing granule cells in 12-month-old mice, a group of mice received an injection of a lentivirus expressing DsRed 3 months before the beginning of the experiment (Supp.Fig.2A). These pre-existing neurons were aged 3 months and thus fully mature when learning started. Viral injection was performed as explained above with a Lenti-PGK-DsRed virus (titer 6.1×10^8 UI/ml), whose generation was described previously (Forest et al., 2020). DsRed immunostaining followed a protocol similar to the one described above. Blocking solution contained goat serum (5%), bovine serum albumin (2%) and Triton X-100 (0.3%) in 1X PBS. Chicken anti-DsRed antibody (EnCor, 1/5000, ref ABIN1842222) was diluted in the blocking solution and incubated during 48h at 25°C. Goat anti-chicken Alexa 546 antibody (1:250, Molecular Probes, ref A11040) was diluted in goat serum (5%) in 1X PBS and applied for 2h at room temperature. Image acquisition and analysis of neuronal morphology were performed as described for adult-born neurons. For statistical analysis, as only two groups were compared, unpaired bilateral student t-tests were used when data verified normality and variance equality, otherwise unpaired bilateral Wilcoxon tests were used. Detailed statistical results are provided in Supp. Tables 2, 3 and 5.

Results

Evolution of olfactory perceptual learning performances along lifetime.

In each age group (2, 6, 12 and 18 months), olfactory discrimination performances were tested using a habituation/dishabituation task, once before (pre-test) and twice after an olfactory enrichment period (short- and long-term post-tests) (Fig.1A). Short- and long-term testing allowed to evaluate respectively the ability to perform olfactory perceptual learning and the long-term retention of this learning.

As expected, in pre-enrichment test sessions (Supp.Fig.1A-B), all groups of mice (2-, 6-, 12- and 18-month old showed habituation for the two tested odorant pairs ((+) Limonene / (-) Limonene and Dodecanone / Carvone) (Friedman's ANOVA showed a significant trial effect, and Wilcoxon unilateral paired tests revealed a significantly decreased investigation time from OHab1 to OHab4, see Supp. Table 1 for complete statistical report). None of the groups discriminated (+) Limonene from (-) Limonene, as revealed by a similar investigation time between OHab4 and OTest ($p > 0.05$; Supp.Fig.1A), while all groups discriminated Dodecanone from Carvone ($p < 0.001$; Supp.Fig.1B). This indicated that even aged mice were able to spontaneously discriminate dissimilar odorants and confirmed that basic olfactory discrimination ability is not altered by aging (Moreno et al., 2014).

When tested shortly after the 10-day enrichment period (short-term test), all groups of mice showed odor habituation (Supp.Fig.1C-D; Supp. Table 1). None of the control groups discriminated (+) Limonene from (-) Limonene, as revealed by a similar investigation time between OHab4 and OTest (Fig.1B; Supp. Table 1). In the learning groups, while 2-, 6- and 12-month-old enriched mice discriminated (+) Limonene from (-) Limonene ($p < 0.05$), 18-month-old mice were not able to discriminate between the two odorants, indicating their inability to perform perceptual learning (Fig.1B; Supp. Table 1).

In the long-term test (40 days after the enrichment period), all groups of mice habituated to the odorant (Supp.Fig.1E-F; Supp. Table 1). None of the control groups discriminated (+) Limonene from (-) Limonene (Fig.1C; Supp. Table 1). Interestingly, in the learning groups, while 2 and 6-month-old enriched mice still discriminated (+) Limonene from (-) Limonene, 12- and 18-month-old mice were not able to discriminate between the two odorants (Fig.1C; Supp. Table 1), indicating that 12-month-old mice had forgotten the learned discrimination.

In conclusion, our results identified that 12-month-old mice were still able to learn to discriminate between two similar odorants but their memory was shorter than younger mice (2- and 6-month-old). 12-month-old is thus a critical time point during mice lifetime, when memory retention after olfactory perceptual learning subtly declines before learning becomes totally altered at later ages.

Integration of adult-born granule cells in the aging OB in basal conditions and after olfactory perceptual learning

Since memory retention impairments after olfactory perceptual learning appeared at the age of 12 months, we focused our morphological analysis on this key time point and compared it to the 2-month-old group. Given the critical role of adult-born granule cells in olfactory perceptual learning acquisition and retention (Moreno et al., 2009; Daroles et al., 2016; Mandairon et al., 2018; Forest et al., 2019, 2020), we analyzed the morphology of this neuronal population at both short- and long-term after olfactory perceptual learning to identify structural changes that could underly behavioral performances. Since the maturation of adult-born granule cells lasts around 6 weeks (Whitman and Greer, 2007; Kelsch et al., 2010), neurons analyzed at the short-term time point were aged 25 days and thus still rather immature, while neurons analyzed at the long-term time point were aged 60 days and had reached maturity. We focused first on apical dendrites and second on basal dendrites of adult-born granule cells (Fig.2A and 3A). This analysis was performed on both control and learning groups, in order to determine how adult-born granule cells integrate into the middle-aged OB and how the learning-induced structural

plasticity in adult-born granule cells could be impaired at middle age when learning impairments appear.

Apical dendrites

Regarding the apical compartment (Fig.2A), total dendritic length and number of branch points showed no significant impact of learning (control vs learning), age of the animal (2 vs 12 months) or delay post-learning (D25 vs D60) (Fig.2B-C, see Supp. Table 2 for complete statistical report on Fig.2). These first results indicated 1) that adult-born granule cells integrating in 12-month-old OB developed an apical ramification that was similar to cells born in a 2-month-old OB and 2) that learning did not modify the development of the apical ramification, whatever the age of the animal.

When analyzing apical spine density, our data showed a significant effect of learning ($F_{(1,136)}= 8.7775$; $p= 0.0036010$) and of the interaction between animal age * delay post-learning * learning ($F_{(1,136)}=14.4096$; $p=0.0002207$), as well as a strong trend toward an effect of the age of the animal ($F_{(1,136)}=3.7090$; $p=0.0562051$). When looking at the effect of aging in control mice, post-hoc tests revealed that apical spine density at D25 tended to be higher in neurons of 12-month-old mice compared to 2-month-old mice (Fig.2D, $p=0.07$), suggesting that granule cells born in a 12-month-old OB might displayed an increased synaptic integration in control conditions. When looking at the effect of learning, post-hoc tests revealed that in 2-month-old mice, apical spine density was higher in D25 neurons of the learning group compared to their control (Fig.2D, $p=0.025$), confirming previous data reporting learning-induced structural plasticity in adult-born granule cells of young adult mice shortly after learning (Daroles et al., 2016; Mandairon et al., 2018; Forest et al., 2020). Such effect of learning was no longer visible in D60 neurons, confirming our previous report (Mandairon et al., 2018). In 12-month-old mice, no effect of learning was visible in D25 neurons, but the spine density of these neurons was equivalent to that of the 2-month-old learning group. Keeping in mind that D25 neurons' spine density in 12-month-old control animals tend to be higher than in their 2-month-old counterpart, this finding suggested that this high spine density observed in control conditions at 12 months could be sufficient to enable learning, without requiring further increase. Only a late effect of learning was found in 12-month-old mice, since the apical spine density was significantly higher in D60 neurons of the learning group compared to controls (Fig.2D, $p=0.0025$). Furthermore, in the 12-month-old learning group, the apical spine density was higher in D60 neurons than in D25 neurons (Fig.2D, $p=0.045$), suggesting an extended period of spine growth after learning at middle age. The spine density reached by D60 neurons of 12-month-old mice after learning also exceeded that of D60 neurons of 2-month-old learning mice ($p=0.005$).

Altogether, these data revealed that the early structural plasticity that was induced by perceptual learning on the apical dendrites of immature adult-born granule cells immediately after learning (D25), was altered at middle age. Indeed, granule cells born in a 12-month-old OB did not display such early

plasticity, but instead displayed a delayed plasticity, visible at long-term post-learning (D60), when mice had forgotten. This structural plasticity was thus concomitant with behavioral performances only in young adult mice. However, 12-month-old mice were still able to perform perceptual learning but retained memory only during a short period following learning. We thus concluded that other cellular mechanisms were at play to ensure learning at 12 months. In addition to the above hypothesis suggesting that the high spine density observed in control conditions at 12 months could be sufficient to enable learning, we tested a second hypothesis proposing that pre-existing mature granule cells could be a cellular substrate of perceptual learning at this age. Therefore, we labeled a cohort of pre-existing granule cells in 12-month-old mice and assessed their learning-induced structural plasticity (Supp.Fig.2A). At the age of 12 months, pre-existing granule cells present in the OB are either neurons born during ontogeny or neurons born earlier during adulthood. However, given the high level of renewal of granule cells (approx. 50% in 12 months) permitted by adult neurogenesis (Imayoshi et al., 2008), the number of granule cells born during the perinatal period that remain present in the OB at 12 months is low. Therefore, we chose to label and study pre-existing granule cells that were born during adulthood but had reached full maturity at the beginning of learning. The pre-existing granule cells that we investigated were thus aged 3 months when enrichment started. This analysis was performed for the short-term time point after learning, when 12-month-old mice displayed efficient learning. The apical spine density of pre-existing granule cells appeared similar between control and learning 12-month-old groups (Fig.2E; Supp. Table 2), as well as their apical dendritic arborization (Supp.Fig.2B-C; Supp. Table 5). This population of pre-existing granule cells of 12-month-old mice thus did not display structural plasticity induced by learning on their apical dendrites, suggesting that they were unlikely to contribute to learning.

Basal dendrites

Regarding the basal compartment (Fig.3A), total dendritic length and number of basal dendrites showed no significant changes with learning (control vs learning), age of the animal (2 vs 12 months) or delay post-learning (D25 vs D60) (Fig.3B-C, see Supp. Table 3 for complete statistical report on Fig.3). These results indicated 1) that adult-born granule cells integrating in 12-month-old OB developed basal dendrites similarly to cells born in a 2-month-old OB and 2) that learning did not modify the development of the basal dendrites, whatever the age of the animal.

When analyzing basal spine density and looking at the effect of aging in control mice, our data revealed that basal spine density was significantly higher in D60 neurons of 12-month-old mice compared to 2-month-old mice (Fig.3D, $p=0.019$), suggesting an increased synaptic input onto the basal dendrites of adult-born granule cells integrating in a middle-aged OB. Regarding the effect of learning, basal spine density was higher in D60 neurons of the 2-month-old learning group compared to its control group (Fig.3D, $p=0.019$), revealing a structural plasticity induced by learning in adult-born granule cells in 2-month-old mice at long-term post-learning. On the contrary, 12-month-old mice displayed no learning-

induced changes in the basal spine density of adult-born granule cells, neither at short-term nor at long-term post-learning (D25 or D60).

Altogether, these data revealed that granule cells born in a 12-month-old OB displayed a different integration than neurons born in a 2-month-old OB, suggestive of an increased synaptic input on their basal dendrites with aging. In addition, the structural plasticity that was induced by perceptual learning on the basal dendrites of adult-born granule cells at long-term post-learning (D60) in 2-month-old mice, was absent in 12-month-old mice, when memory impairments appeared. Similarly to our analysis on the apical dendrites, we investigated whether pre-existing granule cells could be a cellular substrate of perceptual learning in 12-month-old mice. The basal spine density of pre-existing granule cells appeared similar between control and learning 12-month-old groups (Fig.3E; Supp. Table 3), as well as their basal dendritic arborization (Supp. Fig.2D-E; Supp. Table 5). These pre-existing granule cells of 12-month-old mice thus did not display structural plasticity induced by learning on their basal dendrites, suggesting that they are unlikely to contribute to learning in middle-aged mice.

Structural plasticity of adult-born granule cells is specific of cells responding to the learned odorants in young adult mice but becomes unspecific with aging.

We then hypothesized that learning would preferentially affect the morphology of adult-born granule cells that are responsive to the learned odorants. Mice were exposed to the learned odorants 1h before sacrifice and we used expression of the immediate early gene *Zif268* to identify neurons responding to the learned odorants (Inaki et al., 2002; Mandairon et al., 2008; Moreno et al., 2009, 2012, 2014; Forest et al., 2020). GFP/*Zif268* double staining allowed us to identify adult-born granule cells responding to the learned odorants (ZIF+ neurons) and compare their morphology to adult-born granule cells that do not respond to the learned odorants (ZIF- neurons). Complete statistical report on Fig.4 is provided in Supp. Table 4.

In 2-month-old mice, ZIF+ neurons displayed a higher apical spine density at D25 in the learning group when compared to control (Fig.4A top panel, $p=0.003$), confirming our previous report (Forest et al., 2020). This difference disappeared at long-term post-learning, since it was no longer visible at D60. On the contrary, ZIF- neurons of 2-month-old mice had similar apical spine densities whatever the learning status of the mice (learning *vs* control) or the delay post-learning (D25 *vs* D60) (Fig.4A bottom panel). These results indicated that the learning-induced structural plasticity that we identified in 2-month-old mice was specific of adult-born granule cells responding to the learned odorants. This remained true for the basal dendrites, as basal spine density was higher in the 2-month-old learning group compared to its control for ZIF+ neurons (Fig.4C top panel, D25 $p=0.166$ and D60 $p=0.019$) but not for ZIF- neurons (Fig.4C bottom panel). On the contrary, in 12-month-old mice, both ZIF+ and ZIF- D60 granule cells displayed increased apical spine densities in the learning group (Fig.4B top and bottom panels, ZIF+

$p=0.057$, ZIF- $p=0.003$). There were no learning-induced changes in basal spine density in 12-month-old mice, whatever the time post-learning or the responsiveness of adult-born granule cells to the learned odorants (Fig.4D top and bottom panels).

This comparison of the effect of learning on subpopulations of adult-born granule cells responding or not to the learned odorants demonstrated that olfactory perceptual learning still had an effect on the morphology of adult-born granule cells in 12-month-old mice, but that this effect had lost specificity when compared to 2-month-old mice. Indeed, the learning-induced plasticity on apical spines was delayed in 12-month-old mice and affected adult-born granule cells that did not respond to the learned odorants (and not only cells responding to the learned odorants as in 2-month-old mice).

Altogether our morphological data revealed that aging altered the structural plasticity induced by olfactory perceptual learning in adult-born granule cells. Indeed, in 2-month-old mice, this learning induced an increase of spine density on both apical and basal dendritic compartments but specifically in adult-born granule cells responding to the learned odorants. With aging, this plasticity disappeared on basal spines and lost its specificity on apical spines (delayed plasticity affecting also cells that do not respond to the learned odorants), suggesting that this altered plasticity could contribute to the decreased memory capacities of middle-aged mice.

Discussion

12-month-old is a decisive time point in the progressive degradation of olfactory perceptual learning and its underlying plasticity with aging.

Olfactory perceptual learning is a non-associative form of learning in which discrimination between perceptually similar odorants is improved following exposure to these odorants (Moreno et al., 2009). We provide here the first report that middle-aged mice (12 months) are still able to acquire this discrimination capacity but their memory is shorter than younger mice (5 to 40 days in 12-month-old mice *versus* more than 40 days in 2- and 6-month-old mice). This memory impairment is accompanied by an alteration of the structural plasticity induced by olfactory perceptual learning in adult-born granule cells. Indeed, in 2-month-old mice, perceptual learning induces an increase of spine density on both apical and basal dendritic compartments, specifically in adult-born granule cells responding to the learned odorants. In 12-month-old mice, this plasticity has disappeared on basal spines and lost its specificity on apical spines: the plasticity is delayed and affects also cells that do not respond to the learned odorants. This effect is unlikely due to an alteration of the expression of the activity marker, as the density of Zif-positive granule cells is similar in naïve young adult and aged mice in response to exposure to (+) Limonene (Moreno et al., 2014).

In 2-month-old mice, a higher number of apical spines would lead to an increased inhibition exerted by adult-born granule cells onto mitral cells (Moreno et al., 2009; Mandairon et al., 2018; Forest et al.,

2020) via the reciprocal dendrodendritic synapses (Price and Powell, 1970; Shepherd et al., 2007). The fact that this increased inhibition is specifically exerted by granule cells responding to the learned odorants refines more specifically the representation of these odorants within the OB, improves pattern separation and thereby discrimination in 2-month-old mice (Chu et al., 2016). On the contrary, in 12-month-old mice, the increase of apical spine density happens at a later time point after learning and in all adult-born granule cells (responding and not responding to the learned odorants), when aging mice have forgotten. Interestingly, the spine density reached by D60 granule cells of 12-month-old mice after learning exceeded that of the same neuronal population in 2-month-old mice after learning. Such a broad increase of inhibitory contacts, regardless of the participation of granule cells to the network coding for the learned odorants suggests a deficit in synapse pruning that would affect pattern separation and could contribute to the long-term instability of the discrimination memory observed behaviorally. More generally, this loss of specificity of structural plasticity in the aging OB could be related to the reduced specificity of activation patterns that is often observed in the aging brain (Grady, 2012; Cabeza et al., 2018). Whether the delay and the loss of specificity of structural plasticity is an intrinsic property of granule cells born in a 12-month-old OB and/or result from changes in the availability of molecular cues inducing such plasticity remains to be determined.

Such decline of memory at 12 months precedes the complete alteration of olfactory perceptual learning that we observe in 18-month-old mice, in agreement with our previous study (Moreno et al., 2014). The reduced memory duration in 12-month-old mice could be due to several different processes: a discrimination efficiency reached immediately after learning that is weaker than in 2-month-old mice and therefore would be more rapidly lost with time causing early forgetting or a similar efficiency of acquired discrimination but associated to an alteration of the maintenance mechanisms allowing persistence of this memory. A last hypothesis could be the alteration of the reconsolidation of this memory upon reactivation. Indeed, we report here an extended memory duration in 2-month-old mice after olfactory perceptual learning (superior to 40 days), in comparison with previous reports where this acquired discrimination capacity was spontaneously lost between 30 and 40 days post-learning (Mandairon et al., 2018; Forest et al., 2019). This apparent discrepancy could be explained by the fact that, in the present protocol, mice were tested twice after learning (25 and 40 days post-learning). This result suggests that the reactivation of the memory trace by retesting the animals increases memory duration in young adult mice. One could thus also explain the memory deficit of 12-month-old mice by an alteration of this reconsolidation upon reactivation.

Neuronal bases of memory retention after olfactory perceptual learning in 2-month-old mice

Our results suggest that the reactivation of adult-born granule cells that are responsive to the learned odorants can extend memory duration in young adult mice, presumably by enabling adult-born neurons' survival. This is consistent with other data from our group showing that the maintenance of the stimulus in the environment beyond the initial 10 days of training promotes the survival of these neurons and

extends the duration of preservation of the discrimination capacities (Forest et al., 2019). Interestingly, basal spine density is higher in granule cells of 2-month-old mice in the learning group compared to their control group at D60, indicating the long-term persistence of structural plasticity in adult-born granule cells. Such persistence was not observed in a previous study (Mandairon et al., 2018), in which discrimination was lost 40 days after learning. This suggests that a high basal spine density and corresponding high corticofugal and neuromodulatory control inputs, such as glutamatergic, noradrenergic, cholinergic and serotonergic inputs (Fletcher and Chen, 2010; Linster and Escanilla, 2019) could be one of the neuronal bases of memory maintenance in 2-month-old mice. Among the neuromodulatory inputs received on basal dendrites of granule cells, noradrenaline is required for olfactory perceptual learning and regulates adult-born granule cell survival in young adult mice (Moreno et al., 2012). A specific increase of this innervation restricted to adult-born granule cells responding to the learned odorants could increase their survival among all adult-born granule cells and thereby explain the increased recruitment of adult-born neurons to participate to the network coding for the learned odorants (Moreno et al., 2009; Forest et al., 2020) and contribute to memory maintenance. Conversely, adult-born granule cells in 12-month-old mice that do not show any structural plasticity on basal spines would not survive as efficiently and this lack of plasticity could contribute to reduced retention of discrimination memory at this age.

How do 12-month-old mice learn to discriminate?

Despite the alteration of the number of adult-born granule cells (Enwere, 2004; Luo et al., 2006; Rey et al., 2012; Moreno et al., 2014) and of their structural plasticity (current study), middle-aged mice are still able to acquire fine olfactory discrimination capacities following enrichment. Two hypothetical mechanisms could be proposed to underly the short-lasting perceptual learning taking place at 12 months. In the first mechanism, the number of adult-born neurons (although low) could still be sufficient to allow task acquisition. In this first study investigating how granule cells born in an aging OB integrate in control conditions, our results suggest an increased integration of granule cells born in a 12-month-old OB, both in terms of synaptic output onto mitral cells and synaptic inputs received from mitral cells on apical spines (increased apical spine density at a relatively immature stage) and from centrifugal fibers on basal spines (increased basal spine density at a more mature stage). This increased integration within the bulbar network could be a mechanism to compensate for the low number of adult-born granule cells produced at middle age (Enwere et al., 2004; Luo et al., 2006; Rey et al., 2012) and maintain the remodeling of the bulbar network allowed by adult neurogenesis. We show here that the spine density of adult-born granule cells in 12-month-old mice after learning (although not different from control conditions) is elevated and equivalent to that of 2-month-old mice after learning. These neurons thus may exert a sufficient inhibition to enable the acquisition of perceptual learning at 12 months, without needing to display structural plasticity after learning. This inhibition could also be reinforced by functional synaptic plasticity occurring on the spines of adult-born neurons. Our results suggest that this

form of plasticity would be short lasting and would allow learning acquisition but not a long-term maintenance of the memory. Implication of adult-born neurons in memory in aged animals despite their low number has also been reported in the hippocampus. Indeed, adult-born neurons in the aged dentate gyrus retain their capacity for participating in functional networks (Marrone et al., 2012) and their recruitment during a complex task is associated with resilience to cognitive aging (Montaron et al., 2020). In a second mechanism, adult-born granule cells would not contribute to perceptual learning in middle-aged mice and other cellular mechanisms could be implemented in the OB network to support learning, but would be short-lasting and/or non-reactivable mechanisms. In young adult mice, increasing complexity of the olfactory perceptual learning induces the additional recruitment and structural plasticity of granule cells born during the perinatal period (Forest et al., 2020). Our current data suggest that the recruitment of pre-existing granule cells (3-month-old neurons) is not one of these compensatory mechanisms in middle-aged mice. However, we cannot exclude the recruitment of neurons born perinatally, although given the renewal of granule cells (approx. 50%) permitted by adult neurogenesis (Imayoshi et al., 2008), the number of granule cells born during the perinatal period that remain present in the OB at 12 months would be low.

In conclusion, this study identified middle age (12 months) as a pivotal age, when memory retention after olfactory perceptual learning subtly declines before learning becomes totally altered at later ages. Structural plasticity is induced by learning specifically in adult-born granule cells responding to the learned odors in young adult mice, a process that loses its specificity as soon as middle age. These results contribute to refining our understanding of the network remodeling induced by olfactory perceptual learning in young adult mice and provide new insights on how aging leads to alterations of plasticity mechanisms in the olfactory bulb and thereby induces progressive olfactory learning and memory deficits.

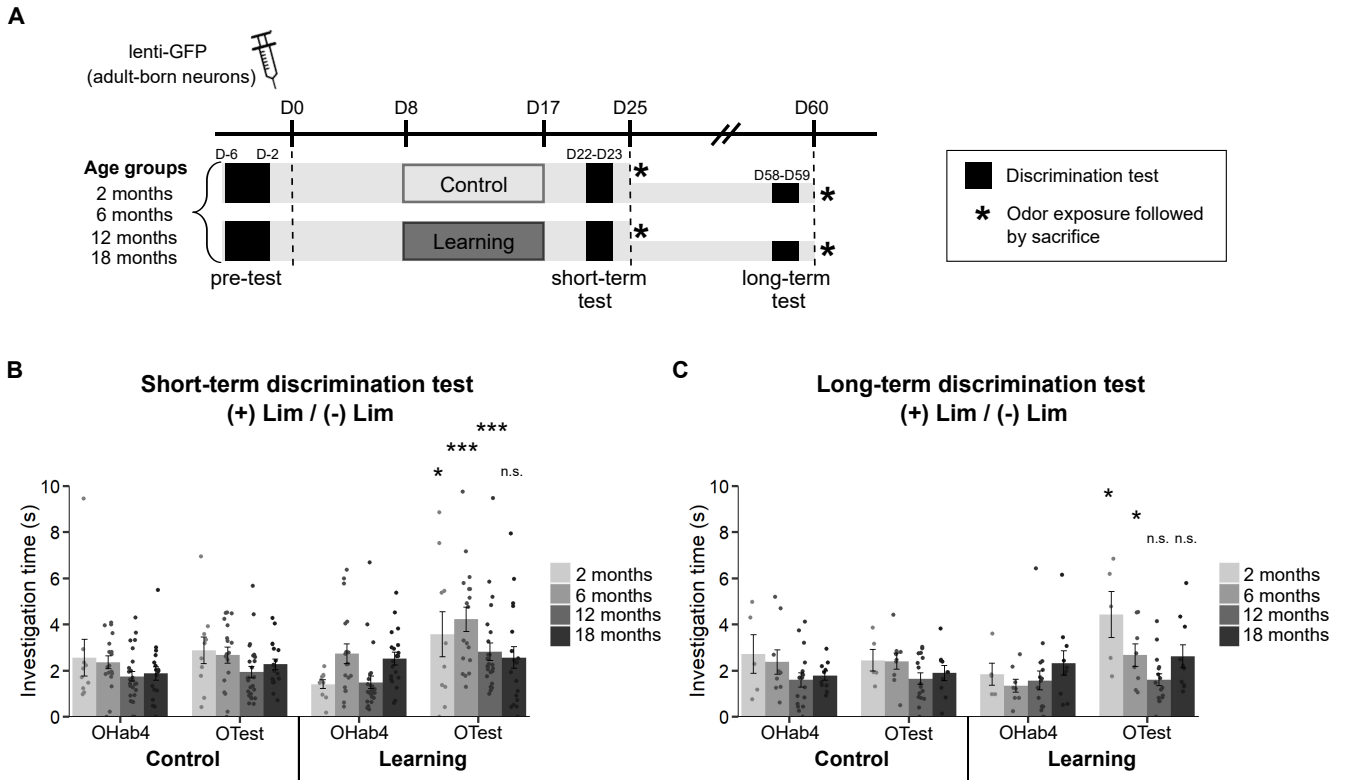


Figure 1: Olfactory perceptual learning is progressively altered during aging.

(A) Experimental design. For each age group (2, 6, 12 and 18 months), two sub-groups of mice (control and learning) were tested for their discrimination ability between (+) Limonene and (-) Limonene, before the olfactory enrichment period (pre-test) and after the olfactory enrichment period (short-term test) before sacrifice (D25). Half of the mice performed an additional long-term test before sacrifice (D60). Olfactory enrichment was performed during 10 days by daily exposure to both (+) Limonene and (-) Limonene. For the control group, odorants were replaced by odorless mineral oil. All mice received an intra-cerebral injection of a GFP-encoding lentivirus at D0 to label a cohort of adult-born neurons born 8 days before the beginning of learning.

(B-C) Discrimination was tested by comparing the investigation time between OHab4 and OTest. Shortly after a 10-day odor enrichment period (B), mice of the learning group successfully discriminated (+) from (-) Limonene ($p < 0.05$) up to 12 months of age, while 18-month-old learning mice, as control mice of all ages, never discriminated the two odorants ($p > 0.05$). At long-term testing (C), only 2- and 6-month-old mice of the learning groups successfully discriminated (+) from (-) Limonene ($p < 0.05$), while older learning mice (12 and 18 months), as control mice of all ages, never discriminated the two odorants ($p > 0.05$). All results are given as mean \pm SEM, dots represent individual mice. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ ($n = 5-25$ mice per group, see Suppl. Table 1 for details).

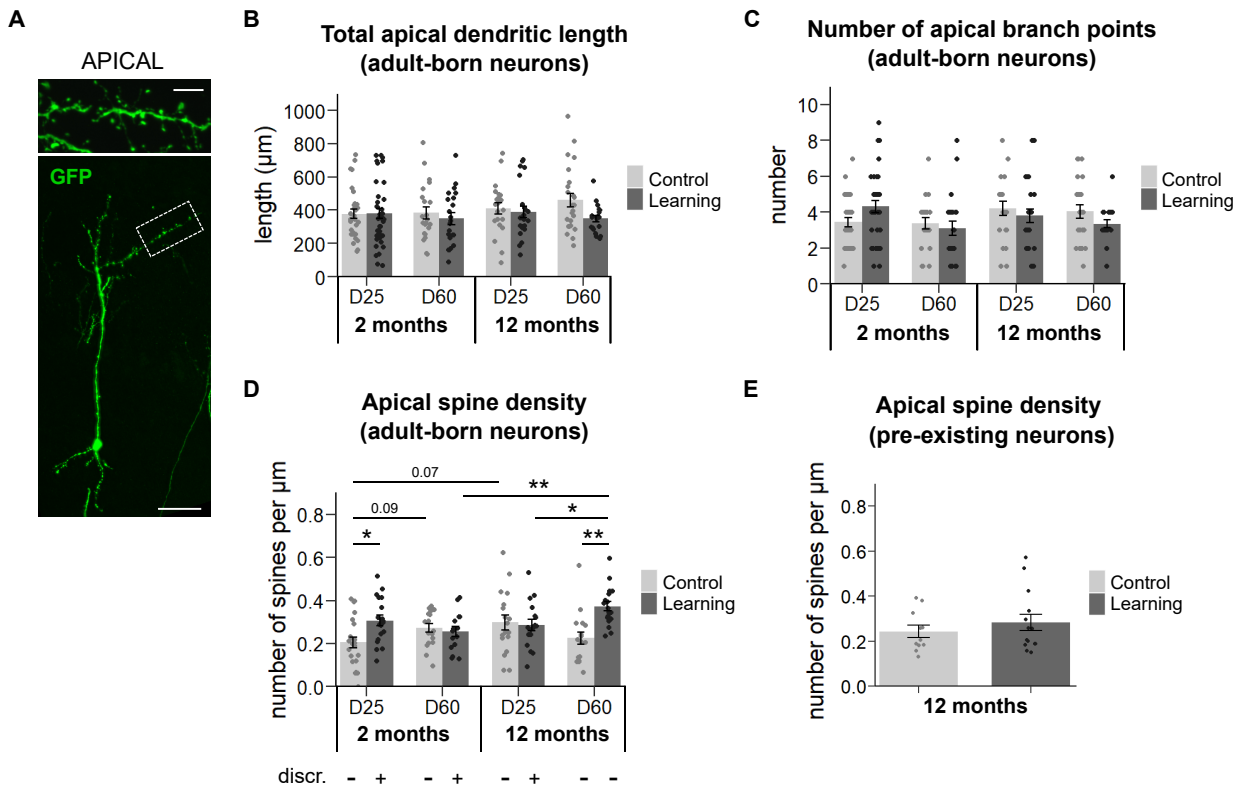


Figure 2: Structural plasticity induced by olfactory perceptual learning on apical dendrites of adult-born granule cells is altered by aging.

(A) Representative image of an adult-born granule cell expressing GFP in the OB. Inset shows an apical dendritic segment with dendritic spines. Scale bars = $50\mu\text{m}$ and $5\mu\text{m}$ in inset.

(B-C) Apical dendrites of adult-born granule cells show no significant changes in their total length (B) and number of branch points (C) with age of the animal (2 vs 12 months), delay post-learning (D25 vs D60) or learning (control vs learning group). (n=20-39 neurons per group, from 4-5 animals).

(D) Apical spine density of adult-born granule cells is increased by learning at D25 in 2-month-old mice and at D60 in 12-month-old mice. (n=15-22 neurons per group, from 4-5 animals).

(E) Apical dendrites of pre-existing granule cells show no changes in spine density with learning in 12-month-old mice (control vs learning). (n=10-14 neurons per group, from 3-4 animals).

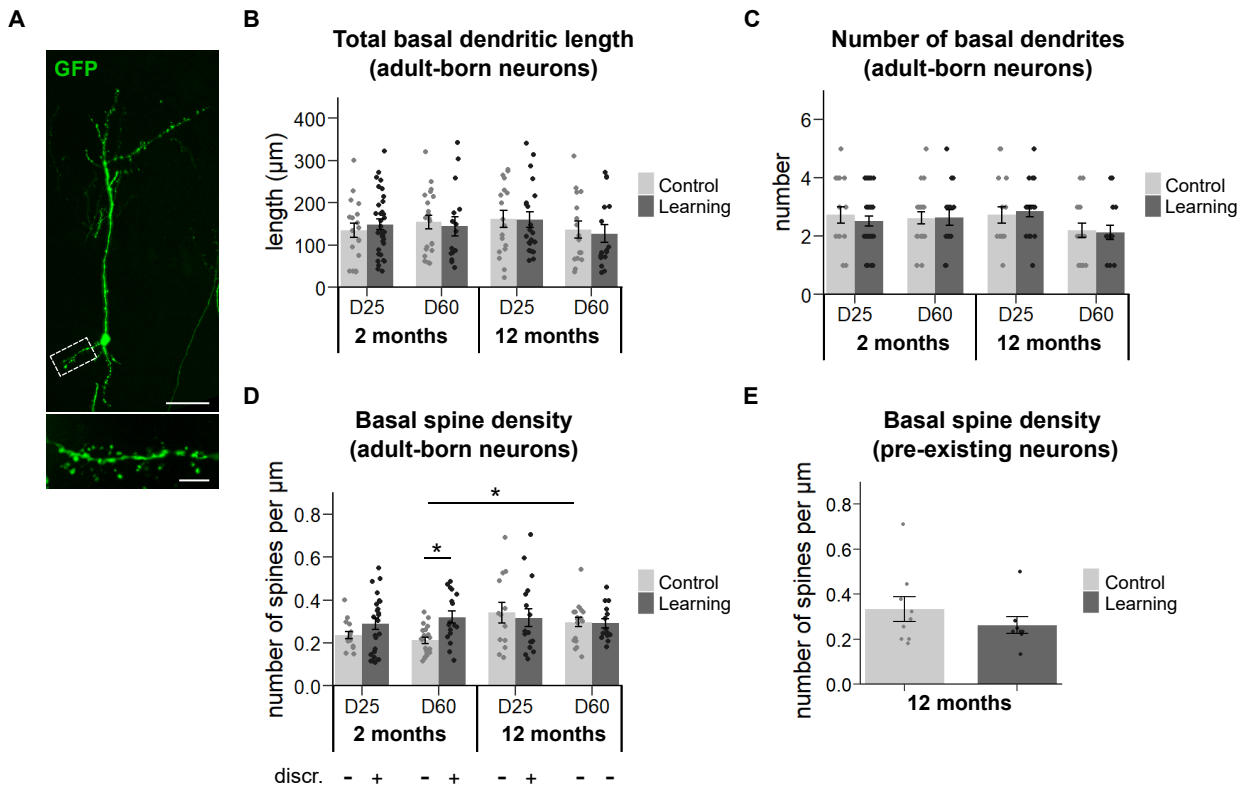


Figure 3: Structural plasticity induced by olfactory perceptual learning on basal dendrites of adult-born granule cells is altered by aging.

(A) Representative image of an adult-born granule cell expressing GFP in the OB. Inset shows a basal dendritic segment with dendritic spines. Scale bars = 50µm and 5µm in inset.

(B-C) Basal dendrites of adult-born granule cells show no significant changes in their total length (B) and number of dendrites (C) with age of the animal (2 vs 12 months), delay post-learning (D25 vs D60) or learning (control vs learning). (n=16-34 neurons per group, from 4-5 animals).

(D) Basal spine density of adult-born granule cells is higher at D60 in 12-month-old mice compared to 2-month-old mice. Perceptual learning specifically increases basal spine density at long-term after learning in 2-month-old mice, as the basal density is higher in the learning group at D60 compared to their control group. 12-month-old mice display no learning-induced structural plasticity in adult-born granule cells. (n=15-24 neurons per group, from 4-5 animals).

(E) Basal dendrites of pre-existing granule cells show no significant changes in spine density with learning (control vs learning) in 12-month-old mice. (n=8-10 neurons per group, from 3-4 animals). All results are given as mean ± SEM, dots represent individual neurons. * p<0.05

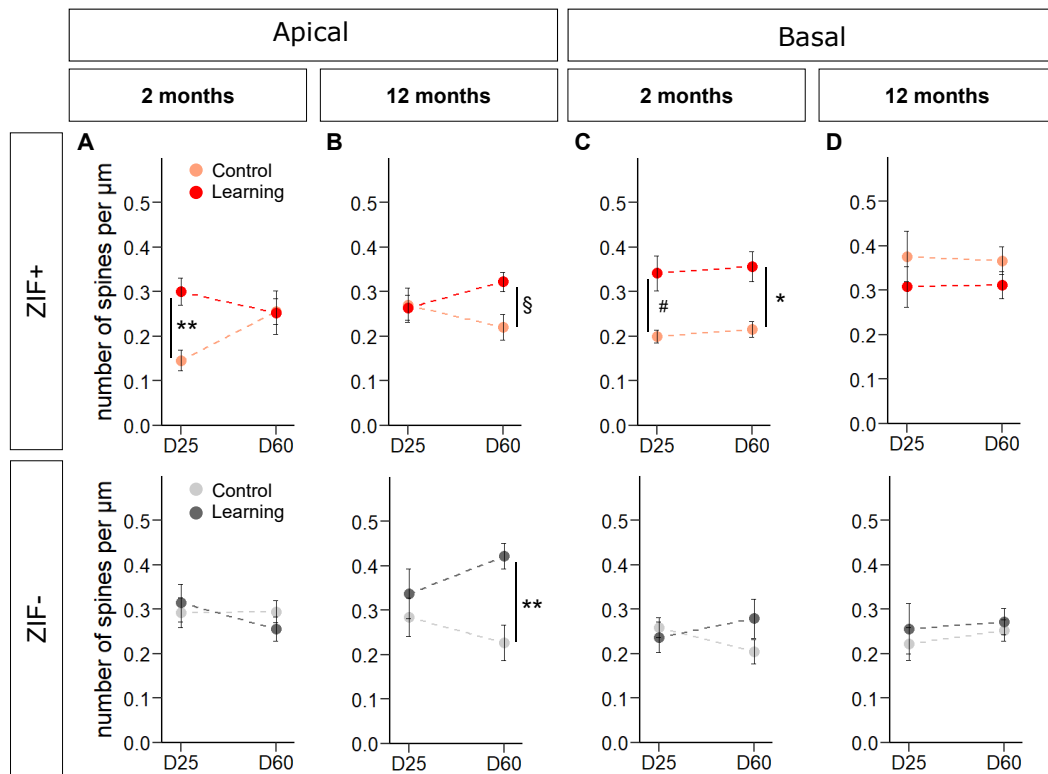


Figure 4: Structural plasticity induced by olfactory perceptual learning is specific of adult-born granule cells responding to the learned odorants and loses this specificity with aging.

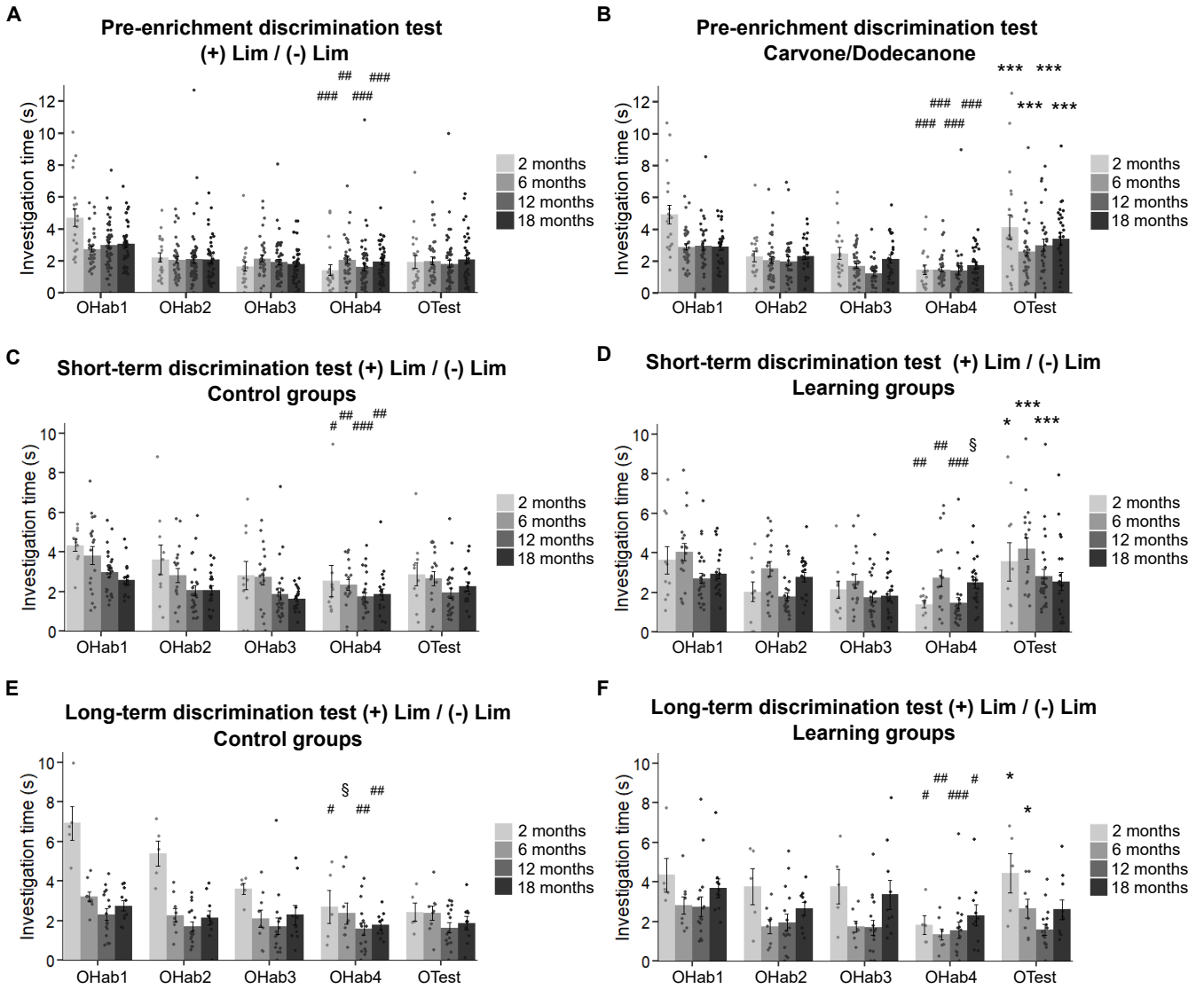
ZIF expression allows to identify adult-born granule cells responding to the learned odorants. (A) Learning-induced structural plasticity of apical spines is restricted to ZIF+ granule cells at D25 in 2-month-old mice.

(B) In 12-month-old mice, learning-induced structural plasticity of apical spines is observed only at D60 and affects both ZIF- and ZIF+ adult-born granule cells. (n=5-13 neurons per group, from 3-5 animals).

(C) Learning-induced structural plasticity of basal spines is restricted to ZIF+ granule cells in 2-month-old mice and visible at both short- and long-term post-learning (D25 and D60).

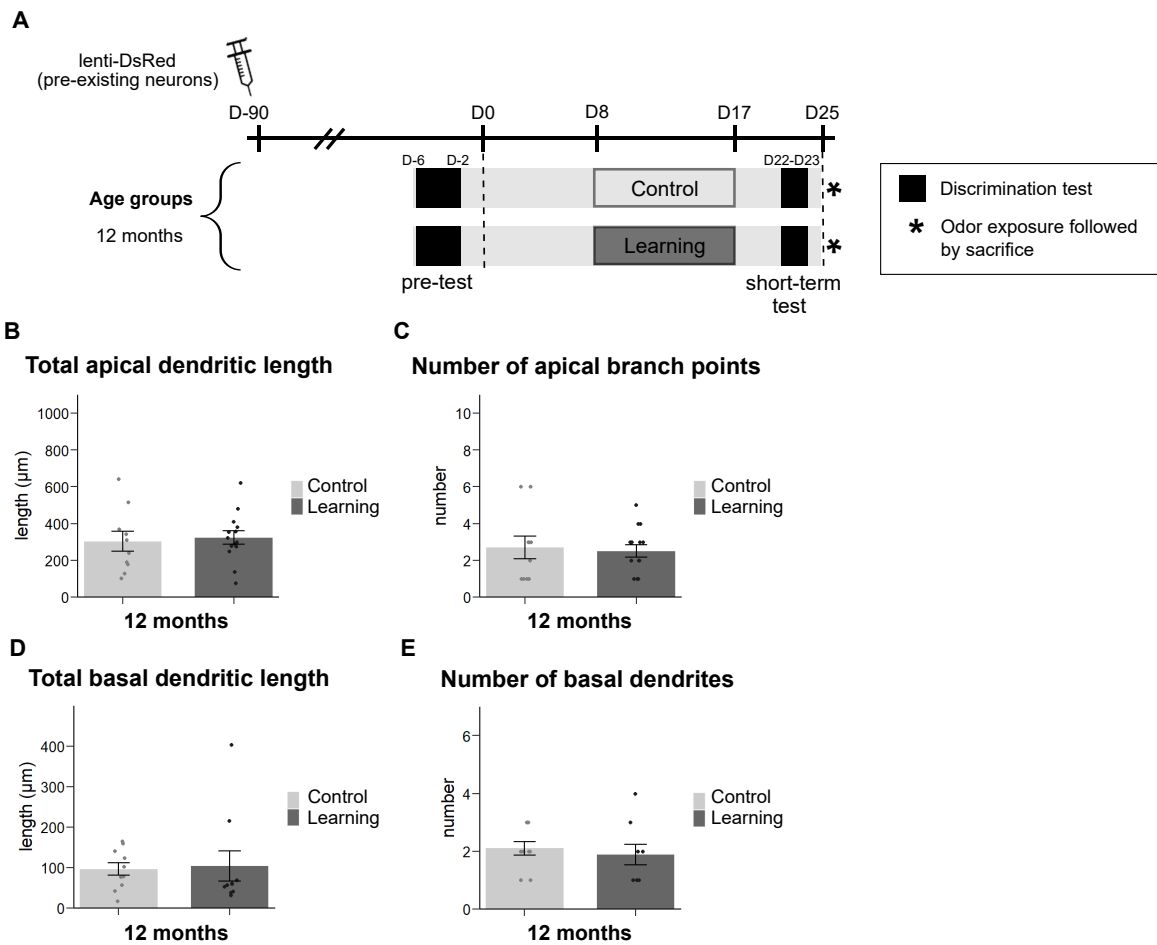
(D) In 12-month-old mice, no learning-induced structural plasticity is observed on basal spines of adult-born granule cells. (n=5-12 neurons per group, from 3-5 animals).

All results are given as mean \pm SEM, dots represent individual neurons. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, # $p = 0.166$, § $p = 0.057$.



Suppl. Figure 1: Habituation to odorants and discrimination of dissimilar odorants are preserved during aging.

In pre-enrichment tests (A-B), short-term tests (C-D) and long-term tests (E-F), mice of all ages and all groups (control and learning) displayed habituation to the presented odorant of both odorant pairs (Dodecanal/Carvone and (+) Limonene / (-) Limonene), as shown by a decreasing investigation time between OHab1 and OHab4 ($p < 0.05$, see Suppl. Table 1 for detailed statistical results). Discrimination was tested by comparing the investigation time between OHab4 and OTest. In pre-enrichment tests, mice of all ages did not discriminate (+) Limonene and (-) Limonene (A, $p > 0.05$) but discriminated Dodecanal and Carvone (B, $p < 0.001$). See Fig.1 for complete description of the (+) Limonene / (-) Limonene discrimination results in short-term and long-term tests. All results are given as mean \pm SEM, dots represent individual mice. OHab1 vs OHab4: # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$, § $0.05 < p < 0.1025$; OHab4 vs OTest: * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$. ($n = 5-55$ mice per group, see Suppl. Table 1 for details).



Supp. Figure 2: Olfactory perceptual learning does not induce structural plasticity in pre-existing granule cells of 12-month-old mice.

(A) Experimental design. In order to label a cohort of pre-existing granule cells, a group of 12-month-old mice received an intra-cerebral injection of lentivirus expressing DsRed 3 months before the beginning of the enrichment period. These mice were subdivided in a control and a learning group and tested for discrimination as previously described. Note that these groups of mice were sacrificed after the short-term test. (B-C) Apical dendrites of pre-existing granule cells show no significant changes in their total length (B) and number of branch points (C) with learning (control vs learning). ($n=10-14$ neurons per group, from 3-4 animals). (D-E) Basal dendrites of pre-existing granule cells show no significant changes in their total length (D) and number of dendrites (E) with learning (control vs learning). ($n=8-10$ neurons per group, from 3-4 animals). All results are given as mean \pm SEM, dots represent individual neurons.

Bibliography

- Alonso M, Viollet C, Gabellec M-M, Meas-Yedid V, Olivo-Marin J-C, Lledo P-M (2006) Olfactory Discrimination Learning Increases the Survival of Adult-Born Neurons in the Olfactory Bulb. *Journal of Neuroscience* 26:10508–10513.
- Belnoue L, Grosjean N, Abrous DN, Koehl M (2011) A Critical Time Window for the Recruitment of Bulbar Newborn Neurons by Olfactory Discrimination Learning. *Journal of Neuroscience* 31:1010–1016.
- Burke SN, Barnes CA (2006) Neural plasticity in the ageing brain. *Nature Reviews Neuroscience* 7:30–40.
- Cabeza R, Albert M, Belleville S, Craik FIM, Duarte A, Grady CL, Lindenberger U, Nyberg L, Park DC, Reuter-Lorenz PA, Rugg MD, Steffener J, Rajah MN (2018) Maintenance, reserve and compensation: the cognitive neuroscience of healthy ageing. *Nat Rev Neurosci* 19:701–710.
- Chu MW, Li WL, Komiyama T (2016) Balancing the Robustness and Efficiency of Odor Representations during Learning. *Neuron* 92:174–186.
- Dardou D, Datiche F, Cattarelli M (2008) Memory is differently impaired during aging according to the learning tasks in the rat. *Behavioural Brain Research* 194:193–200.
- Daroles L, Gribaudo S, Doulazmi M, Scotto-Lomassese S, Dubacq C, Mandairon N, Greer CA, Didier A, Trembleau A, Caillé I (2016) Fragile X Mental Retardation Protein and Dendritic Local Translation of the Alpha Subunit of the Calcium/Calmodulin-Dependent Kinase II Messenger RNA Are Required for the Structural Plasticity Underlying Olfactory Learning. *Biological Psychiatry* 80:149–159.
- Enwere E, Shingo T, Gregg C, Fujikawa H, Ohta S, Weiss S (2004) Aging Results in Reduced Epidermal Growth Factor Receptor Signaling, Diminished Olfactory Neurogenesis, and Deficits in Fine Olfactory Discrimination. *Journal of Neuroscience* 24:8354–8365.
- Fletcher ML, Chen WR (2010) Neural correlates of olfactory learning: Critical role of centrifugal neuromodulation. *Learning & Memory* 17:561–570.
- Forest J, Chalençon L, Midroit M, Terrier C, Caillé I, Sacquet J, Benetollo C, Martin K, Richard M, Didier A, Mandairon N (2020) Role of Adult-Born Versus Preexisting Neurons Born at P0 in Olfactory Perception in a Complex Olfactory Environment in Mice. *Cereb Cortex* 30:534–549.
- Forest J, Moreno M, Cavellius M, Chalençon L, Ziesel A, Sacquet J, Richard M, Didier A, Mandairon N (2019) Short-term availability of adult-born neurons for memory encoding. *Nat Commun* 10:5609.
- Grady C (2012) The cognitive neuroscience of ageing. *Nature Reviews Neuroscience* 13:491–505.
- Imayoshi I, Sakamoto M, Ohtsuka T, Takao K, Miyakawa T, Yamaguchi M, Mori K, Ikeda T, Itohara S, Kageyama R (2008) Roles of continuous neurogenesis in the structural and functional integrity of the adult forebrain. *Nat Neurosci* 11:1153–1161.
- Inaki K, Takahashi YK, Nagayama S, Mori K (2002) Molecular-feature domains with posterodorsal-anteroventral polarity in the symmetrical sensory maps of the mouse olfactory bulb: mapping of odourant-induced Zif268 expression. *Eur J Neurosci* 15:1563–1574.
- Kelsch W, Sim S, Lois C (2010) Watching Synaptogenesis in the Adult Brain. *Annual Review of Neuroscience* 33:131–149.
- Kraemer S, Apfelbach R (2004) Olfactory sensitivity, learning and cognition in young adult and aged male Wistar rats. *Physiology & Behavior* 81:435–442.
- Lepousez G, Nissant A, Bryant AK, Gheusi G, Greer CA, Lledo P-M (2014) Olfactory learning promotes input-specific synaptic plasticity in adult-born neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111:13984–13989.
- Linster C, Escanilla O (2019) Noradrenergic effects on olfactory perception and learning. *Brain Research* 1709:33–38.
- Luo J, Daniels SB, Lenington JB, Notti RQ, Conover JC (2006) The aging neurogenic subventricular zone. *Aging Cell* 5:139–152.
- Mandairon N, Didier A, Linster C (2008) Odor enrichment increases interneurons responsiveness in spatially defined regions of the olfactory bulb correlated with perception. *Neurobiol Learn Mem* 90:178–184.
- Mandairon N, Kuczewski N, Kermen F, Forest J, Midroit M, Richard M, Thevenet M, Sacquet J, Linster C, Didier A (2018) Opposite regulation of inhibition by adult-born granule cells during implicit versus explicit olfactory learning. *Elife* 7.
- Mandairon N, Sacquet J, Garcia S, Ravel N, Jourdan F, Didier A (2006a) Neurogenic correlates of an olfactory discrimination task in the adult olfactory bulb. *Eur J Neurosci* 24:3578–3588.
- Mandairon N, Sacquet J, Jourdan F, Didier A (2006b) Long-term fate and distribution of newborn cells in the adult mouse olfactory bulb: Influences of olfactory deprivation. *Neuroscience* 141:443–451.

- Mandairon N, Stack C, Linster C (2006c) Olfactory enrichment improves the recognition of individual components in mixtures. *Physiol Behav* 89:379–384.
- Mandairon N, Sultan S, Nouvian M, Sacquet J, Didier A (2011) Involvement of Newborn Neurons in Olfactory Associative Learning? The Operant or Non-operant Component of the Task Makes All the Difference. *Journal of Neuroscience* 31:12455–12460.
- Marrone DF, Ramirez-Amaya V, Barnes CA (2012) Neurons generated in senescence maintain capacity for functional integration. *Hippocampus* 22:1134–1142.
- Ming G, Song H (2011) Adult Neurogenesis in the Mammalian Brain: Significant Answers and Significant Questions. *Neuron* 70:687–702.
- Mirich JM, Williams NC, Berlau DJ, Brunjes PC (2002) Comparative study of aging in the mouse olfactory bulb. *Journal of Comparative Neurology* 454:361–372.
- Mizrahi A (2007) Dendritic development and plasticity of adult-born neurons in the mouse olfactory bulb. *Nat Neurosci* 10:444–452.
- Montaron M-F, Charrier V, Blin N, Garcia P, Abrous DN (2020) Responsiveness of dentate neurons generated throughout adult life is associated with resilience to cognitive aging. *Aging Cell* n/a:e13161.
- Moreno M, Richard M, Landrein B, Sacquet J, Didier A, Mandairon N (2014) Alteration of olfactory perceptual learning and its cellular basis in aged mice. *Neurobiology of Aging* 35:680–691.
- Moreno MM, Bath K, Kuczewski N, Sacquet J, Didier A, Mandairon N (2012) Action of the Noradrenergic System on Adult-Born Cells Is Required for Olfactory Learning in Mice. *Journal of Neuroscience* 32:3748–3758.
- Moreno MM, Linster C, Escanilla O, Sacquet J, Didier A, Mandairon N (2009) Olfactory perceptual learning requires adult neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:17980–17985.
- Panzanelli P, Bardy C, Nissant A, Pallotto M, Sassoe-Pognetto M, Lledo P-M, Fritschy J-M (2009) Early Synapse Formation in Developing Interneurons of the Adult Olfactory Bulb. *Journal of Neuroscience* 29:15039–15052.
- Patel RC, Larson J (2009) Impaired olfactory discrimination learning and decreased olfactory sensitivity in aged C57Bl/6 mice. *Neurobiology of Aging* 30:829–837.
- Price JL, Powell TPS (1970) The Synaptology of the Granule Cells of the Olfactory Bulb. *Journal of Cell Science* 7:125–155.
- Rey NL, Sacquet J, Veyrac A, Jourdan F, Didier A (2012) Behavioral and cellular markers of olfactory aging and their response to enrichment. *Neurobiology of Aging* 33:626.e9-626.e23.
- Richard MB, Taylor SR, Greer CA (2010) Age-induced disruption of selective olfactory bulb synaptic circuits. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:15613–15618.
- Rochefort C, Gheusi G, Vincent J-D, Lledo P-M (2002) Enriched Odor Exposure Increases the Number of Newborn Neurons in the Adult Olfactory Bulb and Improves Odor Memory. *J Neurosci* 22:2679–2689.
- Rodriguez A, Ehlenberger DB, Dickstein DL, Hof PR, Wearne SL (2008) Automated Three-Dimensional Detection and Shape Classification of Dendritic Spines from Fluorescence Microscopy Images Sabatini B, ed. *PLoS ONE* 3:e1997.
- Roman FS, Alescio-Lautier B, Soumireu-Mourat B (1996) Age-related learning and memory deficits in odor-reward association in rats. *Neurobiol Aging* 17:31–40.
- Sailor KA, Valley MT, Wiechert MT, Riecke H, Sun GJ, Adams W, Dennis JC, Sharafi S, Ming G, Song H, Lledo P-M (2016) Persistent Structural Plasticity Optimizes Sensory Information Processing in the Olfactory Bulb. *Neuron* 91:384–396.
- Shepherd GM, Chen WR, Willhite D, Migliore M, Greer CA (2007) The olfactory granule cell: From classical enigma to central role in olfactory processing. *Brain Research Reviews* 55:373–382.
- Sultan S, Mandairon N, Kermen F, Garcia S, Sacquet J, Didier A (2010) Learning-dependent neurogenesis in the olfactory bulb determines long-term olfactory memory. *The FASEB Journal* 24:2355–2363.
- Ueha R, Shichino S, Ueha S, Kondo K, Kikuta S, Nishijima H, Matsushima K, Yamasoba T (2018) Reduction of Proliferating Olfactory Cells and Low Expression of Extracellular Matrix Genes Are Hallmarks of the Aged Olfactory Mucosa. *Front Aging Neurosci* 10 Available at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnagi.2018.00086/full> [Accessed July 5, 2021].
- Vinera J, Kermen F, Sacquet J, Didier A, Mandairon N, Richard M (2015) Olfactory perceptual learning requires action of noradrenaline in the olfactory bulb: comparison with olfactory associative learning. *Learning & Memory* 22:192–196.
- Wearne SL, Rodriguez A, Ehlenberger DB, Rocher AB, Henderson SC, Hof PR (2005) New techniques for imaging, digitization and analysis of three-dimensional neural morphology on multiple scales. *Neuroscience* 136:661–680.

- Weiler E, Farbman AI (1997) Proliferation in the Rat Olfactory Epithelium: Age-Dependent Changes. *J Neurosci* 17:3610–3622.
- Whitman MC, Greer CA (2007) Synaptic integration of adult-generated olfactory bulb granule cells: basal axodendritic centrifugal input precedes apical dendrodendritic local circuits. *J Neurosci* 27:9951–9961.
- Yoder WM, Gaynor LS, Burke SN, Setlow B, Smith DW, Bizon JL (2017) Interaction between age and perceptual similarity in olfactory discrimination learning in F344 rats: relationships with spatial learning. *Neurobiol Aging* 53:122–137.

Figure Legends

Figure 1: Olfactory perceptual learning is progressively altered during aging

(A) Experimental design. For each age group (2, 6, 12 and 18 months), two sub-groups of mice (control and learning) were tested for their discrimination ability between (+) Limonene and (–) Limonene, before the olfactory enrichment period (pre-test) and after the olfactory enrichment period (short-term test) before sacrifice (D25). Half of the mice performed an additional long-term test before sacrifice (D60). Olfactory enrichment was performed during 10 days by daily exposure to both (+) Limonene and (–) Limonene. For the control group, odorants were replaced by odorless mineral oil. All mice received an intra-cerebral injection of a GFP-encoding lentivirus at D0 to label a cohort of adult-born neurons born 8 days before the beginning of learning.

(B-C) Discrimination was tested by comparing the investigation time between OHab4 and OTest. Shortly after a 10-day odor enrichment period **(B)**, mice of the learning group successfully discriminated (+) from (–) Limonene ($p < 0.05$) up to 12 months of age, while 18-month-old learning mice, as control mice of all ages, never discriminated the two odorants ($p > 0.05$). At long-term testing **(C)**, only 2- and 6-month-old mice of the learning groups successfully discriminated (+) from (–) Limonene ($p < 0.05$), while older learning mice (12 and 18 months), as control mice of all ages, never discriminated the two odorants ($p > 0.05$). All results are given as mean \pm SEM, dots represent individual mice. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ ($n = 5-25$ mice per group, see Suppl. Table 1 for details).

Figure 2: Structural plasticity induced by olfactory perceptual learning on apical dendrites of adult-born granule cells is altered by aging.

(A) Representative image of an adult-born granule cell expressing GFP in the OB. Inset shows an apical dendritic segment with dendritic spines. Scale bars = $50\mu\text{m}$ and $5\mu\text{m}$ in inset.

(B-C) Apical dendrites of adult-born granule cells show no significant changes in their total length **(B)** and number of branch points **(C)** with age of the animal (2 vs 12 months), delay post-learning (D25 vs D60) or learning (control vs learning group). ($n = 20-39$ neurons per group, from 4-5 animals).

(D) Apical spine density of adult-born granule cells is increased by learning at D25 in 2-month-old mice and at D60 in 12-month-old mice. ($n = 15-22$ neurons per group, from 4-5 animals).

(E) Apical dendrites of pre-existing granule cells show no changes in spine density with learning in 12-month-old mice (control vs learning). ($n = 10-14$ neurons per group, from 3-4 animals).

All results are given as mean \pm SEM, dots represent individual neurons. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

Figure 3: Structural plasticity induced by olfactory perceptual learning on basal dendrites of adult-born granule cells is altered by aging.

(A) Representative image of an adult-born granule cell expressing GFP in the OB. Inset shows a basal dendritic segment with dendritic spines. Scale bars = $50\mu\text{m}$ and $5\mu\text{m}$ in inset.

(B-C) Basal dendrites of adult-born granule cells show no significant changes in their total length (B) and number of dendrites (C) with age of the animal (2 vs 12 months), delay post-learning (D25 vs D60) or learning (control vs learning). (n=16-34 neurons per group, from 4-5 animals).

(D) Basal spine density of adult-born granule cells is higher at D60 in 12-month-old mice compared to 2-month-old mice. Perceptual learning specifically increases basal spine density at long-term after learning in 2-month-old mice, as the basal density is higher in the learning group at D60 compared to their control group. 12-month-old mice display no learning-induced structural plasticity in adult-born granule cells. (n=15-24 neurons per group, from 4-5 animals).

(E) Basal dendrites of pre-existing granule cells show no significant changes in spine density with learning (control vs learning) in 12-month-old mice. (n=8-10 neurons per group, from 3-4 animals).

All results are given as mean \pm SEM, dots represent individual neurons. * $p < 0.05$

Figure 4: Structural plasticity induced by olfactory perceptual learning is specific of adult-born granule cells responding to the learned odorants and loses this specificity with aging.

ZIF expression allows to identify adult-born granule cells responding to the learned odorants. **(A)** Learning-induced structural plasticity of apical spines is restricted to ZIF+ granule cells at D25 in 2-month-old mice.

(B) In 12-month-old mice, learning-induced structural plasticity of apical spines is observed only at D60 and affects both ZIF- and ZIF+ adult-born granule cells. (n=5-13 neurons per group, from 3-5 animals).

(C) Learning-induced structural plasticity of basal spines is restricted to ZIF+ granule cells in 2-month-old mice and visible at both short- and long-term post-learning (D25 and D60).

(D) In 12-month-old mice, no learning-induced structural plasticity is observed on basal spines of adult-born granule cells. (n=5-12 neurons per group, from 3-5 animals).

All results are given as mean \pm SEM, dots represent individual neurons. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, # $p = 0.166$, § $p = 0.057$.

Supplementary figures and tables

Suppl. Figure 1: Habituation to odorants and discrimination of dissimilar odorants are preserved during aging.

In pre-enrichment tests **(A-B)**, short-term tests **(C-D)** and long-term tests **(E-F)**, mice of all ages and all groups (control and learning) displayed habituation to the presented odorant of both odorant pairs (Dodecanal/Carvone and (+) Limonene / (-) Limonene), as shown by a decreasing investigation time between OHab1 and OHab4 ($p < 0.05$, see Supp. Table 1 for detailed statistical results). Discrimination was tested by comparing the investigation time between OHab4 and OTest. In pre-enrichment tests, mice of all ages did not discriminate (+) Limonene and (-) Limonene (**A**, $p > 0.05$) but discriminated Dodecanal and Carvone (**B**, $p < 0.001$). See Fig.1 for complete description of the (+) Limonene / (-)

Limonene discrimination results in short-term and long-term tests. All results are given as mean \pm SEM, dots represent individual mice. OHab1 vs OHab4: # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$, § $0.05 < p < 0.1025$; OHab4 vs OTest: * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$. (n=5-55 mice per group, see Suppl. Table 1 for details).

Supp. Figure 2: Olfactory perceptual learning does not induce structural plasticity in pre-existing granule cells of 12-month-old mice.

(A) Experimental design. In order to label a cohort of pre-existing granule cells, a group of 12-month-old mice received an intra-cerebral injection of lentivirus expressing DsRed 3 months before the beginning of the enrichment period. These mice were subdivided in a control and a learning group and tested for discrimination as previously described. Note that these groups of mice were sacrificed after the short-term test.

(B-C) Apical dendrites of pre-existing granule cells show no significant changes in their total length (B) and number of branch points (C) with learning (control vs learning). (n=10-14 neurons per group, from 3-4 animals).

(D-E) Basal dendrites of pre-existing granule cells show no significant changes in their total length (D) and number of dendrites (E) with learning (control vs learning). (n=8-10 neurons per group, from 3-4 animals).

All results are given as mean \pm SEM, dots represent individual neurons.

Suppl. Table 1: Full statistical report of the behavioral data (Fig.1 and Suppl.Fig.1).

Pre-tests

Odorant	Age	Friedman's ANOVA	Wilcoxon (unilateral, paired)	
		OHab1-4 + OTest	OHab1 vs OHab4	OHab4 vs OTest
Dodec/Carv	2 months	n=19, Friedman chi-squared = 37.095, df = 4, p = 1.722e-07 ***	V = 190, p = 1.907e-06 ***	V = 9, p = 6.294e-05 ***
	6 months	n=39, Friedman chi-squared = 52.821, df = 4, p = 9.291e-11 ***	V = 755, p = 1.822e-07 ***	V = 101.5, p = 2.921e-05 ***
	12 months	n=31, Friedman chi-squared = 54.094, df = 4, p = 5.029e-11 ***	V = 466, p = 1.011e-05 ***	V = 30, p = 1.628e-05 ***
	18 months	n=28, Friedman chi-squared = 26.6, df = 4, p = 2.395e-05 ***	V = 377, p = 6.475e-06 ***	V = 40, p = 0.0001076 ***
(+)Lim/(-)Lim	2 months	n=20, Friedman chi-squared = 39.709, df = 4, p = 4.973e-08 ***	V = 210, p = 9.537e-07 ***	V = 94, p = 0.3506 n.s.
	6 months	n=36, Friedman chi-squared = 18.754, df = 4, p = 0.0008785 ***	V = 508, p = 0.00256 **	V = 353, p = 0.7358 n.s.
	12 months	n=55, Friedman chi-squared = 58.244, df = 4, p = 6.782e-12 ***	V = 1426, p = 1.985e-08 ***	V = 628.5, p = 0.1187 n.s.
	18 months	n=41, Friedman chi-squared = 28.624, df = 4, p = 9.318e-06 ***	V = 735, p = 1.517e-05 ***	V = 366, p = 0.2035 n.s.

Short-term post-tests (only the (+)Lim/(-)Lim odorant pair was tested)

Age	Enrichment group	Friedman's ANOVA	Wilcoxon (unilateral, paired)	
		OHab1-4 + OTest	OHab1 vs OHab4	OHab4 vs OTest
2 months	NE	n=10, Friedman chi-squared = 9.28, df = 4, p = 0.05447 n.s.	V = 45, p = 0.04199 *	V = 20, p = 0.2461 n.s.
	E	n=10, Friedman chi-squared = 12.965, df = 4, p = 0.01145 *	V = 54, p = 0.001953 **	V = 6, p = 0.01367 *

6 months	NE	n=18, Friedman chi-squared = 12.672, df = 4, p = 0.01299 *	V = 121, p = 0.003317 **	V = 54, p = 0.1488 n.s.
	E	n=18, Friedman chi-squared = 26.622, df = 4, p = 2.37e-05 ***	V = 152, p = 0.001167 **	V = 12.5, p = 0.0007949 ***
12 months	NE	n=25, Friedman chi-squared = 22.132, df = 4, p = 0.0001886 ***	V = 300, p = 2.694e-05 ***	V = 148.5, p = 0.3582 n.s.
	E	n=25, Friedman chi-squared = 37.86, df = 4, p = 1.198e-07 ***	V = 290, p = 0.0001249 ***	V = 12, p = 4.269e-05 ***
18 months	NE	n=18, Friedman chi-squared = 10.089, df = 4, p = 0.03896 *	V = 145, p = 0.003845 **	V = 57, p = 0.1144 n.s.
	E	n=20, Friedman chi-squared = 11.769, df = 4, p = 0.01916 *	V = 127, p = 0.1025 n.s.	V = 104, p = 0.4927 n.s.

Long-term post-tests (only the (+)Lim/(-)Lim odorant pair was tested)

Age	Enrichment group	Friedman's ANOVA	Wilcoxon (unilateral, paired)	
		OHab1-4 + OTest	OHab1 vs OHab4	OHab4 vs OTest
2 months	NE	n=5, Friedman chi-squared = 13.6, df = 4, p = 0.008687 **	V = 15, p = 0.03125 *	V = 9, p = 0.6875 n.s.
	E	n=5, Friedman chi-squared = 9.28, df = 4, p = 0.05447 n.s.	V = 15, p = 0.03125 *	V = 0, p = 0.03125 *
6 months	NE	n=9, Friedman chi-squared = 9.5111, df = 4, p = 0.04952 *	V = 35, p = 0.08203 n.s.	V = 19, p = 0.3672 n.s.
	E	n=8, Friedman chi-squared = 12.403, df = 4, p = 0.0146 *	V = 36, p = 0.003906 **	V = 3, p = 0.01953 *
12 months	NE	n=16, Friedman chi-squared = 11.122, df = 4, p = 0.02522 *	V = 114, p = 0.007751 **	V = 74, p = 0.6282 n.s.
	E	n=16, Friedman chi-squared = 10.722, df = 4, p = 0.02988 *	V = 127, p = 0.0005035 ***	V = 58, p = 0.3116 n.s.
18 months	NE	n=10, Friedman chi-squared = 10.513, df = 4, p = 0.03262 *	V = 53, p = 0.00293 **	V = 28, p = 0.5391 n.s.
	E	n=10, Friedman chi-squared = 7.36, df = 4, p = 0.118 n.s.	V = 47, p = 0.02441 *	V = 18, p = 0.1875 n.s.

* p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001

Suppl. Table 2: Full statistical report of the morphological data in Fig.2.

Apical dendrites – Adult-born neurons

Wilcoxon bilateral unpaired tests, corrected for multiple comparisons by FDR (12 selected comparisons)	
Total dendritic length (Fig.2B)	2m.D25.NE vs 12m.D25.NE p=0.9174545 2m.D25.E vs 12m.D25.E p=0.9160000 2m.D60.NE vs 12m.D60.NE p=0.9174545 2m.D60.E vs 12m.D60.E p=0.9160000 2m.D25.NE vs 2m.D25.E p=0.9174545 2m.D60.NE vs 2m.D60.E p=0.9174545 12m.D25.NE vs 12m.D25.E p=0.9174545 12m.D60.NE vs 12m.D60.E p=0.6864000 2m.D25.NE vs 2m.D60.NE p=0.9370000 2m.D25.E vs 2m.D60.E p=0.9174545 12m.D25.NE vs 12m.D60.NE p=0.9174545 12m.D25.E vs 12m.D60.E p=0.9174545
n=number of neurons	2m.D25.NE (n=32) ; 2m.D25.E (n=39) 2m.D60.NE (n=23) ; 2m.D60.E (n=22) 12m.D25.NE (n=21) ; 12m.D25.E (n=24) 12m.D60.NE (n=24) ; 12m.D60.E (n=20)

Wilcoxon bilateral unpaired tests, corrected for multiple comparisons by FDR (12 selected comparisons)	
Number of branch points (Fig.2C)	2m.D25.NE vs 12m.D25.NE p=0.4920000 2m.D25.E vs 12m.D25.E p=0.4280000 2m.D60.NE vs 12m.D60.NE p=0.4920000 2m.D60.E vs 12m.D60.E p=0.4920000 2m.D25.NE vs 2m.D25.E p=0.4074000 2m.D60.NE vs 2m.D60.E p=0.4920000 12m.D25.NE vs 12m.D25.E p=0.4920000 12m.D60.NE vs 12m.D60.E p=0.4920000 2m.D25.NE vs 2m.D60.NE p=0.9350000 2m.D25.E vs 2m.D60.E p=0.1668000 12m.D25.NE vs 12m.D60.NE p=0.7974545 12m.D25.E vs 12m.D60.E p=0.7974545

n=number of neurons	2m.D25.NE (n=32) ; 2m.D25.E (n=39) 2m.D60.NE (n=23) ; 2m.D60.E (n=22) 12m.D25.NE (n=21) ; 12m.D25.E (n=24) 12m.D60.NE (n=24) ; 12m.D60.E (n=20)
----------------------------	--

	3-way ANOVA		Post-hoc bilateral unpaired t-tests, corrected for multiple comparisons by FDR (12 selected comparisons)	
Spine density (Fig.2D)	Animal age	$F_{(1,136)}=3.7090$; $p=0.0562051$	2m.D25.NE vs 12m.D25.NE	$p=0.0748800$
	Delay post-learning	$F_{(1,136)}=0.1530$; $p=0.6963328$	2m.D25.E vs 12m.D25.E	$p=0.6229091$
	Learning	$F_{(1,136)}=8.7775$; $p=0.0036010$ **	2m.D60.NE vs 12m.D60.NE	$p=0.2266667$
	Animal age * Delay post-learning * Learning	$F_{(1,136)}=14.4096$; $p=0.0002207$ ***	2m.D60.E vs 12m.D60.E	$p=0.0050940$ **
			2m.D25.NE vs 2m.D25.E	$p=0.0250800$ *
			2m.D60.NE vs 2m.D60.E	$p=0.6229091$
			12m.D25.NE vs 12m.D25.E	$p=0.7760000$
			12m.D60.NE vs 12m.D60.E	$p=0.0025800$ **
			2m.D25.NE vs 2m.D60.NE	$p=0.0910000$
			2m.D25.E vs 2m.D60.E	$p=0.2175000$
			12m.D25.NE vs 12m.D60.NE	$p=0.1937143$
			12m.D25.E vs 12m.D60.E	$p=0.0456000$ *
n=number of neurons	2m.D25.NE (n=22) ; 2m.D25.E (n=19) 2m.D60.NE (n=18) ; 2m.D60.E (n=15) 12m.D25.NE (n=18) ; 12m.D25.E (n=17) 12m.D60.NE (n=17) ; 12m.D60.E (n=18)			

Apical dendrites – Pre-existing neurons

	Wilcoxon bilateral unpaired test	
Spine density (Fig.2E)	12m NE vs E	$W = 63$, $p\text{-value} = 0.4668$
n=number of neurons	12m.NE (n=11); 12m.E (n=14)	

Suppl. Table 3: Full statistical report of the morphological data in Fig.3.

Basal dendrites – Adult-born neurons

Wilcoxon bilateral unpaired tests, corrected for multiple comparisons by FDR (12 selected comparisons)		
Total dendritic length (Fig.3B)	2m.D25.NE vs 12m.D25.NE 2m.D25.E vs 12m.D25.E 2m.D60.NE vs 12m.D60.NE 2m.D60.E vs 12m.D60.E 2m.D25.NE vs 2m.D25.E 2m.D60.NE vs 2m.D60.E 12m.D25.NE vs 12m.D25.E 12m.D60.NE vs 12m.D60.E 2m.D25.NE vs 2m.D60.NE 2m.D25.E vs 2m.D60.E 12m.D25.NE vs 12m.D60.NE 12m.D25.E vs 12m.D60.E	p=0.9109091 p=0.8331429 p=0.9109091 p=0.8331429 p=0.8331429 p=0.8331429 p=0.9109091 p=0.9260000 p=0.8331429 p=0.9109091 p=0.8331429 p=0.8331429
n=number of neurons	2m.D25.NE (n=18) ; 2m.D25.E (n=34) 2m.D60.NE (n=21) ; 2m.D60.E (n=16) 12m.D25.NE (n=18) ; 12m.D25.E (n=21) 12m.D60.NE (n=16) ; 12m.D60.E (n=16)	

Wilcoxon bilateral unpaired tests, corrected for multiple comparisons by FDR (12 selected comparisons)		
Number of dendrites (Fig.3C)	2m.D25.NE vs 12m.D25.NE 2m.D25.E vs 12m.D25.E 2m.D60.NE vs 12m.D60.NE 2m.D60.E vs 12m.D60.E 2m.D25.NE vs 2m.D25.E 2m.D60.NE vs 2m.D60.E 12m.D25.NE vs 12m.D25.E 12m.D60.NE vs 12m.D60.E 2m.D25.NE vs 2m.D60.NE 2m.D25.E vs 2m.D60.E 12m.D25.NE vs 12m.D60.NE 12m.D25.E vs 12m.D60.E	p=0.5448000 p=0.9740000 p=0.5448000 p=0.5448000 p=0.9308571 p=0.9740000 p=0.8280000 p=0.9740000 p=0.9740000 p=0.9740000 p=0.5448000 p=0.2352000
n=number of neurons	2m.D25.NE (n=18) ; 2m.D25.E (n=34) 2m.D60.NE (n=21) ; 2m.D60.E (n=16) 12m.D25.NE (n=18) ; 12m.D25.E (n=21) 12m.D60.NE (n=16) ; 12m.D60.E (n=16)	

Wilcoxon bilateral unpaired tests, corrected for multiple comparisons by FDR (12 selected comparisons)		
Spine density (Fig.3D)	2m.D25.NE vs 12m.D25.NE 2m.D25.E vs 12m.D25.E 2m.D60.NE vs 12m.D60.NE 2m.D60.E vs 12m.D60.E 2m.D25.NE vs 2m.D25.E 2m.D60.NE vs 2m.D60.E 12m.D25.NE vs 12m.D25.E 12m.D60.NE vs 12m.D60.E 2m.D25.NE vs 2m.D60.NE 2m.D25.E vs 2m.D60.E 12m.D25.NE vs 12m.D60.NE 12m.D25.E vs 12m.D60.E	p=0.7525714 p=0.8661818 p=0.0190800 * p=0.7525714 p=0.7525714 p=0.0190800 * p=0.8661818 p=1.0000000 p=0.7525714 p=0.7525714 p=0.8661818 p=0.8661818
n=number of neurons	2m.D25.NE (n=16) ; 2m.D25.E (n=24) 2m.D60.NE (n=20) ; 2m.D60.E (n=17) 12m.D25.NE (n=13) ; 12m.D25.E (n=17) 12m.D60.NE (n=18) ; 12m.D60.E (n=15)	

Basal dendrites – Pre-existing neurons

Wilcoxon bilateral unpaired test		
Spine density (Fig.3E)	12m.NE vs E	W = 45, p-value = 0.4234
n=number of neurons	12m.NE (n=9); 12m.E (n=8)	

Suppl. Table 4: Full statistical report of the morphological data in Fig.4.

Apical dendrites - Adult-born neurons

	4-way ANOVA		Post-hoc bilateral unpaired t-tests, corrected for multiple comparisons by FDR (8 selected comparisons)	
Spine density (Fig.4A-B)	Animal age	$F_{(1,128)}=1.2206$; $p=0.27131$	12m.D25.Zif- NE vs E 12m.D25.Zif+ NE vs E 12m.D60.Zif- NE vs E 12m.D60.Zif+ NE vs E 2m.D25.Zif- NE vs E 2m.D25.Zif+ NE vs E 2m.D60.Zif- NE vs E 2m.D60.Zif+ NE vs E	p=0.6320000 p=0.6320000 p=0.0033640 ** p=0.0570667 § p=0.7851429 p=0.0033640 ** p=0.6320000 p=0.9640000
	Delay post-learning	$F_{(1,128)}=0.0804$; $p=0.77725$		
	Learning	$F_{(1,128)}=5.0582$; $p=0.02622$ *		
	Zif	$F_{(1,128)}=5.4402$; $p=0.02124$ *		
	interaction Animal age * Learning	$F_{(1,128)}=6.5911$; $p=0.01140$ *		
	interaction Animal age * Delay post-learning * Learning	$F_{(1,128)}= 3.8694$; $p=0.05134$		
	interaction Animal age * Learning* Zif	$F_{(1,128)}= 6.2562$; $p=0.01364$ *		
n=number of neurons	2m.D25.Zif+.NE (n=13) ; 2m.D25.Zif+.E (n=11) 2m.D25.Zif-.NE (n=9) ; 2m.D25.Zif-.E (n=8) 2m.D60.Zif+.NE (n=10) ; 2m.D60.Zif+.E (n=5) 2m.D60.Zif-.NE (n=8) ; 2m.D60.Zif-.E (n=10) 12m.D25.Zif+.NE (n=7) ; 12m.D25.Zif+.E (n=12) 12m.D25.Zif-.NE (n=11) ; 12m.D25.Zif-.E (n=5) 12m.D60.Zif+.NE (n=5) ; 12m.D60.Zif+.E (n=9) 12m.D60.Zif-.NE (n=12) ; 12m.D60.Zif-.E (n=9)			

Note that all interactions that are not listed above were statistically non-significant.

Basal dendrites - Adult-born neurons

	Wilcoxon bilateral unpaired tests, corrected for multiple comparisons by FDR (8 comparisons)	
Spine density (Fig.4C-D)	12m.D25.Zif- NE vs E 12m.D25.Zif+ NE vs E 12m.D60.Zif- NE vs E 12m.D60.Zif+ NE vs E 2m.D25.Zif- NE vs E 2m.D25.Zif+ NE vs E 2m.D60.Zif- NE vs E 2m.D60.Zif+ NE vs E	p=0.6137143 p=0.3900000 p=0.6137143 p=0.6137143 p=0.6280000 p=0.1660000 # p=0.3900000 p=0.0195200 *
n=number of neurons	2m.D25.Zif+.NE (n=6) ; 2m.D25.Zif+.E (n=12) 2m.D25.Zif-.NE (n=10) ; 2m.D25.Zif-.E (n=12) 2m.D60.Zif+.NE (n=12) ; 2m.D60.Zif+.E (n=9) 2m.D60.Zif-.NE (n=8) ; 2m.D60.Zif-.E (n=8) 12m.D25.Zif+.NE (n=8) ; 12m.D25.Zif+.E (n=11) 12m.D25.Zif-.NE (n=5) ; 12m.D25.Zif-.E (n=6) 12m.D60.Zif+.NE (n=7) ; 12m.D60.Zif+.E (n=7) 12m.D60.Zif-.NE (n=11) ; 12m.D60.Zif-.E (n=8)	

Suppl. Table 5: Full statistical report of the morphological data in Supp.Fig.2.

Pre-existing neurons

	Student t-test (unpaired, bilateral)	
Apical dendritic length (Supp.Fig.2B)	12m D25 NE vs E	$t = -0.34014$, $df = 22$, $p\text{-value} = 0.737$
n=number of neurons	12m.NE (n=10); 12m.E (n=14)	
	Wilcoxon test (unpaired, bilateral)	
Apical dendritic branch points (Supp.Fig.2C)	12m D25 NE vs E	$W = 68.5$, $p\text{-value} = 0.9517$
n=number of neurons	12m.NE (n=10); 12m.E (n=14)	
	Wilcoxon test (unpaired, bilateral)	
Basal dendritic length (Supp.Fig.2D)	12m D25 NE vs E	$W = 64$, $p\text{-value} = 0.315$
n=number of neurons	12m.NE (n=10); 12m.E (n=9)	
	Wilcoxon test (unpaired, bilateral)	
Basal dendrite number (Supp.Fig.2D)	12m D25 NE vs E	$W = 54$, $p\text{-value} = 0.7807$
n=number of neurons	12m.NE (n=10); 12m.E (n=9)	

“Long-run olfactory enrichment induces non-olfactory cognitive benefits, noradrenergic plasticity and brain network remodeling in aged mice”

Claire Terrier^{1,2*}, Juliette Greco-Vuilloud^{1,2*}, Matthias Cavellius, Marc Thévenet, Nathalie Mandairon^{1,2}, Anne Didier^{1,2§} and Marion Richard^{1,2§#}

¹ INSERM, U1028; CNRS, UMR5292; Lyon Neuroscience Research Center, Neuroplasticity and Neuropathology of Olfactory Perception Team, Lyon, F-69000, France.

² Claude Bernard University-Lyon1 and University of Lyon, F-69000, France

* equal contribution

§ co-supervision

Corresponding author

Corresponding author

Marion Richard, Ph.D.
Centre de Recherche en Neurosciences de Lyon
Centre Hospitalier Le Vinatier - Bâtiment 462 - Neurocampus Michel Jovet
95 boulevard Pinel
69675 Bron Cedex
France

tel: +33 4 81 10 65 20
marion.richard@univ-lyon1.fr

IN PREPARATION

ABSTRACT

Normal brain aging is accompanied by functional and structural changes, leading to cognitive decline. A potentially powerful tool to achieve successful brain aging is to boost the cognitive reserve. Indeed, a higher level of brain stimulation is associated with changes in neural activity and connectivity possibly supporting better capacity or adaptability of neural networks and higher cognitive performances in elderly. Noradrenaline has been proposed as a molecular link between environmental stimulation and the constitution of the cognitive reserve. Taking advantage of the strong ability of olfactory stimulation to trigger NA release, we used a strategy based on repeated olfactory enrichment sessions during the whole life of the animal in order to enable the cognitive reserve buildup. Mice submitted to long-run olfactory enrichment display improved olfactory discrimination performances and associative learning at late ages. Interestingly, long-run olfactory enrichment benefits extend beyond the olfactory sphere to spatial memory, and cognitive flexibility. In addition, histological analyses in brain regions related to the assessed behavioral performances (the olfactory bulb, orbitofrontal cortex and dorsal hippocampus) reveal an increase of noradrenergic innervation that correlates with cognitive performances. This is not accompanied by changes in adult neurogenesis, but by task-specific remodeling of neural networks. Indeed, the network underlying olfactory discrimination displayed increased specialization, while the network underlying spatial memory was enlarged. We thus propose long-run olfactory enrichment that induces broad cognitive benefits on age-sensitive performances as a mouse model of the cognitive reserve build-up relying on plasticity of the noradrenergic system and network remodeling to promote better cognitive aging.

INTRODUCTION

Aging is an inevitable and complex biological phenomenon associated with a progressive decline of sensory, motor and cognitive functions with time, affecting life quality and health. Apart from any age-related neurodegenerative diseases, normal brain aging is accompanied by functional and structural changes (Damoiseaux, 2017). Current hypothesis proposes that age-associated learning and memory deficits reflect a reduction of brain plasticity relying on discrete and regional alterations of neuronal morphology and synaptic function (Burke and Barnes, 2006, 2010; Morrison and Baxter, 2012; van der Zee, 2015). A potentially powerful tool to achieve successful brain aging is to boost the cognitive reserve. This concept was initially proposed to explain the discrepancy between considerable histological brain alterations and relatively preserved cognitive performances in some Alzheimer's patients (Barulli and Stern, 2013) and can be extended to normal aging. Epidemiological studies indicate that a higher level of brain stimulation through education, occupational attainment or social activities, is associated with changes in neural activity and connectivity possibly supporting better capacity or adaptability of neural networks in humans (Grady, 2012; Barulli and Stern, 2013; Reuter-Lorenz and Park, 2014; Cabeza et al., 2018). These observations prompted the development of training strategies, with positive outcomes on performances and remodeling of brain activation in aged subjects (*e.g.* (Holman and de Villers-Sidani, 2014)). In rodents, environmental enrichment mimics the conditions leading to constitution of the cognitive reserve in humans and has largely proven cognitive benefits including on spatial memory (Pang and Hannan, 2013), in both young and aged rodents (*e.g.* (Galani et al., 2007; Simpson and Kelly, 2011; Kumar et al., 2012; Harati et al., 2013; Mora-Gallegos et al., 2015; Fuchs et al., 2016a, 2016b)). This strategy relies on complex stimulations including enhanced multisensory stimulations, physical exercise and social interactions, among which exposure to novelty appears to play a greater role (Li et al., 2013).

Regarding the cellular mechanisms, environmental enrichment is known to improve brain function through the enhancement of neuronal structural and functional plasticity (van Praag et al., 2000; Neidl et al., 2016; Stein et al., 2016) and adult neurogenesis, mainly in the hippocampus (van Praag et al., 2000). In addition, environmental enrichment triggers noradrenaline (NA) release in the hippocampus (Galani et al., 2007; Brenes et al., 2009), that may contribute to spatial memory by enhancing hippocampal long-term plasticity (Li et al., 2013). NA originates from the Locus Coeruleus, whose activation is sensitive to novel and salient sensory stimuli (Berridge and Waterhouse, 2003). NA is released widely in cortical areas and participates in the modulation of sensory processing and many cognitive functions, such as attention, flexibility and memory (Sara, 2009; Sara and Bouret, 2012; Chamberlain and Robbins, 2013; Borodovitsyna et al., 2017). A recent study reported that the human Locus Coeruleus is vulnerable to aging and that its anatomical integrity is positively associated with preserved cognitive functions in healthy subjects (Clewett et al., 2016). This brought support to the noradrenergic theory of the cognitive reserve (Robertson, 2013; Clewett et al., 2016; Mather and Harley, 2016), proposing that NA could be the mechanism underlying the implementation of various experiences into brain networks to allow better performances during the cognitive reserve built-up.

In the olfactory modality, our group has previously shown that a session of olfactory enrichment based on novelty (introduction of a new odor every day during 30-40 days) has beneficial effects in young adult mice on odor discrimination and memory, improves survival of adult-born neurons within the olfactory bulb and induces NA release by the LC (Veyrac et al., 2009; Rey et al., 2012). However, olfactory enrichment becomes progressively inefficient in aged mice. In the current

study, we developed a strategy based on repeated olfactory enrichment sessions, each session consisting in a single sensory stimulation with a novel odor every day for 10 days and during the whole life of the animal in order to enable the cognitive reserve buildup. We hypothesized that such olfactory enrichment would allow repeated activation of the brain networks associated to arousal and novelty and thereby improve cognition at late ages. Olfactory enrichment started in young adulthood and sessions were distributed along the whole lifespan and we performed a longitudinal follow up of the cognitive benefits up to late ages, focusing on olfactory performances, spatial memory and cognitive flexibility. In addition, to identify the cellular bases of the improved performances in aged mice, we performed histological analyses in brain regions related to the assessed behavioral performances: olfactory bulb for olfactory discrimination and associative olfactory memory (Moreno et al., 2009, 2012, 2014; Sultan et al., 2010; Rey et al., 2012), orbitofrontal cortex for cognitive flexibility (Schoenbaum et al., 2002, 2006; Ragozzino, 2007) and the dorsal hippocampus for spatial memory (Moser et al., 1995; Assini et al., 2009; Fanselow and Dong, 2010). Since NA appears essential for maintaining cognitive function in the aging brain (Robertson, 2013; Clewett et al., 2016; Mather and Harley, 2016), we first focused our analysis on the noradrenergic system by investigating the integrity of the Locus Coeruleus and the density of NA innervation in target structures. Then, given the implication of adult-born neurons in olfactory and spatial learning and memory (Malvaut and Saghatelian, 2016; Anacker and Hen, 2017; Snyder and Drew, 2020), we analyzed the effect of long-run olfactory enrichment on bulbar and hippocampal adult neurogenesis. Last, as preserved cognitive functions are often associated with remodeling of brain activation patterns in aged humans (Grady, 2012; Cabeza et al., 2018) and NA influences connectivity and brain activation patterns in mice (Zerbi et al., 2019), we hypothesized that such remodeling of brain network could contribute to the cognitive benefits of long-run olfactory enrichment.

MATERIAL AND METHODS

Animals

Adult male C57Bl/6J mice were housed in groups of 5-7 in standard laboratory cages and were kept on a 12 hours light/dark cycle, at a temperature of 22°C, with food and water *ad libitum*. All mice were purchased at the age of 2 months (Charles River laboratory, Domaine des Oncins, France) and were aged in our animal facility in order to control environmental parameters whole life long. All efforts were made to minimize the number of animals used and their suffering during the experimental procedure in accordance with the European Community Council Directive 2010/63/EU. Protocols were approved by the French Ethical Committee (DR2013-48 (vM)).

Experimental design

In order to assess the benefits of a long-run olfactory enrichment, mice were submitted to repeated sessions of olfactory enrichment starting at young adulthood (2-month-old) or at middle age (12-month old). Each group of enriched mice (n=14-17) was compared to a control non-enriched group (n=15-16). The enrichment session lasted 10 days (5 weekdays during 2 consecutive weeks) and was repeated every month until mice reached 18 months (Fig.1). Olfactory enrichment was conducted between 8am and 1pm while behavioral testing was conducted in the afternoon (12am–7pm). During behavioral evaluation sessions, the animals were not enriched. Behavioral tests were performed to

assess olfactory discrimination, spatial memory, associative learning and flexibility abilities before, during and at the end of the enrichment period (2, 12, 15 and 18 months, Fig.1). All mice were sacrificed at the end of the experiment for histological examination. A subgroup of mice received BrdU injection 30 days before sacrifice to evaluate adult neurogenesis. To investigate the effect of long-run olfactory enrichment on brain activation, subgroups of control and enriched mice performed an olfactory discrimination task or a spatial non-olfactory memory task, 1h before the sacrifice.

Olfactory enrichment

Enrichment sessions took place in a ventilated cabinet. Two tea balls were hung in the home cage during 1h per day for 10 days. For the enriched group, a single odor was placed in the tea balls as opposed to the control non-enriched group where the tea balls were empty (sham manipulation). Enrichment odors were 10 natural odors, one odor per day: white pepper, star anise, cinnamon, chocolate, cardamom, fennel, garlic, ginger, nutmeg and clove. The same set of 10 odors was used for all sessions. The interval between two enrichment sessions (20 days) is sufficient for the mouse to consider the odor as a salient stimulus in the environment, even though it has already experienced it in a previous enrichment session. This assumption is supported by previous studies reporting the relatively short duration of odor memory in mice (*e.g.* (Rocheffort et al., 2002; Rey et al., 2012)). The order of odors presentation was randomized during the different enrichment sessions.

Behavioral evaluations

All behavioral evaluations were performed blind with regard to the enrichment status of the mice.

Assessment of olfactory discrimination

Behavioral testing. We used a cross-habituation task (Cleland et al., 2002) to assess spontaneous discrimination between perceptually close or distant odorants. This task has been previously described in details (Mandairon et al., 2006; Moreno et al., 2009; Vinera et al., 2015). It consisted of a habituation phase, during which the same odorant is presented 4 times (Hab1-Hab4), followed by a discrimination phase, during which a new odorant is presented (OTest). Each odorant of the pair was alternatively used as OHab or OTest. For each mouse, the data presented correspond to the mean of both configurations (odorant 1 and odorant 2 as OTest). Habituation resulted in a decrease in the investigation time across trials. During the last trial (OTest), an increase of investigation time indicated discrimination between the two odorants. Odorants were spotted on a filter paper (60 µl) which was placed in a tea ball in the experimental cage. Each trial lasted 50 s and the intertrial interval was 5 min. During each trial, the investigation time of odorants was measured when the mouse's nose was within 1cm of the tea ball. Before the habituation phase, a trial with mineral oil was made.

Odorants used in the cross-habituation task. Three pairs of odorants were used at a vapor phase pressure of 1 Pa (Cleland et al., 2002): Propyl Acetate (CAS # 109-60-4, purity >99%; Sigma Aldrich, St.Louis, MO, USA) and Hexyl Acetate (CAS #142-92-7, purity >99%, TCI Europe, Zwijndrecht, Belgium), + Limonene and - Limonene (CAS #5989-27-5 and #5989-54-8, purity >97%, Sigma Aldrich) and Decanal (CAS #112-31-2, purity >98%, Sigma Aldrich) and 2-Dodecanone (CAS #6175-49-1, purity >97%, Aldrich Sigma). Based on our previous studies (Moreno et al., 2009; Rey et al., 2012), these odorants were selected to compose two pairs of perceptually similar odorants (+ Limonene and - Limonene, Decanal

and 2-Dodecanone) or one pair of dissimilar odorants (Propyl acetate and Hexyl acetate). The mice were tested for discrimination with each of the three pairs on separate days and the order of testing of these three pairs was randomized during the behavioral session.

Data analysis. Investigation time for each trial was averaged within groups. Individual sessions with investigation times lower than 0.5s at OHab1 were excluded, as well as sessions where one trial exceeded mean +2SD (these exclusions represented 187 sessions among a total of 957 sessions), in order to be able to perform paired statistical analysis. We calculated a discrimination index defined as $[1-(OHab4/OTest)]$, where OHab4 and OTest were the exploration time during respectively the 4th habituation trial (Hab4) and the test trial (OTest). The discrimination index approaches 0 when OTest is similar to OHab4 (no discrimination) and 1 when OTest largely exceeds OHab4 (high discrimination). When OHab4 > OTest, the index was set to 0. This index enables the comparison of discrimination performances independently of overall variations in investigation time and gives a graded measure of discrimination while the cross-habituation task is a binary evaluation (Cleland et al., 2002; Rey et al., 2012).

Data were analyzed using in-house made scripts written in R-Studio® (stats package and PMCMRplus package for Friedman's ANOVA). The level of significance was set to 0.05. As the behavioral data did not satisfy to normality and variance equality criteria (assessed with Shapiro-Wilk normality test on residues and Bartlett test of homogeneity of variances), we performed non-parametric tests: a Friedman's ANOVA to test for trial effect (OHab1-4, OTest) followed by pairwise Nemenyi tests corrected for multiple comparisons (Hab1 vs Hab4 to test for odor habituation and Hab4 vs OTest to test for odor discrimination). To compare indices between control and enriched mice, 2-way ANOVA (type III ANOVAs with enrichment and age as factors) were performed and followed by pairwise t-test with Holm correction for multiple comparisons when data respected normality and variance equality criteria, otherwise unpaired bilateral two samples Wilcoxon tests were performed. When data respected normality but not variance equality, pairwise t.tests with Welch correction and Holm correction for multiple

Assessment of spatial memory

Behavioral testing. To assess spatial memory, we used the object location test as described previously (e.g. (Murai et al., 2007; Wimmer et al., 2012; Cès et al., 2018) with minor modifications. In this task, after familiarization to the experimental set-up, the mouse has to learn the position of two similar objects during an acquisition trial of 5 min (Fig.3A). After a variable delay (5, 15 and 60 minutes), spatial memory is assessed by displacing one of the objects. This task is based on the spontaneous tendency of rodents to preferentially re-explore a displaced object when it is confronted to a non-displaced object and recognizes that it has been displaced.

This test was conducted in an open field (length 50x width 50x height 30 cm) in which we placed a pair of objects (objects A and B). Three different pairs of objects were used: two black metal towers, two Lego® blocks and two Playmobile®, all approximately of the same volume (5x5x2 cm) but pairs differing in shape and colors. A visual cue was present on one of the four walls and light intensity was set around 50 W. The task consisted in a familiarization to the experimental chamber, followed by an acquisition phase and a retention test phase (Fig.3A). For familiarization, the mice were individually introduced in the empty arena for 5 min per day during 2 consecutive days. The acquisition phase then consisted in

a single trial, during which the mice were allowed to freely explore the objects in the arena during 5 min. Each object was placed in one of the four corners of the open field (at a distance of 12.5 cm from the walls). At the end of the acquisition trial, the mice were returned to their home cage. After a delay of 5, 15 or 60 min, the mice were reintroduced in the open field for the retention test (duration 5 min). For this test, one object was moved to another corner of the apparatus (displaced object, DO) while the other object remained at the same location (non-displaced object, NDO). The displacement distance was 24 cm. Each mouse was tested for all three delays with different pairs of objects and on separate days. Object location, new location, pairs of objects used and retention delays were all counterbalanced over groups and sessions.

During both acquisition and retention test trials, we measured the investigation time of the two objects and calculated a preference index for each mouse. This index corresponds to the ratio of the investigation time of the displaced object to the total time spent exploring both objects (*i.e.* preference = $100 \cdot DO / (NDO + DO)$).

Data analysis. A mean preference index was calculated for each group of mice and each delay. Shapiro and Fisher tests were performed to assess data normality and variance homogeneity. As these conditions were not respected, we performed non-parametric statistical analysis. Univariate Wilcoxon tests (R software, stats package) were used to compare the preference index to 50% (preference value corresponding to similar exploration of the two objects).

Assessment of associative and flexibility capacities

Behavioral testing. We used an olfactory associative learning task with rule reversal as described previously (Guérin et al., 2009; Sultan et al., 2010; Mandairon et al., 2011). In this task, two odorants were presented and the mice had to learn to associate one odorant of the pair to a food reward (=reinforced odorant) while the other odorant was never reinforced. Once the mice had learnt this first task, we inverted the rule and the previously non-reinforced odorant became the reinforced odorant. To succeed in this second task, the mice had to discard the first odor/reward association, thereby showing flexibility.

The experiment took place on a computer-assisted 2-hole board apparatus (40x40 cm) (Mandairon et al., 2009). Each hole contained a swab impregnated with 20 μ l of pure odorant and covered with bedding. The two holes were odorized with two different odorants, one of them was reinforced.

Shaping. One day before the beginning of the experiment, the mice were food deprived (2g per day, leading to a maximum of 20% reduction in body weight). Shaping consisted in sessions of 4 trials (trial duration = 2 min, one session per day) during which mice were trained to retrieve a reward (a small bit of cereal, Corn Flakes, Kellogg's®) hidden in one hole, in the absence of any odorant. During the first trials, the reward was placed on top of the bedding. After the mice retrieved the reward, it was buried deeper and deeper in the bedding. The shaping was considered as completed when every mouse successively retrieved the buried reward (2-3 sessions), and was followed by the conditioning phase.

Conditioning. Conditioning consisted in sessions of 4 trials (trial duration = 2 min, intertrial interval = 15 min, one session per day). During conditioning, one of the odorants was systematically reinforced and mice had to retrieve the reward associated with the reinforced odorant. To avoid spatial learning, the location of the odorants was randomized. A control pseudo-conditioned group was also

constituted, in which the reward was randomly placed in either of the odorized holes, so that the mice would not associate an odorant with the reward.

For each trial, correct choices (first nose poke in the reinforced hole) were recorded as indicative of learning. We calculated a percentage of correct choices for each session (based on the 4 trials of the session). We considered that the association had been made when the average percentage of the correct choices reaches 80% for the group. The rule was reversed once the group had reached this criterion. The same protocol and the same parameters were used for the conditioning with the modified rule.

Odorants used in the associative task. We used three pairs of dissimilar odorants: + Limonene (CAS #5989-27-5) and Decanal (CAS #112-31-2), Isoamyl Acetate (CAS #123-92-2, purity >95%, Sigma Aldrich) and Anisole (CAS #100-66-3, purity >98%, Sigma Aldrich), 3-Hexanol (CAS #623-37-0, purity >97%, Fluka, Buchs, Switzerland) and Heptanal (CAS #111-71-7, purity >95%, SAFC, Sigma Aldrich) (Table 1). Odorants were distributed between testing sessions in order to minimize repetitions. In order to limit the risk of over-training, mice that were pseudo-conditioned during one session (ex at 12 months) were conditioned on the next session (ex at 15 months) and vice-versa. Importantly, for each age, control and enriched mice were tested in identical odor configuration.

Data analysis. For each behavioral session, we calculated a mean percentage of correct choices for each group. Shapiro and Fisher tests were performed to assess data normality and variance homogeneity for each group and each session. As these conditions were not respected, we performed non-parametric statistical analysis. We used Friedman followed by Nemenyi *post hoc* tests (R software, PMCMRplus package) in order to compare the percentage of correct choices across days. Univariate Wilcoxon tests (R software, stats package) were used to evaluate whether the success rate was higher than 50% (chance level).

Histological evaluations

All histological evaluations were conducted blind regarding the experimental group.

Sacrifice

To investigate the neuronal networks activated during a specific task, several subgroups of control and enriched mice were constituted based on the behavioral task they performed 1h before the sacrifice: the olfactory discrimination task using a pair of perceptually similar odorants (Decanal and 2-Dodecanone) or the object location task with a 60-min delay (early-enriched and control mice) or the object location task with a 5-min delay (late-enriched and control mice). 1h after the end of the task, mice were deeply anesthetized (pentobarbital, 0.4g/kg) and killed by intracardiac perfusion of paraformaldehyde (4% in phosphate buffer, pH 7.4). Brains were removed, postfixed, cryoprotected in sucrose (20%), frozen rapidly, and then stored at -20°C. Serial coronal sections (14 µm thick) were obtained at -20°C on a cryostat HM 550 Microm (Microtech, Francheville, France). All cellular experiments were conducted blind regarding the experimental group. This procedure allows to identify neurons activated during the task by the expression of the immediate early-gene c-Fos (Sagar et al., 1988)

Adult-born neuron quantification

BromodeoxyUridine (BrdU) administration. A subgroup of mice received intraperitoneal BrdU (SigmaAldrich) injections (100 mg/kg, 3 times at 2h intervals), 30 days before sacrifice.

BrdU immunohistochemistry. Sections were rehydrated in 1X Phosphate Buffer Saline (PBS), then incubated in Target Retrieval Solution (Dako) for 20 min at 98 °C. After cooling, they were rinsed and permeabilized for 30 min in Triton X-100 (0.5% in 1X PBS). After rinsing, sections were treated with pepsin (0.43 U/mL in 0.1N HCl, Sigma) for 3 min, rinsed, and incubated for 20 min in H₂O₂ (3% in PBS 1X) to inhibit endogenous peroxidase activity. After rinsing, sections were transferred to a blocking solution containing 5% normal horse serum (Sigma) with 5% BSA and 0.125% Triton X-100 for 90 min, and were then incubated overnight at 4°C with a mouse anti-BrdU antibody (1:100, ref MAB4072, Millipore). After rinsing, sections were incubated at RT for 120 min with biotinylated horse anti-mouse secondary antibody (1:200, ref BA-2001, Vector Laboratories). Sections were then rinsed and processed through an avidin-biotin-peroxidase complex (ABC Elite Kit, Vector Laboratories). Then, sections were revealed in a solution containing DAB (0.054%), NiCl₂ (0.03%), and H₂O₂ (0.03%). After dehydration in graded ethanol, the sections were defatted in xylene and cover-slipped in DPX (Sigma).

BrdU-positive cell quantification. Positive cells were manually counted in the antero-posterior axis of the entire granule cell layer of the OB (sampling interval = 140 µm, 2-8 sections/animal) using a mapping software (Mercator, Explora Nova, La Rochelle, France) coupled to a Zeiss microscope. The number of positive cells was divided by the surface of the granule cell layer to yield the total density of labeled cells (labeled profiles/mm²) and an averaged density was calculated for each animal and then for the group (n=4-6 animals/group).

Triple-labeling immunohistochemistry. To determine the phenotype of BrdU-positive cells in the OB and their functional involvement in odor processing, triple labeling was performed using rat anti-BrdU (1:100, ref ABC117-7513, AbCys), rabbit anti-c-Fos (1:2000, ref 26 192-AP, ProteinTech), and mouse anti-NeuN (1:500, ref MAB377, Chemicon) antibodies. Appropriate secondary antibodies coupled with Alexa 488 for revelation of BrdU (Goat anti-rat Alexa 488, ref ab150157), Alexa 546 for c-Fos (Goat anti-rabbit Alexa 546, ref A11010) and Alexa 633 for NeuN (Goat anti-mouse Alexa 633, ref A21052), were used (1:200, Molecular Probes).

BrdU/NeuN- and BrdU/NeuN/c-Fos-positive cell quantification. Double and triple-labeled sections were examined using a pseudo-confocal microscope equipped with an ApoTome system, coupled with an Axio Vision 4.8 image analysis software (Zeiss microscope Axio Imager.ZI). The phenotype of BrdU-positive cells in the OB was assessed by yielding a percentage of neurons (NeuN+) over the new-born cell population (BrdU+) (30-54 cells/animal, n=5-6 animals/group). The functional involvement of newborn neurons was assessed by yielding a percentage of activated neurons (c-Fos+) over the whole adult-born neuron population (BrdU+ and NeuN+) (35-53 cells/animal, n=2-3 animals/group).

Doublecortin (DCX) immunohistochemistry. Immunohistochemistry was performed using a guinea pig anti-DCX (1:1000, ref AB2253, Chemicon/Millipore) antibody. Appropriate secondary antibody coupled with Alexa 488 for revelation of DCX was used (1:250, Goat anti-guinea pig Alexa 488 ref A11073, Molecular Probes).

DCX-positive cell quantification. Images of the DG were acquired using a microscope coupled with an Axio Vision 4.8 image analysis software using a x5 objective (Zeiss microscope Axio Imager.ZI). Positive cells were manually counted in the entire granule cell layer of the dorsal DG along its antero-posterior axis (sampling interval = 210 μm , 8-12 images/animal taken from left and right sides). DG were delineated on ImageJ to determine their surface. The volume was measured using the formula given below (with S the surface of the i sections, d the distance between each section and n the total number of sections). The number of positive cells was divided by the volume of the granule cell layer for each side to yield the total volumic density of labeled cells (labeled profiles/ mm^3) and an averaged density was calculated for each animal and then for the group ($n=4-6$ animal/group).

$$\sum_{i=0}^n S_i d$$

Noradrenergic innervation

NET immunohistochemistry. Sections were rehydrated in 1X Phosphate Buffer Saline (PBS), then permeabilized for 30 min in Triton X-100 (0.5% in 1X PBS) and rinsed 5 min in 1X PBS at room temperature. To block nonspecific binding, sections were incubated at RT during 90 min in a blocking solution containing horse serum (5%), bovine serum albumin (2%), Triton X-100 (0.1%) in 1X PBS. They were then incubated with mouse anti-NET primary antibody (1:1000, ref AMAB91116-100UL, Sigma Aldrich) diluted in the blocking solution during 72h at 4°C. After rinsing, sections were incubated for 120 min at room temperature with biotinylated horse anti-mouse (1:200, ref A-2001, Vector) secondary antibody in a solution containing horse serum (5%) in 1X PBS. Sections were rinsed and incubated for 90 min with Streptavidin Alexa 488 (1:1000, ref S32354, Molecular Probes). Finally, after rinsing, sections were coverslipped with a Vectashield medium containing DAPI (Vector Lab).

Image acquisition and quantification. 3D images were acquired with a pseudo-confocal microscope equipped with an ApoTome system, coupled with an Axio Vision 4.8 image analysis software (Zeiss microscope Axio Imager.ZI). To quantify the area occupied by the NA fibers, z-stack images were acquired with a x40 immersion objective (1 μm interval between each image of the stack). Pictures were randomly taken within the granule cell layer to sample the OB (along its dorsal, lateral, medial and ventral regions) on 2 different sections for each animal, the stratum oriens, the pyramidal layer and the stratum radiatum (along its dorso-lateral, ventro-lateral, dorso-medial and ventro-medial regions) to sample CA1, and the molecular and granule cells layers (along its dorso-lateral, ventro-lateral, and medial regions) to sample the dentate gyrus. The stained surface was measured on a maximum intensity projection of the z-stack ($z=1\mu\text{m}$). The stained surface was automatically measured by applying the same intensity threshold to all images with ImageJ software. Results are expressed as the ratio between the NET-labeled area and the total area of the image (% of stained surface). An average stained surface is calculated for each animal and then for the group ($n=4-6$ animals/group).

Locus Coeruleus integrity

Phox2a/TH immunohistochemistry. Immunohistochemistry was performed using a mouse anti-phox2a (1:500, ref WH0000401M1-100UG, Merck) and a chicken anti-TH (1:1000, ref ab76442, Inst.J.Boy) antibodies. Appropriate biotinylated horse anti-mouse (1:200, ref A-2001, Vector) and goat

anti-chicken Alexa 633 secondary antibodies (1:250, ref A21103, Molecular Probes) were used followed by streptavidin coupled with Alexa 488 (1:1000, ref S32354, Molecular Probes).

Phox2a/TH-positive cells quantification. Double-labeled sections were examined using a pseudo-confocal microscope equipped with an ApoTome system, coupled with an Axio Vision 4.8 image analysis software (Zeiss microscope Axio Imager.ZI). z-stack images were acquired with a x20 objective (z-step =2 μ m). Locus Coeruleus was delineated on each section with ImageJ software to determine its surface. Phox2a and TH-positive cells were manually counted in the anterior part of the Locus Coeruleus (2-6 sections/animal, distance from Bregma: -5.2 to +5.51 mm). The number of Phox2a and TH-positive cells was divided by the surface of the LC to yield the total density of labeled cells (labeled profiles/mm²) and an averaged density was calculated for each animal and then for the group (n=4-6 animals/group). We also assessed the number of Phox2a neurons expressing the TH phenotype by yielding the percentage of TH-positive neurons over the whole Phox2a-positive population (15-67 cells/animal, n=4-6 animals/group).

TH intensity. The mean gray value was assessed with ImageJ on delineated Locus Coeruleus areas. An averaged mean gray value was calculated for each animal (2-6 sections/animal) and then for the group (n=4-6 animals/group).

Brain activation pattern analysis

To investigate the neuronal networks activated during a specific task, a sub-group of mice performed the olfactory discrimination task, and a second subgroup performed the object location task with a 60 min delay. Network analyses for the discrimination task sub-group were performed by pooling the early and late-enriched group together, as well as their respective control groups. For the object location task sub-group, analyses were performed on the early enriched and control groups.

c-Fos immunohistochemistry. Sections were rehydrated in 1X Phosphate Buffer Saline (PBS), then permeabilized for 30 min in Triton X-100 (0.1% in 1X PBS) and rinsed in 1X PBS at room temperature. To block endogenous peroxidases, sections were incubated in H₂O₂ (3%) and rinsed in 1X PBS. To block nonspecific binding, sections were incubated at RT during 90 min in a blocking solution containing goat serum (5%), bovine serum albumin (2%), Triton X-100 (0.5%) in 1X PBS. They were then incubated with rabbit anti-c-Fos (1:2000, ref 26 192-AP, ProteinTech) primary antibody diluted in the blocking solution during 48h at 4°C. After rinsing, sections were incubated for 120 min at room temperature with biotinylated goat anti-rabbit secondary antibody (1:200, ref BA-1000, Vector) in a solution containing goat serum (5%) and BSA (5%) in 1X PBS. Sections were rinsed and incubated for 60 min with an avidine-biotine peroxidase kit (Vectastain Elite kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). After rinsing, sections were pre-incubated in a diaminobenzidine solution (0,06% in Tris HCl 0,05M) and revealed with the diaminobenzidine solution containing NiCl₂ (0,03%) and H₂O₂ (0,06%).

c-Fos-positive cells quantification. For each section analyzed, the external contour of the right or the left hemisphere was outlined and c-Fos-positive cells were automatically counted using a mapping software (Mercator, Explora Nova, La Rochelle, France) coupled to a Zeiss microscope. The coordinates of each labelled cell and the contour point were exported into a software made by the team allowing high-accuracy matching of experimental brain sections with a reference brain atlas (Midroit et al., 2018). This method allows precise, automatic assignment of the labelled cells to a brain structure and permits between-group comparisons after re-fitting in a common anatomical space. A total of 31 areas

was analyzed. These areas were distributed into 6 functional systems named olfaction, prefrontal, spatial memory, motor, other sensory and neuromodulatory. 10 areas were selected based on their known involvement in olfactory processing and constituted the “olfaction” system: the glomerular (GL) and granular (GrL) layer of the OB, the accessory olfactory bulb (AOB), the anterior olfactory nucleus (AON), tenia tecta (TT), piriform cortex (Pir), tubercle (Tu), cortical amygdala (ACo), nucleus of the lateral olfactory tract (LOT), postero-lateral cortical amygdala (PLCo). The “spatial memory” system (7 areas) was composed of lateral (LSN) and medial (MSN) septal nucleus, entorhinal cortex (EC), dorsal dentate gyrus (dDG), dorsal CA3 (dCA3), dorsal CA1 (dCA1) and lateral habenula (LHb). The “prefrontal” system (7) was composed of the cingular cortex (CC), frontal association cortex (Fr), insular cortex (IC), lateral (LO), medial (MO), ventral (VO) and dorso-lateral (DLO) orbital cortex. Last, 2 areas composed the “motor system” (motor cortex (MC), caudate and putamen (CPu)), 3 areas composed the “other sensory system” (parietal cortex (PC), somatosensory cortex (S1), auditory cortex (A1)) and 2 composed the “neuromodulatory system” (diagonal band of Broca (HDB) and locus coeruleus (LC)). Missing sections were interpolated, as explained in (Midroit et al., 2018).

Comparison of cell densities. In order to reduce inter-individual variability in staining intensity, c-Fos density for each area of a given animal was normalized by the average c-Fos density of all 31 regions of this animal. Results from enriched animals were then expressed as a percentage of change relative to controls.

Functional connectivity analysis and network construction. Functional connectivity analysis was performed similarly to previous studies using the graph theory (Wheeler et al., 2013; Babayan et al., 2017; Vetere et al., 2017; Cavelius et al., in prep.). Within each experimental group (olfactory discrimination: controls and enriched, OLT: controls and enriched), pairwise correlations between non-normalized c-Fos densities in the 31 regions were determined by computing Pearson’s correlations (totaling 465 correlations). Each set of correlations was displayed as color-coded correlation matrices using R software. Networks graphs were constructed by considering only correlations reaching a bilateral significance level of $p \leq 0.025$ corresponding to $r \geq 0.82$ (uncorrected for multiple comparisons). Each region is represented by a point called a node. The lines between the regions represent the correlations. These correlations represent the co-variation of the density of c-Fos+ cells in two regions across mice and are interpreted as functional connections between these two regions (Horwitz et al., 1995; Wheeler et al., 2013; Babayan et al., 2017; Vetere et al., 2017).

Measure of networks parameters. Complex networks can be both segregated - enabling for specialized processing in more densely connected clusters - and integrated - enabling for efficient information flow through the network – (Bullmore and Sporns, 2009). Networks measures were generated using functions from Olaf Sporns’ brain connectivity toolbox (<https://www.brain-connectivity-toolbox.net/>). To assess the integration of our networks, we measured their global efficiency, defined as the average inverse shortest path length in the network, the shortest path length being the minimum number of connections that must be traversed to go from one node to another (Bullmore and Sporns, 2009). To assess the segregation, we computed the mean clustering coefficient that represents the average clustering coefficient of all nodes of the network. The clustering coefficient represents the number of connections that exist between the nearest neighbors of a node divided by the total number of possible connections between them (Rubinov and Sporns, 2010). Experimental network’s parameters were compared to those calculated from 1000 random networks, each random network sharing the same number of active nodes, connections and same degree distribution with our

original network (Rubinov and Sporns, 2010). For our 4 experimental networks, we generated 95% confidence intervals by bootstrapping. Bootstrapping involves resampling subjects with replacement 1000 times and recalculating network measures as described in (Wheeler et al., 2013). When the confidence intervals do not overlap, the parameters of the experimental network are considered different from the random network.

Cluster analysis and hub identification. The cluster analysis was conducted with the Markov Cluster Algorithm (inflation parameter set at 2), a scalable, unsupervised cluster algorithm for networks based on simulation of stochastic flow in graphs (<https://www.micans.org/mcl/>). Clusters and associated visualizations were performed using Cytoscape (<http://www.cytoscape.org/>). Hubs are nodes with high degree and high betweenness (Rubinov and Sporns, 2010). Degree corresponds to the number of connections in which the region is involved. Betweenness is the number of times a node appears in the shortest path between two nodes in the network. All structures were ranked by degree and betweenness, and candidate hub structures were defined as the structures ranked >80th percentile for both measures in the $p \leq 0.025$ confidence levels' networks (Wheeler et al., 2013; Babayan et al., 2017).

Statistical Analyses

All data were analyzed using in-house made scripts written in R-Studio® (stats package and car package for ANOVAs). The level of significance was set to 0.05. Shapiro-Wilk and Bartlett preliminary tests were performed to assess respectively the normality and homoscedasticity of the data. For mean comparisons, when data respected normality and homoscedasticity, statistical analysis was carried out by 2-way ANOVA (type III ANOVA) with enrichment and onset of the enrichment (early or late) as factors. If only normality was respected, data were analyzed using a test of Student with Welch correction for homoscedasticity. If not, data were analyzed using a Mann-Whitney test with holm correction for multiple comparisons. For proportion comparisons, we performed bilateral proportion test. For comparison to a mean of reference, when data respected normality we performed one sample t.test, if not we performed one sample Wilcoxon test. For linear correlations, as data did not respect normality, we performed Spearman tests.

RESULTS

Long-run olfactory enrichment improves olfactory discrimination

In order to investigate whether long-run olfactory enrichment could have benefits on fine olfactory discrimination, mice were tested using a pair of perceptually similar odorants (Decanal and 2-Dodecanone) at different ages. These odorants are not spontaneously discriminated by young adult mice (2 to 3 month-old mice) but their discrimination can be induced through learning (Moreno et al., 2009, 2012). Mice were evaluated for olfactory discrimination before the enrichment started (2 months for the early group and 12 months for the late group) and at several ages during long-run olfactory enrichment up to 18 months.

Behavioral tests (Fig.2) revealed that at all time points and regardless of the onset of enrichment (early or late enrichment), both control and enriched mice displayed habituation to Decanal and 2-Dodecanone, as evidenced by the decreased investigation time between OHab1 and OHab4 (see Table

2 for complete statistical description). Discrimination was assessed by comparing the investigation time of the test odorant (OTest) to the fourth presentation of the habituation odorant (OHab4). As expected, at the beginning of the experiment, none of the mice discriminated Decanal and 2-Dodecanone, as shown by a similar investigation time between OHab4 and OTest (Fig.2Ai and Fig.2Bi). At 12, 15 and 18 months, enriched groups were able to discriminate Decanal and 2-Dodecanone, as evidenced by the significant increase of the investigation time between OHab4 and OTest. This was true whether the enrichment had started early (Fig.2Aii-Aiv) or late in life (Fig.2Bii-Biii). Unexpectedly, the investigation time significantly increased between OHab4 and OTest in the early-control group at 12 months. However, analysis of the discrimination indices, that allow evaluating the strength of the discrimination, confirmed the higher discrimination abilities of enriched mice compared to controls at 12, 15 and 18 months (Fig.2Av and Biv, Table 2), whether the enrichment had started early or late in life.

The improvement of olfactory discrimination at 18 months was confirmed using another pair of perceptually similar odorants (Fig.S1, + Limonene and - Limonene). Both early- and late-enriched aged mice were better at discriminating + Limonene and - Limonene than their respective control groups. When tested against a pair of perceptually dissimilar odorants (Fig.S2, Propyl Acetate and Hexyl Acetate), both control and enriched mice remained able to discriminate these odorants until late ages, with similar discrimination indices regardless of the onset of enrichment.

All together, these results indicate that the degradation of olfactory discrimination with aging is restricted to fine olfactory discrimination (*i.e.* discrimination of perceptually similar odorants), while gross discrimination remains intact. Interestingly, life-long olfactory enrichment prevents such degradation regardless of the onset of enrichment.

Long-run olfactory enrichment improves retention of spatial memory

In order to investigate whether long-run olfactory enrichment could have benefits on spatial memory, mice were submitted to the object location task, with three different delays (5, 15 and 60 min, Fig.3A).

Before any enrichment (pre-tests), young adult mice (2-month-old) detected the displaced object for all tested delays (Fig.3Bi), as shown by a preference index that was significantly higher than the chance level (50%). At middle age (12 months), early-control mice were still able to remember the object location for the 5- and 15-min delays but not for the 60-min delay (Fig.3Bii), demonstrating a deficit in longer retention compared to 2-month-old mice. On the contrary, 12 months early-enriched mice were able to remember the object location after 60 min, suggestive of an improvement of long-term retention mediated by long-run olfactory enrichment (Fig.3Bii). At 15 months, early-control mice were able to remember the object location for the 5- and 15-min delays but not for the 60-min delay, a pattern similar to that of early-control mice aged 12 months (Fig.3Biii). This result indicates a stability of the spatial memory performances between 12 and 15 months. No benefits of early enrichment were visible at 15 months. At late ages (18 months), early-control mice were unable to remember the object location whatever the delay (Fig.3Biv), indicating deficits in both short and longer retention of spatial information. On the contrary, early-enriched aged mice performed above chance level for all tested delays (Fig.3Biv), revealing a beneficial effect of long-run olfactory enrichment at 18 months, improving retention of spatial information for both short and longer delays. Comparisons of the exploration times

of the displaced and non-displaced objects confirmed the results obtained with the preference indices (Fig.S3A-B).

We also evaluated the effect of an olfactory enrichment started at middle age (12 months, late enrichment). Mice pre-tested at 12 months showed a deficit in spatial memory for the longer delay of 60 min (Fig 3Ci), replicating the data presented on Fig.3Bii with another group of animals. When tested at 15 months, late-enriched mice displayed a preference for the displaced object for the 15-min delay, indicating that they were able to remember the object location at this delay while late-control mice were not (Fig.3Cii). This result demonstrated that the late-started olfactory enrichment efficiently improved short term retention. At 18 months (Fig.3Ciii), it is difficult to conclude about the late groups, as late-control were able to remember the object location for the 15- and 60-min delays, while late-enriched remembered for 5 and 15 minutes. Although discrepancies are visible between the early-control and late-control groups at 18 months, late-enriched mice seem to reach performances that are similarly to those of early-enriched mice for the 5- and 15-min delays. These results suggest that the late-started enrichment still has benefits on the retention of spatial memory for short delays.

Thus, spatial memory is degraded at middle age (12-15 months) with the loss of longer retention (60 min) and preceding an aggravation (shorter retention times, 5 and 15 min) at 18 months. Long-run olfactory enrichment is beneficial, whether started at young adulthood or middle age, with a somehow more pronounced effect in the early-enriched group.

The memory deficits described above were not due to an alteration of the initial exploration during the acquisition trial that could induce a deficit in encoding. Indeed, the total exploration time during the acquisition trial was similar between groups (Fig.S3C-D). Only a significant effect of age was found in the early-control group (Kruskal-Wallis chi-squared = 10.994, df = 3, p-value = 0.01176), restricted to a reduction of the exploration time in the control 18-month-old group compared to the 12-month-old control group (*post hoc* pairwise Wilcoxon test $p=0.01$, Fig.S3C).

Interestingly, significant positive correlation was found between spatial memory performances (5-min delay) and olfactory discrimination ($\rho(45)=0.5519849$, $p=5.132e-05$) (Fig.S4), indicating global cognitive benefits of olfactory enrichment, extending outside the olfactory sphere.

Long-run olfactory enrichment does not affect olfactory associative learning.

In order to further investigate the potential benefits of long-run olfactory enrichment, mice were submitted to an olfactory associative learning paradigm (Fig.4).

Young adult mice (2 months) displayed an increasing success rate with days, indicative of successful learning of the association of the odorant with the reward (Fig.4Ai). At 12 and 15 months, mice of the control groups were also able to perform this task (Fig.4Aii, Aiii, Bi, Bii, see Table 3 for detailed statistical results). Enriched animals did not display any significantly different behavior whether enriched early or late in life (Fig.4Aii, Aiii, Bii).

Interestingly, at 18 months, none of the late groups (late-control or late-enriched) were able to learn the task as their success rate remained stable around 50% for 5 successive training days (Fig. 4Biii), similar to what is usually observed for pseudo-conditioned groups (Fig.S4, Table S4 for detailed statistical results). On the contrary, both early-control and early-enriched mice were able to learn the

association (Fig. 4Aiv). This result suggests that olfactory enrichment *per se* has no effect on associative learning, but that regular intervention on the mice (manipulating the cages and placement of a tea ball in the cage) whole life long may have a beneficial effect on this type of learning.

Long-run olfactory enrichment improves late age cognitive flexibility

In order to investigate whether long-run olfactory enrichment could have benefits on cognitive flexibility, we reversed the rule in the olfactory associative learning task. Task reversal is a widely used paradigm to evaluate cognitive flexibility in animal models (Izquierdo et al., 2017).

Reversal of the reinforcement rule induced a drop of performances on the first day of rule reversal (R1) reflecting the confidence of the animals on the previously learned rule. The drop in success rate was present and of the same magnitude for all conditioned groups of all ages (Fig.4, see Table 3 for detailed statistical results), but not for pseudo-conditioned groups (Fig.S5, see Table S4 for detailed statistical results). This observation suggests that the strength of the first learning, as long as it is reflected by the performance drop on R1, was similar in all groups. While learning the new rule, animals of all groups behaved similarly indicating no difference in behavioral flexibility to the notable exception of 18-month-old mice. Indeed, the 18-month-old early-control group did not reach the learning criterion, nor significantly exceeded chance level, in contrast to their enriched counterpart (Fig.4Aiv). This shed light on a benefit of long-run olfactory enrichment on cognitive flexibility at late ages.

Altogether, our behavioral data demonstrate benefits of long-run olfactory enrichment on olfactory discrimination abilities in aged mice and extending outside the olfactory modality, with benefits in spatial memory and cognitive flexibility.

Long-run olfactory enrichment does not modify the integrity of the Locus Coeruleus but induces a local remodeling of NA innervation.

The noradrenergic system is vulnerable to aging and its anatomical integrity is positively associated with preserved cognitive functions in human healthy subjects (Clewett et al., 2016). We hypothesized that long-run olfactory enrichment would recruit the noradrenergic system and thereby preserves this neuromodulatory system from aging, in accordance with the noradrenergic theory of the cognitive reserve (Robertson, 2013; Clewett et al., 2016; Mather and Harley, 2016). In addition, long-run olfactory enrichment could induce noradrenergic structural remodeling contributing to the preservation of cognitive capacities. We thus investigated the integrity of the LC in the 18-month-old mice after early or late-started long-run olfactory enrichment.

Using the noradrenergic transcription factor Phox2a, we measured the survival of noradrenergic neurons in the LC and found no effects of long-run olfactory enrichment (Fig.5Bi, see Table 4 for detailed statistical results) onset of the enrichment or interaction between enrichment and onset on the density of Phox2a+ cells. As Phox2a regulates the expression of noradrenergic markers (Morin et al., 1997; Yang et al., 1998; Goridis and Brunet, 1999), we also measured the expression of TH in the Locus Coeruleus and we did not observe any effect of enrichment (Fig.5Bii, see Table 4 for detailed statistical results), onset of the enrichment or interaction between enrichment and onset on the density of TH+ cells. These results indicate that long-run olfactory enrichment did not increase the survival of neurons in the Locus Coeruleus of aged mice. Moreover, “resting-noradrenergic” neurons

exist in the rostral Locus Coeruleus under basal conditions. These neurons express the Phox2a transcription factor but not TH and can be reactivated following different treatments (Bezin et al., 2000). We asked whether long-run olfactory enrichment could lead to their reactivation. The percentage of TH-positive cells coexpressing Phox2a was nearly 95% in all groups. We did not observe any effect of enrichment (Fig.5Biii, see Table 4 for detailed statistical results) onset of the enrichment or interaction between enrichment and onset on the reactivation of Phox2a+ cells. There was also no increase in TH expression in enriched animals compared to their controls as we did not observe any effect of enrichment, onset of the enrichment or interaction between enrichment and onset (Fig.5Bii, see Table 4 for detailed statistical results) on the TH intensity in the Locus Coeruleus. This suggests a similar level of NA synthesis in the Locus Coeruleus neurons. Altogether, these results indicate that long-run olfactory enrichment did not increase the survival of neurons in the Locus Coeruleus of aged mice, nor the recruitment of a subpopulation of resting noradrenergic neurons or their NA synthesis. The integrity of the Locus Coeruleus was thus not modified by long-run olfactory enrichment.

In order to quantify NA innervation, we then evaluated the density of NET-positive fibers in brain regions related to the tested behavioral performances: the OB for olfactory performances (Fig.6Ai-Aii), the orbitofrontal cortex for cognitive flexibility (Schoenbaum et al., 2002; Ragozzino, 2007; Izquierdo et al., 2017) (Fig.6Bi-Bii) and the dorsal hippocampus for spatial memory (Moser et al., 1995; Assini et al., 2009; Fanselow and Dong, 2010; Eichenbaum, 2017) (Fig.6Ci-Cii). More precisely, the density of NET-positive fibers was evaluated in the granule cell layer of the OB, the CA1 (stratum oriens, pyramidal cell layer and stratum radiatum), DG (granule-cell and molecular layers) and CA3 of the dorsal hippocampus, and the lateral orbital cortex (LO, a subregion of the OFC) in enriched and control non-enriched mice. Results were expressed as a percentage of the surface occupied by NET-positive fibers. For all these brain regions, we did not observe any difference in the density of NA fibers between the two control groups (early and late controls) nor between the early and late-enriched groups. This indicated that the onset of the enrichment had no influence on the structural remodeling of NA fibers. Thus, we pooled the early- and late-enriched groups together, as well as their respective control groups.

In the OB, the density of NA fibers was significantly higher in enriched mice compared to controls (Fig.6Aii, unilateral test of Mann-Whitney, $W=29$, $p=0.021$) with an increase of 23%. In the dorsal hippocampus, the density of NA fibers was significantly higher in enriched mice compared to controls in CA1 (Fig.6Bii, $W=34$, $p=0.047$) with an increase of 45%. This increase of NA innervation was local and restricted to CA1, as the density of NA fibers was similar in the DG (unilateral t.test, $t=-0.39997$, $p=0.3467$) and CA3 region ($t = 1.319$, $df = 8$, $p\text{-value} = 0.2237$) of enriched and control mice (Fig.6Bii). In the lateral orbital cortex, enrichment did not modify the NA innervation (Fig.6Cii, unilateral test of Mann-Whitney, $W = 34$, $p\text{-value} = 0.1527$).

Finally, to test the hypothesis that the extension of the NA innervation is positively associated with improved cognitive functions in aged mice, we performed linear correlation between the behavioral performances at 18 months and the NA innervation in the structures of interest. Our results revealed that in the olfactory bulb, the NA innervation was positively associated with olfactory discrimination performances (Fig.6Di, unilateral Spearman test, $\rho(22)=0.3657032$, $p=0.05152$). Note that when one outlier animal was removed, this correlation reached full statistical significance ($\rho(21)=0.4400151$, $p=0.0261$). In the same way, in the dorsal hippocampus, the NA innervation in CA1 was positively

associated with spatial memory performances for the 5-min delay (Fig.6Dii, unilateral Spearman test, $\rho(18)=0.3894737$, $p=0.04529$).

In summary, our results revealed a local increase of noradrenergic innervation following long-run olfactory enrichment that could be responsible for the behavioral improvement observed in 18-month-old enriched mice. More specifically, the increased NA innervation in the OB could account for the improved olfactory discrimination and the increased NA innervation in the dorsal hippocampal CA1 could account for the improved spatial memory at short delay. Given the modulatory influence of NA on adult neurogenesis (Kulkarni et al., 2002; Bauer et al., 2003; Moreno et al., 2012, 2014; Coradazzi et al., 2016), and the implication of adult-born neurons in olfactory and spatial learning and memory (Malvaut and Saghatelian, 2016; Anacker and Hen, 2017; Snyder and Drew, 2020), we then analyzed the effect of long-run olfactory enrichment on bulbar and hippocampal adult neurogenesis.

Long-run olfactory enrichment does not improve adult neurogenesis in the aged olfactory bulb and hippocampal dentate gyrus.

In the adult OB, the contribution of newborn neurons is necessary for fine olfactory discrimination (Moreno et al., 2009; Forest et al., 2020) and a strong reduction in neurogenesis is observed from middle age on (Enwere, 2004; Rey et al., 2012; Moreno et al., 2014). We asked whether long-run olfactory enrichment could prevent the age-associated reduction of neurogenesis and thus explain the observed preservation of discrimination capacities in enriched animals throughout life.

Using the dividing cell marker BrdU (injected 30d before sacrifice, Fig.7Ai), we measured the survival of adult-born cells in the OB and found no effects of long-run olfactory enrichment, onset of the enrichment or interaction between enrichment and onset on the density of BrdU-positive cells in the granule cell layer (Fig. 7Aii, see table 4 for detailed statistical results). We then evaluated the effect of enrichment on the neuronal differentiation of adult-born cells. The percentage of BrdU-positive cells coexpressing the neuronal marker NeuN (Fig.7Bi) was nearly 95%. In addition, we did not observe any effect of long-run olfactory enrichment, onset of the enrichment or interaction between enrichment and onset on the level of neuronal differentiation of newborn cells (Fig.7Bii). Since we found no increase in the density of surviving adult-born cells nor their neuronal differentiation rate, we hypothesized that a higher proportion of the surviving adult-born neurons could be recruited to perform the olfactory discrimination task. To test this hypothesis, we investigated the expression of the immediate-early gene c-Fos among BrdU+/NeuN+ adult born neurons in response to the olfactory discrimination task (Fig.7Bi). We observed that long-run olfactory enrichment did not modify adult-born neurons recruitment in the OB (Fig.7Biii, Pearson's Chi-squared test $X^2=0.5329$, $df=1$, $p\text{-value}=0.4654$). Taken together our results indicate that the behavioral improvement observed in the olfactory discrimination task did not coincide with an increase in adult-born granule cells survival or neuronal differentiation or recruitment of a higher proportion of the surviving adult-born neurons to perform the olfactory discrimination task.

In the adult DG, the contribution of adult-born neurons is necessary for spatial memory, especially in the object location task (Goodman et al., 2010) and a strong reduction in neurogenesis is observed in aged rodents (Kempermann et al., 1997; Rao et al., 2005; Marrone et al., 2012; Gil-Mohapel et al., 2013). As the number of adult-born neurons is very low in the aged dentate gyrus, we quantified doublecortin-positive (DCX) immature neurons (Fig.7Ci) (Aguilar-Arredondo and Zepeda, 2018) to test

the hypothesis of an increase in hippocampal neurogenesis responsible for the improvement of spatial memory. Our results show a similar number of DCX+ neurons in 18-month-old mice subjected to repeated olfactory enrichment sessions from early adulthood (2 months) or middle age (12 months) compared to their respective controls (Fig.7Cii, bilateral Mann-Whitney test, $W=23$, $p=0.4632$ for the early group and $W=23.5$, $p=0.2224$ for the late group).

Taken together our results on neurogenesis show that life-long olfactory enrichment does not modify OB and hippocampal neurogenesis in aged mice. Our results thus support the existence of other mechanisms than neurogenesis to underlie the observed improvements in olfactory discrimination and spatial memory observed in aged mice after long-run olfactory enrichment. As preserved cognitive functions are often associated with remodeling of brain activation patterns in aged humans (Grady, 2012; Cabeza et al., 2018) and NA influences connectivity and brain activation patterns in mice (Zerbi et al., 2019), we hypothesized that changes in brain activation levels or/and distribution could be induced by long-run olfactory enrichment and contribute to improvement in behavioral performances.

Brain activation pattern and network analysis

We investigated brain activation in controls and enriched mice by 3D post-mortem mapping of the expression of the immediate early gene (IEG) c-Fos, in response to a particular task (Midroit et al., 2018). This method allows quantification and statistical analysis of neuronal activation in multiple brain regions, similar to what is done in human brain imaging, while having good spatial resolution. Brain activation was analyzed in two different tasks: the olfactory discrimination task and the object location task. In order to reach a sufficient number of animals, the network analysis for the olfactory discrimination task was performed on pooled early and late groups ($n=7$ animals per group), but only on early groups for the object location task with 5-min delay ($n=5$ animals per group).

We first measured the density of activated neurons in 31 brain regions of animals submitted to the olfactory discrimination task or to the object location task. Normalized c-Fos densities in enriched mice were expressed as a percentage of control mice. Our results showed that enriched animals had an activation level similar to controls in most areas analyzed, for both tasks (Fig.8). Only one brain region displayed a change in activation level during the olfactory discrimination task: the frontal region (Fr) of enriched mice performing the olfactory discrimination task displayed a reduced activation when compared to controls (Fig.8A, bilateral one sample t.test corrected for multiple comparisons, $t=-6.4513016$, $p=0.020367$). This first analysis revealed that long-run olfactory enrichment did not induce major changes in terms of density of neurons activated by the task.

We thus searched for subtler modifications of brain activation and investigated network organization, as this is commonly modified in aging humans, notably with the recruitment of additional regions to perform a specific task (Grady et al., 2010; Morcom and Henson, 2018; Crowell et al., 2020). To identify connectivity between brain regions, we assessed how c-Fos activity covaries across brain regions. We thus examined the correlation of activity between all pairs of structures. This was done separately for each experimental group (olfactory discrimination: controls and enriched, OLT: controls and enriched). Correlation matrices were generated by computing Pearson's correlations between all pairs of structures across individual mice. To generate the network graphs, only the strongest positive correlations between structures were considered (applied threshold: Pearson's $r \geq 0.82$, corresponding to a bilateral significance level of $p \leq 0.025$) (Fig.9).

Regarding the olfactory discrimination task, networks analysis revealed that enriched mice displayed less correlations than controls (Fig.9A-C). Indeed, the proportion of correlations in enriched mice decreased by 60% when compared to control mice (Fig.9A, control: 124 correlations out of 465 total possible, enriched: 50 correlations out of 465 total possible, proportion test X-squared = 38.715, $p=4.905e-10$). When looking more into details at the remaining correlations in enriched mice, these appear to be more centered on the olfactory and PFC sub-systems. Indeed, there was a strong trend toward an increased proportion of correlations between olfactory regions, although not reaching statistical significance (Fig.9B, proportion test X-squared = 3.616, $p= 0.05722$). The percentage of correlations between prefrontal regions were also significantly higher in enriched mice compared to controls (Fig.9B, proportion test, X-squared = 6.9844, $p=0.008222$). Interestingly, the Locus Coeruleus correlated with prefrontal structures in enriched mice, while it did not correlate with any structures in control mice (Fig.9B, proportion test, X-squared = 7.5705, $p=0.005933$). This network analysis thus suggested a specialization of brain activation in enriched mice to successfully perform the olfactory discrimination task.

Regarding the object location task, enriched mice displayed more correlations than controls (Fig.9D-F), as the proportion of correlations in enriched mice was significantly higher than in control mice (Fig.9D, control: 47 correlations out of 465 total possible, enriched: 169 correlations out of 465 total possible, proportion test, X-squared = 89.753, $p<2.2e-16$) with a 260% increase. More specifically, spatial memory regions were more connected with the rest of the brain in enriched mice since there was a higher proportion of correlations between memory regions and all other structures among effective correlations (Fig.9E, proportion test, X-squared = 4.5096, $p=0.03371$) with an increase of 67%. But there was no significant change in the correlations within spatial memory regions (Fig.9E, proportion test, X-squared=0.41837, $p=0.5178$). As in the group of mice performing the olfactory discrimination task, the Locus Coeruleus did not correlate with any structures in control mice whereas it was correlated with 5 structures in enriched mice, although this change was not statistically significant (Fig.9E, proportion test, X-squared = 1.4235, $p=0.2328$). This network analysis thus suggested a reorganization of brain activation in enriched mice to successfully perform the object location task. This reorganization consisted in a more distributed activity in enriched mice, with the recruitment of new correlated brain regions.

All together, these results indicated that a life-long olfactory enrichment induces changes in functional connectivity. The two different tasks used revealed different network reorganization, with an increased network specialization for olfactory discrimination and a network enlargement for a spatial memory task.

In order to go further into the analysis of these network reorganization, we performed a graph theory analysis. The non-Gaussian distribution of degrees revealed that experimental networks were different from random for both control and enriched mice in both tasks (Fig.S6A). To further describe quantitatively the networks' topology, we measured efficiency and clustering coefficients that detect functional integration and segregation respectively. Indeed, networks presenting a small-world organization combine the presence of functionally specialized (segregated) clusters with a robust number of interclusters (integrating) links (Rubinov and Sporns, 2010).

The networks activated by the olfactory discrimination task were segregated as they displayed a higher mean clustering coefficient compared to random networks, but not the networks activated by the

object location task (Fig.S6B). Both networks were also integrated as they displayed a high global efficiency, equivalent to random networks (Fig.S6C). Thus, the functional network engaged by the olfactory discrimination task displays properties that are consistent with a small-world topology, but not the network activated by the object location task.

We thus pursued the analyses on the olfactory discrimination task and applied a Markov clustering algorithm, which organizes structures into clusters based on their common inter-connections. Two clusters were identified in the control group performing the olfactory discrimination task: a small cluster involving prefrontal areas and a widespread cluster including olfactory, spatial memory, motor and sensory areas (Fig.9C). In the enriched group, we found 4 clusters: a first one involving structures including mostly olfactory regions (pink); a second involving structures belonging to the reward system (green); a third involving auditory and motor structures (blue); and the fourth (yellow) involving prefrontal structures, spatial memory structures, motor structures and the Locus Coeruleus (Fig.9C). Finally, to identify the most influential structures in our networks, we searched for possible hubs. Hubs are nodes with high degree and high betweenness (Wheeler et al., 2013; Babayan et al., 2017). In the control group performing the olfactory discrimination task, we identified two hub regions (EC and dCA1) and two other hubs in the enriched group (MC and Pir) (Fig.9C and Fig.S7).

Taken together, our results revealed a task-dependent reorganization of functional networks following life-long olfactory enrichment with a network implicated in the olfactory discrimination task that became more segregated and a network implicated in the object location task more integrated. A refinement of the network could account for the improved olfactory discrimination whereas the improved spatial memory could be driven by a more widespread brain network organization enabling recruitment of additional regions to perform the task.

DISCUSSION

All together our data demonstrate benefits of long-run olfactory enrichment that extend beyond the olfactory sphere and include broad cognitive benefits on age-sensitive performances, suggesting that this strategy could be an efficient way of enabling the buildup of a cognitive reserve accompanied by increased NA cortical innervation. Benefits in aged mice include improvement of olfactory discrimination, spatial memory and cognitive flexibility. Our investigation of the cellular bases of these improved behavioral performances reveal a local increase of noradrenergic innervation that correlates with cognitive performances. This is not accompanied by changes in adult neurogenesis, but by remodeling of neural networks activation, with a more specific network underlying efficient olfactory discrimination, while broader brain activation enables spatial memory. We thus propose long-run olfactory enrichment in mice as a pre-clinical model of the cognitive reserve build-up that relies on plasticity of the noradrenergic system and network remodeling opening new avenues to promote better cognitive aging.

Improving olfactory discrimination

In rodents, olfactory discrimination abilities can be assessed with an olfactory associative learning or a cross habituation task. Regardless of the task used, it appears that aged rodents (18-23 months) are still able to discriminate two dissimilar odorants (Schoenbaum et al., 2002; Kraemer and Apfelbach,

2004; Rey et al., 2012; Moreno et al., 2014), however, the discrimination of two perceptually similar odorants is no longer possible (Enwere, 2004; Moreno et al., 2014; Yoder et al., 2017). We report here that repeated sessions of olfactory enrichment distributed throughout the life span are an efficient and non-invasive strategy with positive outcomes on olfactory discrimination.

One can note that early 12-month-old controls animals spontaneously discriminate perceptually similar odorants, a performance that is not reached by young adult mice (Moreno et al., 2009, 2012, 2014). Although this is counter intuitive at first glance, previous work already suggested that discrimination performances at middle age are better than in young adults (Rey et al., 2012). Considering that olfactory processing, as other sensory processing, is permanently making a trade-off between detection and discrimination, it could be that characteristics of the young olfactory bulb network favors detection over discrimination and that age-induced changes deteriorate detection and improve discrimination as a “side effect”. This hypothesis however remains difficult to explain at the neuronal level. Indeed, this switch can hardly be explained by the decrease in adult-born neurons that occurs already at middle age in mice (Rey et al., 2012). Indeed, adult-born neurons play a well-documented role in reinforcing inhibition and tuning the odor specificity of mitral cells in the OB (Moreno et al., 2009). Other cellular changes, including changes in NA concentration with aging, that remain to be investigated may shed light on these age-dependent changes in discrimination abilities.

Improving broad cognitive performances with long-run olfactory enrichment

Regarding the effect of aging on cognition, our results are in accordance with previous studies reporting alterations of spatial memory in mice aged over 20 months using the object location test (*e.g.* (Murai et al., 2007; Wimmer et al., 2012; Gray et al., 2018)). Our results reveal the kinetics of this decline that appears at middle age (12-15 months) by affecting longer retention and pursued by an aggravation at 18 months for shorter retention delays. Our results thus show a progressive reduction of the retention time of spatial information, suggesting a progressive alteration of plasticity and consolidation mechanisms. Regarding associative learning, our results indicate that olfactory associative learning is relatively preserved up to 15 months in mice, in accordance with data obtained in aged rats (Schoenbaum et al., 2002; Brushfield et al., 2008; Gilbert et al., 2009), although conflicting results are also found in the literature (Roman et al., 1996; Marchetti et al., 2011), depending on the associative paradigm used. Regarding cognitive flexibility, our results show subtle reversal deficits at 18 months, in accordance with the existing literature in aged rats (Barense, 2002; Schoenbaum et al., 2002; Gilbert et al., 2009).

Our results, especially those obtained in the object location task, show discrepancies between the two control groups (early and late) from 15 months on. For example, the two 15-month-old control groups differ at the 15-min delay (early-controls remember but not late-controls). Aside from a “cohort effect”, this discrepancy could be due to the longitudinal testing as the design of the study involves regular manipulation and testing of the animals. Control groups are true shams as they are manipulated and tested as much as enriched animals, even though they are exposed to an empty tea ball (=no odor) rather than an odor-containing one. The repeated manipulation and testing of the mice could influence their olfactory discrimination, learning and memory capacities, as suggested by the fact that late-controls are unable to learn the odor-reward association while early-controls are. However, this type of controls is the only way of revealing the specific benefits of olfactory enrichment.

More interestingly, the age-related deficits in spatial memory and cognitive flexibility are prevented or postponed by long-run olfactory enrichment, whether started at young adulthood or middle age. To our knowledge, olfactory enrichment has been shown to improve olfactory memory (Rocheffort et al., 2002; Rey et al., 2012), but our results are the first to report beneficial effects of repeated olfactory enrichment outside the olfactory sphere. Early- and late-started olfactory enrichment yield relatively similar benefits. Importantly, this finding suggests that the sole exposure to odorants, rather than a global environmental enrichment including several distinct elements (sensory stimulations, social interactions, physical exercise...) is sufficient to induce cognitive benefits in aging. In addition, late olfactory enrichment is efficient on spatial memory, similarly to benefits of late-started environmental enrichment (*e.g.* (Kobayashi et al., 2002; Harburger et al., 2007; Mora-Gallegos et al., 2015; Fuchs et al., 2016b). Such efficiency is important regarding the translational value of repeated olfactory enrichment as remediation strategy. Indeed, late-life olfactory enrichment would be easier to implement in humans rather than starting on young adulthood and would still yield cognitive benefits. The observation that mice with the best olfactory discrimination performances also had the best spatial memory performances, suggests that long-run olfactory enrichment activates a network that is large enough to modulate other than olfactory brain functions.

Contribution of NA fiber local remodeling to olfactory and cognitive improvements

We hypothesized that long-run olfactory stimulation improves brain function by preserving brain plasticity in aged mice. Previous studies reported that the LC is vulnerable to aging and that its anatomical integrity is positively associated with the preservation of cognitive functions in elderly (Robertson, 2013; Wilson et al., 2013; Clewett et al., 2016; Mather and Harley, 2016; Dahl et al., 2019). Our results showed no effect of long-run olfactory enrichment on the integrity of the LC but revealed for the first time a plasticity of the NA fibers in aged mice. In young adult mice, a novelty-based olfactory enrichment of 40 days increases the expression of the noradrenergic marker DBH in the LC, a process that becomes ineffective during aging (Rey et al., 2012). Long-run olfactory enrichment might have induced such changes transiently in the LC, but if so they are not maintained once the mice aged. Our results also suggested that a sprouting of axon collaterals of LC neurons could be responsible for the increase of NA innervation in enriched animals, as the integrity of the LC remained similar in both groups. Such remodeling of NA fibers in the OB had not been shown following shorter duration olfactory enrichment (Rey et al., 2012), suggesting that the repetition of the enrichment period is necessary to trigger such plasticity. Remodeling of NA fibers is well known after lesion of the LC or of its projections (*e.g.* (Fritschy and Grzanna, 1992; Peterson, 1994)) but only one study reported such remodeling in physiological conditions within the cerebellum following exercise (Nedelescu et al., 2017). To our knowledge, our study is thus the first to describe physiological structural plasticity of the NA innervation within cortical regions and in aged mice.

Given the extensive NA innervation throughout the brain, we would have expected an increase in NA innervation throughout the brain areas studied but we observed localized changes restricted to certain brain regions: increased innervation in the OB and CA1, but not CA3, DG or lateral orbital cortex. One possible explanation may come from the fact that the LC is not a homogeneous cluster of neurons that provides a global and uniform signal to the brain. Indeed, there is accumulating evidence for specialization of LC neurons into subsets based notably on their anatomical projections (Chandler et al., 2014; Schwarz and Luo, 2015; Schwarz et al., 2015; Kobschull et al., 2016; Uematsu et al., 2017). There is a wide divergence in axon projections from LC neurons to multiple brain regions (Schwarz et

al., 2015) and functional heterogeneity in LC neurons depending on their combinatorial activation patterns and their specific efferent and afferent connectivity (Uematsu et al., 2017). It is therefore possible that long-run olfactory enrichment stimulated a subset of LC neurons that would project to only a portion of the brain areas studied.

Interestingly, the density of NA innervation correlated with behavioral performances, suggesting a role for increased NA innervation in the BO to allow the improvement of olfactory discrimination, while increased NA innervation in CA1 would contribute to the improvement of spatial memory. How could an increased NA innervation induce behavioral changes? In the olfactory modality, NA is the mediator of the beneficial effects of novelty-based olfactory enrichment on olfactory memory in young adult mice (Veyrac et al., 2009). NA modulates the activity of both granule and mitral cells (Mouly et al., 1995; Ciombor et al., 1999; Nai et al., 2009, 2010; Zimnik et al., 2013; Schwarz and Luo, 2015) and reduces the signal to noise ratio in the OB (Manella et al., 2017) and thereby also contributes to olfactory discrimination (Doucette et al., 2007; Escanilla et al., 2010; Linster, 2019). Regarding the hippocampus, environmental enrichment triggers NA release in the hippocampus (Galani et al., 2007; Brenes et al., 2009), which contributes to spatial memory by enhancing hippocampal long-term plasticity (Li et al., 2013). Increased NA release by LC fibers after long-run olfactory enrichment might similarly enhance hippocampal LTP in CA1 and contribute to spatial memory. However, stimulation of LC fibers in the hippocampus leads to the co-release of NA and dopamine, and the enhancement of memory abilities in the context of environmental enrichment is induced by dopamine rather than NA (Kempadoo et al., 2016; Takeuchi et al., 2016). Dopamine could thus also be a mediator of the spatial memory improvements we observed.

Long-run olfactory enrichment does not improve adult neurogenesis

Adult-born neurons are implicated in learning and memory such as spatial learning, spatial memory and cognitive flexibility for neurons born in the hippocampal dentate gyrus (for review (Anacker and Hen, 2017; Snyder and Drew, 2020) and olfactory perceptual or associative learning for neurons born in the OB (*e.g.* (Moreno et al., 2009; Alonso et al., 2012; Grelat et al., 2018; Forest et al., 2020)).

In the OB, neurogenesis decreases as early as middle age (Enwere, 2004; Luo et al., 2006; Rey et al., 2012), as well as the structural plasticity induced by learning, contributing to age-associated deficits in olfactory perceptual learning (Moreno et al., 2014; Greco-Vuilloud et al., submitted). Our group previously reported that a single session of olfactory enrichment improves fine olfactory discrimination performances by increasing adult neurogenesis in the BO of young adult mice (Moreno et al., 2009, 2014; Rey et al., 2012) but becomes ineffective during aging. However, a longer, 30-day novelty-based enrichment improves fine olfactory discrimination performances including in aged mice, but without increasing neurogenesis rates (Rey et al., 2012). Our results expand these findings by showing that long-run olfactory enrichment improves olfactory discrimination performances in aged mice, without increasing neurogenesis rates in the BO. This supports the hypothesis that at this age, performance in olfactory discrimination learning would be independent of the adult neurogenesis process.

In the aging hippocampus, neurogenesis decreases drastically (*e.g.* (Kuhn et al., 1996; Gil-Mohapel et al., 2013) but positive experiences, such as learning, exposure to enriched environment and increased physical activity, can partially reverse the age-related decline of neurogenesis (*e.g.*

(Kempermann et al., 1997, 1998; van Praag et al., 2000; van Praag, 2005). Our results complement data from the literature showing that olfactory enrichment does not influence hippocampal neurogenesis in young adults (Rocheffort et al., 2002). Nonetheless, a trend towards a decrease in the number of DCX+ neurons is observed in the dentate gyrus of aged enriched mice. This could be interpreted as a slight increase in the speed of maturation of adult-born neurons in long-run enriched mice. Indeed, aging not only reduces the number of adult-born neurons in the dentate gyrus but also delays their morphological maturation and functional integration (Rao et al., 2005; Morgenstern et al., 2008; Marrone et al., 2012; Trincherro et al., 2017, 2019).

Our results therefore support the existence of mechanisms other than neurogenesis to underlie the observed improvements in olfactory discrimination and spatial memory induced by life-long olfactory enrichment. In most studies focusing on synaptic plasticity, an environmental enrichment appears to increase the neuronal excitability in hippocampal regions (Sharp et al., 1985; Green and Greenough, 1986; Irvine et al., 2006; Malik and Chattarji, 2012) and the phenomenon of LTP (Foster et al., 1996; Feng et al., 2001; Tang et al., 2001; Irvine et al., 2006; Maggi et al., 2011; Kumar et al., 2012; Malik and Chattarji, 2012; Stein et al., 2016). Thus, an effect of long-run olfactory enrichment in functional plasticity is plausible and will deserve further investigations.

Contribution of brain networks remodeling to olfactory and cognitive improvements

Preserved cognitive functions are often associated with remodeling of brain activation patterns in aged humans (Grady, 2012; Cabeza et al., 2018). In agreement with this, our results show that a long-run olfactory enrichment leads to behavioral improvements in aged mice, that are accompanied by a remodeling of brain activation patterns. Such a remodeling had already been observed following olfactory enrichment in anosmic subjects (Kollndorfer et al., 2015). Indeed, after olfactory training, sensitivity to detect odors increased significantly in the anosmic group, accompanied by an increase in the number of functional connections in the network (Kollndorfer et al., 2015). Furthermore, olfactory enrichment allows for more specific connections as the piriform cortex is connected to fewer non-olfactory structures than before training (Kollndorfer et al., 2014). Our results in the discrimination task also support this view, as the enriched group tended to have more connections within the olfactory regions than the non-enriched group.

Interestingly, the two different tasks used revealed different network reorganization enabling performance improvement after long-run olfactory enrichment, with an increased network specialization for the olfactory discrimination task (more segregated network) and a network enlargement for the spatial memory task (more connections and less segregation). This is consistent with what has been observed in humans, in which both types of network reorganization have been underlying cognitive tasks. However, depending on the task, additional recruitment of brain areas in older subjects can either be accompanied by an improvement in performance (Fera, 2005; Crowell et al., 2020) or a decrease in performance (Persson and Nyberg, 2006). In the later case, the increase in activity observed in some regions would not reflect compensation but rather may suggest a lack of specificity or less efficient activity (Morcom and Henson, 2018). Our data suggest that following long-run olfactory enrichment, overall increased connectivity is associated with better performances in spatial memory. The difference we observed between the two tasks could also reflect a difference related to the difficulty of the task. A recent fMRI study in humans showed that as the difficulty of a working memory task increases, network integration decreases in younger subjects, whereas it

increases in older subjects. Furthermore, the best performing elderly had a more integrated brain network in the most difficult task condition compared to worse performing elderly (Crowell et al., 2020), suggesting that increasing integration was enabling better performances in a difficult task. Our data showing increased overall connectivity in the spatial memory task and increased segregation in the sensory task (olfactory discrimination) are also consistent with this frame. NA sprouting could contribute to the observed behavioral improvement by remodeling brain activation networks. Indeed, chemogenetic activation of the LC allows functional reconfiguration of neural networks across the mouse brain (Zerbi et al., 2019).

Long-run olfactory enrichment as a model to study the buildup of the cognitive reserve

Despite the enthusiasm elicited around the concept of cognitive reserve, the mechanisms allowing cognitive experience to be implemented into neural circuits to make them resilient to aging and form the cognitive reserve are mostly unknown. The identification of such mechanisms at the cellular and sub-cellular levels cannot be performed in humans and requires using an animal model. Since the long-run olfactory enrichment protocol improves cognition outside the olfactory sphere, we propose that this strategy should be considered as an interesting model of cognitive reserve build-up. While the classical environmental enrichment combines multi-sensory stimulations, increased social interactions and motor activity whose individual effects are difficult to tease apart (Pang and Hannan, 2013), our model is based on a single sensory modality and allows an easy control and manipulation of the duration, intensity, frequency and complexity of the stimulation. In addition, since mouse and human olfaction display similar structural and functional organization and decline with aging (Neville and Haberly, 2004; Shepherd et al., 2004; Bushdid et al., 2014), olfactory enrichment is a strategy from which we can expect positive translational value. In support of this hypothesis, odor exposure decreases stress, depression and confusion in aged human subjects, demonstrating broad benefits of odor exposure (*e.g.* (Schiffman et al., 1995; Jouslain et al., 2014)).

With long-run olfactory enrichment, we identified some cellular bases of healthy brain aging and brought support to the noradrenergic hypothesis of the cognitive reserve (Robertson, 2013; Wilson et al., 2013; Clewett et al., 2016). Based on the known activation of the LC upon olfactory enrichment (Veyrac et al., 2009; Moreno et al., 2012, 2014; Rey et al., 2012) and on the broadly distributed noradrenergic innervation within the brain, we hypothesize that a repeated release of NA would be induced by the repeated sessions of olfactory enrichment along the life span of the animal. Such repeated recruitment of the NA system would induce the observed increased NA innervation. As NA plays a key role in the recruitment of brain resources to underpin cognitive functions and enables the regulation of plasticity throughout the brain (Berridge and Waterhouse, 2003; Sara, 2009; Sara and Bouret, 2012; Waterhouse and Navarra, 2019; Poe et al., 2020), the increased NA innervation is likely to be responsible for the remodeling of brain networks observed in enriched animals and underpin the cognitive benefits induced by life-long olfactory enrichment.

In conclusion, this study revealed life-long olfactory enrichment as an efficient remediation strategy to promote better brain aging and broadly improve cognition in aged mice, by inducing localized increase of NA innervation and brain network remodeling.

ACKNOWLEDGEMENT

This work was supported by the CNRS, Inserm, Lyon 1 University, a PhD fellowship from the Arc2 Région Auvergne Rhône Alpes to C.T, a PhD fellowship from Fondation de France - Fondation Roudnistka to J.G-V and a PhD fellowship from Ecole Normale Supérieure de Lyon to M.C. We thank Ounsa Ben Hellal-Jelassi for her valuable care to the aging mouse colony, Erwan Moussy and Sabrina Diacquenod for technical help with histological analyses.

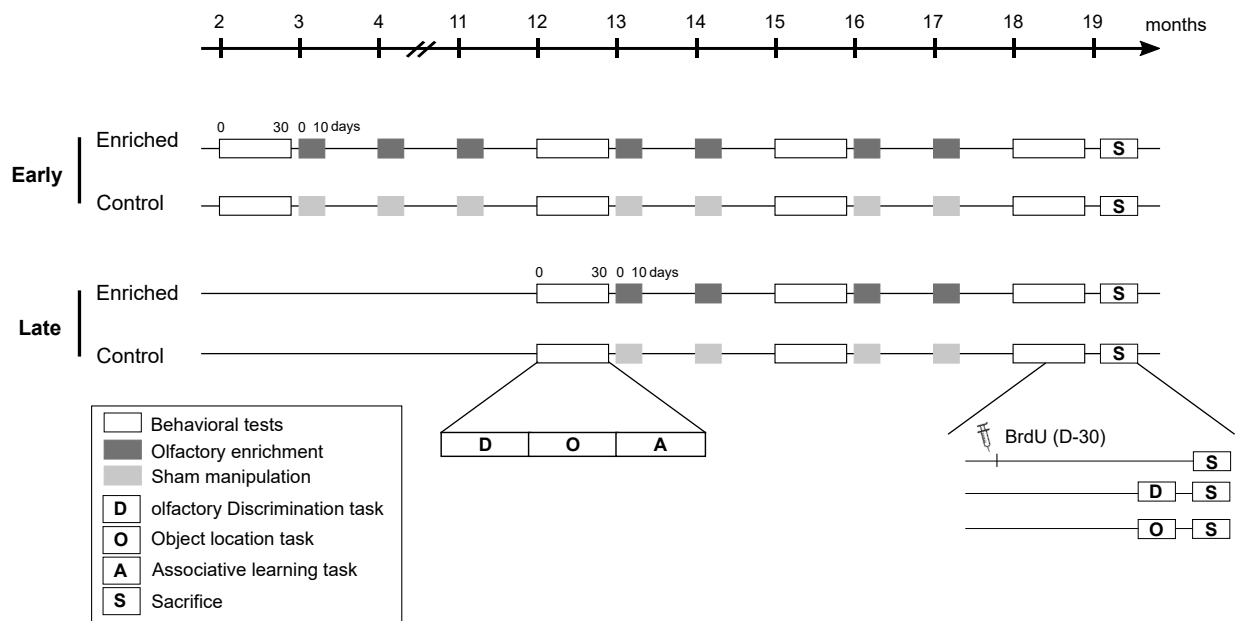


Figure 1: Experimental design.

Mice were submitted to repeated sessions of olfactory enrichment starting at young adulthood (2 months, Early group) or at middle age (12 months, Late group). Each group of enriched mice was compared to a control non-enriched group (sham manipulation but mice were exposed to no odor). Each enrichment session lasted 10 days (1h/day) and sessions were repeated every month until mice reached 18 months. Behavioral evaluation (olfactory discrimination, spatial memory, associative learning and cognitive flexibility) was performed before the beginning of the enrichment and at different time points during aging (12, 15 and 18 months). For each group, a subgroup of mice received BrdU injections, 30 days before sacrifice to quantify adult neurogenesis. Last, subgroups of control and enriched mice performed a behavioral task 1h before the sacrifice to investigate the neuronal networks activated during a specific task. One subgroup of mice performed the olfactory discrimination task using the Decanal / 2-Dodecanone odorant pair. A second subgroup performed the object location task with a 60-min delay (early-enriched and control mice) or a 5-min delay (late-enriched and control mice).

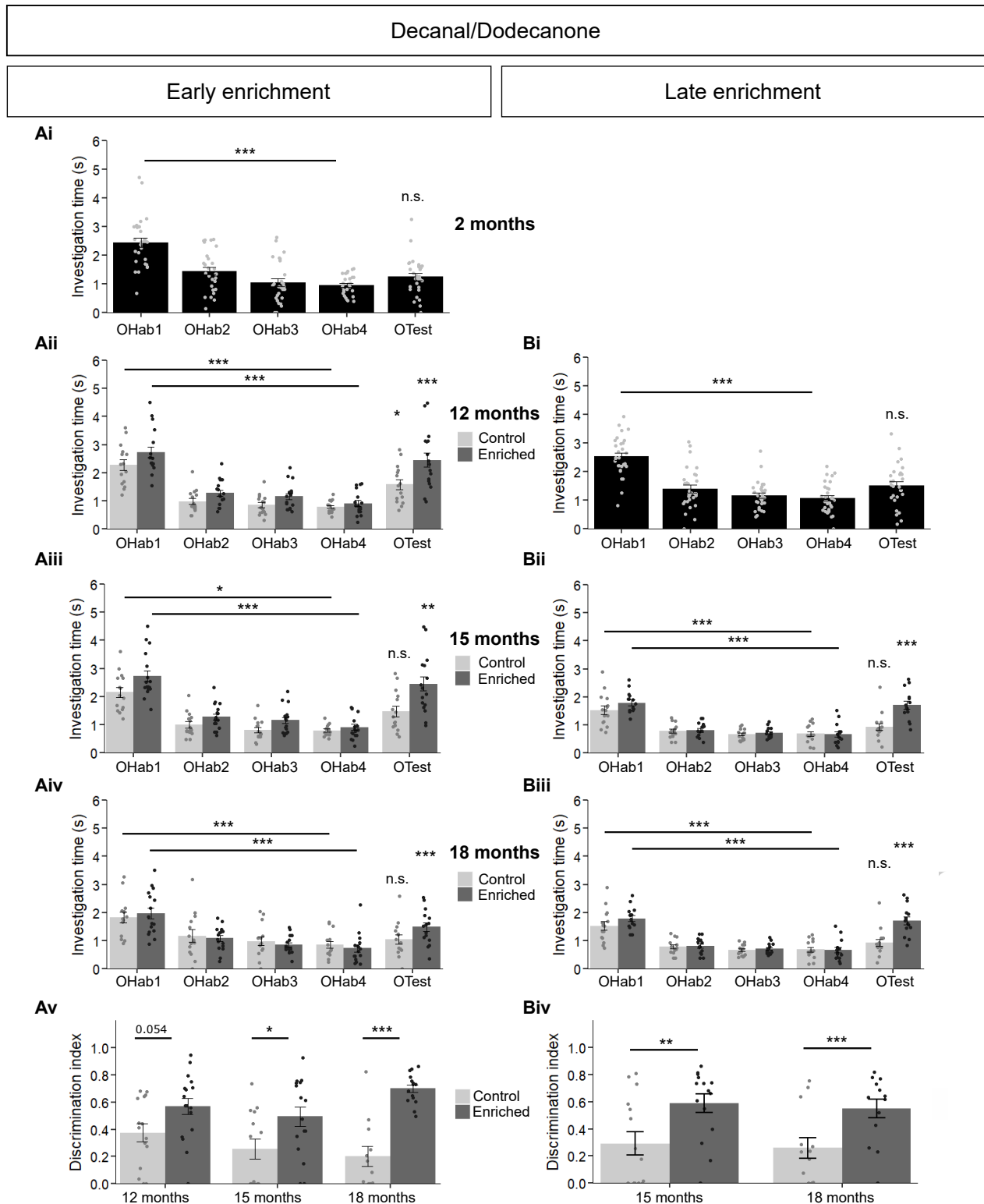
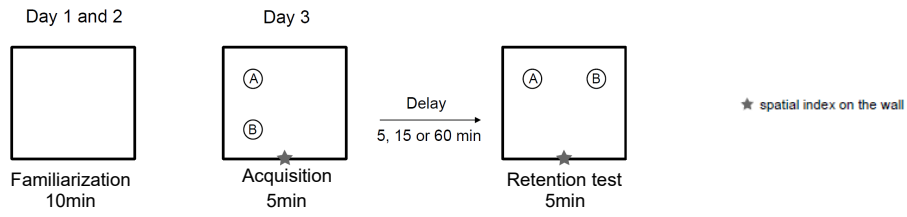


Figure 2: Fine discrimination abilities are improved by long-run olfactory enrichment until late ages. Assessment of the discrimination of Decanal and 2-Dodecanone at different ages (12, 15 and 18 months) in the enriched and control groups of early- (A) and late-started (B) enrichment. Mice habituated to the first presented odorant (OHab), as evidenced by the significantly decreased investigation time between OHab1 and OHab4. Both early- and late-enriched mice were able to discriminate Decanal and 2-Dodecanone, as shown by the significantly increased investigation time between OHab4 and OTest (Ai-Aiii, Bi-Bii) and displayed higher discrimination indices when compared to their respective controls (Aiv, Biii). Data are presented as mean investigation time or mean discrimination indices \pm standard error of the mean. 2 months: n=28. 12 months: n=15 for the early control group, n=17 for the early enriched group, n=30 for the late group. 15 months: n=14 for the early control group, n=16 for the early enriched group, n=15 for the late control group, n=15 for the late enriched group. 18 months: n=12 for the early control group, n=15 for the early enriched group, n=13 for the late control group, n=13 for the late enriched group. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

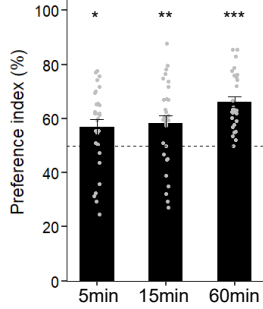
A



Early enrichment

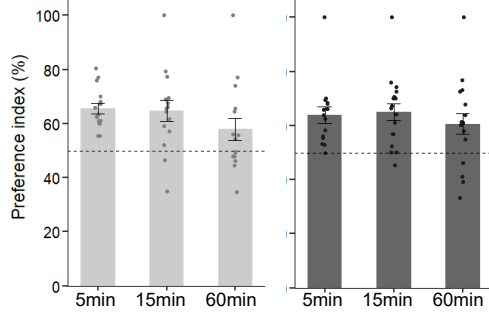
Late enrichment

Bi



2 months

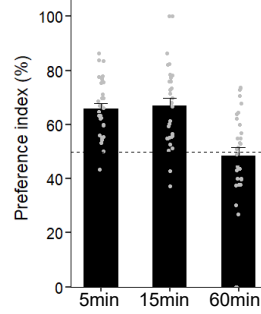
Bii



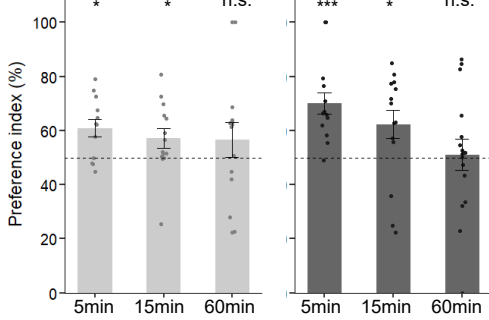
12 months

Control
Enriched

Bi



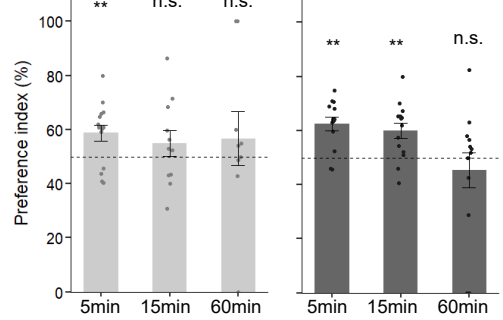
Biii



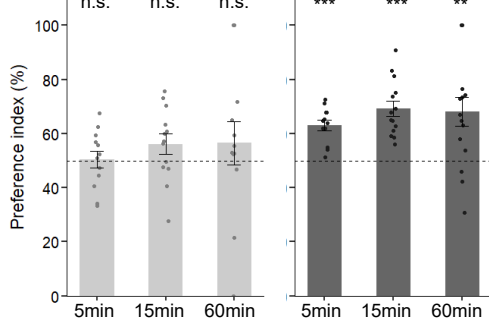
15 months

Control
Enriched

Cii



Biv



18 months

Control
Enriched

Ciii

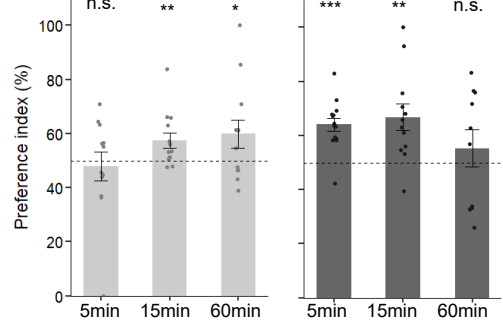


Figure 3: Spatial memory is improved by long-run olfactory enrichment.

(A) Schematic of the procedure used in the Object Location Task (OLT). Displaced object, object location and displacement, and retention delays were randomized among the mice and the sessions. (B-C) Preference index assessed before the beginning of the enrichment (pre-test at 2 or 12 months) and at different ages (12, 15 and 18 months) in the enriched and control groups of early- (B) and late-started (C) enrichment. A preference index significantly greater than 50% indicates that mice remember the initial position of the object. A deficit for the 60 min delay appears as early as middle age and can be partially prevented through long-run olfactory enrichment. Further aging leads to impaired spatial memory for all tested delays. The benefits of long-run olfactory enrichment are maintained up to late ages. Data are presented as mean preference index \pm standard error of the mean. Number of samples are reported in Table2. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

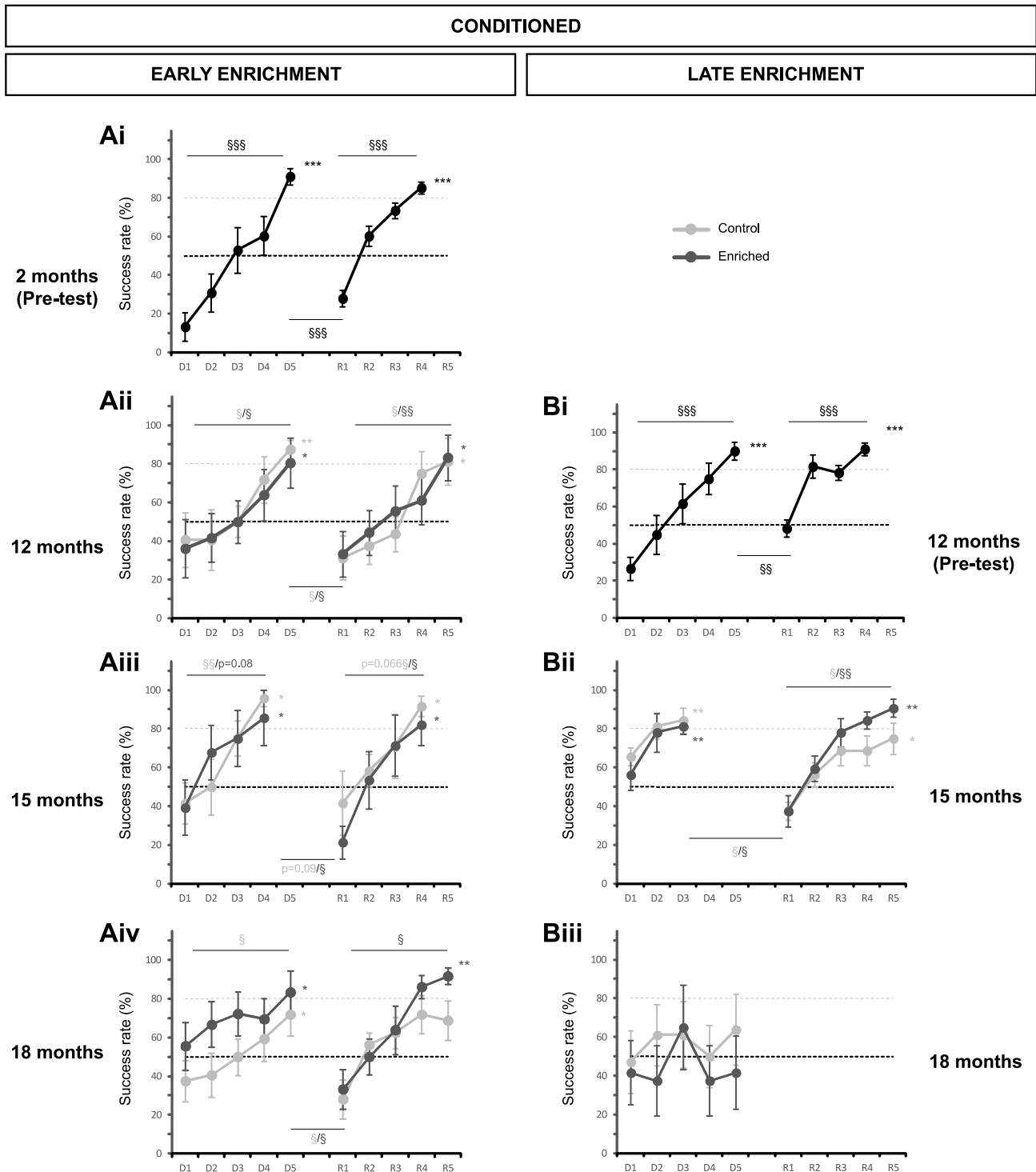


Figure 4: Associative learning and cognitive flexibility.

Evolution of the success rate in the olfactory associative task during the acquisition of the first rule (D1-D5) and after the reversal of the rule (R1-R5) for the conditioned groups. Mice were tested before the beginning of the enrichment (pre-tests) and at different ages (12, 15 and 18 months) in the enriched and control groups of early- (A) and late-started (B) enrichment. Data are presented as mean success rate \pm standard error of the mean. Number of samples are provided in Table 3. § $p < 0.05$; §§ $p < 0.01$; §§§ $p < 0.001$ for comparisons between days. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ for comparisons to 50% (chance level).

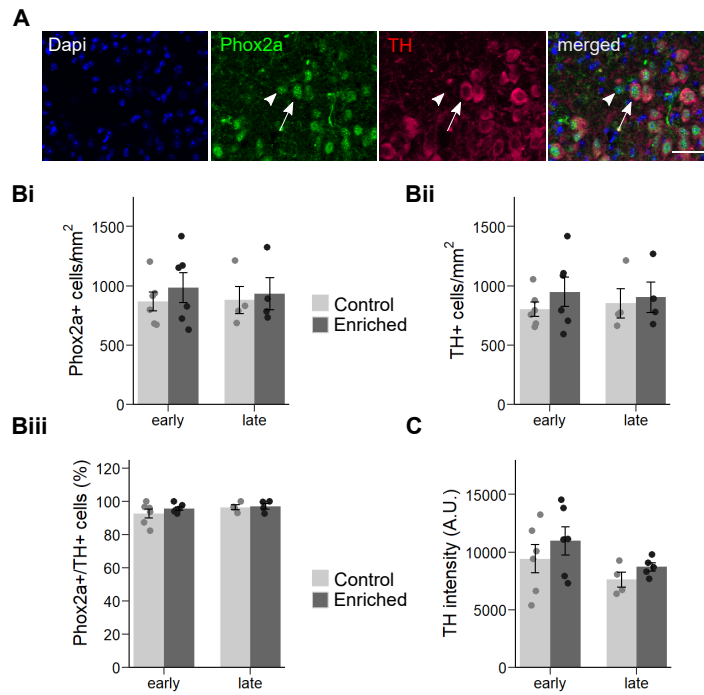


Figure 5: No impact of long-run olfactory enrichment on the integrity of the Locus Coeruleus.

Phox2a and TH double immunolabeling allowed to analyze the integrity of the Locus Coeruleus. (A) Example of a Phox2a+/TH- neuron (arrowhead) and a Phox2a+/TH+ neuron (arrow). Quantification of Phox2a+ cell density (Bi), TH+ cell density (Bii), Phox2a+/TH+ double-labeled cells (Biii) and TH intensity (C) in the LC revealed no difference between early and late-enriched mice and their respective control group. Data represent the mean \pm SEM. Dots represent data from individual mice. n=4-6 animals/group (27-146 cells/animal for Phox2a/TH). Scale bar = 40 μ m.

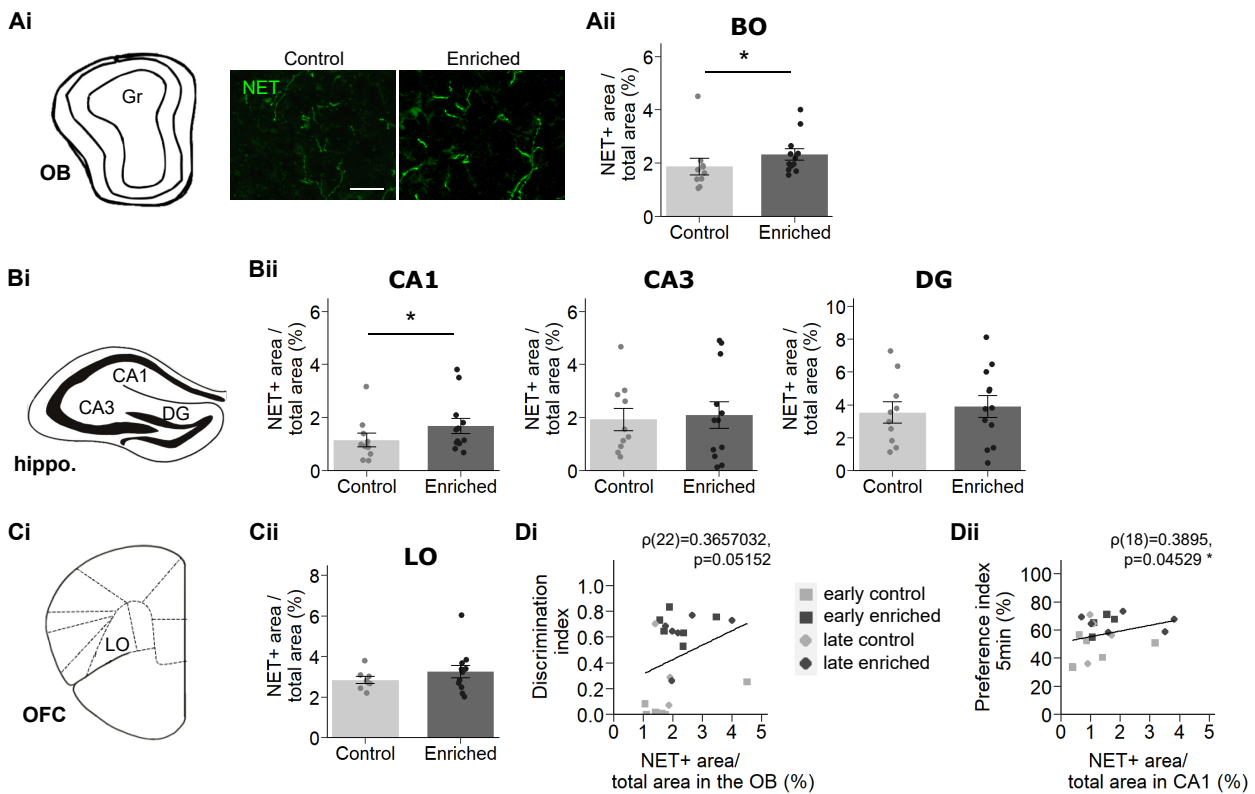


Figure 6: Local increase of noradrenergic innervation in the aged brain following long-run olfactory enrichment positively correlates with behavioral performances.

Norepinephrine transporter (NET) immunolabeling allowed to visualize NA fibers within the granule cell layer of the olfactory bulb (Ai), the hippocampus (Bi) and the OFC (Ci). Quantification of the area occupied by NET-positive fibers in the olfactory bulb (Aii), CA1, dentate gyrus and CA3 of the hippocampus (Bii) and LO (Cii) of enriched and control mice. Data represent the mean \pm SEM. Dots represent data from individual mice. $n=10-12$ animals/group for pooled controls and enriched groups. Significant positive linear correlations were found between the NA innervation in the OB and the discrimination index for the Dec/Dodec pair (Di) and between the NA innervation in the dorsal hippocampal CA1 and the preference index for the 5-min-delay (Dii). * $p<0.05$. DG: Dentate Gyrus; Gr: granule cell layer of the OB; LO: lateral orbitofrontal cortex; OFC: OrbitoFrontal Cortex. Scale bar = $20\mu\text{m}$

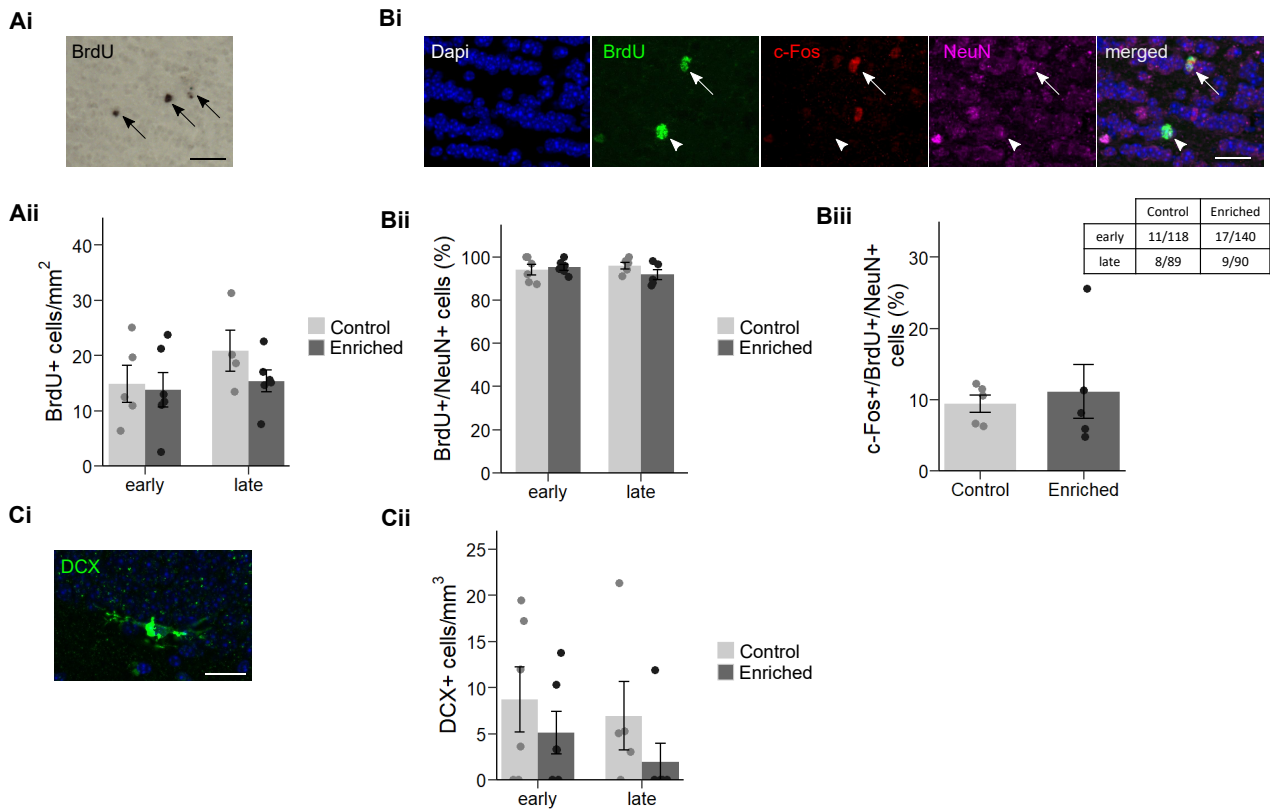


Figure 7: Long-run olfactory enrichment had no impact on adult neurogenesis in the aged olfactory bulb and hippocampal dentate gyrus.

(A) Evaluation of adult-born granule cell density in the OB: representative image of BrdU+ cells in the OB granule cell layer (Ai, arrows) and quantification in early- or late-enriched mice and their respective controls (Aii). $n=4-6$ animals/group. (B) Evaluation of neuronal differentiation and recruitment of OB adult-born granule cells: representative images of a BrdU+/NeuN+/c-Fos- neuron (Bi, arrowhead) and a BrdU+/NeuN+/c-Fos+ neuron (Bi, arrow). Quantification in early- and late-enriched mice and their respective controls is shown for the percentage of NeuN+ neurons among BrdU+ adult-born cells (Bii). 30-41 cells/animal, $n=5-6$ animals/group. Quantification in early- and late-enriched mice and their respective controls is shown for the proportion of c-Fos+ cells among BrdU+/NeuN+ adult-born neurons (Biii). The table presents the total number of cells counted in each group (number of triple positive cells / number of BrdU+/NeuN+ cells, 2-3 animals/group), on which proportion test was performed. (C) Evaluation of adult neurogenesis in the dentate gyrus: representative image of a DCX+ cell in the granule cell layer of the dentate gyrus (Ci) and quantification of DCX+ cell density in early- or late-enriched mice and their respective controls (Cii). $n=4-6$ animals/group. Data represent the mean \pm SEM. Dots represent data from individual mice. Scale bars = 20 μ m.

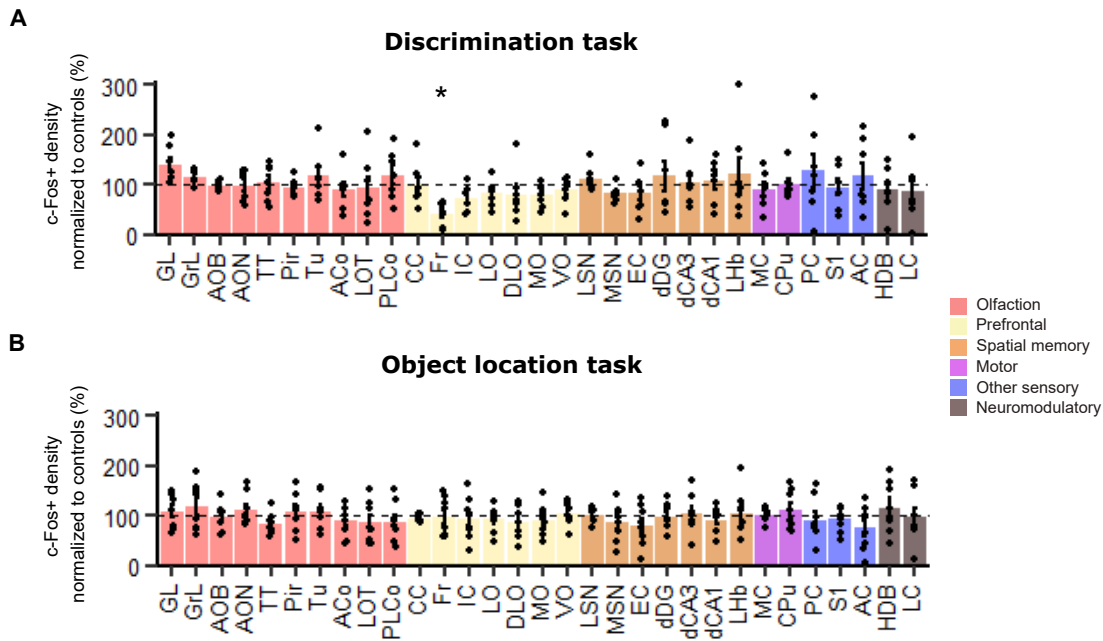
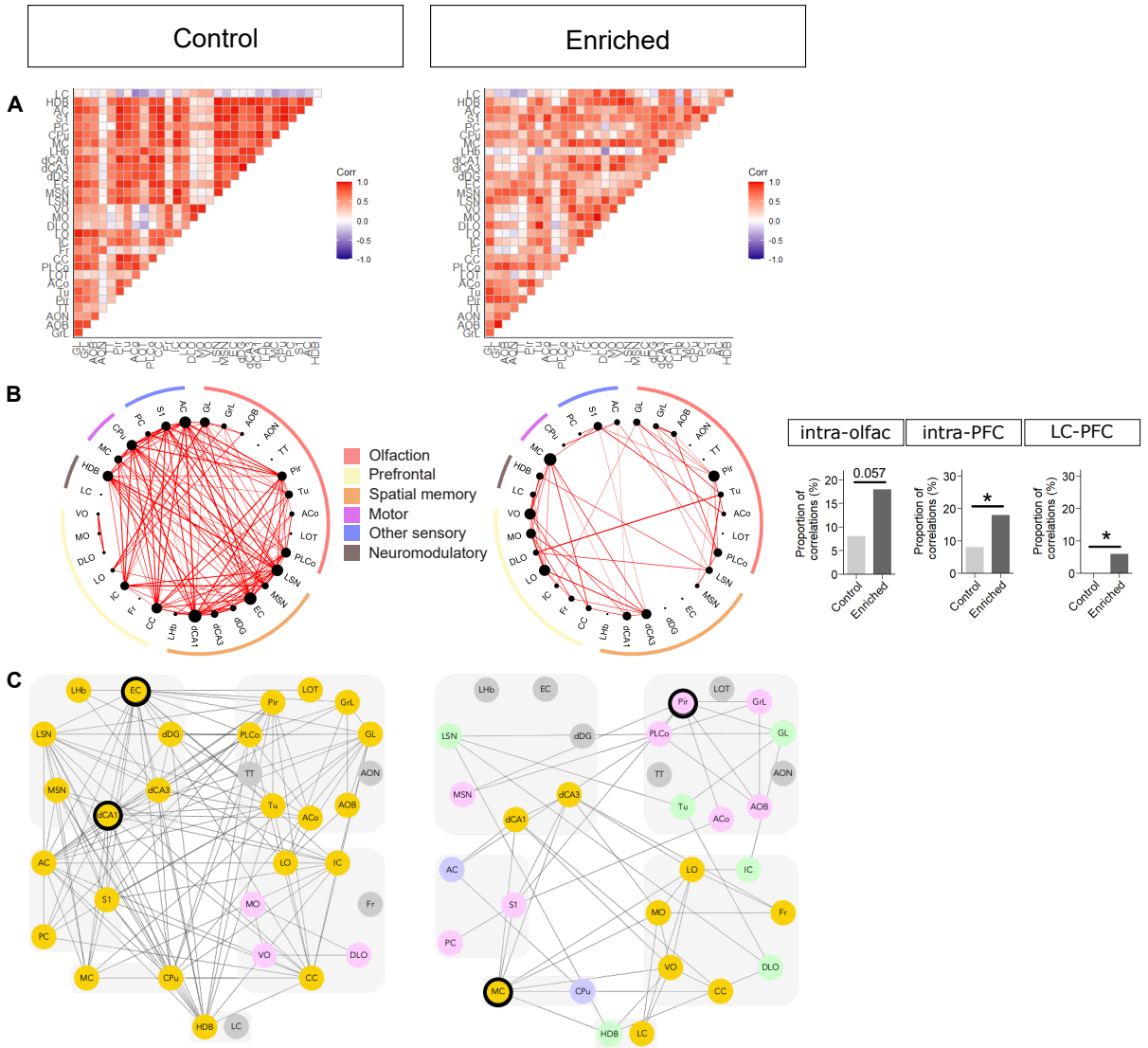


Figure 8: Brain regional activation induced by olfactory discrimination task and object location task. c-Fos+ cell densities of enriched mice for the 31 regions of interest in the olfactory discrimination task (A) and the object location task (B). Results of enriched mice are expressed as percentages of controls. Data represent the mean \pm SEM. Dots represent data from individual mice. n=5-7 animals/group. Statistical comparisons to 100% were assessed by bilateral one-sample t.test corrected for multiple comparisons. * $p < 0.05$.

Olfactory discrimination task



Object location task

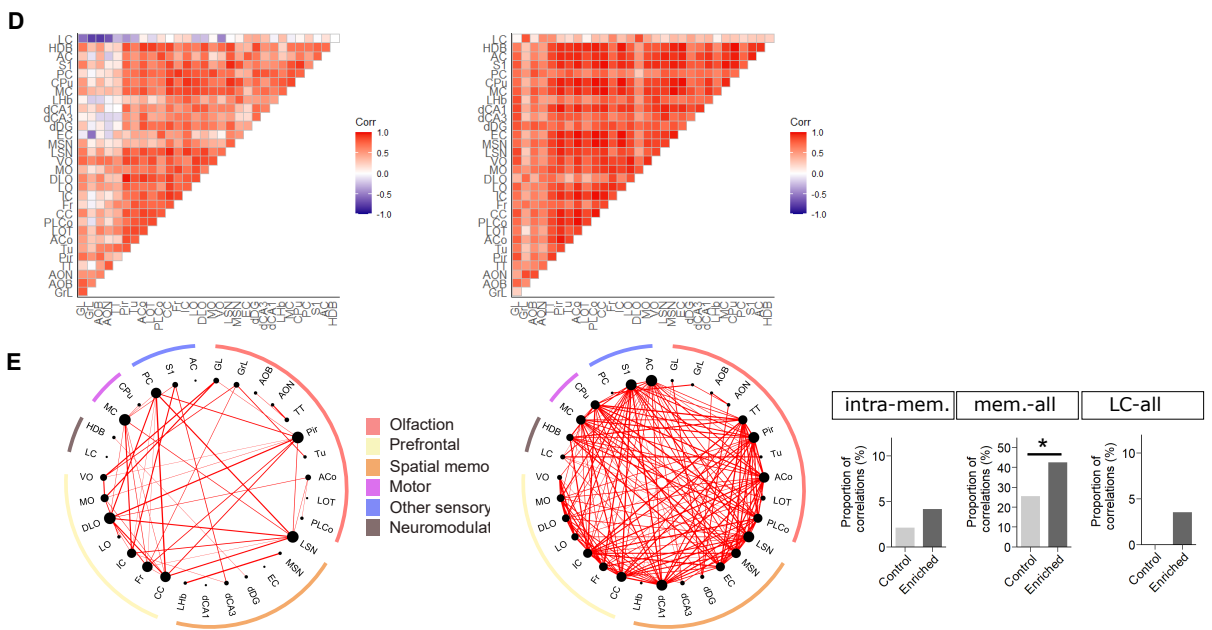


Figure 9: Task-dependent reorganization of functional networks following long-run olfactory enrichment.

Functional networks were analyzed in controls (left column) and enriched animals (right column) in the olfactory discrimination task (A-C) and the object location task (D-F). (A, D) Matrices representing all inter-regional correlations (without any thresholding). Axes correspond to brain structures and colors reflect correlation strength (with positive correlations in red and negative correlations in blue). (B, E) Networks representing correlations between regions. Graphs were generated by considering only the strongest correlations (Pearson's $r \geq 0.82$, $p \leq 0.025$). The thickness of the connection line is proportional to the correlation strength and the node size is proportional to the node's degree (number of connections). Graphics on the right represent the percentage of correlations within or between systems among the effective correlations in each group. Statistical analyses were assessed by bilateral proportion tests. * $p < 0.05$. (C) Other representation of the networks organized into discrete color-coded clusters (pink, green, blue, yellow) based on their common inter-connections using the Markov clustering algorithm. Regions that are not correlated at all are represented in grey. Network hubs are circled in black.

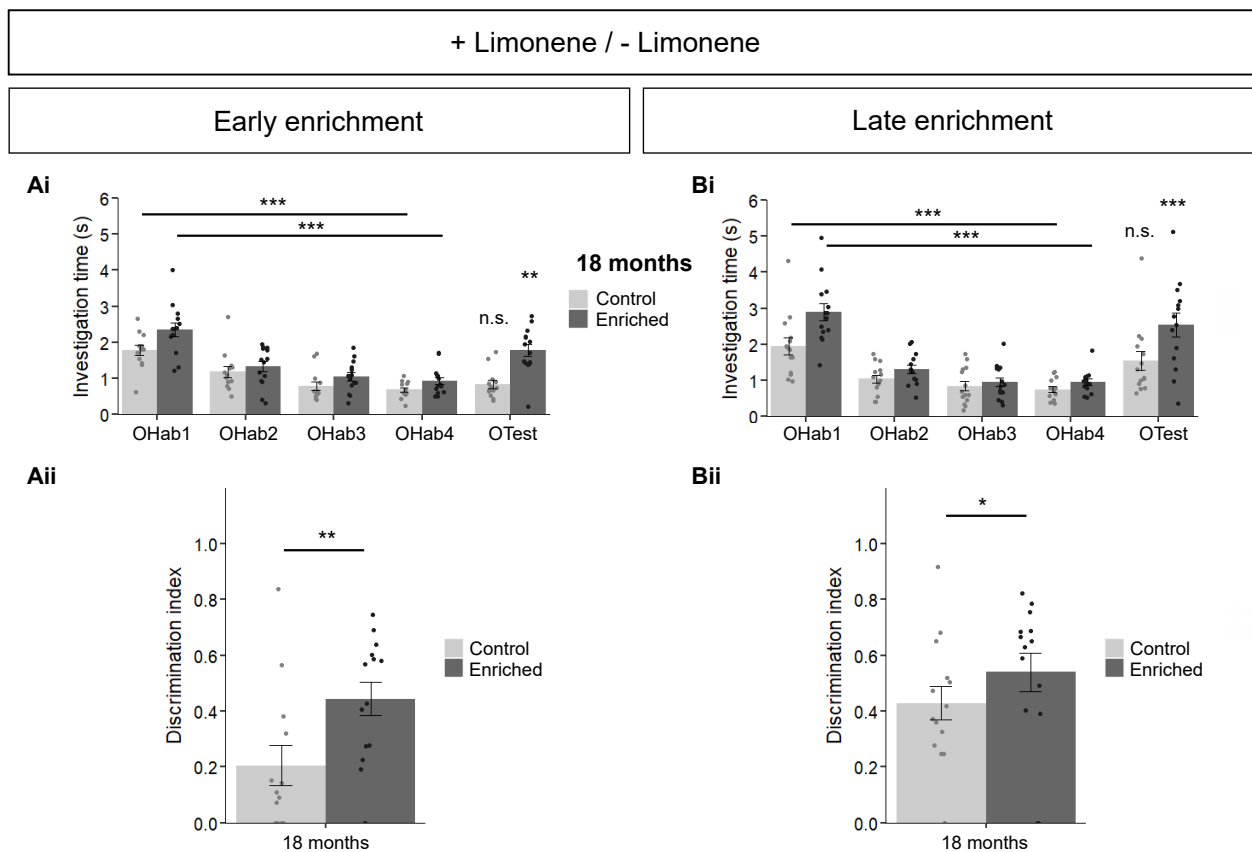


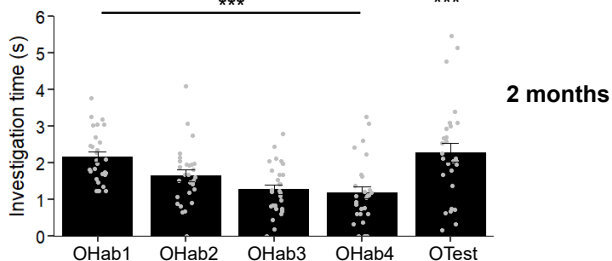
Figure S1: Fine olfactory discrimination abilities are improved by long-run olfactory enrichment. Assessment of the discrimination of + Limonene and - Limonene at 18 months in the enriched and control groups after early- (A) and late-started (B) enrichment. All groups habituated to the first presented odorant (OHab), as evidenced by the significantly decreased investigation time between OHab1 and OHab4. Both early and late-enriched groups were able to discriminate + Limonene and - Limonene, as shown by the significantly increased investigation time between OHab4 and OTest (Ai, Bi). Both early- and late-enriched mice displayed higher discrimination indices when compared to their respective controls (Aii, Bii). Data are presented as mean investigation time or mean discrimination indices \pm standard error of the mean. $n=13$ for the early-control group, $n=14$ for the early-enriched group, $n=14$ for the late-control group, $n=14$ for the late-enriched group. * $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$

Propyl Acetate / Hexyl Acetate

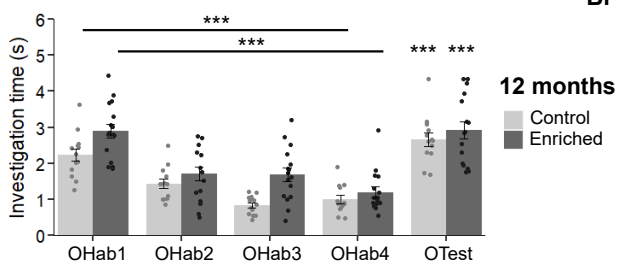
Early enrichment

Late enrichment

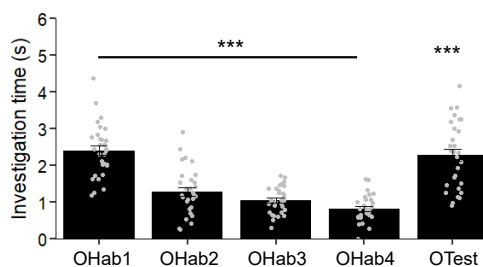
Ai



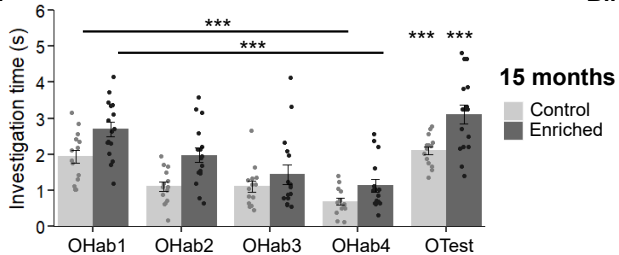
Aii



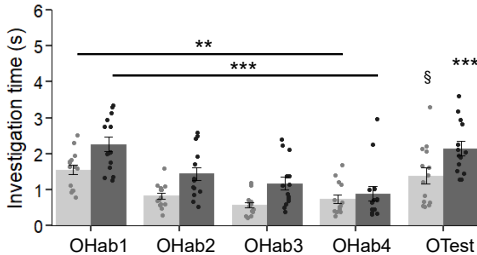
Bi



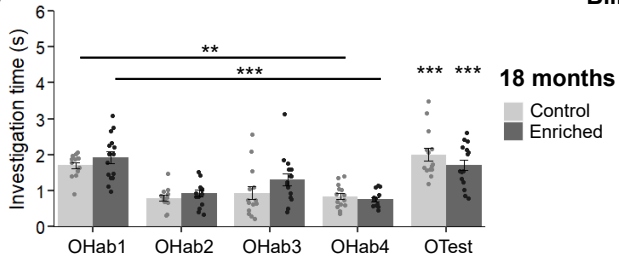
Aiii



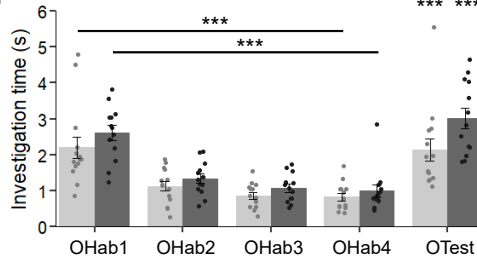
Bii



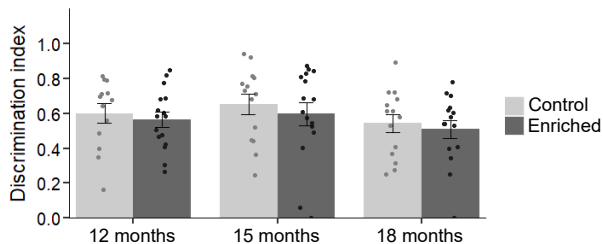
Aiv



Biii



Av



Biv

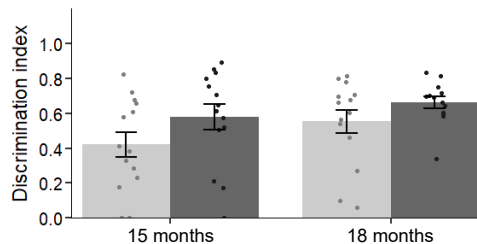


Figure S2: Gross discrimination abilities are maintained during aging and are not modulated by long-run olfactory enrichment.

Assessment of the discrimination of Propyl Acetate and Hexyl Acetate at different ages (12, 15 and 18 months) in the enriched and control groups of early- (A) and late-started (B) enrichment. All groups habituated to the first presented odorant (OHab), as evidenced by the significantly decreased investigation time between OHab1 and OHab4. All groups were also able to discriminate Propyl Acetate and Hexyl Acetate, as shown by the significantly increased investigation time between OHab4 and OTest (Ai-Aiii and Bi-Bii) and the similar discrimination indices of control and enriched mice (Aiv, Biii). Data are presented as mean investigation time or discrimination indices \pm standard error of the mean. 2 months: n=28. 12 months: n=13 for the early-control group, n=16 for the early-enriched group, n=30 for the late-enriched group. 15 months: n=14 for the early-control group, n=16 for the early-enriched group, n=14 for the late-control group, n=14 for the late-enriched group. 18 months: n=14 for the early-control group, n=15 for the early-enriched group, n=14 for the late-control group, n=13 for the late-enriched group. *** $p < 0.001$

Early enrichment	Late enrichment
------------------	-----------------

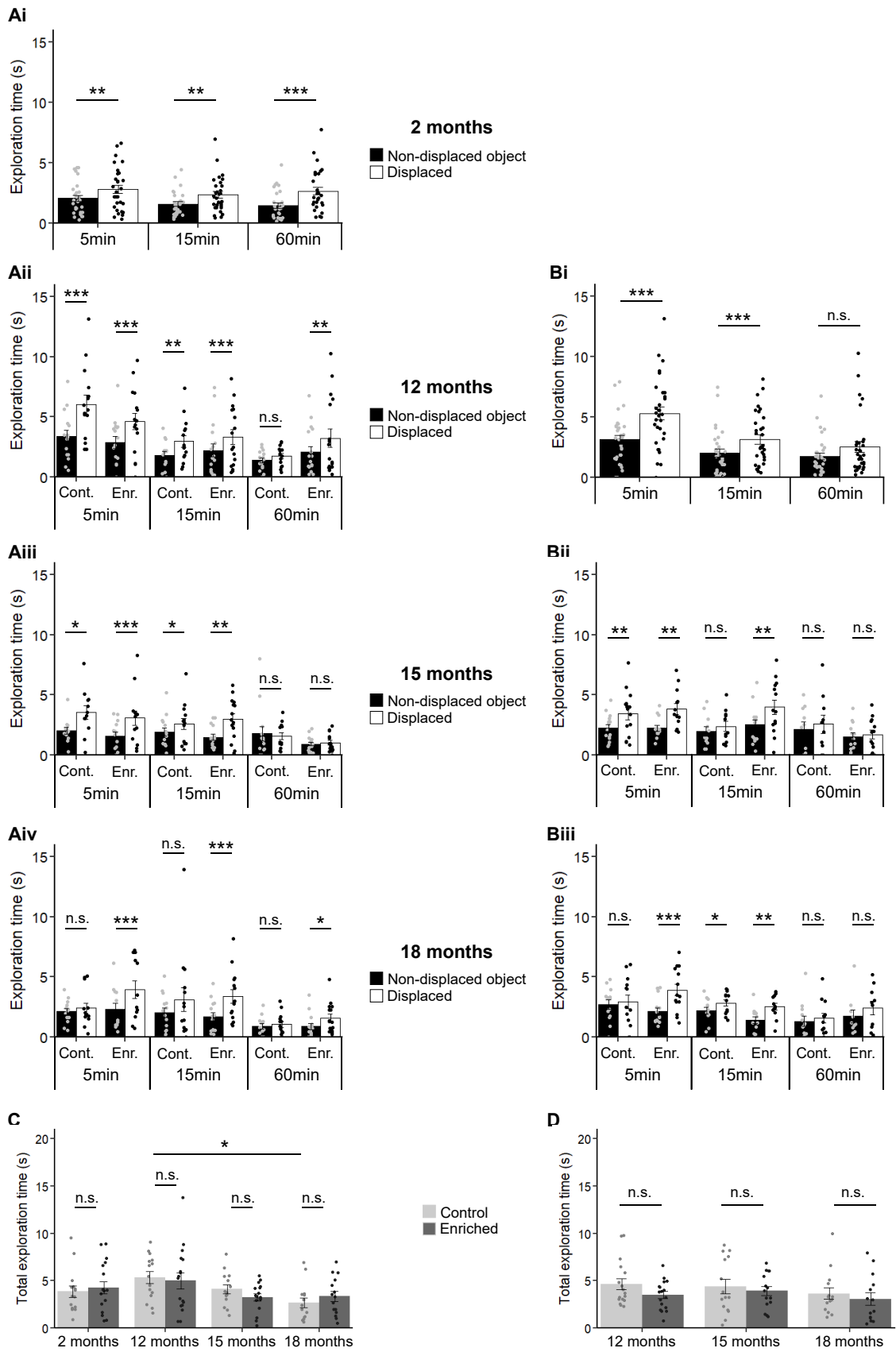


Figure S3: Comparison of the exploration times of the displaced and non-displaced objects confirms the improved spatial memory in enriched mice.

(A-B) Exploration of the two objects during the retention trial was assessed before the beginning of the enrichment (pre-test at 2 or 12 months) and at different ages (12, 15 and 18 months) in the enriched and control groups of early- (A) and late-started (B) enrichment. A significantly longer exploration of the displaced object indicates when the group remembers the object location. Data are presented as mean exploration time \pm standard error of the mean. Sample numbers are reported in Table 2. Comparison between displaced and non-displaced objects is performed by paired 2-samples Wilcoxon tests. (C-D) Total exploration time during the acquisition trial was assessed before the beginning of the enrichment (pre-test at 2 or 12 months) and at different ages (12, 15 and 18 months) in the enriched and control groups of early- (C) and late-started (D) enrichment. Data are presented as mean total exploration time \pm standard error of the mean. Sample numbers are reported in Table 2. The effect of age was investigated by Kruskal-Wallis followed by post hoc pairwise Wilcoxon tests. Wilcoxon tests revealed no effect of enrichment whatever the age of the mice. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; ns non significant

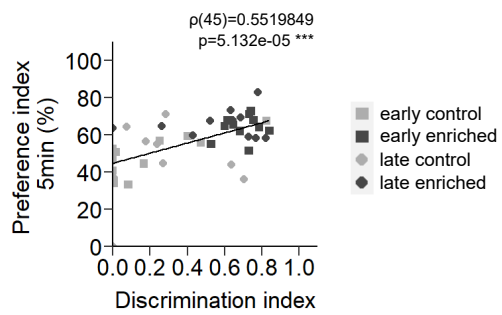


Figure S4: Positive linear correlation between olfactory discrimination and spatial memory performances.

Significant positive linear correlation was found between the discrimination index for the Dec/Dodec pair and the preference index for the 5-min-delay. *** $p < 0.001$.

PSEUDO-CONDITIONED

EARLY ENRICHMENT	LATE ENRICHMENT
-------------------------	------------------------

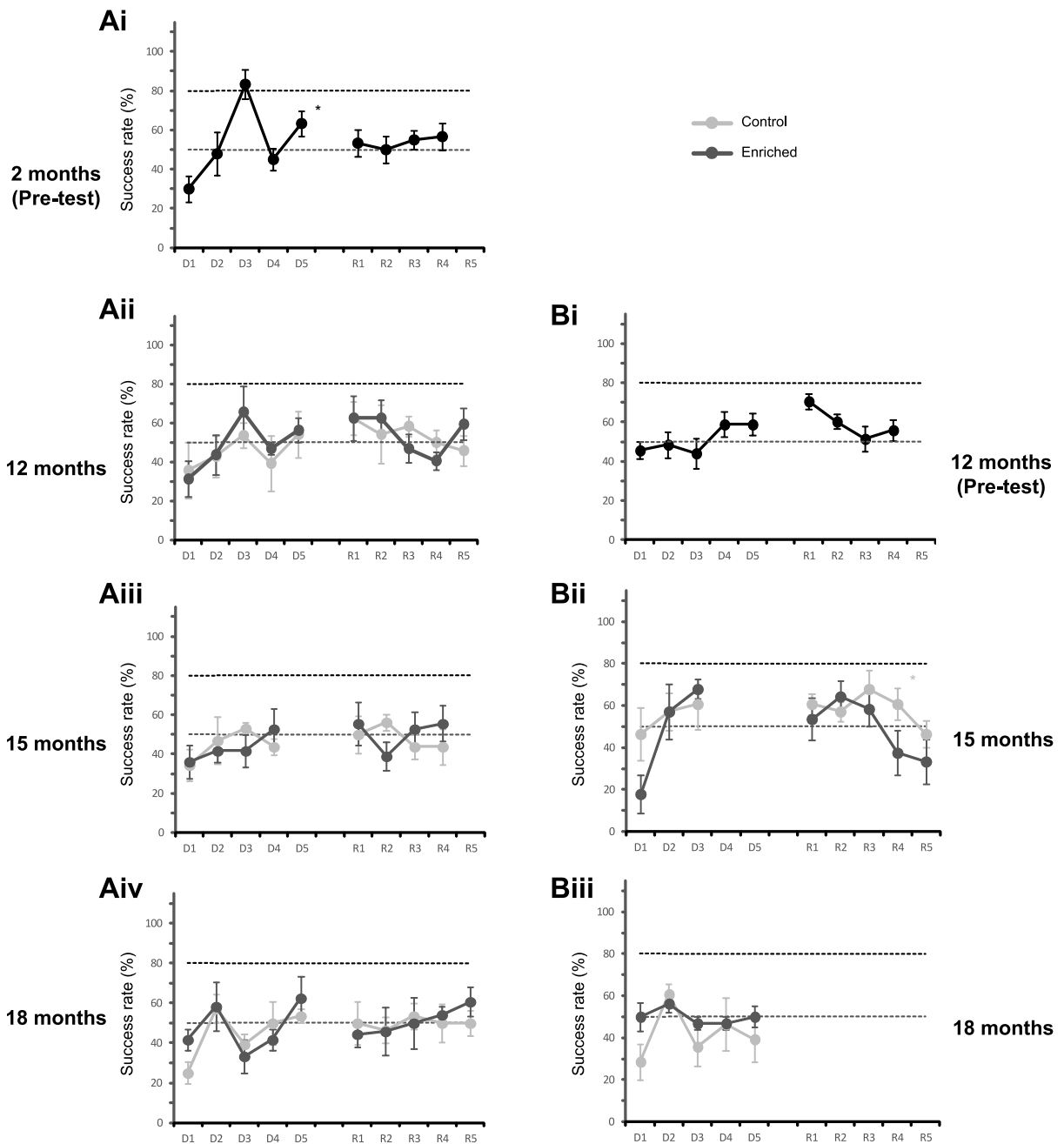


Figure S5: Pseudo-conditioned mice are unable to learn to perform the olfactory associative learning task. Evolution of the success rate in the olfactory associative task during the acquisition of the first rule (D1-D5) and after the reversal of the rule (R1-R5) for the pseudo-conditioned groups. Mice were tested before the beginning of the enrichment (pre-tests) and at different ages (12, 15 and 18 months) in the enriched and control groups of early- (A) and late-started (B) enrichment. Number of samples is provided in Table S4. § $p < 0.05$; §§ $p < 0.01$; §§§ $p < 0.001$ for comparisons between days. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ for comparisons to 50% (chance level).

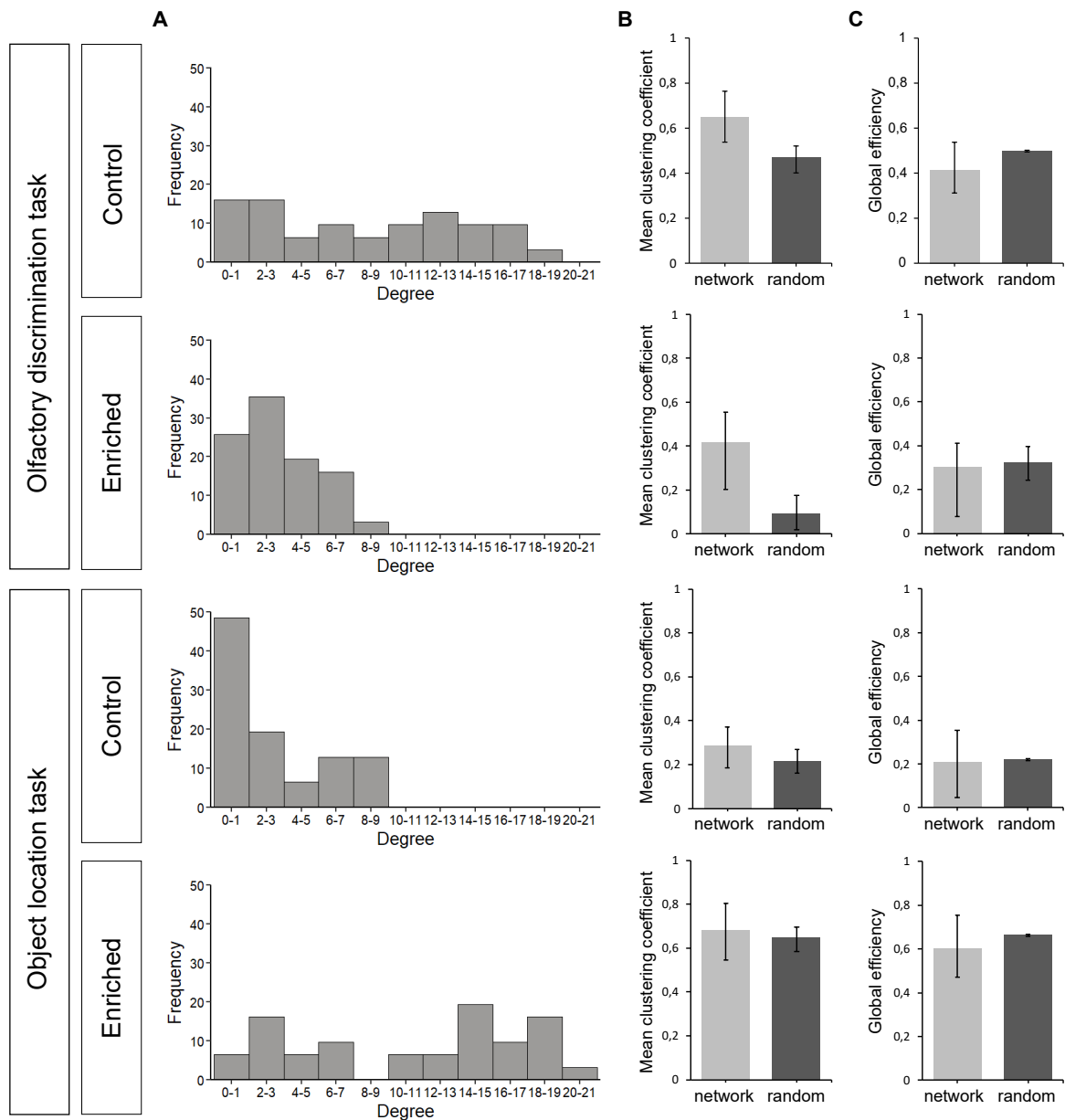


Figure S6: The olfactory discrimination network displays a small-world organization, but not the object location network.

(A) Histogram showing the degree distribution for each task and each group (control and enriched). (B) Mean clustering coefficient was measured to assess the segregation of our networks. (C) Global efficiency was measured to assess the integration of our networks. Each parameter is compared between the experimental network and a random network. Error bars represent 95% confidence intervals.

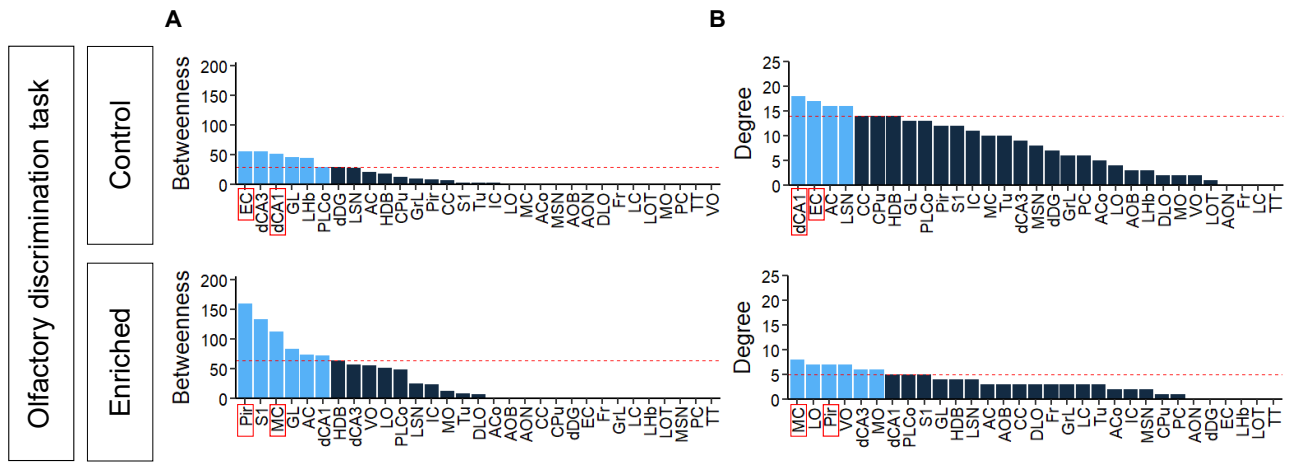


Figure S7 : Identification of hub regions in olfactory discrimination networks.

Hub regions (red) were identified as regions ranked above the 80th percentile (red dashed line) for betweenness (A) and degree (B), for each group (control and enriched).

REFERENCES

- Aguilar-Arredondo A, Zepeda A (2018) Memory retrieval-induced activation of adult-born neurons generated in response to damage to the dentate gyrus. *Brain Struct Funct* 223:2859–2877.
- Alonso M, Lepousez G, Wagner S, Bardy C, Gabellec M-M, Torquet N, Lledo P-M (2012) Activation of adult-born neurons facilitates learning and memory. *Nat Neurosci* 15:897–904.
- Anacker C, Hen R (2017) Adult hippocampal neurogenesis and cognitive flexibility — linking memory and mood. *Nat Rev Neurosci* 18:335–346.
- Assini FL, Duzzioni M, Takahashi RN (2009) Object location memory in mice: Pharmacological validation and further evidence of hippocampal CA1 participation. *Behavioural Brain Research* 204:206–211.
- Babayán BM, Watilliaux A, Viejo G, Paradis A-L, Girard B, Rondi-Reig L (2017) A hippocampo-cerebellar centred network for the learning and execution of sequence-based navigation. *Sci Rep* 7:17812.
- Barense MD (2002) Aged Rats Are Impaired on an Attentional Set-Shifting Task Sensitive to Medial Frontal Cortex Damage in Young Rats. *Learning & Memory* 9:191–201.
- Barulli D, Stern Y (2013) Efficiency, capacity, compensation, maintenance, plasticity: emerging concepts in cognitive reserve. *Trends in Cognitive Sciences* 17:502–509.
- Bauer S, Moysé E, Jourdan F, Colpaert F, Martel JC, Marien M (2003) Effects of the α_2 -adrenoreceptor antagonist dexefaroxan on neurogenesis in the olfactory bulb of the adult rat in vivo : selective protection against neuronal death. :11.
- Berridge CW, Waterhouse BD (2003) The locus coeruleus–noradrenergic system: modulation of behavioral state and state-dependent cognitive processes. *Brain Research Reviews* 42:33–84.
- Bezin L, Marcel D, Desgeorges S, Pujol J-F, Weissmann D (2000) Singular subsets of locus coeruleus neurons may recover tyrosine hydroxylase phenotype transiently expressed during development. *Molecular Brain Research* 76:275–281.
- Borodovitsyna O, Flamini M, Chandler D (2017) Noradrenergic Modulation of Cognition in Health and Disease. *Neural Plast* 2017:6031478.
- Brenes J, Padilla M, Fornaguera J (2009) A detailed analysis of open-field habituation and behavioral and neurochemical antidepressant-like effects in postweaning enriched rats. *Behavioural Brain Research* 197:125–137.
- Brushfield AM, Luu TT, Callahan BD, Gilbert PE (2008) A comparison of discrimination and reversal learning for olfactory and visual stimuli in aged rats. *Behavioral Neuroscience* 122:54–62.
- Bullmore E, Sporns O (2009) Complex brain networks: graph theoretical analysis of structural and functional systems. *Nat Rev Neurosci* 10:186–198.
- Bushdid C, Magnasco MO, Vosshall LB, Keller A (2014) Humans can Discriminate more than one Trillion Olfactory Stimuli. *Science* 343:1370–1372.
- Cabeza R, Albert M, Belleville S, Craik FIM, Duarte A, Grady CL, Lindenberger U, Nyberg L, Park DC, Reuter-Lorenz PA, Rugg MD, Steffener J, Rajah MN (2018) Maintenance, reserve and compensation: the cognitive neuroscience of healthy ageing. *Nat Rev Neurosci* 19:701–710.
- Cavelius M, Greco-Vuilloud J, Thevenet M, Didier A (in prep.) Context-dependent asymmetric processing of olfactory information.
- Cès A, Burg T, Herbeaux K, Héraud C, Bott J-B, Mensah-Nyagan AG, Mathis C (2018) Age-related vulnerability of pattern separation in C57BL/6J mice. *Neurobiology of Aging* 62:120–129.
- Chamberlain SR, Robbins TW (2013) Noradrenergic modulation of cognition: Therapeutic implications. *Journal of Psychopharmacology* 27:694–718.
- Chandler DJ, Gao W-J, Waterhouse BD (2014) Heterogeneous organization of the locus coeruleus projections to prefrontal and motor cortices. *PNAS* 111:6816–6821.
- Ciombor KJ, Ennis M, Shipley MT (1999) Norepinephrine increases rat mitral cell excitatory responses to weak olfactory nerve input via alpha-1 receptors in vitro. *Neuroscience* 90:595–606.
- Cleland TA, Morse A, Yue EL, Linster C (2002) Behavioral models of odor similarity. *Behavioral Neuroscience* 116:222–231.
- Clewett DV, Lee T-H, Greening S, Ponzio A, Margalit E, Mather M (2016) Neuromelanin marks the spot: identifying a locus coeruleus biomarker of cognitive reserve in healthy aging. *Neurobiology of Aging* 37:117–126.
- Coradazzi M, Gulino R, Fieramosca F, Falzacappa LV, Riggi M, Leanza G (2016) Selective noradrenaline depletion impairs working memory and hippocampal neurogenesis. *Neurobiology of Aging* 48:93–102.
- Crowell CA, Davis SW, Beynel L, Deng L, Lakhani D, Hilbig SA, Palmer H, Brito A, Peterchev AV, Lubner B, Lisanby SH, Appelbaum LG, Cabeza R (2020) Older adults benefit from more widespread brain network integration during working memory. *Neuroimage* 218:116959.

- Dahl MJ, Mather M, Düzel S, Bodammer NC, Lindenberger U, Kühn S, Werkle-Bergner M (2019) Rostral locus coeruleus integrity is associated with better memory performance in older adults. *Nat Hum Behav* 3:1203–1214.
- Damoiseaux JS (2017) Effects of aging on functional and structural brain connectivity. *NeuroImage* 160:32–40.
- Doucette W, Milder J, Restrepo D (2007) Adrenergic modulation of olfactory bulb circuitry affects odor discrimination. *Learning & Memory* 14:539–547.
- Eichenbaum H (2017) On the Integration of Space, Time, and Memory. *Neuron* 95:1007–1018.
- Enwere E (2004) Aging Results in Reduced Epidermal Growth Factor Receptor Signaling, Diminished Olfactory Neurogenesis, and Deficits in Fine Olfactory Discrimination. *Journal of Neuroscience* 24:8354–8365.
- Escanilla O, Arrellanos A, Karnow A, Ennis M, Linster C (2010) Noradrenergic modulation of behavioral odor detection and discrimination thresholds in the olfactory bulb: Noradrenergic modulation of bulbar odor processing. *European Journal of Neuroscience* 32:458–468.
- Fanselow MS, Dong H-W (2010) Are the Dorsal and Ventral Hippocampus Functionally Distinct Structures? *Neuron* 65:7–19.
- Feng R, Rampon C, Tang Y-P, Shrom D, Jin J, Kyin M, Sopher B, Martin GM, Kim S-H, Langdon RB, Sisodia SS, Tsien JZ (2001) Deficient Neurogenesis in Forebrain-Specific Presenilin-1 Knockout Mice Is Associated with Reduced Clearance of Hippocampal Memory Traces. *Neuron* 32:911–926.
- Fera F (2005) Neural Mechanisms Underlying Probabilistic Category Learning in Normal Aging. *Journal of Neuroscience* 25:11340–11348.
- Forest J, Chalencón L, Midroit M, Terrier C, Caillé I, Sacquet J, Benetollo C, Martin K, Richard M, Didier A, Mandairon N (2020) Role of Adult-Born Versus Preexisting Neurons Born at P0 in Olfactory Perception in a Complex Olfactory Environment in Mice. *Cereb Cortex* 30:534–549.
- Foster TC, Gagne J, Massicotte G (1996) Mechanism of altered synaptic strength due to experience: relation to long-term potentiation. *Brain Research* 736:243–250.
- Fritschy JM, Grzanna R (1992) Restoration of ascending noradrenergic projections by residual locus coeruleus neurons: compensatory response to neurotoxin-induced cell death in the adult rat brain. *J Comp Neurol* 321:421–441.
- Fuchs F, Cosquer B, Penazzi L, Mathis C, Kelche C, Majchrzak M, Barbelivien A (2016a) Exposure to an enriched environment up to middle age allows preservation of spatial memory capabilities in old age. *Behavioural Brain Research* 299:1–5.
- Fuchs F, Herbeaux K, Aufrere N, Kelche C, Mathis C, Barbelivien A, Majchrzak M (2016b) Late enrichment maintains accurate recent and remote spatial memory only in aged rats that were unimpaired when middle aged. *Learn Mem* 23:303–312.
- Galani R, Berthel M-C, Lazarus C, Majchrzak M, Barbelivien A, Kelche C, Cassel J-C (2007) The behavioral effects of enriched housing are not altered by serotonin depletion but enrichment alters hippocampal neurochemistry. *Neurobiology of Learning and Memory* 88:1–10.
- Gilbert PE, Pirogovsky E, Brushfield AM, Luu TT, Tolentino JC, Renteria AF (2009) Age-related Changes in Associative Learning for Olfactory and Visual Stimuli in Rodents. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1170:718–724.
- Gil-Mohapel J, Brocardo PS, Choquette W, Gothard R, Simpson JM, Christie BR (2013) Hippocampal Neurogenesis Levels Predict WATERMAZE Search Strategies in the Aging Brain Mattson MP, ed. *PLoS ONE* 8:e75125.
- Goodman T, Trouche S, Massou I, Verret L, Zerwas M, Roulet P, Rampon C (2010) Young hippocampal neurons are critical for recent and remote spatial memory in adult mice. *Neuroscience* 171:769–778.
- Goridis C, Brunet J-F (1999) Transcriptional control of neurotransmitter phenotype. *Current Opinion in Neurobiology* 9:47–53.
- Grady C (2012) The cognitive neuroscience of ageing. *Nature Reviews Neuroscience* 13:491–505.
- Grady CL, Protzner AB, Kovacevic N, Strother SC, Afshin-Pour B, Wojtowicz M, Anderson JAE, Churchill N, McIntosh AR (2010) A multivariate analysis of age-related differences in default mode and task-positive networks across multiple cognitive domains. *Cereb Cortex* 20:1432–1447.
- Gray NE, Zweig JA, Caruso M, Martin MD, Zhu JY, Quinn JF, Soumyanath A (2018) *Centella asiatica* increases hippocampal synaptic density and improves memory and executive function in aged mice. *Brain Behav* 8:e01024.
- Greco-Vuilloud J, Midroit M, Terrier C, Forest J, Sacquet J, Mandairon N, Didier A, Richard MB (submitted) 12-month-old is a pivotal age for olfactory perceptual learning and its underlying neuronal plasticity in aging mice.
- Green EJ, Greenough WT (1986) Altered synaptic transmission in dentate gyrus of rats reared in complex environments: evidence from hippocampal slices maintained in vitro. *J Neurophysiol* 55:739–750.

- Grelat A, Benoit L, Wagner S, Moigneu C, Lledo P-M, Alonso M (2018) Adult-born neurons boost odor–reward association. *Proc Natl Acad Sci USA* 115:2514–2519.
- Guérin D, Sacquet J, Mandairon N, Jourdan F, Didier A (2009) Early locus coeruleus degeneration and olfactory dysfunctions in Tg2576 mice. *Neurobiology of Aging* 30:272–283.
- Harati H, Barbelivien A, Herbeaux K, Muller M-A, Engeln M, Kelche C, Cassel J-C, Majchrzak M (2013) Lifelong environmental enrichment in rats: impact on emotional behavior, spatial memory vividness, and cholinergic neurons over the lifespan. *Age (Dordr)* 35:1027–1043.
- Harburger LL, Lambert TJ, Frick KM (2007) Age-dependent effects of environmental enrichment on spatial reference memory in male mice. *Behav Brain Res* 185:43–48.
- Holman C, de Villers-Sidani E (2014) Indestructible plastic: the neuroscience of the new aging brain. *Front Hum Neurosci* 8 Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3990104/> [Accessed June 21, 2018].
- Horwitz B, McIntosh AR, Haxby JV, Grady CL (1995) Network analysis of brain cognitive function using metabolic and blood flow data. *Behavioural Brain Research* 66:187–193.
- Irvine GI, Logan B, Eckert M, Abraham WC (2006) Enriched environment exposure regulates excitability, synaptic transmission, and LTP in the dentate gyrus of freely moving rats. *Hippocampus* 16:149–160.
- Izquierdo A, Brigman JL, Radke AK, Rudebeck PH, Holmes A (2017) The neural basis of reversal learning: An updated perspective. *Neuroscience* 345:12–26.
- Joussain P, Rouby C, Bensafi M (2014) A pleasant familiar odor influences perceived stress and peripheral nervous system activity during normal aging. *Front Psychol* 5 Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3925886/> [Accessed June 21, 2018].
- Kebschull JM, Silva PG da, Reid AP, Peikon ID, Albeanu DF, Zador AM (2016) High-Throughput Mapping of Single-Neuron Projections by Sequencing of Barcoded RNA. *Neuron* 91:975–987.
- Kempadoo KA, Mosharov EV, Choi SJ, Sulzer D, Kandel ER (2016) Dopamine release from the locus coeruleus to the dorsal hippocampus promotes spatial learning and memory. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113:14835–14840.
- Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH (1997) More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature* 386:493–495.
- Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH (1998) Experience-Induced Neurogenesis in the Senescent Dentate Gyrus. *The Journal of Neuroscience* 18:3206–3212.
- Kobayashi S, Ohashi Y, Ando S (2002) Effects of enriched environments with different durations and starting times on learning capacity during aging in rats assessed by a refined procedure of the Hebb-Williams maze task. *J Neurosci Res* 70:340–346.
- Kollndorfer K, Fischmeister FPhS, Kowalczyk K, Hoche E, Mueller CA, Trattng S, Schöpf V (2015) Olfactory training induces changes in regional functional connectivity in patients with long-term smell loss. *NeuroImage: Clinical* 9:401–410.
- Kollndorfer K, Kowalczyk K, Hoche E, Mueller CA, Pollak M, Trattng S, Schöpf V (2014) Recovery of Olfactory Function Induces Neuroplasticity Effects in Patients with Smell Loss. *Neural Plasticity* 2014:1–7.
- Kraemer S, Apfelbach R (2004) Olfactory sensitivity, learning and cognition in young adult and aged male Wistar rats. *Physiology & Behavior* 81:435–442.
- Kuhn H, Dickinson-Anson H, Gage F (1996) Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J Neurosci* 16:2027–2033.
- Kulkarni VA, Jha S, Vaidya VA (2002) Depletion of norepinephrine decreases the proliferation, but does not influence the survival and differentiation, of granule cell progenitors in the adult rat hippocampus: Norepinephrine depletion decreases adult neurogenesis. *European Journal of Neuroscience* 16:2008–2012.
- Kumar A, Rani A, Tchigranova O, Lee W-H, Foster TC (2012) Influence of late-life exposure to environmental enrichment or exercise on hippocampal function and CA1 senescent physiology. *Neurobiol Aging* 33:828.e1-17.
- Li S, Jin M, Zhang D, Yang T, Koeglsperger T, Fu H, Selkoe DJ (2013) Environmental Novelty Activates β 2-Adrenergic Signaling to Prevent the Impairment of Hippocampal LTP by A β Oligomers. *Neuron* 77:929–941.
- Linster C (2019) Cellular and network processes of noradrenergic modulation in the olfactory system. *Brain Research* 1709:28–32.
- Luo J, Daniels SB, Lenington JB, Notti RQ, Conover JC (2006) The aging neurogenic subventricular zone. *Aging Cell* 5:139–152.

- Maggi L, Scianni M, Branchi I, D'Andrea I, Lauro C, Limatola C (2011) CX3CR1 Deficiency Alters Hippocampal-Dependent Plasticity Phenomena Blunting the Effects of Enriched Environment. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 5:22.
- Malik R, Chattarji S (2012) Enhanced intrinsic excitability and EPSP-spike coupling accompany enriched environment-induced facilitation of LTP in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Journal of Neurophysiology* 107:1366–1378.
- Malvaut S, Saghatelian A (2016) The Role of Adult-Born Neurons in the Constantly Changing Olfactory Bulb Network. *Neural Plasticity* 2016:e1614329.
- Mandairon N, Sacquet J, Garcia S, Ravel N, Jourdan F, Didier A (2006) Neurogenic correlates of an olfactory discrimination task in the adult olfactory bulb. *Eur J Neurosci* 24:3578–3588.
- Mandairon N, Sultan S, Nouvian M, Sacquet J, Didier A (2011) Involvement of Newborn Neurons in Olfactory Associative Learning? The Operant or Non-operant Component of the Task Makes All the Difference. *Journal of Neuroscience* 31:12455–12460.
- Mandairon N, Sultan S, Rey N, Kermen F, Moreno M, Busto G, Farget V, Messaoudi B, Thevenet M, Didier A (2009) A computer-assisted odorized hole-board for testing olfactory perception in mice. *Journal of Neuroscience Methods* 180:296–303.
- Manella LC, Petersen N, Linster C (2017) Stimulation of the Locus Coeruleus Modulates Signal-to-Noise Ratio in the Olfactory Bulb. *J Neurosci* 37:11605–11615.
- Marchetti E, Jacquet M, Escoffier G, Miglioratti M, Dumuis A, Bockaert J, Roman FS (2011) Enhancement of reference memory in aged rats by specific activation of 5-HT4 receptors using an olfactory associative discrimination task. *Brain Research* 1405:49–56.
- Marrone DF, Ramirez-Amaya V, Barnes CA (2012) Neurons generated in senescence maintain capacity for functional integration. *Hippocampus* 22:1134–1142.
- Mather M, Harley CW (2016) The Locus Coeruleus: Essential for Maintaining Cognitive Function and the Aging Brain. *Trends in Cognitive Sciences* 20:214–226.
- Midroit M, Thevenet M, Fournel A, Sacquet J, Bensafi M, Breton M, Chalençon L, Cavelius M, Didier A, Mandairon N (2018) Non-imaged based method for matching brains in a common anatomical space for cellular imagery. *Journal of Neuroscience Methods* 304:136–145.
- Mora-Gallegos A, Rojas-Carvajal M, Salas S, Saborío-Arce A, Fornaguera-Trías J, Brenes JC (2015) Age-dependent effects of environmental enrichment on spatial memory and neurochemistry. *Neurobiology of Learning and Memory* 118:96–104.
- Morcom AM, Henson RNA (2018) Increased Prefrontal Activity with Aging Reflects Nonspecific Neural Responses Rather than Compensation. *J Neurosci* 38:7303–7313.
- Moreno M, Richard M, Landrein B, Sacquet J, Didier A, Mandairon N (2014) Alteration of olfactory perceptual learning and its cellular basis in aged mice. *Neurobiology of Aging* 35:680–691.
- Moreno MM, Bath K, Kuczewski N, Sacquet J, Didier A, Mandairon N (2012) Action of the Noradrenergic System on Adult-Born Cells Is Required for Olfactory Learning in Mice. *Journal of Neuroscience* 32:3748–3758.
- Moreno MM, Linster C, Escanilla O, Sacquet J, Didier A, Mandairon N (2009) Olfactory perceptual learning requires adult neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:17980–17985.
- Morgenstern NA, Lombardi G, Schinder AF (2008) Newborn granule cells in the ageing dentate gyrus. *The Journal of Physiology* 586:3751–3757.
- Morin X, Cremer H, Hirsch M-R, Kapur RP, Goridis C, Brunet J-F (1997) Defects in Sensory and Autonomic Ganglia and Absence of Locus Coeruleus in Mice Deficient for the Homeobox Gene Phox2a. *Neuron* 18:411–423.
- Moser MB, Moser EI, Forrest E, Andersen P, Morris RG (1995) Spatial learning with a minislab in the dorsal hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92:9697–9701.
- Mouly A-M, Elaagouby A, Ravel N (1995) A study of the effects of noradrenaline in the rat olfactory bulb using evoked field potential response. *Brain Research* 681:47–57.
- Murai T, Okuda S, Tanaka T, Ohta H (2007) Characteristics of object location memory in mice: Behavioral and pharmacological studies. *Physiology & Behavior* 90:116–124.
- Nai Q, Dong H-W, Hayar A, Linster C, Ennis M (2009) Noradrenergic Regulation of GABAergic Inhibition of Main Olfactory Bulb Mitral Cells Varies as a Function of Concentration and Receptor Subtype. *Journal of Neurophysiology* 101:2472–2484.
- Nai Q, Dong HW, Linster C, Ennis M (2010) Activation of $\alpha 1$ and $\alpha 2$ noradrenergic receptors exert opposing effects on excitability of main olfactory bulb granule cells. *Neuroscience* 169:882–892.
- Nedelescu H, Chowdhury TG, Wable GS, Arbuthnott G, Aoki C (2017) Cerebellar sub-divisions differ in exercise-induced plasticity of noradrenergic axons and in their association with resilience to activity-based anorexia. *Brain Structure and Function* 222:317–339.

- Neidl R, Schneider A, Bousiges O, Majchrzak M, Barbelivien A, de Vasconcelos AP, Dorgans K, Doussau F, Loeffler J-P, Cassel J-C, Boutillier A-L (2016) Late-Life Environmental Enrichment Induces Acetylation Events and Nuclear Factor B-Dependent Regulations in the Hippocampus of Aged Rats Showing Improved Plasticity and Learning. *Journal of Neuroscience* 36:4351–4361.
- Neville KR, Haberly LB (2004) Olfactory Cortex. In: *Synaptic organization of the brain*, Vth. Oxford University Press.
- Pang TYC, Hannan AJ (2013) Enhancement of cognitive function in models of brain disease through environmental enrichment and physical activity. *Neuropharmacology* 64:515–528.
- Persson J, Nyberg L (2006) Altered brain activity in healthy seniors: what does it mean? In: *Progress in Brain Research*, pp 45–385. Elsevier. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0079612306570049> [Accessed August 26, 2021].
- Peterson GM (1994) Sprouting of central noradrenergic fibers in the dentate gyrus following combined lesions of its entorhinal and septal afferents. *Hippocampus* 4:635–648.
- Poe GR, Foote S, Eschenko O, Johansen JP, Bouret S, Aston-Jones G, Harley CW, Manahan-Vaughan D, Weinschenker D, Valentino R, Berridge C, Chandler DJ, Waterhouse B, Sara SJ (2020) Locus coeruleus: a new look at the blue spot. *Nat Rev Neurosci* 21:644–659.
- Ragozzino ME (2007) The Contribution of the Medial Prefrontal Cortex, Orbitofrontal Cortex, and Dorsomedial Striatum to Behavioral Flexibility. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1121:355–375.
- Rao MS, Hattiangady B, Abdel-Rahman A, Stanley DP, Shetty AK (2005) Newly born cells in the ageing dentate gyrus display normal migration, survival and neuronal fate choice but endure retarded early maturation. *European Journal of Neuroscience* 21:464–476.
- Reuter-Lorenz PA, Park DC (2014) How Does it STAC Up? Revisiting the Scaffolding Theory of Aging and Cognition. *Neuropsychol Rev* 24:355–370.
- Rey NL, Sacquet J, Veyrac A, Jourdan F, Didier A (2012) Behavioral and cellular markers of olfactory aging and their response to enrichment. *Neurobiology of Aging* 33:626.e9-626.e23.
- Robertson IH (2013) A noradrenergic theory of cognitive reserve: implications for Alzheimer’s disease. *Neurobiology of Aging* 34:298–308.
- Rocheffort C, Gheusi G, Vincent J-D, Lledo P-M (2002) Enriched Odor Exposure Increases the Number of Newborn Neurons in the Adult Olfactory Bulb and Improves Odor Memory. *J Neurosci* 22:2679–2689.
- Roman FS, Alescio-Lautier B, Soumireu-Mourat B (1996) Age-related learning and memory deficits in odor-reward association in rats. *Neurobiol Aging* 17:31–40.
- Rubinov M, Sporns O (2010) Complex network measures of brain connectivity: Uses and interpretations. *NeuroImage* 52:1059–1069.
- Sagar S, Sharp F, Curran T (1988) Expression of c-fos protein in brain: metabolic mapping at the cellular level. *Science* 240:1328–1331.
- Sara SJ (2009) The locus coeruleus and noradrenergic modulation of cognition. *Nature Reviews Neuroscience* 10:211–223.
- Sara SJ, Bouret S (2012) Orienting and Reorienting: The Locus Coeruleus Mediates Cognition through Arousal. *Neuron* 76:130–141.
- Schiffman SS, Suggs MS, Sattely-Miller EA (1995) Effect of pleasant odors on mood of males at midlife: Comparison of African-American and European-American men. *Brain Research Bulletin* 36:31–37.
- Schoenbaum G, Nugent SL, Saddoris MP, Setlow B (2002) Orbitofrontal lesions in rats impair reversal but not acquisition of go, no-go odor discriminations. *NeuroReport* 13:885–890.
- Schoenbaum G, Setlow B, Saddoris MP, Gallagher M (2006) Encoding Changes in Orbitofrontal Cortex in Reversal-Impaired Aged Rats. *Journal of Neurophysiology* 95:1509–1517.
- Schwarz LA, Luo L (2015) Organization of the Locus Coeruleus-Norepinephrine System. *Current Biology* 25:R1051–R1056.
- Schwarz LA, Miyamichi K, Gao XJ, Beier KT, Weissbourd B, DeLoach KE, Ren J, Ibanes S, Malenka RC, Kremer EJ, Luo L (2015) Viral-genetic tracing of the input–output organization of a central noradrenergic circuit. *Nature* 524:88–92.
- Sharp PE, McNaughton BL, Barnes CA (1985) Enhancement of hippocampal field potentials in rats exposed to a novel, complex environment. *Brain Research* 339:361–365.
- Shepherd GM, Chen WR, Greer CA (2004) Olfactory Bulb. In: *Synaptic organization of the brain*, Vth. Oxford University Press.
- Simpson J, Kelly JP (2011) The impact of environmental enrichment in laboratory rats—Behavioural and neurochemical aspects. *Behavioural Brain Research* 222:246–264.
- Snyder JS, Drew MR (2020) Functional neurogenesis over the years. *Behavioural Brain Research* 382:112470.

- Stein LR, O'Dell KA, Funatsu M, Zorumski CF, Izumi Y (2016) Short-term environmental enrichment enhances synaptic plasticity in hippocampal slices from aged rats. *Neuroscience* 329:294–305.
- Sultan S, Mandairon N, Kermen F, Garcia S, Sacquet J, Didier A (2010) Learning-dependent neurogenesis in the olfactory bulb determines long-term olfactory memory. *The FASEB Journal* 24:2355–2363.
- Takeuchi T, Duszkiewicz AJ, Sonneborn A, Spooner PA, Yamasaki M, Watanabe M, Smith CC, Fernández G, Deisseroth K, Greene RW, Morris RGM (2016) Locus coeruleus and dopaminergic consolidation of everyday memory. *Nature* 537:357–362.
- Tang Y-P, Wang H, Feng R, Kyin M, Tsien JZ (2001) Differential effects of enrichment on learning and memory function in NR2B transgenic mice. *Neuropharmacology* 41:779–790.
- Trinchero MF, Buttner KA, Sulkes Cuevas JN, Temprana SG, Fontanet PA, Monzón-Salinas MC, Ledda F, Paratcha G, Schinder AF (2017) High Plasticity of New Granule Cells in the Aging Hippocampus. *Cell Rep* 21:1129–1139.
- Trinchero MF, Herrero M, Monzón-Salinas MC, Schinder AF (2019) Experience-Dependent Structural Plasticity of Adult-Born Neurons in the Aging Hippocampus. *Front Neurosci* 13 Available at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnins.2019.00739/full> [Accessed July 9, 2021].
- Uematsu A, Tan BZ, Ycu EA, Cuevas JS, Koivumaa J, Junyent F, Kremer EJ, Witten IB, Deisseroth K, Johansen JP (2017) Modular organization of the brainstem noradrenaline system coordinates opposing learning states. *Nat Neurosci* 20:1602–1611.
- van Praag H (2005) Exercise Enhances Learning and Hippocampal Neurogenesis in Aged Mice. *Journal of Neuroscience* 25:8680–8685.
- van Praag H van, Kempermann G, Gage FH (2000) Neural consequences of environmental enrichment. *Nat Rev Neurosci* 1:191–198.
- Vetere G, Kenney JW, Tran LM, Xia F, Steadman PE, Parkinson J, Josselyn SA, Frankland PW (2017) Chemogenetic Interrogation of a Brain-wide Fear Memory Network in Mice. *Neuron* 94:363–374.e4.
- Veyrac A, Sacquet J, Nguyen V, Marien M, Jourdan F, Didier A (2009) Novelty determines the effects of olfactory enrichment on memory and neurogenesis through noradrenergic mechanisms. *Neuropsychopharmacology* 34:786–795.
- Vinera J, Kermen F, Sacquet J, Didier A, Mandairon N, Richard M (2015) Olfactory perceptual learning requires action of noradrenaline in the olfactory bulb: comparison with olfactory associative learning. *Learning & Memory* 22:192–196.
- Waterhouse BD, Navarra RL (2019) The locus coeruleus-norepinephrine system and sensory signal processing: A historical review and current perspectives. *Brain Research* 1709:1–15.
- Wheeler AL, Teixeira CM, Wang AH, Xiong X, Kovacevic N, Lerch JP, McIntosh AR, Parkinson J, Frankland PW (2013) Identification of a functional connectome for long-term fear memory in mice. *PLoS Comput Biol* 9:e1002853.
- Wilson RS, Nag S, Boyle PA, Hibel LP, Yu L, Buchman AS, Schneider JA, Bennett DA (2013) Neural reserve, neuronal density in the locus ceruleus, and cognitive decline. *Neurology* 80:1202–1208.
- Wimmer ME, Hernandez PJ, Blackwell J, Abel T (2012) Aging impairs hippocampus-dependent long-term memory for object location in mice. *Neurobiology of Aging* 33:2220–2224.
- Yang C, Kim H-S, Seo H, Kim C-H, Brunet J-F, Kim K-S (1998) Paired-Like Homeodomain Proteins, Phox2a and Phox2b, Are Responsible for Noradrenergic Cell-Specific Transcription of the Dopamine β -Hydroxylase Gene. *Journal of Neurochemistry* 71:1813–1826.
- Yoder WM, Gaynor LS, Burke SN, Setlow B, Smith DW, Bizon JL (2017) Interaction between age and perceptual similarity in olfactory discrimination learning in F344 rats: relationships with spatial learning. *Neurobiol Aging* 53:122–137.
- Zerbi V, Floriou-Servou A, Markicevic M, Vermeiren Y, Sturman O, Privitera M, von Ziegler L, Ferrari KD, Weber B, De Deyn PP, Wenderoth N, Bohacek J (2019) Rapid Reconfiguration of the Functional Connectome after Chemogenetic Locus Coeruleus Activation. *Neuron* 103:702–718.e5.
- Zimnik NC, Treadway T, Smith RS, Araneda RC (2013) α 1A-Adrenergic regulation of inhibition in the olfactory bulb. *The Journal of Physiology* 591:1631–1643.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Experimental design

Mice were submitted to repeated sessions of olfactory enrichment starting at young adulthood (2 months, Early group) or at middle age (12 months, Late group). Each group of enriched mice was compared to a control non-enriched group (sham manipulation but mice were exposed to no odor). Each enrichment session lasted 10 days (1h/day) and sessions were repeated every month until mice reached 18 months. Behavioral evaluation (olfactory discrimination, spatial memory, associative learning and cognitive flexibility) was performed before the beginning of the enrichment and at different time points during aging (12, 15 and 18 months). For each group, a subgroup of mice received BrdU injections, 30 days before sacrifice to quantify adult neurogenesis. Last, subgroups of control and enriched mice performed a behavioral task 1h before the sacrifice to investigate the neuronal networks activated during a specific task. One subgroup of mice performed the olfactory discrimination task using the Decanal / 2-Dodecanone odorant pair. A second subgroup performed the object location task with a 60-min delay (early-enriched and control mice) or a 5-min delay (late-enriched and control mice).

Table 1: Odorants used in the olfactory associative learning task

	EARLY ENRICHMENT	LATE ENRICHMENT
2 months	Amyl Acetate/ Anisol ; 1 st rule : Amyl Acetate reinforced, reversal : Anisol reinforced	–
12 months	3 odor pairs ; odor pairs and reinforced odor were randomized within groups	Amyl Acetate / Anisol ; 1 st rule : Amyl Acetate reinforced, reversal : Anisol reinforced
15 months	3 odor pairs ; odor pairs and reinforced odor were randomized within groups	+ Limonene / Decanal ; 1 st rule : + Limonene reinforced, reversal : Decanal reinforced
18 months	3 odor pairs ; odor pairs and reinforced odor were randomized within groups	3-Hexanol / Heptanal ; reinforced odor was counterbalanced within groups

Figure 2: Fine discrimination abilities are improved by long-run olfactory enrichment until late ages.

Assessment of the discrimination of Decanal and 2-Dodecanone at different ages (12, 15 and 18 months) in the enriched and control groups of early- **(A)** and late-started **(B)** enrichment. Mice habituated to the first presented odorant (OHab), as evidenced by the significantly decreased investigation time between OHab1 and OHab4. Both early- and late-enriched mice were able to discriminate Decanal and 2-Dodecanone, as shown by the significantly increased investigation time between OHab4 and OTest (Ai-Aiii, Bi-Bii) and displayed higher discrimination indices when compared to their respective controls (Aiv, Biii). Data are presented as mean investigation time or mean discrimination indices \pm standard error of the mean. 2 months: n=28. 12 months: n=15 for the early control group, n=17 for the early enriched group, n=30 for the late group. 15 months: n=14 for the early control group, n=16 for the early enriched group, n=15 for the late control group, n=15 for the

late enriched group. 18 months: n=12 for the early control group, n=15 for the early enriched group, n=13 for the late control group, n=13 for the late enriched group. * p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.001

Table 2: Detailed statistical analysis related to Figure 2

Enrichment	Age	Mice group	Odorants (related Fig)	Friedman	Pairwise Nemenyi	
				OOHab1-4 + OTest	OHab1 vs OHab4	OHab4 vs OTest
EARLY	2 months	(n=28)	Decanal / 2-Dodecanone (Fig.2)	chi-squared = 48.537, df = 4, p-value = 7.294e-10	p-value = 1.5e-08 ***	p-value = 0.576 ns
	12 months	Control (n=15)		chi-squared = 33.458, df = 4, p-value = 9.623e-07	p-value = 9.1e-06 ***	p-value = 0.0318 *
		Enriched (n=17)		chi-squared = 45.558, df = 4, p-value = 3.044e-09	p-value = 1.7e-07 ***	p-value = 5.1e-05 ***
	15 months	Control (n=14)		chi-squared = 12.849, df = 4, p-value = 0.01204	p-value = 0.011 *	p-value = 0.848 n.s.
		Enriched (n=16)		chi-squared = 38.843, df = 4, p-value = 7.507e-08	p-value = 2.7e-06 ***	p-value = 0.0032 **
	18 months	Control (n=12)		chi-squared = 26.689, df = 4, p-value = 2.297e-05	p-value = 0.0002 ***	p-value = 0.7731 n.s.
Enriched (n=15)		chi-squared = 46.14, df = 4, p-value = 2.303e-09	p-value = 6.6e-05 ***	p-value = 3.7e-06 ***		
LATE	12 months	(n=30)	chi-squared = 45.683, df = 4, p-value = 2.867e-09	p-value = 1.4e-07 ***	p-value = 0.26569 ns	
	15 months	Control (n=15)	chi-squared = 27.947, df = 4, p-value = 1.279e-05	p-value = 0.00082 ***	p-value = 0.63693 n.s.	
		Enriched (n=15)	chi-squared = 43.278, df = 4, p-value = 9.062e-09	p-value = 1.6e-05 ***	p-value = 2.9e-05 ***	
	18 months	Control (n=13)	chi-squared = 27.969, df = 4, p-value = 1.265e-05	p-value = 7.8e-05 ***	p-value = 0.4893 ns	
		Enriched (n=13)	chi-squared = 35.508, df = 4, p-value = 3.653e-07	p-value = 0.00041 ***	p-value = 0.00041 ***	

DISCRIMINATION INDICES			2-way ANOVA	Pairwise t.test corrected with Holm for multiple comparisons
Enrichment	Age	n=	Decanal / 2-Dodecanone	NE vs E
EARLY	12 months	Control : 15 Enriched : 17	Normal distribution of the data, but no homocedasticity → Pairwise t.test with Welch correction	p-value = 0.05484 n.s.
	15 months	Control : 14 Enriched : 16		p-value = 0.04083 *
	18 months	Control : 12 Enriched : 15		p-value = 2.67e-05 ***
LATE	15 months	Control : 15 Enriched : 15	enrichment effect F(1,52)=15.2594, p= 0.0002719 *** age effect F(1,52)=0.2325, p= 0.6317286 interaction enrichment x age F(1,52)=0.0028, p=0.9581686	p-value = 0.01 **
	18 months	Control : 13 Enriched : 13		p-value = 0.0096 ***

Figure 3: Spatial memory is improved by long-run olfactory enrichment.

(A) Schematic of the procedure used in the Object Location Task (OLT). Displaced object, object location and displacement, and retention delays were randomized among the mice and the sessions. **(B-C)** Preference index assessed before the beginning of the enrichment (pre-test at 2 or 12 months) and at different ages (12, 15 and 18 months) in the enriched and control groups of early- **(B)** and late-started **(C)** enrichment. A preference index significantly greater than 50% indicates that mice remember the initial position of the object. A deficit for the 60 min delay appears as early as middle age and can be partially prevented through long-run olfactory enrichment. Further aging leads to impaired spatial memory for all tested delays. The benefits of long-run olfactory enrichment are maintained up to late ages. Data are presented as mean preference index \pm standard error of the mean. Number of samples are reported in Table2. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

Table 2: Detailed statistical analysis related to Figure 3

Enrichment	Age	Mice group	5 min		15 min		60 min	
			n =	Wilcoxon, p-value	n =	Wilcoxon, p-value	n =	Wilcoxon, p-value
EARLY	2 months		29	V = 322, p-value = 0.01145 *	30	V = 334, p-value = 0.006066 **	28	V = 405, p-value = 2.231e-06 ***
		12 months	Control	15	V = 120, p-value = 3.052e-05 ***	15	V = 111, p-value = 0.001007 **	15
	Enriched		15	V = 119, p-value = 6.104e-05 ***	17	V = 149, p-value = 5.341e-05 ***	17	V = 129, p-value = 0.005493 **
	15 months	Control	12	V = 68, p-value = 0.0105 *	14	V = 89, p-value = 0.01013 *	14	V = 67, p-value = 0.1897 n.s.
		Enriched	14	V = 104, p-value = 0.0006815 ***	15	V = 95, p-value = 0.02396 *	16	V = 76, p-value = 0.3529 n.s.
	18 months	Control	12	V = 52, p-value = 0.3424 n.s.	13	V = 68, p-value = 0.0636 n.s.	12	V = 54, p-value = 0.1273 n.s.
		Enriched	12	V = 78, p-value = 0.0002441 ***	14	V = 105, p-value = 6.104e-05 ***	15	V = 107, p-value = 0.004107 **
	LATE	12 months		32	V = 521, p-value = 4.424e-09 ***	30	V = 441, p-value = 9.415e-06 ***	32
15 months		Control	15	V = 109, p-value = 0.001678 **	11	V = 41, p-value = 0.2598 n.s.	10	V = 32, p-value = 0.3408 n.s.
		Enriched	13	V = 86, p-value = 0.001221 **	14	V = 96, p-value = 0.002014 **	13	V = 32, p-value = 0.5531 n.s.
18 months		Control	12	V = 42, p-value = 0.425 n.s.	13	V = 82, p-value = 0.004028 **	12	V = 61, p-value = 0.04614 *
		Enriched	14	V = 104, p-value = 0.0001221 ***	12	V = 74, p-value = 0.001709 **	10	V = 36, p-value = 0.2158 n.s.

Univariate Wilcoxon tests were used to compare the preference index to 50%.

Figure 4: Associative learning and cognitive flexibility

Evolution of the success rate in the olfactory associative task during the acquisition of the first rule (D1-D5) and after the reversal of the rule (R1-R5) for the conditioned groups. Mice were tested before the beginning of the enrichment (pre-tests) and at different ages (12, 15 and 18 months) in the enriched and control groups of early- (**A**) and late-started (**B**) enrichment. Data are presented as mean success rate \pm standard error of the mean. Number of samples are provided in Table 3. § $p < 0.05$; §§ $p < 0.01$; §§§ $p < 0.001$ for comparisons between days. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ for comparisons to 50% (chance level).

Table 3: Detailed statistical analysis related to Figure 4

Enrichment	Age	Mice group	n =	1st rule		reversed rule		> 50%	Drop on rule reversal
				day effect, Friedman	D1 vs last day (\$)	day effect Friedman	R1 vs last day (\$)	Wilcoxon p-value (*)	D last vs R1, Wilcoxon p-value (\$)
EARLY	2 months		17	chi-squared = 40.349, df = 4, p-value = 3.666e-08	7.9e-06 §§§	chi-squared = 39.31, df = 3, p-value = 1.492e-08	3.1e-07 §§§	D5 : p=0.0001264162 R2 : p=0.0388357715 R3 : p=0.0004487514 R4 : p=0.0001018007	V = 136, p-value = 0.0004116 §§§
	12 months	Control	8	chi-squared = 16.686, df = 4, p-value = 0.002224	0.022 §	chi-squared = 18.825, df = 4, p-value = 0.0008505	0.028 §	D4 : p=0.049726740 D5 : p= 0.005987952 R5 : p=0.039223798	V = 21, p-value = 0.03451 §
		Enriched	9	chi-squared = 16.062, df = 4, p-value = 0.002936	0.037 §	chi-squared = 17.86, df = 4, p-value = 0.001314	0.0071 §§	D5 : p=0.02336987 R5 : p=0.02053845	V = 36, p-value = 0.01298 §
	15 months	Control	6	chi-squared = 12.231, df = 3, p-value = 0.006633	0.0095 §§	chi-squared = 9.2, df = 3, p-value = 0.02675	0.066 ns	D3 : p=0.04733536 D4 : p=0.01313415 R4 : p=0.01527242	V = 10, p-value = 0.09751 ns
		Enriched	7	chi-squared = 10.902, df = 3, p-value = 0.01227	0.081 ns	chi-squared = 12.429, df = 3, p-value = 0.00605	0.020 §	D4 : p= 0.03630047 R4 : p=0.02305675	V = 21, p-value = 0.03451 §
	18 months	Control	8	chi-squared = 14.647, df = 4, p-value = 0.005493	0.036 §	chi-squared = 8.4286, df = 4, p-value = 0.07708	-	D5 : p=0.04846909 R4 : p=0.04313778	V = 26, p-value = 0.04983 §
		Enriched	9	chi-squared = 8.3364, df = 4, p-value = 0.08	-	chi-squared = 21.944, df = 4, p-value = 0.0002056	0.012 §	D5 : p=0.022855634 R4 : p=0.005769994 R5 : p= 0.003463305	V = 36, p-value = 0.01287 §
	LATE	12 months		15	chi-squared = 33, df = 4, p-value = 1.194e-06	3.1e-05 §§§	chi-squared = 22.595, df = 3, p-value = 4.905e-05	0.00045 §§§	D4 : p=0.0161727902 D5 : p= 0.0006109972 R2 : p= 0.0012104204 R3 : p=0.0005234558 R4 : p=0.0003583362
15 months		Control	8	chi-squared = 5.3043, df = 2, p-value = 0.0705	-	chi-squared = 13.188, df = 4, p-value = 0.01039	0.022 §	D1 : p=0.018444213 D2 : p=0.009611013 D3 : p=0.009611013 R3 : p=0.035379907 R4 : p=0.035379907 R5 : p=0.020033398	V = 36, p-value = 0.01321 §

		Enriched	8	chi-squared = 5.5455, df = 2, p-value = 0.06249	-	chi-squared = 22.387, df = 4, p-value = 0.0001678	0.0034 §§	D2 : p=0.023056749 D3 : p=0.005139131 R3 : p=0.016007429 R4 : p=0.005769994 R5 : p=0.005769994	V = 28, p-value = 0.02107 §
18 months		Control	7	chi-squared = 10.687, df = 4, p-value = 0.03032	0.44 ns	-	-	All p > 0.05	-
		Enriched	6	chi-squared = 4.9375, df = 4, p-value = 0.2938	-	-	-	All p > 0.05	-

p-values for pairwise comparisons using Nemenyi multiple comparison test for D1 vs last day of training or R1 vs last day of reversed training. Only statistical values corresponding to the last day of each rule are represented on the graphs.

Figure 5: No impact of long-run olfactory enrichment on the integrity of the Locus Coeruleus.

Phox2a and TH double immunolabeling allowed to analyze the integrity of the Locus Coeruleus. **(A)** Example of a Phox2a+/TH- neuron (arrowhead) and a Phox2a+/TH+ neuron (arrow). Quantification of Phox2a+ cell density **(Bi)**, TH+ cell density **(Bii)**, Phox2a+/TH+ double-labeled cells **(Biii)** and TH intensity **(C)** in the Locus Coeruleus revealed no difference between early and late-enriched mice and their respective control group. Data represent the mean \pm SEM. Dots represent data from individual mice. n=4-6 animals/group (27-146 cells/animal for Phox2a/TH). Scale bar = 40 μ m.

Figure 6: Local increase of noradrenergic innervation in the aged brain following long-run olfactory enrichment positively correlates with behavioral performances.

Norepinephrine transporter (NET) immunolabeling allowed to visualize NA fibers within the granule cell layer of the olfactory bulb **(Ai)**, the hippocampus **(Bi)** and the OFC **(Ci)**. Quantification of the area occupied by NET-positive fibers in the olfactory bulb **(Aii)**, CA1, dentate gyrus and CA3 of the hippocampus **(Bii)** and LO **(Cii)** of enriched and control mice. Data represent the mean \pm SEM. Dots represent data from individual mice. n=10-12 animals/group for pooled controls and enriched groups. Significant positive linear correlations were found between the NA innervation in the OB and the discrimination index for the Dec/Dodec pair **(Di)** and between the NA innervation in the dorsal hippocampal CA1 and the preference index for the 5-min-delay **(Dii)**. *p<0.05. DG: Dentate Gyrus; Gr: granule cell layer of the OB; LO: Lateral Orbital cortex, OFC: OrbitoFrontal Cortex. Scale bar = 20 μ m

Figure 7: Long-run olfactory enrichment had no impact on adult neurogenesis in the aged olfactory bulb and hippocampal dentate gyrus.

(A) Evaluation of adult-born granule cell density in the OB: representative image of BrdU+ cells in the OB granule cell layer (Ai, arrows) and quantification in early- or late-enriched mice and their respective controls (Aii). n=4-6 animals/ group. **(B)** Evaluation of neuronal differentiation and recruitment of OB adult-born granule cells: representative images of a BrdU+/NeuN+/c-Fos- neuron (Bi, arrowhead) and a BrdU+/NeuN+/c-Fos+ neuron (Bi, arrow). Quantification in early- and late-enriched mice and their respective controls is shown for the percentage of NeuN+ neurons among BrdU+ adult-born cells (Bi). 30-41 cells/animal, n=5-6 animals/group. Quantification in early- and late-enriched mice and their respective controls is shown for the proportion of c-Fos+ cells among BrdU+/NeuN+ adult-born neurons (Biii). The table presents the total number of cells counted in each group (number of triple positive cells / number of BrdU+/NeuN+ cells, 2-3 animals/group), on which proportion test was performed. **(C)** Evaluation of adult neurogenesis in the dentate gyrus: representative image of a DCX+ cell in the granule cell layer of the dentate gyrus (Ci) and quantification of DCX+ cell density in early- or late-enriched mice and their respective controls (Cii). n=4-6 animals/ group. Data represent the mean \pm SEM. Dots represent data from individual mice. Scale bars = 20 μ m.

Table 4: Detailed statistical analysis related to Figures 5 and 7

		2-way ANOVA
Fig.5	Phox2A+ cell density	enrichment effect $F_{(1,16)}=0.6438$, $p=0.4341$ onset of the enrichment $F_{(1,16)}=0.0295$, $p=0.8658$ interaction enrichment x onset $F_{(1,16)}=0.0779$, $p=0.7837$
	TH+ cell density	enrichment effect $F_{(1,16)}= 1.0850$, $p=0.3131$ onset of the enrichment $F_{(1,16)}=0.0005$, $p=0.9818$ interaction enrichment x onset $F_{(1,16)}=0.1809$, $p=0.6763$
	Phox2A+/TH+ cell percentage	enrichment effect $F_{(1,16)}=1.4386$, $p=0.2478$ onset of the enrichment $F_{(1,16)}=1.6375$, $p=0.2189$ interaction enrichment x onset $F_{(1,16)}=0.3852$, $p=0.5436$
	TH intensity	enrichment effect $F_{(1,16)}= 1.2485$, $p=0.27938$ onset of the enrichment $F_{(1,16)}=3.7019$, $p=0.07126$ interaction enrichment x onset $F_{(1,16)}=0.0421$, $p=0.83977$
Fig.7	BrdU+ cell density	enrichment effect $F_{(1,17)}=0.0642$, $p=0.8030$ onset of the enrichment $F_{(1,17)}=1.5372$, $p=0.2319$ interaction enrichment x onset $F_{(1,17)}=0.5287$, $p=0.4770$
	BrdU+/NeuN+ cell percentage	enrichment effect $F_{(1,18)}=0.1967$, $p=0.6627$ onset of the enrichment $F_{(1,18)}=0.1486$, $p=0.7044$ interaction enrichment x onset $F_{(1,18)}=1.9376$, $p=0.1809$

Figure 8: Brain regional activation induced by olfactory discrimination task and object location task. c-Fos+ cell densities of enriched mice for the 31 regions of interest in the olfactory discrimination task (A) and the object location task (B). Results of enriched mice are expressed as percentages of controls. Data represent the mean \pm SEM. Dots represent data from individual mice. n=5-7 animals/group. Statistical comparisons to 100% were assessed by bilateral one-sample t.test corrected for multiple comparisons. * $p<0.05$.

Table 5: Detailed statistical analysis related to Figure 8

Region	One sample t.test – corrected for multiple comparisons (Holm)	
	Discrimination (n=7)	OLT (n=5)
GL	t=2.7422090, df=6, p-value=0.907200	t=0.6372548, df=4, p-value=1.00000
GrL	t=3.2449913, df=6, p-value=0.528000	t=0.1241422, df=4, p-value=1.00000
AOB	t=-0.3831990, df=6, p-value=1.000000	t=-0.4577025, df=4, p-value=1.00000
AON	t=-0.0722482, df=6, p-value=1.000000	t=0.3727057, df=4, p-value=1.00000
TT	t=0.2736880, df=6, p-value=1.000000	t=-3.9612859, df=4, p-value=0.50100
Pir	t=-0.9977609, df=6, p-value=1.000000	t=2.0621155, df=4, p-value=1.00000
Tu	t=1.0302920, df=6, p-value=1.000000	t=1.4386105, df=4, p-value=1.00000
ACo	t=-0.5805701, df=6, p-value=1.000000	t=-0.7252736, df=4, p-value=1.00000
LOT	t=-0.3017819, df=6, p-value=1.000000	t=-0.2767281, df=4, p-value=1.00000
PLCo	t=1.0232356, df=6, p-value=1.000000	t=-0.1020341, df=4, p-value=1.00000
CC	t=0.1806945, df=6, p-value=1.000000	t=-0.4083695, df=4, p-value=1.00000
Fr	t=-6.4513016, df=6, p-value=0.020367 *	t=0.2010182, df=4, p-value=1.00000
IC	t=-2.9878986, df=6, p-value=0.707600	t=0.8432099, df=4, p-value=1.00000
LO	t=-1.6711252, df=6, p-value=1.000000	t=-0.7635747, df=4, p-value=1.00000
DLO	t=-1.0197380, df=6, p-value=1.000000	t=-0.9306547, df=4, p-value=1.00000
MO	t=-2.4887956, df=6, p-value=1.000000	t=-1.6440735, df=4, p-value=1.00000
VO	t=-0.9579011, df=6, p-value=1.000000	t=0.1600005, df=4, p-value=1.00000
LSN	t=1.4647771, df=6, p-value=1.000000	t=7.0724911, df=4, p-value=0.06541
MSN	t=-2.9580096, df=6, p-value=0.708400	t=-0.3137590, df=4, p-value=1.00000
EC	t=-1.0874535, df=6, p-value=1.000000	t=0.1770284, df=4, p-value=1.00000
dDG	t=0.5844792, df=6, p-value=1.000000	t=-0.1809796, df=4, p-value=1.00000
dCA3	t=0.3769388, df=6, p-value=1.000000	t=-0.3991831, df=4, p-value=1.00000

dCA1	t=0.5424153, df=6, p-value=1.000000	t=-1.4986547, df=4, p-value=1.000000
LHb	t=0.6111451, df=6, p-value=1.000000	t=0.8477874, df=4, p-value=1.000000
MC	t=-0.7003207, df=6, p-value=1.000000	t=-0.4409766, df=4, p-value=1.000000
CPu	t=0.1660283, df=6, p-value=1.000000	t=2.0540285, df=4, p-value=1.000000
PC	t=0.8361551, df=6, p-value=1.000000	t=-0.6314042, df=4, p-value=1.000000
S1	t=-0.2814966, df=6, p-value=1.000000	t=-0.0264315, df=4, p-value=1.000000
AC	t=0.6799859, df=6, p-value=1.000000	t=-0.4709355, df=4, p-value=1.000000
HDB	t=-0.5289393, df=6, p-value=1.000000	t=1.5259671, df=4, p-value=1.000000
LC	t=-0.5608465, df=6, p-value=1.000000	t=0.1580401, df=4, p-value=1.000000

Figure 9: Task-dependent reorganization of functional networks following long-run olfactory enrichment.

Functional networks were analyzed in controls (left column) and enriched animals (right column) in the olfactory discrimination task **(A-C)** and the object location task **(D-F)**. **(A, D)** Matrices representing all inter-regional correlations (without any thresholding). Axes correspond to brain structures and colors reflect correlation strength (with positive correlations in red and negative correlations in blue). **(B, E)** Networks representing correlations between regions. Graphs were generated by considering only the strongest correlations (Pearson's $r \geq 0.82$, $p \leq 0.025$). The thickness of the connection line is proportional to the correlation strength and the node size is proportional to the node's degree (number of connections). Graphics on the right represent the percentage of correlations within or between systems among the effective correlations in each group. Statistical analyses were assessed by bilateral proportion tests. * $p < 0.05$. **(C)** Other representation of the networks organized into discrete color-coded clusters (pink, green, blue, yellow) based on their common inter-connections using the Markov clustering algorithm. Regions that are not correlated at all are represented in grey. Network hubs are circled in black.

Table 6: Detailed statistical analysis related to Figure 9

		2-sample test for equality of proportions
Discrimination	intra-olfac	X-squared = 3.616, df = 1, p-value = 0.05722
	intra-PFC	X-squared = 6.9844, df = 1, p-value = 0.008222 **
	LC-PFC	X-squared = 7.5705, df = 1, p-value = 0.005933 **
OLT	intra-mem.	X-squared = 0.41837, df = 1, p-value = 0.5178
	mem.-all	X-squared = 4.5096, df = 1, p-value = 0.03371 *
	LC-all	X-squared = 1.4235, df = 1, p-value = 0.2328

SUPPLEMENTARY FIGURE LEGENDS

Figure S1: Fine olfactory discrimination abilities are improved by long-run olfactory enrichment.

Assessment of the discrimination of + Limonene and - Limonene at 18 months in the enriched and control groups after early- **(A)** and late-started **(B)** enrichment. All groups habituated to the first presented odorant (OHab), as evidenced by the significantly decreased investigation time between OHab1 and OHab4. Both early- and late-enriched groups were able to discriminate + Limonene and - Limonene, as shown by the significantly increased investigation time between OHab4 and OTest (Ai, Bi). Both early- and late-enriched mice displayed higher discrimination indices when compared to their respective controls (Aii, Bii).

Data are presented as mean investigation time or mean discrimination indices \pm standard error of the mean. n=13 for the early-control group, n=14 for the early-enriched group, n=14 for the late-control group, n=14 for the late-enriched group. * p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.001

Table S1: Detailed statistical analysis related to Figure S1

INVESTIGATION TIME				Friedman	Pairwise Nemenyi	
Enrichment	Age	Mice group	Odorants (related Fig)	OHab1-4 + OTest	OHab1 vs OHab4	OHab4 vs OTest
EARLY	18 months	Control (n=13)	+ Limonene / - Limonene (Fig.S1)	chi-squared = 23.877, df = 4, p-value = 8.454e-05	p-value = 7.8e-05 ***	p-value = 0.7277 n.s.
		Enriched (n=14)		chi-squared = 32.475, df = 4, p-value = 1.53e-06	p-value = 1.7e-05 ***	p-value = 0.00593 **
LATE	18 months	Control (n=14)		chi-squared = 30, df = 4, p-value = 4.894e-06	p-value = 3.1e-05 ***	p-value = 0.065 n.s.
		Enriched (n=14)		chi-squared = 32.857, df = 4, p-value = 1.278e-06	p-value = 9.5e-05 ***	p-value = 0.0073 ***

DISCRIMINATION INDICES			Unpaired bilateral two samples Wilcoxon test comparing control to enriched mice
Enrichment	Age	n=	+/- Lim
EARLY	18 months	Control : 13	W = 38, p-value = 0.005303 **
		Enriched : 14	
LATE	18 months	Control : 14	W = 61, p-value = 0.04667 *
		Enriched : 14	

Figure S2: Gross discrimination abilities are maintained during aging and are not modulated by long-run olfactory enrichment.

Assessment of the discrimination of Propyl Acetate and Hexyl Acetate at different ages (12, 15 and 18 months) in the enriched and control groups of early- **(A)** and late-started **(B)** enrichment. All groups habituated to the first presented odorant (OHab), as evidenced by the significantly decreased investigation time between OHab1 and OHab4. All groups were also able to discriminate Propyl Acetate and Hexyl Acetate, as shown by the significantly increased investigation time between OHab4 and OTest (Ai-Aiii and Bi-Bii) and the similar discrimination indices of control and enriched mice (Aiv, Biii).

Data are presented as mean investigation time or discrimination indices \pm standard error of the mean. 2 months: n=28. 12 months: n=13 for the early-control group, n=16 for the early-enriched group, n=30 for the late-enriched group. 15 months: n=14 for the early-control group, n=16 for the early-enriched group, n=14 for the late-control group, n=14 for the late-enriched group. 18 months: n=14 for the early-control group, n=15 for the early-enriched group, n=14 for the late-control group, n=13 for the late-enriched group. *** p<0.001

Table S2: Detailed statistical analysis related to Figure S2

INVESTIGATION TIME				Friedman	Pairwise Nemenyi	
Enrichment	Age	Mice group	Odorants (related Fig)	OHab1-4 + OTest	OHab1 vs OHab4	OHab4 vs OTest
EARLY	2 months	(n=28)	Propyl/Hexyl (Fig.S2)	chi-squared = 33.187, df = 4, p-value = 1.094e-06	p-value = 6e-05 ***	p-value = 0.00013 ***
	12 months	Control (n=13)		chi-squared = 44.369, df = 4, p-value = 5.377e-09	p-value = 0.00024 ***	p-value = 3.6e-06 ***
		Enriched (n=16)		chi-squared = 38.734, df = 4, p-value = 7.908e-08	p-value = 3.4e-05 ***	p-value = 5.1e-05 ***
	15 months	Control (n=14)		chi-squared = 33.714, df = 4, p-value = 8.528e-07	p-value = 5.5e-05 ***	p-value = 5.1e-06 ***
		Enriched (n=16)		chi-squared = 29.981, df = 4, p-value = 4.938e-06	p-value = 0.00087 ***	p-value = 0.00021 ***
	18 months	Control (n=14)		chi-squared = 35.082, df = 4, p-value = 4.468e-07	p-value = 0.00386 **	p-value = 0.00021 ***
Enriched (n=15)		chi-squared = 31.211, df = 4, p-value = 2.773e-06	p-value = 3.8e-05 ***	p-value = 0.00031 ***		
LATE	12 months	(n=30)	chi-squared = 76.884, df = 4, p-value = 7.956e-16	p-value = 5.0e-12 ***	p-value = 4.2e-09 ***	
	15 months	Control (n=14)	chi-squared = 29.09, df = 4, p-value = 7.496e-06	p-value = 0.0020 **	p-value = 0.1178 n.s.	
		Enriched (n=14)	chi-squared = 35.829, df = 4, p-value = 3.138e-07	p-value = 1.7e-05 ***	p-value = 9.5e-05 ***	
	18 months	Control (n=14)	chi-squared = 36.659, df = 4, p-value = 2.117e-07	p-value = 3.1e-05 ***	p-value = 0.00028 ***	
		Enriched (n=13)	chi-squared = 38.892, df = 4, p-value = 7.333e-08	p-value = 0.00024 ***	p-value = 3.6e-06 ***	

DISCRIMINATION INDICES			pairwise bilateral unpaired Wilcoxon test, corrected with Holm for multiple comparisons
Enrichment	Age	n=	Propyl/Hexyl
EARLY	12 months	Control : 13 Enriched : 16	p-value = 1
	15 months	Control : 14 Enriched : 16	p-value = 1
	18 months	Control : 14 Enriched : 15	p-value = 1
LATE	15 months	Control : 14 Enriched : 14	p-value=0.27
	18 months	Control : 14 Enriched : 13	p-value=0.65

Figure S3: Comparison of the exploration times of the displaced and non-displaced objects confirms the improved spatial memory in enriched mice.

(A-B) Exploration of the two objects during the retention trial was assessed before the beginning of the enrichment (pre-test at 2 or 12 months) and at different ages (12, 15 and 18 months) in the enriched and control groups of early- **(A)** and late-started **(B)** enrichment. A significantly longer exploration of the displaced object indicates when the group remembers the object location. Data are presented as mean exploration time \pm standard error of the mean. Sample numbers are reported in Table 2. Comparison between displaced and non-displaced objects is performed by paired 2-samples Wilcoxon tests. **(C-D)** Total exploration time during the acquisition trial was assessed before the beginning of the enrichment (pre-test at 2 or 12 months) and at different ages (12, 15 and 18 months) in the enriched and control groups of early- **(C)** and late-started **(D)** enrichment. Data are presented as mean total exploration time \pm standard error of the mean. Sample numbers are reported in Table 2. The effect of age was investigated by Kruskal-Wallis followed by *post hoc* pairwise Wilcoxon tests. Wilcoxon tests revealed no effect of enrichment whatever the age of the mice. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; ns non significant

Figure S4: Positive linear correlation between olfactory discrimination and spatial memory performances.

Significant positive linear correlation was found between the discrimination index for the Dec/Dodec pair and the preference index for the 5-min-delay. *** $p < 0.001$.

Figure S5: Pseudo-conditioned mice are unable to learn to perform the olfactory associative learning task.

Evolution of the success rate in the olfactory associative task during the acquisition of the first rule (D1-D5) and after the reversal of the rule (R1-R5) for the pseudo-conditioned groups. Mice were tested before the beginning of the enrichment (pre-tests) and at different ages (12, 15 and 18 months) in the enriched and control groups of early- **(A)** and late-started **(B)** enrichment. Number of samples is provided in Table S4. § $p < 0.05$; §§ $p < 0.01$; §§§ $p < 0.001$ for comparisons between days. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ for comparisons to 50% (chance level).

Table S4: Detailed statistical analysis related to Figure S5

Enrichment	Age	Mice group	n =	1st rule		reversed rule		> 50%	Drop on rule reversal
				day effect, Friedman	D1 vs last day (\$)	day effect Friedman	R1 vs last day (\$)	Wilcoxon p-value (*)	D last vs R1, Wilcoxon p-value (\$)
EARLY	2 months		15	chi-squared = 17.041, df = 4, p-value = 0.001898	0.09454 ns	chi-squared = 1.3611, df = 3, p-value = 0.7147	-	D3 : p=0.002717034 D5 : p=0.042861298	V = 38.5, p-value = 0.266 ns
	12 months	Control	7	chi-squared = 3.1765, df = 4, p-value = 0.5287	-	chi-squared = 2.7347, df = 4, p-value = 0.6032	-	All p >0.05	V = 6, p-value = 0.7835 ns
		Enriched	8	chi-squared = 9.9259, df = 4, p-value = 0.04169	0.147 ns	chi-squared = 6.5631, df = 4, p-value = 0.1609	-	All p >0.05	V = 8, p-value = 0.6707 ns
	15 months	Control	8	chi-squared = 4.1, df = 3, p-value = 0.2509	-	chi-squared = 3.1579, df = 3, p-value = 0.3679	-	All p >0.05	V = 8, p-value = 0.6653 ns
		Enriched	9	chi-squared = 5.4762, df = 3, p-value = 0.1401	-	chi-squared = 3.7164, df = 3, p-value = 0.2938	-	All p >0.05	V = 13, p-value = 0.9309 ns
	18 months	Control	6	chi-squared = 6.8738, df = 4, p-value = 0.1427	-	chi-squared = 2.2338, df = 4, p-value = 0.6929	-	All p >0.05	V = 12.5, p-value = 0.2207 ns
		Enriched	7	chi-squared = 11.964, df = 4, p-value = 0.01762	0.102 ns	chi-squared = 6.4587, df = 4, p-value = 0.1674	-	All p >0.05	V = 6, p-value = 0.8501 ns
	LATE	12 months		17	chi-squared = 6.0758, df = 4, p-value = 0.1936	-	chi-squared = 6.609, df = 3, p-value = 0.08546	-	R1 : p=0.0006109972 R2 : p=0.0117052981
15 months		Control	7	chi-squared = 0.56, df = 2, p-value = 0.7558	-	chi-squared = 4.6914, df = 4, p-value = 0.3205	-	All p >0.05	V = 10.5, p-value = 1 ns
		Enriched	6	chi-squared = 4.6667, df = 2, p-value = 0.09697	-	chi-squared = 3.6436, df = 4, p-value = 0.4564	-	D3 : p=0.03593032	V = 12.5, p-value = 0.2031 ns
18 months		Control	7	chi-squared = 6.6316, df = 4, p-value = 0.1567	-	-	-	All p >0.05	-

		Enriched	8	chi-squared = 3.697, df = 4, p-value = 0.4486	-	-	-	All p > 0.05	-
--	--	----------	---	---	---	---	---	--------------	---

p-values for pairwise comparisons using Nemenyi multiple comparison test for D1 vs last day of training or R1 vs last day of reversed training. Only statistical values corresponding to the last day of each rule are represented on the graphs.

Figure S6: The olfactory discrimination network displays a small-world organization, but not the object location network.

(A) Histogram showing the degree distribution for each task and each group (control and enriched). **(B)** Mean clustering coefficient was measured to assess the segregation of our networks. **(C)** Global efficiency was measured to assess the integration of our networks. Each parameter is compared between the experimental network and a random network. Error bars represent 95% confidence intervals.

Figure S7: Identification of hub regions in olfactory discrimination networks.

Hub regions (red) were identified as regions ranked above the 80th percentile (red dashed line) for betweenness **(A)** and degree **(B)**, for each group (control and enriched).

DISCUSSION

Au-delà de toute pathologie neurodégénérative liée à l'âge, le vieillissement cérébral normal s'accompagne de changements fonctionnels et structuraux entraînant des altérations de l'intégrité cérébrale et du traitement de l'information. Cela conduit à un déclin des performances sensorielles, motrices et cognitives au cours du temps, affectant la qualité de vie et la santé des sujets âgés. L'objectif général de cette thèse était de mieux comprendre et d'améliorer le traitement des odeurs par le cerveau vieillissant.

Pour cela, dans une première étude, nous avons cherché à avancer dans la compréhension des mécanismes cellulaires sous-tendant le vieillissement olfactif, en conditions basales et dans des conditions sollicitant la plasticité, à travers le modèle de l'apprentissage perceptif olfactif. Nous avons étudié plus finement la cinétique d'apparition des déficits d'apprentissage perceptif olfactif au cours de la vie de la souris (de 2 à 18 mois) et d'altération de la neurogenèse bulbaire adulte. Nos résultats ont montré que la plasticité structurale induite par l'apprentissage perceptif olfactif est spécifique des nouveaux neurones répondant aux odorants appris chez la souris jeune adulte. Nous avons également montré qu'à l'âge intermédiaire (12 mois), cette plasticité structurale perd sa spécificité et cela s'accompagne d'un déficit de rétention à long-terme de la discrimination acquise (Figure 11).

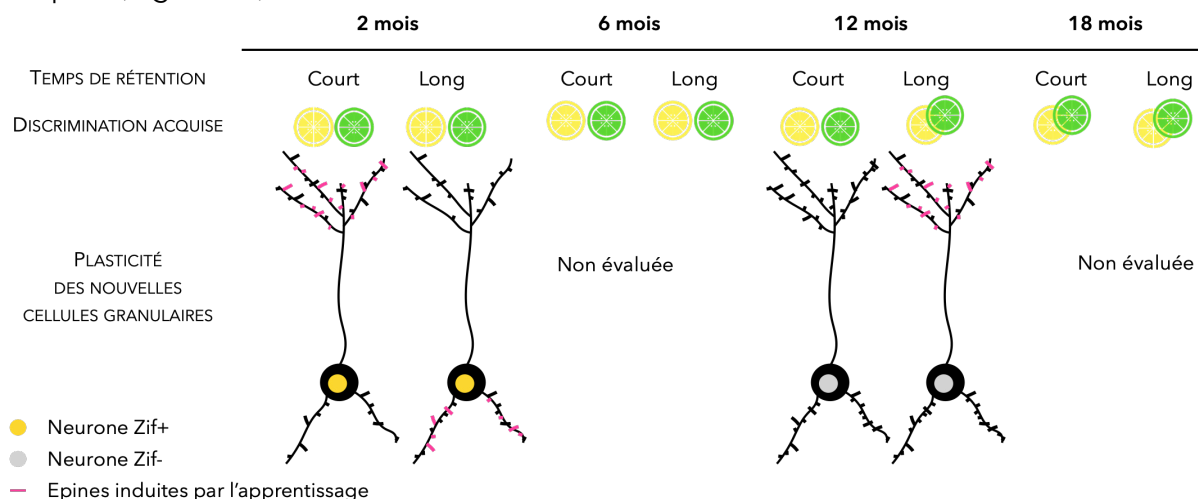


Figure 11. Schéma récapitulatif des résultats de l'étude 1.

L'apprentissage perceptif olfactif permet de discriminer les 2 odorants à la suite de l'exposition répétée à ceux-ci (ex : citron vert et citron jaune). Cet apprentissage est possible jusqu'à l'âge de 12 mois et est altéré à 18 mois. La rétention de cet apprentissage est en revanche altérée plus précocement, dès 12 mois. Chez les souris jeunes adultes (2 mois), cet apprentissage induit une augmentation de la densité d'épines dendritiques apicales et basales spécifiquement dans les nouvelles cellules granulaires qui répondent aux odorants appris (Zif+). Chez les souris d'âge moyen (12 mois), nous observons une augmentation de la densité d'épines dendritiques, mais retardée et affectant tous les nouveaux neurones granulaires (ceux qui répondent et ceux qui ne répondent pas à l'odeur).

Dans une deuxième étude, nous avons développé une stratégie de remédiation du vieillissement olfactif et cérébral. Nous avons émis l'hypothèse qu'une stimulation olfactive répétée tout au long de la vie par des odorants saillants dans l'environnement serait un moyen efficace de stimuler les fonctions cognitives et de contrecarrer les effets délétères

du vieillissement, via la sollicitation répétée du système noradrénergique et le développement d'une réserve cognitive. Sur la base des données comportementales indiquant un effet bénéfique de l'enrichissement olfactif au long cours chez les souris âgées et afin d'identifier ses bases cellulaires, nous avons réalisé des analyses histologiques dans des régions du cerveau liées aux performances comportementales évaluées. Nos résultats ont révélé qu'un enrichissement olfactif tout au long de la vie améliorerait les performances de discrimination olfactive des souris jusqu'à un âge avancé. Nous avons également montré que les bénéfices de cet enrichissement s'étendent au-delà de la sphère olfactive en améliorant la flexibilité cognitive et la mémoire spatiale des souris âgées. Ces améliorations ne s'accompagnent pas de changements de la neurogenèse adulte bulbaire, un mécanisme connu pour sous-tendre l'apprentissage et la mémoire dans le bulbe olfactif chez la souris jeune. En revanche, ces améliorations s'accompagnent d'un remaniement local des fibres noradrénergiques qui corrèle avec les performances comportementales ainsi que d'un remaniement des réseaux cérébraux chez la souris âgée. Ce remaniement des réseaux cérébraux dépend de la tâche, avec des réseaux plus spécifiques sous-tendant une discrimination olfactive efficace, tandis qu'une activation cérébrale plus large sous-tendrait l'amélioration de la mémoire spatiale (Figure 12).

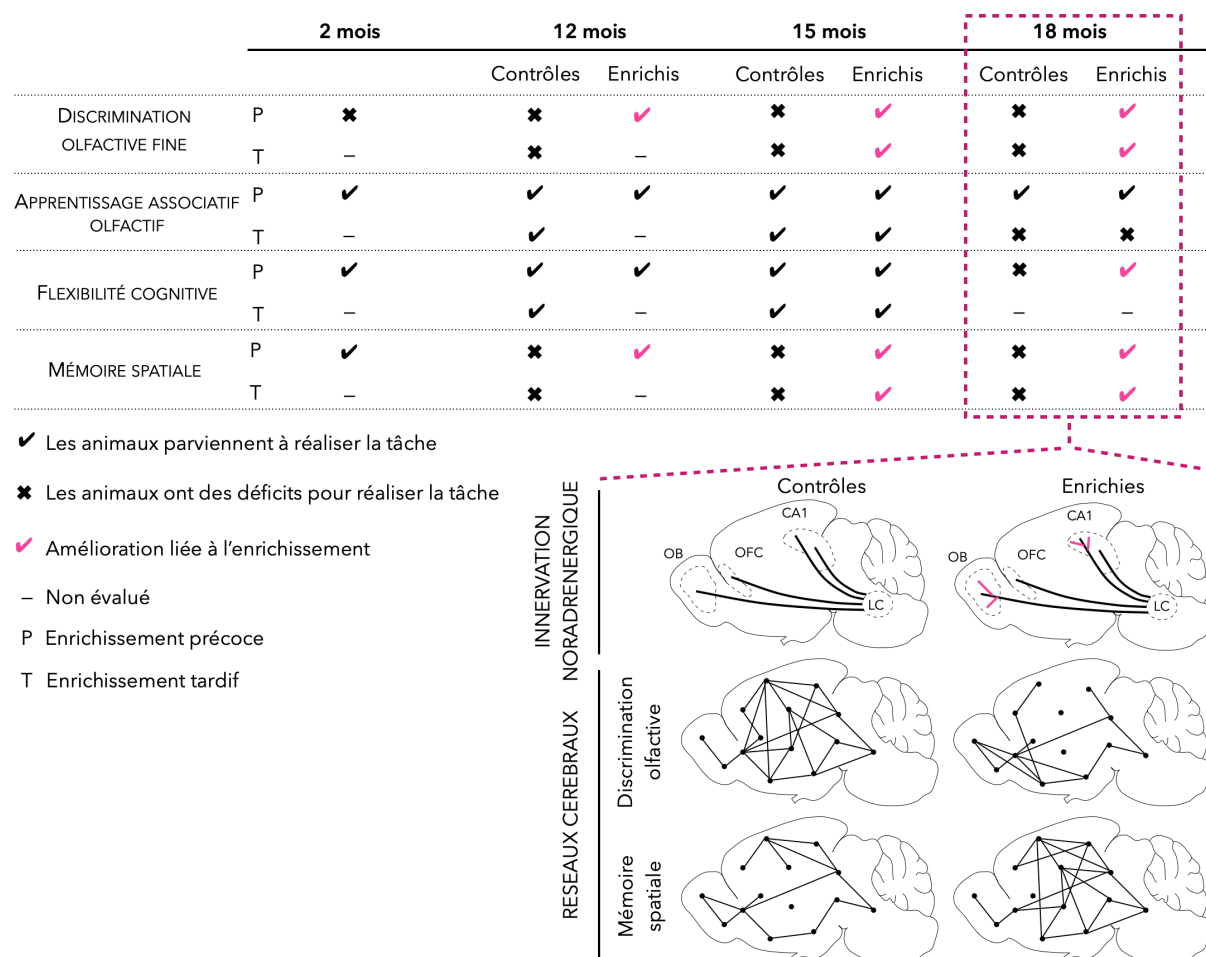


Figure 12. Schéma récapitulatif des résultats de l'étude 2.

Le tableau récapitule les performances comportementales des souris aux différents âges, dans les groupes contrôles et enrichis, qui ont commencé l'enrichissement précocement ou tardivement. Les analyses cellulaires de l'innervation noradrénergique et des réseaux cérébraux ont été réalisées sur les souris âgées de 18 mois.

1. Effets du vieillissement sur les performances olfactives et cognitives, et mécanismes sous-jacents

1.1. Dégradation progressive des performances olfactives et cognitives au cours du vieillissement

Les études portant sur le vieillissement rapportent un déclin des performances cognitives notamment de flexibilité cognitive et de mémoire lié à l'âge (Dias et al., 2015; Moffat, 2009; Nyberg et al., 2003, 2012; Rönnlund et al., 2005; Toepper, 2017; Vieweg et al., 2015), ainsi que des déficits sensoriels, notamment en olfaction (Barsz et al., 2002; Desai et al., 2001; Doty and Kamath, 2014). Alors que la chronologie d'apparition de ces troubles est assez bien connue chez l'humain, ce n'est pas le cas chez le rongeur chez qui la plupart des tests est effectuée chez les rongeurs âgés voire très âgés. Connaitre la chronologie d'apparition de ces déficits est néanmoins important pour mieux comprendre le déclin progressif des déficits olfactifs et cognitifs au cours du vieillissement et identifier les mécanismes cellulaires sous-jacents.

En ce sens, les résultats comportementaux de nos deux études complètent et précisent les données existantes sur l'effet du vieillissement sur la perception olfactive et les capacités d'apprentissage olfactif. Dans notre première étude, nous montrons que les souris âgées de 2 et 6 mois sont capables d'apprendre à discriminer deux odorants similaires sur le plan perceptif à la suite de l'exposition répétée à ces odorants (apprentissage perceptif olfactif) et retiennent cet apprentissage à long terme (au moins 40 jours après la fin de l'enrichissement). En accord avec des précédents résultats de l'équipe, nous montrons que ces capacités d'apprentissage sont altérées chez la souris âgée de 18 mois (Moreno et al., 2014). Nos données apportent des informations supplémentaires sur la cinétique d'apparition de ces troubles d'apprentissage perceptif olfactif : à l'âge moyen (12 mois), les capacités d'apprentissage sont préservées et les souris atteignent un niveau de performances similaire à celui des jeunes adultes. Toutefois ces animaux montrent un oubli plus précoce de ce type d'apprentissage (ils ne se souviennent plus à 40 jours). Cette altération des capacités d'apprentissage perceptif olfactif liée à l'âge ne s'explique pas par une altération des capacités globales de discrimination au cours du vieillissement. En effet, les souris âgées de 18 mois discriminent des odorants perceptivement différents, tels que le 2-dodécanone et la (+) carvone (étude 1), ainsi que le propyl acétate et l'hexyl acétate (étude 2). Ces données sont en accord avec des données précédentes de l'équipe indiquant que les souris âgées de 18 et 23 mois conservent leurs capacités basiques de discrimination (Moreno et al., 2014; Rey et al., 2012).

En accord avec les données de la littérature, nos résultats indiquent que les capacités d'apprentissage associatif sont préservées jusqu'à l'âge moyen (12 mois) (Dardou et al., 2008), et que c'est le cas un peu plus tard au cours du vieillissement à 15 mois. Nos résultats rapportent également une altération relative de l'apprentissage associatif olfactif des souris âgées de 18 mois (étude 2). Ces résultats viennent compléter des données de la littérature montrant que dans la plupart des cas les animaux âgés parviennent à associer une odeur à une récompense (Dardou et al., 2008; Kraemer and Apfelbach, 2004; Patel and Larson, 2009), toutefois la vitesse d'apprentissage des animaux âgés est généralement plus lente que celle des jeunes adultes (Dardou et al., 2008; Patel and Larson, 2009). Ainsi

dans notre étude 2, le groupe de souris âgées de 18 mois ne parvenant pas à associer l'odeur à la récompense (groupes tardifs contrôles et enrichis), une durée plus longue de d'entraînement leur aurait peut-être permis de réaliser la tâche. Des données non publiées de l'équipe avaient également noté cette incapacité d'apprentissage associatif chez des souris âgées de 22 mois pour une durée d'apprentissage similaire à la nôtre.

En plus de ces altérations des fonctions olfactives, le vieillissement normal s'accompagne d'un déclin progressif des fonctions cognitives au cours du vieillissement. Notre suivi longitudinal des performances cognitives (études 2) a montré que les capacités de flexibilité cognitive, mesurées en changeant de règle quant à l'odeur récompensée dans la tâche d'apprentissage associatif olfactif, ne sont altérées que tardivement à 18 mois. Ces résultats sont en accord avec ceux de la littérature indiquant que des rats âgés de 21-23 mois présentent des déficits de flexibilité cognitive dans une tâche de règle inversée dans la modalité olfactive (Schoenbaum et al., 2002, 2006). Ces données n'excluent pas qu'avec un temps d'entraînement supplémentaire, les souris atteindraient le critère de réussite. Cette question serait intéressante à trancher car retard ou impossibilité d'apprentissage sont vraisemblablement sous-tendus par des altérations structurales différentes et n'ouvrent pas les mêmes perspectives de remédiation. Enfin, en accord avec la littérature (Cès et al., 2018; Kwapis et al., 2018; Wimmer et al., 2012), nos résultats montrent une altération de la mémoire spatiale chez la souris âgée de 18 mois. Nos résultats apportent également une précision sur la chronologie d'apparition de ces déficits puisque nous montrons que la rétention d'une information spatiale est altérée plus précocement, dès 12 mois, pour les délais les plus longs.

Nos données pointent deux notions importantes relatives au processus de vieillissement des fonctions cérébrales. Tout d'abord, l'âge moyen (12 mois chez la souris) est un âge charnière qui voit apparaître des modifications subtiles des capacités de mémoire olfactive ou spatiale, avec un apprentissage préservé mais une rétention altérée. D'autre part, il apparaît que des tâches différentes, apprentissage perceptif (implicite) et apprentissage associatif (explicite, renforcé par une récompense) par exemple, ou tâche de flexibilité et tâche de mémoire spatiale, ne montrent pas le même décours temporel d'altération, l'apprentissage associatif étant conservé plus tardivement que l'apprentissage perceptif par exemple. Il est probable qu'à cette hétérogénéité comportementale corresponde une hétérogénéité des circuits impliqués et de leur vulnérabilité au vieillissement. Plus largement, cela renforce l'idée que le vieillissement ne forme pas un processus global et synchrone mais se déroule selon un décours spécifique à des sous-systèmes cérébraux sous-tendant différentes fonctions. Le modèle murin, par la diversité des tâches possibles à appliquer au cours du vieillissement constitue un bon modèle d'étude de cette hétérogénéité et de ses bases cellulaires.

1.2. Bases cellulaires du vieillissement olfactif

De nombreuses données de la littérature s'accordent sur le fait que les altérations fonctionnelles apparaissant avec l'âge ne résultent pas d'une perte neuronale massive, mais d'altérations plus fines, aux niveaux de la morphologie neuronale, des contacts synaptiques et de la plasticité synaptique (voir Burke and Barnes, 2006 pour revue). Ces observations sont également faites dans le système olfactif, dans lequel les altérations fonctionnelles s'accompagnent de modifications histologiques plus fines aux niveaux

périphérique et central, incluant une diminution du remplacement des NSO dans l'épithélium olfactif (Kondo et al., 2010; Li et al., 2020; Ueha et al., 2018; Weiler and Farbman, 1997) ainsi qu'une diminution de la densité synaptique et de la neurogenèse adulte dans le BO (Enwere, 2004; Moreno et al., 2014; Rey et al., 2012; Richard et al., 2010). Nos données confortent ces observations en montrant qu'au cours du vieillissement les modifications de la morphologie des nouveaux neurones sont discrètes en conditions basales et sont révélées dans un contexte qui requiert de la plasticité.

1.2.1. Maintien de l'intégration des nouveaux neurones dans le BO vieillissant

A l'âge moyen (10 mois), des données précédentes de l'équipe montrent une diminution importante de la neurogenèse adulte dans le BO avec une réduction de 65% du nombre de neurones nouvellement formés chez la souris (Rey et al., 2012). Nos données (étude 1) apportent des informations supplémentaires sur la capacité d'intégration de ces nouveaux neurones dans le BO vieillissant, sur laquelle aucune donnée n'était auparavant disponible dans la littérature.

Les mesures de différents paramètres morphologiques (longueur de dendrite apicale primaire, longueur totale de l'arborisation dendritique, nombre de points de branchement) révèlent qu'en conditions basales (chez les souris contrôles non enrichies), le vieillissement n'affecte pas la morphologie des nouveaux neurones granulaires s'intégrant dans un BO de 12 mois. Cela suggère qu'à cet âge, les nouveaux neurones du BO, bien que réduits en nombre (Enwere, 2004; Rey et al., 2012), se développent et s'intègrent aussi efficacement que ceux présents dans le BO jeune adulte. Cette préservation de la capacité de développement et d'intégration suggère qu'à l'âge intermédiaire, le BO demeure un environnement permissif au développement et à l'intégration de nouveaux neurones granulaires. De plus, de manière intéressante, nos résultats montrent non seulement un maintien de l'intégration des nouveaux neurones dans le BO âgé de 12 mois, mais également une tendance à l'augmentation de l'intégration des nouveaux neurones à 12 mois comparés à ceux du BO jeune adulte. La tendance à l'augmentation du nombre d'épines dendritiques que l'on observe à 12 mois pourrait refléter une compensation pour la diminution du nombre de nouveaux neurones à cet âge. En effet, pour maintenir un nombre total de synapses identique à ce que l'on pourrait trouver dans un BO jeune adulte, à 12 mois, ces neurones présents en nombre plus faible feraient plus de synapses. Néanmoins, la densité des épines dendritiques n'apporte qu'une information indirecte sur le nombre de contacts synaptiques réalisés par les nouvelles CG au sein du réseau bulbaire. Elles ne portent pas toutes nécessairement une synapse fonctionnelle. Il serait donc pertinent de poursuivre les analyses à une échelle plus fine afin de confirmer la présence de synapses sur les épines dendritiques de ces nouvelles CG dans le BO âgé. Cela pourrait être réalisé grâce à des immunomarquages dirigés contre des protéines synaptiques. La synaptoporine (marqueur des vésicules présynaptiques dans les terminaisons GABAergiques) et la gephyrine (marqueur post-synaptique associé aux récepteurs GABA) (Pallotto et al., 2012) nous permettraient de vérifier l'existence de synapses GABAergiques fonctionnelles entre les épines apicales des CG et les dendrites des cellules mitrales (Whitman and Greer, 2007). De la même façon, le marqueur VGluT (transporteur vésiculaire du glutamate) et la PSD-95 (marqueur post-synaptique des synapses glutamatergiques) nous permettraient de vérifier l'existence de synapses

glutamatergiques fonctionnelles entre la cellule mitrale et les épines apicales des CG, ou des retours centrifuges glutamatergiques sur les épines basales des CG.

Cette capacité d'intégration des nouveaux neurones granulaires dans le BO âgé peut être comparée à ce qui est observé dans le gyrus denté âgé, pour lequel il existe quelques données. De la même façon que ce qui est observé dans le BO, le vieillissement diminue le nombre de neurones nouvellement générés dans le gyrus denté (Kuhn et al., 1996; Walter et al., 2011). De manière analogue à nos résultats, ces nouveaux neurones conservent leur capacité à s'intégrer et à participer au fonctionnement du réseau (Marrone et al., 2012; Morgenstern et al., 2008; Rao et al., 2005). Toutefois, leur maturation morphologique et leur intégration fonctionnelle est retardée dès l'âge de 8 mois chez la souris puisque les nouveaux neurones des animaux âgés mettent plusieurs semaines supplémentaires pour atteindre un niveau d'intégration identique à celui des jeunes (Rao et al., 2005; Trincherio et al., 2017, 2019). En conditions basales, nous n'avons pas observé de tel retard de maturation chez les souris âgées de 12 mois, bien que nous ayons analysé la morphologie des nouvelles CG à deux temps différents de leur maturation, à 25 et 60 jours. Nous aurions en effet pu nous attendre à ce que les nouvelles CG âgées de 25 jours s'intègrent moins bien chez les souris âgées de 12 mois comparées aux jeunes adultes, mais qu'une fois âgées de 60 jours, ces dernières présentent une morphologie identique aux nouvelles CG âgées de 25 jours des souris jeunes adultes indiquant un rattrapage de leur retard. Bien que la neurogenèse bulbaire présente un certain nombre d'homologies avec la neurogenèse hippocampique (ex : périodes critiques au cours de la neurogenèse, capacité des nouveaux neurones à faire de la LTP, la contribution à l'apprentissage et à la mémoire) (Ming and Song, 2011), nous montrons que ces deux populations neuronales différentes ont également une sensibilité différente face au vieillissement.

1.2.2. Altération de la plasticité structurale des nouveaux neurones bulbaires au cours du vieillissement

Chez les souris jeunes adultes, l'apprentissage perceptif olfactif nécessite une neurogenèse adulte bulbaire et une plasticité structurale des nouvelles CG (Daroles et al., 2016; Forest et al., 2019, 2020; Mandairon et al., 2018; Moreno et al., 2009). Cette plasticité est caractérisée par une augmentation de la densité des épines sur les compartiments dendritiques apical et basal, ce qui suggère une intégration synaptique plus élevée des nouvelles CG et notamment une augmentation de l'inhibition exercée sur les cellules mitrales (Moreno 2009).

Nos résultats (étude 1) confirment également cet effet de l'apprentissage perceptif olfactif sur l'intégration des nouvelles CG chez les animaux jeunes adultes, modification susceptible de contribuer à l'amélioration de la discrimination. En effet, à cet âge, l'apprentissage perceptif augmente la densité d'épines dendritiques apicales à court terme après l'apprentissage, spécifiquement chez les nouveaux neurones granulaires qui répondent aux odorants d'enrichissement. Un nombre plus élevé d'épines apicales conduirait à une inhibition accrue exercée par les CG sur les cellules mitrales (Forest et al., 2020; Mandairon et al., 2018; Moreno et al., 2009) via les synapses dendrodendritiques réciproques (Shepherd et al., 2007). Le fait que cette inhibition accrue soit exercée par des CG répondant aux odorants appris affine encore la représentation de ces odorants au sein du BO. A long-terme après apprentissage, une fois les neurones âgés de 60 jours, nos

résultats rapportent une augmentation de la densité des épines basales, spécifiquement chez les nouveaux neurones granulaires qui répondent aux odorants appris. Cette augmentation pourrait être responsable du maintien en mémoire de l'apprentissage chez la souris jeune adulte par une influence accrue des retours corticaux et neuromodulateurs sur les nouvelles CG (Fletcher and Chen, 2010; Linster and Escanilla, 2019). Puisque la noradrénaline régule la survie des nouvelles CG et l'inhibition des CG exercée sur les cellules mitrales, nous pouvons supposer que l'innervation noradrénergique est augmentée sur ces neurones, accroissement qui pourrait participer à la mémoire de l'apprentissage perceptif (Moreno et al., 2012).

A l'âge moyen, l'apprentissage reste possible alors que les modulations de morphologie des nouveaux neurones granulaires engendrées par l'apprentissage ne sont plus les mêmes qu'à 2 mois. En effet, chez les souris âgées de 12 mois, à court terme après l'apprentissage, les nouvelles CG ne montrent pas de modifications de leur densité d'épines dendritiques. Toutefois, à plus long terme après l'apprentissage, ces dernières présentent une augmentation de la densité d'épines à la suite de l'enrichissement, ce qui pourrait évoquer un retard de développement et d'intégration des CG néoformées à l'âge moyen en conditions d'apprentissage. Cette augmentation qui était bénéfique pour l'apprentissage lorsqu'elle se déroulait à court terme chez le jeune adulte, deviendrait moins efficace voire délétère lorsqu'elle se manifeste tardivement. De plus, de manière originale, nous montrons qu'à cet âge, toutes les nouvelles CG (qu'elles répondent ou non aux odorants appris) montrent cette augmentation des épines. Cette plasticité qui a perdu de sa spécificité temporelle et fonctionnelle vis-à-vis des CG répondant aux odorants appris pourrait ainsi être responsable des déficits de rétention de l'apprentissage à plus long terme chez les souris d'âge moyen, en déstabilisant la carte d'activation bulbaire.

Malgré cette altération de la plasticité structurale après l'enrichissement, les souris âgées de 12 mois restent capables d'apprendre à discriminer les deux odorants proches. Cet apprentissage pourrait être permis par une plasticité synaptique fonctionnelle plutôt que de la plasticité structurale, telle que de la potentialisation à long terme. Cette plasticité fonctionnelle serait moins durable, d'où l'observation d'un oubli plus précoce de l'apprentissage chez les souris de 12 mois comparées à celles de 2 mois. Cependant, les méthodes de mise en évidence de plasticité synaptique fonctionnelle ne permettent pas d'étudier son maintien sur des périodes aussi longues, et donc de vérifier cette hypothèse d'un maintien plus durable de la plasticité structurale par rapport à la plasticité fonctionnelle.

Dans l'ensemble, les résultats cellulaires viennent en appui des données comportementales pour montrer que l'âge moyen est une période charnière à laquelle les performances olfactives commencent à se dégrader, en particulier l'apprentissage perceptif olfactif en même temps que les phénomènes de plasticité sont également altérés. De manière intéressante, des phénomènes compensatoires semblent exister contribuant à maintenir, même si moins efficacement les performances olfactives.

2. L'enrichissement olfactif : une stratégie efficace pour lutter contre le vieillissement olfactif et cognitif

2.1. Hétérogénéité de la population âgée

Le concept de la RC émane de l'observation du caractère hétérogène de la population atteinte de pathologie neurodégénérative, autrement dit de l'observation de la préservation chez certains patients des fonctions cognitives en présence d'atteintes neuropathologiques majeures. Ce concept a été étendu à l'hétérogénéité du vieillissement normal. En effet, certains sujets âgés présentent des performances cognitives similaires à celles des jeunes alors que d'autres présentent des performances détériorées (Morrison and Baxter, 2012; Wilson et al., 2002). Ces différences peuvent s'expliquer par la prédisposition génétique, mais également par l'exposition à un environnement de vie plus ou moins stimulant (Stern et al., 2020). Pour étudier les bases cellulaires de la résilience au vieillissement conférée par la RC, nous avons cherché à développer un modèle de mise en place de la RC chez la souris par l'enrichissement olfactif au long cours. En laboratoire les souris sont toutes issues de la même lignée et ne présentent donc pas ou très peu de variabilité génétique et nous avons proposé une seule forme d'enrichissement, l'enrichissement olfactif au long cours. Ces éléments constituent des limites au modèle, si l'on considère la variabilité non seulement génétique, mais également des conditions de vie de la population humaine. Afin de mieux mimer l'hétérogénéité génétique de la population, nous pourrions comparer l'effet de l'enrichissement tout au long de la vie sur des animaux issus de souches différentes. Par ailleurs, sur le plan comportemental, les interactions sociales peuvent varier d'un individu à l'autre dans la cage, pouvant conduire à une hétérogénéité d'accès aux odorants utilisés pour l'enrichissement, et donc à une certaine variabilité écologique de l'effet de l'enrichissement (Kempermann, 2019). Il serait intéressant de rechercher dans les groupes enrichis cette hétérogénéité sur le plan comportemental et de pouvoir la lier aux paramètres cellulaires. Pour cela, il faudrait augmenter les effectifs afin de pouvoir identifier, séparer et comparer statistiquement différents sous-groupes. Cependant, ce paradigme, avec ses limites, a montré une efficacité sur les performances cognitives des animaux, comme discuté ci-après.

2.2. L'enrichissement olfactif est efficace chez les souris âgées lorsqu'il est répété tout au long de la vie

Dans les deux études réalisées au cours de cette thèse, nous avons utilisé un enrichissement olfactif. Dans la première étude, il s'agissait d'un enrichissement unique de courte durée (10 jours) avec deux odorants perceptivement proches, pour permettre un apprentissage perceptif et ainsi améliorer la discrimination de ces deux odorants. Dans notre deuxième étude, nous avons utilisé un enrichissement olfactif tout au long de la vie basé sur la nouveauté (introduction d'une nouvelle odeur chaque jour pendant 10 jours par mois, répété tout au long de la vie) dans le but de permettre la mise en place d'une RC et d'améliorer les performances olfactives et cognitives des souris. Le terme d'enrichissement olfactif recouvre donc des protocoles différents qui ont donc des effets comportementaux différents. En accord avec les données précédentes de l'équipe, nous avons montré qu'un

enrichissement ponctuel avec des odorants similaires améliore la discrimination de ces derniers mais perd de son efficacité au cours du vieillissement dès l'âge moyen (Moreno et al., 2014). Un enrichissement avec des odeurs nouvelles tout au long de la vie, quant à lui, permet de prolonger ces bénéfices chez la souris âgée, y compris en dehors de la sphère olfactive.

Nous pouvons nous demander si les effets positifs de cet enrichissement au long cours sont liés à la durée de cet enrichissement ou à sa composante nouveauté.

Une étude précédente de l'équipe a montré qu'un troisième type d'enrichissement olfactif, cette fois-ci de 30 jours basé sur la nouveauté de l'odeur, permettait également d'améliorer les performances de discrimination fine des souris, y compris chez les souris âgées de 23 mois (Rey et al., 2012). Ce type d'enrichissement olfactif permet également d'améliorer la rétention d'une odeur chez la souris jeune adulte (Rey et al., 2012; Rochefort et al., 2002) et chez la souris d'âge moyen (10 mois) (Rey et al., 2012). Les bienfaits de ce type d'enrichissement semblent donc être dus à la composante nouveauté. Ces résultats sont corroborés par l'observation qu'un enrichissement olfactif sans nouveauté (même mélange d'odeurs présenté quotidiennement) n'a pas cet effet positif sur la mémoire chez la souris jeune adulte (Veyrac et al., 2009). Bien que dans le type d'enrichissement que nous avons utilisé, le même jeu d'odeurs soit répété chaque mois, l'enrichissement olfactif n'est pas continu afin de maintenir la saillance de l'odorant par rapport à l'environnement et donc une relative nouveauté de l'odorant pour la souris. En effet, la durée de rétention d'une odeur (qui dépend du temps d'exposition initiale) ne dépasse pas quelques heures chez la souris jeune adulte, y compris après un enrichissement olfactif basé sur la nouveauté (Rochefort et al., 2002). Ainsi, l'odeur sentie il y a un mois par l'animal lui apparaîtra nouvelle le mois suivant. La nouveauté joue donc un rôle clé dans l'efficacité de l'enrichissement olfactif.

Néanmoins, la durée de l'enrichissement est également un paramètre important dans les améliorations comportementales observées. En effet, alors que nous observons des améliorations de la mémoire spatiale après un enrichissement olfactif tout au long de la vie, une étude précédente avait montré que 40 jours d'enrichissement olfactif également basé sur la nouveauté étaient insuffisants pour améliorer la mémoire spatiale dans une tâche de piscine de Morris chez la jeune souris (Rochefort et al., 2002). Enfin, dans une perspective translationnelle, il est intéressant de noter qu'un enrichissement commencé plus tard dans la vie (enrichissement tardif débuté à l'âge moyen) est presque aussi efficace que l'enrichissement précoce au niveau du comportement puisqu'il améliore les performances de discrimination fine et la mémoire spatiale.

D'un point de vue cellulaire, chez la souris jeune adulte, un enrichissement ponctuel avec deux odorants similaires ou avec des odeurs nouvelles entraîne une augmentation de la neurogenèse adulte (Moreno et al., 2014; Rey et al., 2012; Rochefort et al., 2002). De plus, ces deux types d'enrichissement font intervenir le système NA puisque le blocage des récepteurs noradrénergiques $\alpha 1$ et β par le propranolol bloque les effets positifs de ces enrichissements (Moreno et al., 2012; Veyrac et al., 2009). De plus, un enrichissement olfactif basé sur la nouveauté augmente l'expression de DBH dans le LC (Rey et al., 2012). Toutefois, chez les souris âgées, ces enrichissements n'induisent plus d'augmentation de la neurogenèse adulte et n'induisent pas de plasticité du système noradrénergique mesuré par l'expression de la DBH (Moreno et al., 2014; Rey et al., 2012). En revanche, l'enrichissement au long cours de notre étude 2 entraîne un remaniement des fibres NA

qui corrèle avec les performances cognitives chez la souris âgée. On peut donc supposer que c'est la durée et/ou la répétition de ces enrichissements qui déclenche la plasticité de l'innervation NA.

2.3. Bases cellulaires des bienfaits de l'enrichissement olfactif à long terme

2.3.1. Réserve cérébrale

Selon la théorie de la RC, le maintien des performances cognitives au cours du vieillissement pourrait notamment passer par le maintien de l'intégrité cérébrale (Barulli and Stern, 2013; Cabeza et al., 2018; Nyberg et al., 2012). Nous aurions donc pu nous attendre à ce que l'enrichissement à long terme améliore les performances cognitives chez les souris âgées en augmentant la neurogenèse adulte (qui est connue pour décliner drastiquement avec l'âge) (Enwere, 2004; Kempermann et al., 1998; Marrone et al., 2012; Moreno et al., 2014; Rao et al., 2005; Rey et al., 2012) et/ou en maintenant l'intégrité du LC et du système NA en contrecarrant la diminution du nombre de neurones dans le LC (Liu et al., 2019b; Manaye et al., 1995) et de l'innervation NA dans le BO (Rey et al., 2012) au cours du vieillissement. Cependant, nos résultats révèlent une absence de modifications de la neurogenèse adulte bulbaire et hippocampique à la suite de l'enrichissement olfactif. Ces résultats complètent des données précédentes de l'équipe indiquant qu'un enrichissement olfactif de 30 jours basé sur la nouveauté améliore les capacités de discrimination olfactive des souris âgées de 23 mois sans augmenter la neurogenèse (Rey et al., 2012). De l'ensemble de ces travaux, il découle que chez la souris âgée, les nouveaux neurones ne seraient peut-être pas nécessaires à l'amélioration des performances olfactives (Rey et al., 2012). Toutefois, à cet âge, l'enrichissement olfactif basé sur la nouveauté agit peut-être sinon sur le nombre, mais sur la morphologie des nouveaux neurones, comme nous l'avons observé dans notre étude 1. Il pourrait notamment augmenter le nombre d'épines dendritiques sur les nouveaux neurones pour compenser la perte de neurogenèse et maintenir un taux d'inhibition sur les cellules mitrales identiques aux jeunes animaux. Cela pourrait être vérifié avec l'injection d'un virus codant pour la GFP afin d'étudier la morphologie des nouveaux neurones dans le contexte de l'enrichissement au long cours.

Nos résultats montrent également que l'enrichissement olfactif tout au long de la vie n'a pas augmenté le nombre de neurones dans le LC. En revanche, nos résultats révèlent un remaniement local des fibres NA. En effet, nous observons une densité de fibres NA dans le BO et la région CA1 de l'hippocampe supérieure chez les souris enrichies comparées aux contrôles. En l'absence d'augmentation du nombre de neurones dans le LC chez les souris enrichies, nous pouvons supposer que cette augmentation de l'innervation NA serait due à une augmentation de l'arborisation axonale du LC (phénomène de « sprouting », création de nouvelles collatérales d'axones). Si ce processus de sprouting était décrit après lésion expérimentale des neurones du LC (Fritschy and Grzanna, 1992), une telle plasticité dans des conditions physiologiques et dans des régions corticales n'a jamais été décrite et renforce l'hypothèse que la NA peut être une cible intéressante pour stimuler la plasticité cérébrale. La comparaison avec la densité de l'innervation chez un groupe de souris jeunes adultes nous permettrait de savoir si l'enrichissement olfactif a effectivement permis la création de nouvelles collatérales

d'axones chez les souris enrichies, ou s'il a préservé l'intégrité de l'innervation NA qui se serait dégradée chez les animaux non enrichis de 18 mois.

Il faut noter que le remaniement de l'innervation NA observée dans notre étude 2 chez les souris âgées soumises à l'enrichissement olfactif tout au long de la vie bien que robuste statistiquement reste modeste quantitativement. Cela pourrait venir du fait que les souris contrôles auraient également été « enrichies » légèrement tout au long de leur vie par la simple introduction quotidienne d'une boule à thé sans odeur dans leur cage et la réalisation des tests comportementaux régulièrement tout au long de leur vie. Ainsi, ces interventions pourraient constituer une forme de protection légère envers le vieillissement cérébral. Cela pourrait expliquer aussi l'effet bénéfique observé au niveau de l'apprentissage associatif olfactif dans le groupe contrôle de l'enrichissement précoce. En effet, alors que le groupe contrôle tardif est incapable d'apprendre l'association odeur-récompense, le groupe contrôle précoce en est capable. Toutefois, les modifications cellulaires engendrées par cet enrichissement « sham » ne seraient pas suffisantes pour enclencher des modifications cognitives complètes puisque nous n'observons pas d'amélioration de la discrimination dans le groupe contrôle, ni de mémoire spatiale. Un groupe contrôle élevé dans des conditions standard (sans boule à thé et sans avoir réalisé les tests comportementaux tout au long de la vie) aurait peut-être permis de mettre en évidence un effet plus important au niveau cellulaire. Toutefois, pour caractériser la réserve cognitive, un tel groupe n'est pas représentatif de ce qui est observé dans la population car ces conditions correspondent plus à des conditions d'appauvrissement de l'environnement avec des conséquences délétères sur le bien-être plutôt qu'un réel contrôle de la condition de l'enrichissement olfactif.

2.3.2. Plasticité des réseaux neuronaux : maintenance cérébrale et compensation

Au niveau fonctionnel, certains sujets âgés ont la capacité de s'adapter aux altérations structurales en développant et/ou en s'appuyant sur des réseaux compensatoires lorsque les réseaux primaires ne sont plus suffisamment efficaces pour la réalisation d'une certaine tâche (Cabeza et al., 2018; Grady, 2012). Cette compensation est le reflet soit d'une augmentation d'activité dans les régions cérébrales impliquées dans la tâche (Cappell et al., 2010), soit d'une augmentation du nombre de régions recrutées pour réaliser la tâche (Burke et al., 2012; Cabeza, 2002; Davis et al., 2008; Grady et al., 1994), soit d'une augmentation du nombre de régions connectées entre elles (Crowell et al., 2020).

Nos résultats montrent que l'effet de l'enrichissement olfactif tout au long de la vie sur l'organisation du réseau cérébral est dépendant de la tâche avec des réseaux qui deviennent plus spécifiques sous-tendant une discrimination olfactive efficace, tandis qu'une activation cérébrale plus large sous-tendrait la mémoire spatiale.

Dans la tâche de discrimination olfactive, nous avons observé moins de régions connectées entre elles globalement mais des régions spécifiques à l'olfaction plus connectées entre elles chez les souris enrichies comparées aux contrôles. L'enrichissement olfactif n'aurait donc pas permis aux animaux enrichis de recruter un réseau cérébral plus large leur permettant de réaliser la tâche comportementale, mais aurait plutôt permis au circuit dédié de moins se dégrader et de rester plus spécifique. En revanche, dans la tâche de mémoire spatiale, l'enrichissement à long terme a permis un recrutement supplémentaire de régions pour effectuer la tâche en augmentant le nombre de régions

interconnectées impliquées dans la résolution de la tâche de mémoire spatiale. Il serait intéressant de poursuivre cette analyse de réseaux chez des souris jeunes adultes afin de déterminer si l'enrichissement a rétabli une organisation des réseaux cérébraux similaire aux jeunes adultes en permettant au circuit dédié de moins se dégrader et de rester plus spécifique dans la tâche de discrimination olfactive ou a promu une nouvelle organisation, distincte de celle du jeune. Ces données permettraient d'avancer dans la compréhension des phénomènes de compensation cérébrale. De même, dans la tâche de mémoire spatiale, cela permettrait également de conclure sur l'existence d'un éventuel phénomène de compensation par recrutement de régions supplémentaires. Néanmoins, la sélection du groupe expérimental adapté est complexe pour la tâche de discrimination olfactive. En effet, les souris jeunes adultes, contrairement aux souris de 12 mois ne parviennent pas à discriminer deux odeurs perceptivement similaires sans enrichissement. Des souris jeunes adultes n'ayant pas été enrichies ne seraient donc pas un bon groupe pour comparer les réseaux cérébraux. Il faudrait donc prévoir un groupe soumis à enrichissement.

Il est également important de souligner que les mesures d'activité cérébrale effectuées dans cette étude proviennent de la cartographie post-mortem de l'expression du gène d'activation précoce *c-fos*, exprimé en réponse à l'activation neuronale. Cette mesure est couramment utilisée en neurosciences pour évaluer l'activité neuronale chez le rongeur (Babayán et al., 2017; Cavélius et al., 2021; Dardou et al., 2010; Wheeler et al., 2013). Les comparaisons inter-individuelles et inter-groupes sont effectuées après réajustement topographique des cellules marquées dans un espace anatomique commun. Cette méthode, développée dans l'équipe, permet une quantification et une analyse statistique de l'activation neuronale dans de multiples régions cérébrales (Midroit et al., 2018), de manière proche de ce qui se fait en imagerie cérébrale chez l'humain, tout en ayant une bonne résolution spatiale, de l'échelle de la cellule. Toutefois la dimension temporelle n'est pas accessible avec cette technique puisque la mesure de l'activité cérébrale se fait à un instant donné et l'activité mesurée résulte de l'activation cumulée sur 1 heure environ. Pour cette raison, la mesure de la connectivité fonctionnelle du réseau cérébral est réalisée à partir des corrélations d'activité des régions entre les animaux du groupe, ce qui ne nous donne aucune indication concernant la direction de ces connexions, ni leur dynamique temporelle. Pour étudier la dynamique de ces connexions et leur direction, il faudrait avoir recours à des techniques d'électrophysiologie mais qui ne permettraient pas d'accéder en simultanément à l'activité d'autant de régions cérébrales que la technique d'imagerie cellulaire *c-fos*.

2.3.3. Théorie noradrénergique de la réserve cognitive

Récemment un certain nombre d'études a relié l'intégrité du LC avec de meilleures performances cognitives au cours du vieillissement chez l'humain ce qui a grandement contribué à étayer la théorie NA de la RC (Clewett et al., 2016; Dahl et al., 2019; Mather et al., 2016; Robertson, 2013; Wilson et al., 2013). Nous avons utilisé une stimulation olfactive tout au long de la vie afin de mimer la constitution d'une réserve cognitive chez la souris ce qui a permis d'améliorer leurs performances cognitives. Toutefois, nos résultats ont montré que l'intégrité du LC n'était pas corrélée avec les performances de discrimination olfactive ni avec les performances de mémoire spatiale chez les souris âgées (étude 2). En revanche, ils montrent une tendance à la corrélation entre le taux d'innervation NA dans le BO et les

performances de discrimination olfactive et une corrélation entre le taux d'innervation NA dans CA1 et les performances de mémoire spatiale, suggérant que dans ces structures, l'augmentation de l'innervation NA sous-tendrait de meilleures performances. Afin de confirmer l'implication de la NA dans les effets bénéfiques de l'enrichissement olfactif à long terme, il serait nécessaire de manipuler l'activité du LC durant les périodes d'enrichissement olfactif. Cela peut être réalisé par chimogénétique avec la technique de DREADD en infectant les neurones du LC avec un virus codant pour un récepteur muscarinique modifié qui ne peut être activé que par l'injection d'un ligand exogène. En particulier, si la NA est effectivement impliquée dans les bienfaits de notre enrichissement olfactif, l'activation du DREADD inhibiteur (hM4Di) pendant chaque période d'enrichissement devrait bloquer les effets bénéfiques de l'enrichissement olfactif. De manière complémentaire, l'activation d'un DREADD activateur (hM3Dq) pourrait mimer les bienfaits de l'enrichissement olfactif tout au long de la vie. Bien que théoriquement possible, la mise en place d'une telle expérience présente de nombreuses contraintes pratiques et éthiques, notamment la voie de délivrance du ligand des DREADD (il n'est éthiquement pas concevable de réaliser des injections intra-péritonéales 10 jours par mois pendant toute la vie de la souris et la voie orale ne semble pas très fiable en termes de dose ingérée).

On peut également se demander comment agit la NA pour maintenir les performances cognitives au cours du vieillissement. Connaissant l'influence de la NA sur la neurogenèse bulbaire et hippocampique (Bauer et al., 2003; Coradazzi et al., 2016; Kulkarni et al., 2002; Moreno et al., 2014, 2012; Veyrac et al., 2005), une première hypothèse était que la NA augmente la survie des nouveaux neurones dans le BO et le gyrus denté de l'hippocampe. Cependant, nos résultats ne montrent pas de modulation de la neurogenèse par l'enrichissement olfactif, ni de corrélation entre l'innervation NA et la neurogenèse (données non présentées dans l'article de l'étude 2). Toutefois, il serait intéressant de regarder plus finement la morphologie des nouveaux neurones. Il est possible que l'enrichissement tout au long de la vie n'ait pas augmenté leur survie mais leur intégration synaptique au sein du réseau bulbaire ou hippocampique.

Une deuxième hypothèse est que l'augmentation régionalisée de l'innervation NA modifie le fonctionnement des réseaux neuronaux, en augmentant la quantité de NA libérée, ainsi que le nombre de cellules soumises à son action. Dans le BO, l'action de la NA permet une modulation dynamique de l'inhibition GABAergique sur les cellules mitrales en augmentant ou diminuant l'excitabilité des cellules granulaires (Nai et al., 2010). Dans l'hippocampe, la NA libérée lors d'un enrichissement environnemental (Galani et al., 2007) augmente la plasticité synaptique à long terme via l'activation des récepteurs adrénergiques (Li et al., 2013). Ainsi, notre stratégie d'enrichissement olfactif répété, en augmentant l'innervation NA, pourrait également augmenter la LTP hippocampique. D'autres mécanismes peuvent également être envisagés, comme l'augmentation de la probabilité de décharge des neurones pyramidaux de CA1 induite par la NA (Bacon et al., 2020). Enfin, les neurones du LC ne libèrent pas que de la NA dans l'hippocampe mais peuvent co-libérer de la dopamine (Kempadoo et al., 2016; Takeuchi et al., 2016), qui pourrait également contribuer à l'amélioration comportementale observée. Ainsi, par différents mécanismes, l'augmentation régionalisée de l'innervation NA est susceptible de modifier le fonctionnement des réseaux neuronaux. Cette hypothèse est étayée par une étude récente menée sur des souris anesthésiées et qui a montré que l'activation

chémogénétique du LC, connue pour induire un comportement de stress en éveil, augmente fortement la connectivité à l'échelle du cerveau entier, avec des effets plus importants dans les réseaux de la saillance et de l'amygdale (Zerbi et al., 2019). Les modifications de la connectivité du réseau corrèlent également avec la distribution des récepteurs noradrénergiques et dopaminergiques et avec les quantités de NA et de dopamine (Zerbi et al., 2019). Nos résultats (étude 2) montrent un remaniement des réseaux cérébraux à la suite de l'enrichissement olfactif tout au long de la vie. En revanche le niveau d'activité du LC (en densité de cellules c-Fos positives) étant similaire chez les animaux contrôles et enrichis, nous n'avons pas pu lier directement l'activité du LC aux remaniements des réseaux cérébraux. Cette activité c-Fos identique dans le LC peut s'expliquer par le fait que les deux groupes de souris ont effectué la tâche comportementale alors que dans l'étude de Zerbi et al., 2019, l'activation chémogénétique est une stimulation artificielle très forte et leurs souris sont sous anesthésie, il est donc peut être plus facile de mettre en évidence des différences d'activité dans le LC dans ces conditions. Des résultats précédents non publiés de l'équipe avaient déjà montré que l'activité basale du LC était assez élevée en c-Fos et n'avaient pas montré de différence d'activité à la suite de l'exposition à une odeur en utilisant ce marqueur d'activité neuronale. Ces résultats ne sont pas surprenants puisque les neurones du LC sont impliqués dans de nombreux comportements et sont activés lors de l'éveil (Aston-Jones and Bloom, 1981b; Berridge and Waterhouse, 2003; Poe et al., 2020; Sara, 2009). Le marqueur c-Fos n'est peut-être pas le marqueur le plus adapté pour révéler les modifications d'activité des neurones du LC : en éveil, les neurones du LC basculent d'un état tonique à une décharge de manière phasique (Aston-Jones and Bloom, 1981b; Aston-Jones and Cohen, 2005; Berridge and Waterhouse, 2003). Les neurones du LC ne sont donc finalement sans doute jamais complètement inactifs, mais présentent des modifications de leur activité en fonction du temps qui pourraient ne pas être capturées par une expression différentielle de c-Fos. Afin de démontrer l'activation du LC en réponse à une odeur, il serait donc nécessaire de mettre en œuvre des enregistrements électrophysiologiques des neurones du LC.

2.3.4. Est-ce qu'un enrichissement dans une autre modalité pourrait avoir les mêmes bénéfices qu'un enrichissement olfactif ?

Plusieurs études ont montré les bienfaits d'un enrichissement environnemental complexe (interactions sociales, présence de jeux, de roues pour faire de l'exercice) sur les performances cognitives des rongeurs au cours du vieillissement (Fuchs et al., 2016a, 2016b; Galani et al., 2007; Harati et al., 2013; Kumar et al., 2012; Mora-Gallegos et al., 2015; Simpson and Kelly, 2011). Toutefois, dans ces environnements complexes, il est difficile de savoir si les bienfaits observés sont dus à la nouveauté (remplacement quotidien des jeux), l'exercice physique lié à la présence de roues ou à la stimulation d'une modalité sensorielle en particulier. Dans le but de simplifier cet enrichissement et afin de mieux le contrôler, et en raison de son applicabilité possible en clinique, nous avons choisi l'exposition répétée à un stimulus issu d'une seule modalité. Nous avons ainsi montré qu'un enrichissement olfactif basé sur la nouveauté a des bénéfices en dehors de la sphère olfactive puisqu'il améliore également les capacités de flexibilité cognitive et de mémoire spatiale des souris

âgées. Nous pouvons toutefois nous demander si nous aurions obtenu les mêmes bénéfices avec un enrichissement dans une autre modalité.

Le but de l'enrichissement que nous proposons n'est pas que l'environnement soit riche en odeurs, mais qu'il soit renouvelé, afin de recruter le LC qui est connu pour être activé en réponse à la présence de stimuli saillants ou nouveaux dans l'environnement (Aston-Jones and Bloom, 1981b; Foote et al., 1980; Rasmussen et al., 1986; Sara et al., 1994) et de mimer la constitution d'une RC, qui est considérée comme issue d'un enrichissement de la vie lié à la confrontation régulière à la nouveauté à travers les acquis scolaires et les activités professionnelles, mais aussi les activités de loisirs. Si le recrutement du système noradrénergique est bien responsable des effets bénéfiques de l'enrichissement olfactif, il est probable qu'une stimulation sensorielle issue d'une autre modalité ait des effets bénéfiques similaires sur le fonctionnement cérébral. Toutefois, il n'existe pas, à ma connaissance, d'évidences montrant que des stimuli auditifs ou visuels par exemple induisent des modifications d'expression de DBH ou des remaniements des fibres NA comme c'est le cas des stimuli olfactifs (Rey et al., 2012, notre étude 2). De plus, dans le cas de l'enrichissement olfactif, les odeurs sont placées dans des boules à thé situées dans les cages des souris. Ainsi les souris vont pouvoir développer un comportement actif d'exploration du stimulus, ce qui sera moins le cas dans le cas d'un stimulus distant. Enfin, le BO est une cible majeure du LC avec près de 40 % des neurones du LC qui projettent sur le BO (McLean and Shipley, 1991). Ainsi, dans l'hypothèse d'une réciprocité des relations entre le LC et ses cibles, il est possible que la stimulation olfactive soit un stimulus privilégié pour activer les neurones du LC, le rendant ainsi particulièrement efficace à induire la libération de NA.

3. Conclusion générale et perspectives

Dans l'ensemble, les résultats de cette thèse confortent et complètent des données existantes sur l'effet du vieillissement sur les fonctions sensorielles et cognitives. Ils montrent une altération des capacités de discrimination olfactive et une altération relative de l'apprentissage associatif olfactif chez la souris, ainsi qu'une altération de la flexibilité cognitive et de la mémoire spatiale. Ils mettent également en évidence des corrélats cellulaires originaux montrant que le vieillissement olfactif apparaît comme discret en conditions basales et que les altérations du système nerveux sont révélées lorsque le système est confronté à des conditions qui sollicitent la plasticité cérébrale. Enfin, ils montrent que les processus de vieillissement sont à l'œuvre dès le milieu de la vie chez la souris, avec une bascule vers un fonctionnement différent de celui du jeune cerveau aux alentours de 12 mois chez la souris. L'identification de l'âge moyen comme âge charnière du vieillissement permet d'envisager des interventions préventives précoces afin de promouvoir le bien-vieillir.

Afin de remédier à aux altérations liées à l'âge et d'améliorer le fonctionnement du cerveau vieillissant, nous avons soumis des souris à un enrichissement olfactif tout au long de la vie et démontré les bénéfices à la fois sur les performances olfactives, mais également en dehors de la sphère olfactive, en améliorant la flexibilité cognitive et la mémoire spatiale des animaux. Nos analyses histologiques ont révélé une augmentation locale de l'innervation noradrénergique et des remaniements des réseaux cérébraux qui pourraient contribuer aux bénéfices cognitifs.

Maintenant que nous avons établi une preuve de principe de l'efficacité de l'enrichissement tout au long de la vie chez la souris, nous pourrions développer une validation expérimentale de cette stratégie chez l'humain pour en confirmer la valeur translationnelle. Un certain nombre d'études chez l'humain a déjà démontré des effets bénéfiques des odeurs en dehors de la sphère olfactive, en particulier sur l'état émotionnel (Baron and Thomley, 1994; Lehrner et al., 2005; Perry et al., 2012). De plus, un enrichissement olfactif de quelques semaines a déjà démontré des bénéfices olfactifs chez les personnes âgées et en dehors de la sphère olfactive en améliorant le bien-être mais aussi la fluence verbale (Birte-Antina et al., 2018). Introduire de la nouveauté dans cet enrichissement pourrait également améliorer d'autres performances cognitives, comme c'est le cas chez le rongeur. Ce protocole présente de nombreux avantages puisqu'il représente un moyen non invasif et non pharmacologique de stimuler la plasticité cérébrale et de promouvoir le bien-vieillir. De plus, ce protocole est simple à mettre à œuvre quel que soit le lieu de vie (maison de retraite, hôpital ou domicile), ne nécessite pas de formation technique complexe de la personne prodiguant les soins (personnel médical, aide à domicile ou famille) et peut être développé à faible coût. Ainsi, ce type de stratégie pourrait être développée pour promouvoir le bien-vieillir émotionnel et cognitif, un enjeu de santé publique, économique et sociétal.

REFERENCES

- Abraham, N.M., Egger, V., Shimshek, D.R., Renden, R., Fukunaga, I., Sprengel, R., Seeburg, P.H., Klugmann, M., Margrie, T.W., Schaefer, A.T., et al. (2010). Synaptic Inhibition in the Olfactory Bulb Accelerates Odor Discrimination in Mice. *Neuron* 65, 399-411.
- Abraham, N.M., Vincis, R., Lagier, S., Rodriguez, I., and Carleton, A. (2014). Long term functional plasticity of sensory inputs mediated by olfactory learning. *ELife* 3, e02109.
- Abriat, A., Barkat, S., Bensafi, M., Rouby, C., and Fanchon, C. (2007). Psychological and physiological evaluation of emotional effects of a perfume in menopausal women. *International Journal of Cosmetic Science* 29, 399-408.
- Agster, K.L., Mejias-Aponte, C.A., Clark, B.D., and Waterhouse, B.D. (2013). Evidence for a regional specificity in the density and distribution of noradrenergic varicosities in rat cortex. *J Comp Neurol* 521, 2195-2207.
- Ahnaou, A., Rodriguez-Manrique, D., Embrechts, S., Biermans, R., Manyakov, N.V., Youssef, S.A., and Drinkenburg, W.H.I.M. (2020). Aging Alters Olfactory Bulb Network Oscillations and Connectivity: Relevance for Aging-Related Neurodegeneration Studies. *Neural Plasticity* 2020, e1703969.
- Aiello, M., Parma, V., De Carlo, S., Hummel, T., and Rumiati, R.I. (2019). Cognitive, Olfactory, and Affective Determinants of Body Weight in Aging Individuals. *Archives of Clinical Neuropsychology* 34, 637-647.
- Aimone, J.B., Deng, W., and Gage, F.H. (2011). Resolving New Memories: A Critical Look at the Dentate Gyrus, Adult Neurogenesis, and Pattern Separation. *Neuron* 70, 589-596.
- Akaike, T. (1982). Periodic bursting activities of locus coeruleus neurons in the rat. *Brain Research* 239, 629-633.
- Alonso, M., Viollet, C., Gabellec, M.-M., Meas-Yedid, V., Olivo-Marin, J.-C., and Lledo, P.-M. (2006). Olfactory Discrimination Learning Increases the Survival of Adult-Born Neurons in the Olfactory Bulb. *J. Neurosci.* 26, 10508-10513.
- Alonso, M., Lepousez, G., Wagner, S., Bardy, C., Gabellec, M.-M., Torquet, N., and Lledo, P.-M. (2012). Activation of adult-born neurons facilitates learning and memory. *Nat Neurosci* 15, 897-904.
- Amaral, D.G., and Foss, J.A. (1975). Locus coeruleus lesions and learning. *Science* 188, 377-378.
- Aschenbrenner, K., Hummel, C., Teszmer, K., Krone, F., Ishimaru, T., Seo, H.-S., and Hummel, T. (2008). The influence of olfactory loss on dietary behaviors. *Laryngoscope* 118, 135-144.
- Aston-Jones, G., and Bloom, F.E. (1981a). Activity of norepinephrine-containing locus coeruleus neurons in behaving rats anticipates fluctuations in the sleep-waking cycle. *J. Neurosci.* 1, 876-886.
- Aston-Jones, G., and Bloom, F.E. (1981b). Norepinephrine-containing locus coeruleus neurons in behaving rats exhibit pronounced responses to non-noxious environmental stimuli. *J. Neurosci.* 1, 887-900.

- Aston-Jones, G., and Cohen, J.D. (2005). An Integrative Theory of Locus Coeruleus-Norepinephrine Function: Adaptive Gain and Optimal Performance. *Annu. Rev. Neurosci.* 28, 403-450.
- Aston-Jones, G., and Waterhouse, B. (2016). Locus coeruleus: From global projection system to adaptive regulation of behavior. *Brain Research* 1645, 75-78.
- Attems, J., Walker, L., and Jellinger, K.A. (2015). Olfaction and Aging: A Mini-Review. *GER* 61, 485-490.
- Aungst, J.L., Heyward, P.M., Puche, A.C., Karnup, S.V., Hayar, A., Szabo, G., and Shipley, M.T. (2003). Centre-surround inhibition among olfactory bulb glomeruli. *Nature* 426, 623-629.
- Babayan, B.M., Watilliaux, A., Viejo, G., Paradis, A.-L., Girard, B., and Rondi-Reig, L. (2017). A hippocampo-cerebellar centred network for the learning and execution of sequence-based navigation. *Scientific Reports* 7.
- Bacon, T.J., Pickering, A.E., and Mellor, J.R. (2020). Noradrenaline Release from Locus Coeruleus Terminals in the Hippocampus Enhances Excitation-Spike Coupling in CA1 Pyramidal Neurons Via β -Adrenoceptors. *Cereb Cortex* 30, 6135-6151.
- Banerjee, A., Parente, G., Teutsch, J., Lewis, C., Voigt, F.F., and Helmchen, F. (2020). Value-guided remapping of sensory cortex by lateral orbitofrontal cortex. *Nature* 585, 245-250.
- Bardy, C., and Pallotto, M. (2010). What happens to olfaction without adult neurogenesis? *Front. Neurosci.* 4.
- Bardy, C., Alonso, M., Bouthour, W., and Lledo, P.-M. (2010). How, When, and Where New Inhibitory Neurons Release Neurotransmitters in the Adult Olfactory Bulb. *J. Neurosci.* 30, 17023-17034.
- Barnes, C.A., Suster, M.S., Shen, J., and McNaughton, B.L. (1997). Multistability of cognitive maps in the hippocampus of old rats. *Nature* 388, 272-275.
- Barnes, D.C., Hofacer, R.D., Zaman, A.R., Rennaker, R.L., and Wilson, D.A. (2008). Olfactory perceptual stability and discrimination. *Nat Neurosci* 11, 1378-1380.
- Baron, R.A., and Bronfen, M.I. (1994). A whiff of reality: Empirical evidence concerning the effects of pleasant fragrances on work-related behavior. *Journal of Applied Social Psychology* 24, 1179-1203.
- Baron, R.A., and Thomley, J. (1994). A whiff of reality: Positive affect as a potential mediator of the effects of pleasant fragrances on task performance and helping. *Environment and Behavior* 26, 766-784.
- Barsz, K., Ison, J.R., Snell, K.B., and Walton, J.P. (2002). Behavioral and neural measures of auditory temporal acuity in aging humans and mice. *Neurobiology of Aging* 23, 565-578.
- Barulli, D., and Stern, Y. (2013). Efficiency, capacity, compensation, maintenance, plasticity: emerging concepts in cognitive reserve. *Trends in Cognitive Sciences* 17, 502-509.
- Bathellier, B., Lagier, S., Faure, P., and Lledo, P.-M. (2006). Circuit Properties Generating Gamma Oscillations in a Network Model of the Olfactory Bulb. *Journal of Neurophysiology* 95, 2678-2691.
- Bauer, S., Moyse, E., Jourdan, F., Colpaert, F., Martel, J.C., and Marien, M. (2003). Effects of the α 2-adrenoreceptor antagonist dexefaroxan on neurogenesis in the olfactory bulb of the adult rat in vivo: selective protection against neuronal death. *Neuroscience* 117, 281-291.

- Baxter, M.G., and Murray, E.A. (2002). The amygdala and reward. *Nat Rev Neurosci* 3, 563-573.
- Beas, B.S., Wright, B.J., Skirzewski, M., Leng, Y., Hyun, J.H., Koita, O., Ringelberg, N., Kwon, H.-B., Buonanno, A., and Penzo, M.A. (2018). The locus coeruleus drives disinhibition in the midline thalamus via a dopaminergic mechanism. *Nat Neurosci* 21, 963-973.
- Bekkers, J.M., and Suzuki, N. (2013). Neurons and circuits for odor processing in the piriform cortex. *Trends in Neurosciences* 36, 429-438.
- Bensafi, M., Rouby, C., Farget, V., Bertrand, B., Vigouroux, M., and Holley, A. (2002a). Psychophysiological correlates of affects in human olfaction. *Neurophysiologie Clinique/Clinical Neurophysiology* 32, 326-332.
- Bensafi, M., Rouby, C., Farget, V., Bertrand, B., Vigouroux, M., and Holley, A. (2002b). Autonomic Nervous System Responses to Odours: the Role of Pleasantness and Arousal. *Chemical Senses* 27, 703-709.
- Bergmann, O., Liebl, J., Bernard, S., Alkass, K., Yeung, M.S.Y., Steier, P., Kutschera, W., Johnson, L., Landén, M., Druid, H., et al. (2012). The Age of Olfactory Bulb Neurons in Humans. *Neuron* 74, 634-639.
- Bergmann, O., Spalding, K.L., and Frisén, J. (2015). Adult Neurogenesis in Humans. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7.
- Berridge, C.W., and Waterhouse, B.D. (2003). The locus coeruleus-noradrenergic system: modulation of behavioral state and state-dependent cognitive processes. *Brain Research Reviews* 42, 33-84.
- Berridge, C.W., Page, M.E., Valentino, R.J., and Foote, S.L. (1993). Effects of locus coeruleus inactivation on electroencephalographic activity in neocortex and hippocampus. *Neuroscience* 55, 381-393.
- Bettcher, B.M., Gross, A.L., Gavett, B.E., Widaman, K.F., Fletcher, E., Dowling, N.M., Buckley, R.F., Arenaza-Urquijo, E.M., Zahodne, L.B., Hohman, T.J., et al. (2019). Dynamic change of cognitive reserve: associations with changes in brain, cognition, and diagnosis. *Neurobiology of Aging* 83, 95-104.
- Bhatnagar, K.P., Kennedy, R.C., Baron, G., and Greenberg, R.A. (1987). Number of mitral cells and the bulb volume in the aging human olfactory bulb: a quantitative morphological study. *Anat Rec* 218, 73-87.
- Binder, S., Dere, E., and Zlomuzica, A. (2015). A critical appraisal of the what-where-when episodic-like memory test in rodents: Achievements, caveats and future directions. *Progress in Neurobiology* 130, 71-85.
- Birte-Antina, W., Ilona, C., Antje, H., and Thomas, H. (2018). Olfactory training with older people. *International Journal of Geriatric Psychiatry* 33, 212-220.
- Bissonette, G.B., Powell, E.M., and Roesch, M.R. (2013). Neural structures underlying set-shifting: Roles of medial prefrontal cortex and anterior cingulate cortex. *Behavioural Brain Research* 250, 91-101.
- Bizon, J.L.P.D., Foster, T.C., Alexander, G.E., and Glisky, E.L. (2012). Characterizing cognitive aging of working memory and executive function in animal models. *Front. Aging Neurosci.* 4.
- Bliss, T.V.P., and Lømo, T. (1973). Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *The Journal of Physiology* 232, 331-356.

- Böhm, E., Brunert, D., and Rothermel, M. (2020). Input dependent modulation of olfactory bulb activity by HDB GABAergic projections. *Scientific Reports* 10, 10696.
- Boisselier, L., Ferry, B., and Gervais, R. (2014). Involvement of the lateral entorhinal cortex for the formation of cross-modal olfactory-tactile associations in the rat. *Hippocampus* 24, 877-891.
- Boldrini, M., Fulmore, C.A., Tartt, A.N., Simeon, L.R., Pavlova, I., Poposka, V., Rosoklija, G.B., Stankov, A., Arango, V., Dwork, A.J., et al. (2018). Human Hippocampal Neurogenesis Persists throughout Aging. *Cell Stem Cell* 22, 589-599.e5.
- Bonfanti, L. (2006). PSA-NCAM in mammalian structural plasticity and neurogenesis. *Progress in Neurobiology* 80, 129-164.
- Bouret, S. (2019). Locus Coeruleus, Noradrenaline, and Behavior: Network Effect, Network Effects? *Neuron* 103, 554-556.
- Bouret, S., and Sara, S.J. (2002). Locus coeruleus activation modulates firing rate and temporal organization of odour-induced single-cell responses in rat piriform cortex. *European Journal of Neuroscience* 16, 2371-2382.
- Bowman, G.L. (2017). Biomarkers for early detection of Parkinson disease: A scent of consistency with olfactory dysfunction. *Neurology* 89, 1432-1434.
- Breer, H. (2003). Olfactory receptors: molecular basis for recognition and discrimination of odors. *Anal Bioanal Chem* 377, 427-433.
- Brenes, J.C., Padilla, M., and Fornaguera, J. (2009). A detailed analysis of open-field habituation and behavioral and neurochemical antidepressant-like effects in postweaning enriched rats. *Behavioural Brain Research* 197, 125-137.
- Breton-Provencher, V., and Sur, M. (2019). Active control of arousal by a locus coeruleus GABAergic circuit. *Nat Neurosci* 22, 218-228.
- Breton-Provencher, V., Lemasson, M., Peralta, M.R., and Saghatelian, A. (2009). Interneurons Produced in Adulthood Are Required for the Normal Functioning of the Olfactory Bulb Network and for the Execution of Selected Olfactory Behaviors. *J. Neurosci.* 29, 15245-15257.
- Brunert, D., and Rothermel, M. (2021). Extrinsic neuromodulation in the rodent olfactory bulb. *Cell Tissue Res* 383, 507-524.
- Brunjes, P.C., Illig, K.R., and Meyer, E.A. (2005). A field guide to the anterior olfactory nucleus (cortex). *Brain Research Reviews* 50, 305-335.
- Bryche, B., Baly, C., and Meunier, N. (2021). Modulation of olfactory signal detection in the olfactory epithelium: focus on the internal and external environment, and the emerging role of the immune system. *Cell Tissue Res* 384, 589-605.
- Buck, L., and Axel, R. (1991). A Novel Multigene Family May Encode Odorant Receptors: A Molecular Basis for Odor Recognition. 13.
- Buonviso, N., and Chaput, M. (1999). Olfactory experience decreases responsiveness of the olfactory bulb in the adult rat. *Neuroscience* 95, 325-332.
- Burke, S.N., and Barnes, C.A. (2006). Neural plasticity in the ageing brain. *Nature Reviews Neuroscience* 7, 30-40.
- Burke, S.N., Hartzell, A.L., Lister, J.P., Hoang, L.T., and Barnes, C.A. (2012). Layer V perirhinal cortical ensemble activity during object exploration: A comparison between young and aged rats. *Hippocampus* 22, 2080-2093.
- Burton, S.D. (2017). Inhibitory circuits of the mammalian main olfactory bulb. *Journal of Neurophysiology* 118, 2034-2051.

- Bushdid, C., Magnasco, M.O., Vosshall, L.B., and Keller, A. (2014). Humans can Discriminate more than one Trillion Olfactory Stimuli. *Science* 343, 1370-1372.
- Cabeza, R. (2002). Hemispheric asymmetry reduction in older adults: the HAROLD model. *Psychol Aging* 17, 85-100.
- Cabeza, R., Albert, M., Belleville, S., Craik, F.I.M., Duarte, A., Grady, C.L., Lindenberger, U., Nyberg, L., Park, D.C., Reuter-Lorenz, P.A., et al. (2018). Maintenance, reserve and compensation: the cognitive neuroscience of healthy ageing. *Nature Reviews Neuroscience* 19, 701-710.
- Cain, W.S., Stevens, J.C., Nickou, C.M., Giles, A., Johnston, I., and Garcia-Medina, M.R. (1995). Life-Span Development of Odor Identification, Learning, and Olfactory Sensitivity. *Perception* 24, 1457-1472.
- Cappell, K.A., Gmeindl, L., and Reuter-Lorenz, P.A. (2010). Age differences in prefrontal recruitment during verbal working memory maintenance depend on memory load. *Cortex* 46, 462-473.
- Carleton, A., Petreanu, L.T., Lansford, R., Alvarez-Buylla, A., and Lledo, P.-M. (2003). Becoming a new neuron in the adult olfactory bulb. *Nat Neurosci* 6, 507-518.
- Carlson, K.S., Whitney, M.S., Gadziola, M.A., Deneris, E.S., and Wesson, D.W. (2016). Preservation of Essential Odor-Guided Behaviors and Odor-Based Reversal Learning after Targeting Adult Brain Serotonin Synthesis. *ENeuro* 3.
- Carlson, K.S., Gadziola, M.A., Dauster, E.S., and Wesson, D.W. (2018). Selective Attention Controls Olfactory Decisions and the Neural Encoding of Odors. *Current Biology* 28, 2195-2205.e4.
- Carreiras, M., Seghier, M.L., Baquero, S., Estévez, A., Lozano, A., Devlin, J.T., and Price, C.J. (2009). An anatomical signature for literacy. *Nature* 461, 983-986.
- Carter, M.E., Yizhar, O., Chikahisa, S., Nguyen, H., Adamantidis, A., Nishino, S., Deisseroth, K., and de Lecea, L. (2010). Tuning arousal with optogenetic modulation of locus coeruleus neurons. *Nature Neuroscience* 13, 1526-1533.
- Cavelius, M., Greco-Vuilloud, J., Thévenet, M., and Didier, A. (2021). Context-dependent asymmetric processing of olfactory information. in prep.
- Cerf-Ducastel, B., and Murphy, C. (2003). fMRI brain activation in response to odors is reduced in primary olfactory areas of elderly subjects. *Brain Research* 986, 39-53.
- Cerpa, J.-C., Marchand, A.R., and Coutureau, E. (2019). Distinct regional patterns in noradrenergic innervation of the rat prefrontal cortex. *Journal of Chemical Neuroanatomy* 96, 102-109.
- Cès, A., Burg, T., Herbeaux, K., Héraud, C., Bott, J.-B., Mensah-Nyagan, A.G., and Mathis, C. (2018). Age-related vulnerability of pattern separation in C57BL/6J mice. *Neurobiology of Aging* 62, 120-129.
- Chan, P., Gabay, M., Wright, F.A., Kan, W., Oner, S.S., Lanier, S.M., Smrcka, A.V., Blumer, J.B., and Tall, G.G. (2011). Purification of Heterotrimeric G Protein α Subunits by GST-Ric-8 Association: PRIMARY CHARACTERIZATION OF PURIFIED G α o1f*. *Journal of Biological Chemistry* 286, 2625-2635.
- Chapuis, J., Cohen, Y., He, X., Zhang, Z., Jin, S., Xu, F., and Wilson, D.A. (2013). Lateral Entorhinal Modulation of Piriform Cortical Activity and Fine Odor Discrimination. *J. Neurosci.* 33, 13449-13459.
- Cheke, L.G. (2016). What-where-when memory and encoding strategies in healthy aging. *Learn. Mem.* 23, 121-126.

- Chen, C.-F.F., Zou, D.-J., Altomare, C.G., Xu, L., Greer, C.A., and Firestein, S.J. (2014). Nonsensory target-dependent organization of piriform cortex. *PNAS* *111*, 16931-16936.
- Choi, B.Y., Jeong, H., Noh, H., Park, J.Y., Cho, J.H., and Kim, J.K. (2020). Effects of Olfactory Training in Patients With Postinfectious Olfactory Dysfunction. *Clin Exp Otorhinolaryngol* *14*, 88-92.
- Choi, G.B., Stettler, D.D., Kallman, B.R., Bhaskar, S.T., Fleischmann, A., and Axel, R. (2011). Driving Opposing Behaviors with Ensembles of Piriform Neurons. *Cell* *146*, 1004-1015.
- Choudhury, E.S. (2003). Influences of Age and Sex on a Microencapsulated Odor Memory Test. *Chemical Senses* *28*, 799-805.
- Chu, M.W., Li, W.L., and Komiyama, T. (2016). Balancing the Robustness and Efficiency of Odor Representations during Learning. *Neuron* *92*, 174-186.
- Ciombor, K.J., Ennis, M., and Shipley, M.T. (1999). Norepinephrine increases rat mitral cell excitatory responses to weak olfactory nerve input via alpha-1 receptors in vitro. *Neuroscience* *90*, 595-606.
- Clayton, E.C., Rajkowski, J., Cohen, J.D., and Aston-Jones, G. (2004). Phasic Activation of Monkey Locus Coeruleus Neurons by Simple Decisions in a Forced-Choice Task. *J. Neurosci.* *24*, 9914-9920.
- Cleland, T.A., and Linstner, C. (2005). Computation in the Olfactory System. *Chemical Senses* *30*, 801-813.
- Cleland, T.A., and Linstner, C. (2019). Chapter 6 - Central olfactory structures. In *Handbook of Clinical Neurology*, R.L. Doty, ed. (Elsevier), pp. 79-96.
- Cleland, T.A., and Sethupathy, P. (2006). Non-topographical contrast enhancement in the olfactory bulb. *BMC Neurosci* *7*, 1-18.
- Cleland, T.A., Johnson, B.A., Leon, M., and Linstner, C. (2007). Relational representation in the olfactory system. *PNAS* *104*, 1953-1958.
- Clewett, D.V., Lee, T.-H., Greening, S., Ponzio, A., Margalit, E., and Mather, M. (2016). Neuromelanin marks the spot: identifying a locus coeruleus biomarker of cognitive reserve in healthy aging. *Neurobiology of Aging* *37*, 117-126.
- Collins, G.G.S., Probett, G.A., Anson, J., and McLaughlin, N.J. (1984). Excitatory and inhibitory effects of noradrenaline on synaptic transmission in the rat olfactory cortex slice. *Brain Research* *294*, 211-223.
- Compton, D.M., Dietrich, K.L., Smith, J.S., and Davis, B.K. (1995). Spatial and non-spatial learning in the rat following lesions to the nucleus locus coeruleus. *Neuroreport* *7*, 177-182.
- Conley, D.B., Robinson, A.M., Shinnors, M.J., and Kern, R.C. (2003). Age-Related Olfactory Dysfunction: Cellular and Molecular Characterization in the Rat. *American Journal of Rhinology* *17*, 169-175.
- Cooper-Kuhn, C.M., Winkler, J., and Kuhn, H.G. (2004). Decreased neurogenesis after cholinergic forebrain lesion in the adult rat. *Journal of Neuroscience Research* *77*, 155-165.
- Coradazzi, M., Gulino, R., Fieramosca, F., Falzacappa, L.V., Riggi, M., and Leanza, G. (2016). Selective noradrenaline depletion impairs working memory and hippocampal neurogenesis. *Neurobiology of Aging* *48*, 93-102.

- Crowell, C.A., Davis, S.W., Beynel, L., Deng, L., Lakhiani, D., Hilbig, S.A., Palmer, H., Brito, A., Peterchev, A.V., Lubner, B., et al. (2020). Older adults benefit from more widespread brain network integration during working memory. *NeuroImage* 218, 116959.
- Croy, I., and Hummel, T. (2017). Olfaction as a marker for depression. *J Neurol* 264, 631-638.
- Croy, I., Nordin, S., and Hummel, T. (2014). Olfactory Disorders and Quality of Life—An Updated Review. *Chem Senses* 39, 185-194.
- Croy, I., Zehner, C., Larsson, M., Zucco, G.M., and Hummel, T. (2015). Test-Retest Reliability and Validity of the Sniffin' TOM Odor Memory Test. *Chemical Senses* 40, 173-179.
- Curcio, C.A., McNelly, N.A., and Hinds, J.W. (1985). Aging in the rat olfactory system: Relative stability of piriform cortex contrasts with changes in olfactory bulb and olfactory epithelium. *J. Comp. Neurol.* 235, 519-528.
- Curtis, M.A., Kam, M., Nannmark, U., Anderson, M.F., Axell, M.Z., Wikkelsø, C., Holtås, S., Roon-Mom, W.M.C. van, Björk-Eriksson, T., Nordborg, C., et al. (2007). Human Neuroblasts Migrate to the Olfactory Bulb via a Lateral Ventricular Extension. *Science* 315, 1243-1249.
- Dahl, M.J., Mather, M., Düzel, S., Bodammer, N.C., Lindenberger, U., Kühn, S., and Werkle-Bergner, M. (2019). Rostral locus coeruleus integrity is associated with better memory performance in older adults. *Nat Hum Behav* 3, 1203-1214.
- Dahlen, J.E., Jimenez, D.A., Gerkin, R.C., and Urban, N.N. (2011). Morphological Analysis of Activity-Reduced Adult-Born Neurons in the Mouse Olfactory Bulb. *Front. Neurosci.* 5.
- Dahmani, L., Patel, R.M., Yang, Y., Chakravarty, M.M., Fellows, L.K., and Bohbot, V.D. (2018). An intrinsic association between olfactory identification and spatial memory in humans. *Nat Commun* 9, 4162.
- Dalley, J.W., Cardinal, R.N., and Robbins, T.W. (2004). Prefrontal executive and cognitive functions in rodents: neural and neurochemical substrates. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 28, 771-784.
- Damm, M., Pikart, L.K., Reimann, H., Burkert, S., Göktas, Ö., Haxel, B., Frey, S., Charalampakis, I., Beule, A., Renner, B., et al. (2014). Olfactory training is helpful in postinfectious olfactory loss: A randomized, controlled, multicenter study. *The Laryngoscope* 124, 826-831.
- Dardou, D., Datiche, F., and Cattarelli, M. (2008). Memory is differently impaired during aging according to the learning tasks in the rat. *Behavioural Brain Research* 194, 193-200.
- Dardou, D., Datiche, F., and Cattarelli, M. (2010). Does the olfactory cue activate the same brain network during aging in the rat after taste potentiated odor aversion retrieval? *Neurobiology of Learning and Memory* 93, 137-150.
- Daroles, L., Gribaudo, S., Doulazmi, M., Scotto-Lomassese, S., Dubacq, C., Mandairon, N., Greer, C.A., Didier, A., Trembleau, A., and Caillé, I. (2016). Fragile X Mental Retardation Protein and Dendritic Local Translation of the Alpha Subunit of the Calcium/Calmodulin-Dependent Kinase II Messenger RNA Are Required for the Structural Plasticity Underlying Olfactory Learning. *Biological Psychiatry* 80, 149-159.

- Daselaar, S.M., Fleck, M.S., Dobbins, I.G., Madden, D.J., and Cabeza, R. (2006). Effects of Healthy Aging on Hippocampal and Rhinal Memory Functions: An Event-Related fMRI Study. *Cerebral Cortex* 16, 1771-1782.
- Davis, S.W., Dennis, N.A., Daselaar, S.M., Fleck, M.S., and Cabeza, R. (2008). Qué PASA? The Posterior-Anterior Shift in Aging. *Cerebral Cortex* 18, 1201-1209.
- Desai, M., Pratt, L.A., Lentzner, H., and Robinson, K.N. (2001). Trends in Vision and Hearing Among Older Americans: (620682007-001) (American Psychological Association).
- Devoto, P., Flore, G., Pani, L., and Gessa, G.L. (2001). Evidence for co-release of noradrenaline and dopamine from noradrenergic neurons in the cerebral cortex. *Mol Psychiatry* 6, 657-664.
- Devoto, P., Flore, G., Saba, P., Fà, M., and Gessa, G.L. (2005). Stimulation of the locus coeruleus elicits noradrenaline and dopamine release in the medial prefrontal and parietal cortex. *Journal of Neurochemistry* 92, 368-374.
- Dias, N.S., Ferreira, D., Reis, J., Jacinto, L.R., Fernandes, L., Pinho, F., Festa, J., Pereira, M., Afonso, N., Santos, N.C., et al. (2015). Age effects on EEG correlates of the Wisconsin Card Sorting Test. *Physiol Rep* 3.
- Diersch, N., Valdes-Herrera, J.P., Tempelmann, C., and Wolbers, T. (2021). Increased hippocampal excitability and altered learning dynamics mediate cognitive mapping deficits in human aging. *J Neurosci*.
- Dintica, C.S., Marseglia, A., Rizzuto, D., Wang, R., Seubert, J., Arfanakis, K., Bennett, D.A., and Xu, W. (2019). Impaired olfaction is associated with cognitive decline and neurodegeneration in the brain. *Neurology* 92, e700-e709.
- Doty, R.L. (2019). Chapter 1 - Epidemiology of smell and taste dysfunction. In *Handbook of Clinical Neurology*, R.L. Doty, ed. (Elsevier), pp. 3-13.
- Doty, R.L., and Kamath, V. (2014). The influences of age on olfaction: a review. *Front Psychol* 5, 20.
- Doty, R.L., Shaman, P., and Dann, M. (1984). Development of the university of pennsylvania smell identification test: A standardized microencapsulated test of olfactory function. *Physiology & Behavior* 32, 489-502.
- Doucette, W., Milder, J., and Restrepo, D. (2007). Adrenergic modulation of olfactory bulb circuitry affects odor discrimination. *Learning & Memory* 14, 539-547.
- Duchamp-Viret, P., Chaput, M.A., and Duchamp, A. (1999). Odor Response Properties of Rat Olfactory Receptor Neurons. *Science* 284, 2171-2174.
- Dudchenko, P.A. (2004). An overview of the tasks used to test working memory in rodents. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 28, 699-709.
- Durante, M.A., Kurtenbach, S., Sargi, Z.B., Harbour, J.W., Choi, R., Kurtenbach, S., Goss, G.M., Matsunami, H., and Goldstein, B.J. (2020). Single-cell analysis of olfactory neurogenesis and differentiation in adult humans. *Nat Neurosci* 23, 323-326.
- Engvig, A., Fjell, A.M., Westlye, L.T., Moberget, T., Sundseth, Ø., Larsen, V.A., and Walhovd, K.B. (2012). Memory training impacts short-term changes in aging white matter: A Longitudinal Diffusion Tensor Imaging Study. *Human Brain Mapping* 33, 2390-2406.
- Ennis, M., Zhou, F.-M., Ciombor, K.J., Aroniadou-Anderjaska, V., Hayar, A., Borrelli, E., Zimmer, L.A., Margolis, F., and Shipley, M.T. (2001). Dopamine D2 Receptor-Mediated Presynaptic Inhibition of Olfactory Nerve Terminals. *Journal of Neurophysiology* 86, 2986-2997.

- Enwere, E. (2004). Aging Results in Reduced Epidermal Growth Factor Receptor Signaling, Diminished Olfactory Neurogenesis, and Deficits in Fine Olfactory Discrimination. *Journal of Neuroscience* 24, 8354-8365.
- Eriksson, P.S., Perfilieva, E., Björk-Eriksson, T., Alborn, A.-M., Nordborg, C., Peterson, D.A., and Gage, F.H. (1998). Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med* 4, 1313-1317.
- Ernst, A., Alkass, K., Bernard, S., Salehpour, M., Perl, S., Tisdale, J., Possnert, G., Druid, H., and Frisén, J. (2014). Neurogenesis in the Striatum of the Adult Human Brain. *Cell* 156, 1072-1083.
- Escanilla, O., Arrellanos, A., Karnow, A., Ennis, M., and Linster, C. (2010). Noradrenergic modulation of behavioral odor detection and discrimination thresholds in the olfactory bulb: Noradrenergic modulation of bulbar odor processing. *European Journal of Neuroscience* 32, 458-468.
- Faturi, C.B., Leite, J.R., Alves, P.B., Canton, A.C., and Teixeira-Silva, F. (2010). Anxiolytic-like effect of sweet orange aroma in Wistar rats. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 34, 605-609.
- Fera, F., Weickert, T.W., Goldberg, T.E., Tessitore, A., Hariri, A., Das, S., Lee, S., Zolnick, B., Meeter, M., Myers, C.E., et al. (2005). Neural Mechanisms Underlying Probabilistic Category Learning in Normal Aging. *J. Neurosci.* 25, 11340-11348.
- Ferdenzi, C., Rouby, C., and Bensafi, M. (2016). The Social Nose: Importance of Olfactory Perception in Group Dynamics and Relationships. *Psychological Inquiry* 27, 299-305.
- Fiorelli, R., Azim, K., Fischer, B., and Raineteau, O. (2015). Adding a spatial dimension to postnatal ventricular-subventricular zone neurogenesis. *Development* 142, 2109-2120.
- Fleiner, F., Lau, L., and Göktas, Ö. (2012). Active Olfactory Training for the treatment of Smelling Disorders. *Ear Nose Throat J* 91, 198-215.
- Fletcher, M.L., and Chen, W.R. (2010). Neural correlates of olfactory learning: Critical role of centrifugal neuromodulation. *Learning & Memory* 17, 561-570.
- Fletcher, M.L., and Wilson, D.A. (2002). Experience Modifies Olfactory Acuity: Acetylcholine-Dependent Learning Decreases Behavioral Generalization between Similar Odorants. *J. Neurosci.* 22, RC201-RC201.
- Foote, S.L., Aston-Jones, G., and Bloom, F.E. (1980). Impulse activity of locus coeruleus neurons in awake rats and monkeys is a function of sensory stimulation and arousal. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77, 3033-3037.
- Forest, J., Moreno, M., Cavellius, M., Chalénçon, L., Ziessel, A., Sacquet, J., Richard, M., Didier, A., and Mandairon, N. (2019). Short-term availability of adult-born neurons for memory encoding. *Nat Commun* 10, 1-9.
- Forest, J., Chalénçon, L., Midroit, M., Terrier, C., Caillé, I., Sacquet, J., Benetollo, C., Martin, K., Richard, M., Didier, A., et al. (2020). Role of Adult-Born Versus Preexisting Neurons Born at P0 in Olfactory Perception in a Complex Olfactory Environment in Mice. *Cereb Cortex*.
- Foster, T.C., DeFazio, R.A., and Bizon, J.L. (2012). Characterizing cognitive aging of spatial and contextual memory in animal models. *Front. Aging Neurosci.* 4.

- Fritschy, J.M., and Grzanna, R. (1992). Restoration of ascending noradrenergic projections by residual locus coeruleus neurons: compensatory response to neurotoxin-induced cell death in the adult rat brain. *J. Comp. Neurol.* 321, 421-441.
- Fuchs, F., Cosquer, B., Penazzi, L., Mathis, C., Kelche, C., Majchrzak, M., and Barbelivien, A. (2016a). Exposure to an enriched environment up to middle age allows preservation of spatial memory capabilities in old age. *Behavioural Brain Research* 299, 1-5.
- Fuchs, F., Herbeaux, K., Aufrere, N., Kelche, C., Mathis, C., Barbelivien, A., and Majchrzak, M. (2016b). Late enrichment maintains accurate recent and remote spatial memory only in aged rats that were unimpaired when middle aged. *Learn. Mem.* 23, 303-312.
- Galani, R., Berthel, M.-C., Lazarus, C., Majchrzak, M., Barbelivien, A., Kelche, C., and Cassel, J.-C. (2007). The behavioral effects of enriched housing are not altered by serotonin depletion but enrichment alters hippocampal neurochemistry. *Neurobiology of Learning and Memory* 88, 1-10.
- Gao, Y., and Strowbridge, B.W. (2009). Long-term plasticity of excitatory inputs to granule cells in the rat olfactory bulb. *Nat Neurosci* 12, 731-733.
- Garrido, P. (2011). Aging and stress: past hypotheses, present approaches and perspectives. *Aging Dis* 2, 80-99.
- Gaser, C., and Schlaug, G. (2003). Brain Structures Differ between Musicians and Non-Musicians. *J. Neurosci.* 23, 9240-9245.
- Gaudry, Q. (2018). Serotonergic Modulation of Olfaction in Rodents and Insects. *Yale J Biol Med* 91, 23-32.
- Geißler, K., Reimann, H., Gudziol, H., Bitter, T., and Guntinas-Lichius, O. (2014). Olfactory training for patients with olfactory loss after upper respiratory tract infections. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 271, 1557-1562.
- Gelfo, F. (2019). Does Experience Enhance Cognitive Flexibility? An Overview of the Evidence Provided by the Environmental Enrichment Studies. *Front. Behav. Neurosci.* 13.
- Gelfo, F., Mandolesi, L., Serra, L., Sorrentino, G., and Caltagirone, C. (2018). The Neuroprotective Effects of Experience on Cognitive Functions: Evidence from Animal Studies on the Neurobiological Bases of Brain Reserve. *Neuroscience* 370, 218-235.
- Gelinas, J.N., and Nguyen, P.V. (2005). β -Adrenergic Receptor Activation Facilitates Induction of a Protein Synthesis-Dependent Late Phase of Long-Term Potentiation. *J. Neurosci.* 25, 3294-3303.
- Ghosh, S., Larson, S.D., Hefzi, H., Marnoy, Z., Cutforth, T., Dokka, K., and Baldwin, K.K. (2011). Sensory maps in the olfactory cortex defined by long-range viral tracing of single neurons. *Nature* 472, 217-220.
- Gilbert, C.D., Sigman, M., and Crist, R.E. (2001). The Neural Basis of Perceptual Learning. *Neuron* 31, 681-697.
- Glachet, O., and El Haj, M. (2020). Effects of Olfactory Stimulation on Past and Future Thinking in Alzheimer's Disease. *Chemical Senses* 45, 313-320.
- Glachet, O., Gandolphe, M.-C., Gallouj, K., Antoine, P., and El Haj, M. (2018). Effects of olfactory stimulation on autobiographical memory in Alzheimer's disease. *Geriatr Psychol Neuropsychiatr Vieil* 16, 311-320.

- Gocel, J., and Larson, J. (2013). Evidence for loss of synaptic AMPA receptors in anterior piriform cortex of aged mice. *Front. Aging Neurosci.* 5.
- Gómez, C., Briñón, J.G., Colado, M.I., Orio, L., Vidal, M., Barbado, M.V., and Alonso, J.R. (2006). Differential effects of unilateral olfactory deprivation on noradrenergic and cholinergic systems in the main olfactory bulb of the rat. *Neuroscience* 141, 2117-2128.
- Goncalves, S., and Goldstein, B. (2016). Pathophysiology of Olfactory Disorders and Potential Treatment Strategies. *Current Otorhinolaryngology Reports* 4.
- Gopinath, B., Sue, C.M., Kifley, A., and Mitchell, P. (2012). The Association Between Olfactory Impairment and Total Mortality in Older Adults. *The Journals of Gerontology: Series A* 67A, 204-209.
- Gottfried, J.A., Winston, J.S., and Dolan, R.J. (2006). Dissociable Codes of Odor Quality and Odorant Structure in Human Piriform Cortex. *Neuron* 49, 467-479.
- Grady, C. (2012). The cognitive neuroscience of ageing. *Nature Reviews Neuroscience* 13, 491-505.
- Grady, C.L., Maisog, J.M., Horwitz, B., Ungerleider, L.G., Mentis, M.J., Salerno, J.A., Pietrini, P., Wagner, E., and Haxby, J.V. (1994). Age-related changes in cortical blood flow activation during visual processing of faces and location. *J. Neurosci.* 14, 1450-1462.
- Graves, A.B., Mortimer, J.A., Larson, E.B., Wenzlow, A., Bowen, J.D., and McCormick, W.C. (1996). Head Circumference as a Measure of Cognitive Reserve: Association with Severity of Impairment in Alzheimer's Disease. *The British Journal of Psychiatry* 169, 86-92.
- Graves, A.B., Mortimer, J.A., Bowen, J.D., McCormick, W.C., McCurry, S.M., Schellenberg, G.D., and Larson, E.B. (2001). Head circumference and incident Alzheimer's disease: Modification by apolipoprotein E. *Neurology* 57, 1453-1460.
- Gray, N.E., Zweig, J.A., Caruso, M., Martin, M.D., Zhu, J.Y., Quinn, J.F., and Soumyanath, A. (2018). Centella asiatica increases hippocampal synaptic density and improves memory and executive function in aged mice. *Brain and Behavior* 8, e01024.
- Graziadei, P.P., Levine, R.R., and Graziadei, G.A. (1978). Regeneration of olfactory axons and synapse formation in the forebrain after bullectomy in neonatal mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75, 5230-5234.
- Grelat, A., Benoit, L., Wagner, S., Moigneu, C., Lledo, P.-M., and Alonso, M. (2018). Adult-born neurons boost odor-reward association. *PNAS* 115, 2514-2519.
- de Groot, J.H.B., Smeets, M.A.M., Rowson, M.J., Bulsing, P.J., Blonk, C.G., Wilkinson, J.E., and Semin, G.R. (2015). A Sniff of Happiness. *Psychol Sci* 26, 684-700.
- Gudziol, V., and Hummel, T. (2009). Effects of pentoxifylline on olfactory sensitivity: a postmarketing surveillance study. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 135, 291-295.
- Guérin, D., Peace, S.T., Didier, A., Linster, C., and Cleland, T.A. (2008). Noradrenergic neuromodulation in the olfactory bulb modulates odor habituation and spontaneous discrimination. *Behavioral Neuroscience* 122, 816-826.
- Haberly, L.B., and Price, J.L. (1978). Association and commissural fiber systems of the olfactory cortex of the rat II. Systems originating in the olfactory peduncle. *J. Comp. Neurol.* 181, 781-807.

- Håglin, S., Berghard, A., and Bohm, S. (2020). Increased Retinoic Acid Catabolism in Olfactory Sensory Neurons Activates Dormant Tissue-Specific Stem Cells and Accelerates Age-Related Metaplasia. *J. Neurosci.* *40*, 4116-4129.
- Hansen, N. (2017). The Longevity of Hippocampus-Dependent Memory Is Orchestrated by the Locus Coeruleus-Noradrenergic System. *Neural Plasticity* *2017*, 1-9.
- Hansen, N., and Manahan-Vaughan, D. (2015a). Locus Coeruleus Stimulation Facilitates Long-Term Depression in the Dentate Gyrus That Requires Activation of β -Adrenergic Receptors. *Cerebral Cortex* *25*, 1889-1896.
- Hansen, N., and Manahan-Vaughan, D. (2015b). Hippocampal long-term potentiation that is elicited by perforant path stimulation or that occurs in conjunction with spatial learning is tightly controlled by beta-adrenoreceptors and the locus coeruleus. *Hippocampus* *25*, 1285-1298.
- Harati, H., Barbelivien, A., Herbeaux, K., Muller, M.-A., Engeln, M., Kelche, C., Cassel, J.-C., and Majchrzak, M. (2013). Lifelong environmental enrichment in rats: impact on emotional behavior, spatial memory vividness, and cholinergic neurons over the lifespan. *AGE* *35*, 1027-1043.
- Hardy, A., Palouzier-Paulignan, B., Duchamp, A., Royet, J.-P., and Duchamp-Viret, P. (2005). 5-hydroxytryptamine action in the rat olfactory bulb: In vitro electrophysiological patch-clamp recordings of juxtglomerular and mitral cells. *Neuroscience* *131*, 717-731.
- Harvey, J.D., and Heinbockel, T. (2018). Neuromodulation of Synaptic Transmission in the Main Olfactory Bulb. *International Journal of Environmental Research and Public Health* *15*, 2194.
- Hayar, A., Heyward, P.M., Heinbockel, T., Shipley, M.T., and Ennis, M. (2001). Direct Excitation of Mitral Cells Via Activation of α 1-Noradrenergic Receptors in Rat Olfactory Bulb Slices. *Journal of Neurophysiology* *86*, 2173-2182.
- Head, D., Kennedy, K.M., Rodrigue, K.M., and Raz, N. (2009). Age differences in perseveration: Cognitive and neuroanatomical mediators of performance on the Wisconsin Card Sorting Test. *Neuropsychologia* *47*, 1200-1203.
- Henkin, R.I., Velicu, I., and Schmidt, L. (2009). An Open-Label Controlled Trial of Theophylline for Treatment of Patients With Hyposmia. *The American Journal of the Medical Sciences* *337*, 396-406.
- Hinds, J.W., and McNelly, N.A. (1977). Aging of the rat olfactory bulb: Growth and atrophy of constituent layers and changes in size and number of mitral cells. *J. Comp. Neurol.* *171*, 345-367.
- Hinds, J.W., and McNelly, N.A. (1981). Aging in the rat olfactory system: Correlation of changes in the olfactory epithelium and olfactory bulb. *J. Comp. Neurol.* *203*, 441-453.
- Howard, J.D., Plailly, J., Grueschow, M., Haynes, J.-D., and Gottfried, J.A. (2009). Odor quality coding and categorization in human posterior piriform cortex. *Nat Neurosci* *12*, 932-938.
- Hultsch, D.F., Hertzog, C., Small, B.J., McDonald-Miszczak, L., and Dixon, R.A. (1992). Short-term longitudinal change in cognitive performance in later life. *Psychol Aging* *7*, 571-584.
- Hummel, T., and Nordin, S. (2005). Olfactory disorders and their consequences for quality of life. *Acta Oto-Laryngologica* *125*, 116-121.

- Hummel, T., Heilmann, S., and Hüttenbrink, K.-B. (2002). Lipoic Acid in the Treatment of Smell Dysfunction Following Viral Infection of the Upper Respiratory Tract. *The Laryngoscope* 112, 2076-2080.
- Hummel, T., Kobal, G., Gudziol, H., and Mackay-Sim, A. (2007). Normative data for the "Sniffin' Sticks" including tests of odor identification, odor discrimination, and olfactory thresholds: an upgrade based on a group of more than 3,000 subjects. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology* 264, 237-243.
- Hummel, T., Rissom, K., Reden, J., Hähner, A., Weidenbecher, M., and Hüttenbrink, K.-B. (2009). Effects of olfactory training in patients with olfactory loss. *The Laryngoscope* 119, 496-499.
- Hummel, T., Croy, I., and Haehner, A. (2016). 16 - Olfactory disorders and consequences. In Flavor, P. Etiévant, E. Guichard, C. Salles, and A. Voilley, eds. (Woodhead Publishing), pp. 363-377.
- Hummel, T., Whitcroft, K.L., Andrews, P., Altundag, A., Cinghi, C., Costanzo, R.M., Damm, M., Frasnelli, J., Gudziol, H., Gupta, N., et al. (2017). Position paper on olfactory dysfunction. *Rhinol. Suppl.* 54, 1-30.
- Iaria, G., Palermo, L., Committeri, G., and Barton, J.J.S. (2009). Age differences in the formation and use of cognitive maps. *Behavioural Brain Research* 196, 187-191.
- Ibarra-Soria, X., Nakahara, T.S., Lilue, J., Jiang, Y., Trimmer, C., Souza, M.A., Netto, P.H., Ikegami, K., Murphy, N.R., Kusma, M., et al. (2017). Variation in olfactory neuron repertoires is genetically controlled and environmentally modulated. *ELife* 6, e21476.
- Igarashi, K.M., Ieki, N., An, M., Yamaguchi, Y., Nagayama, S., Kobayakawa, K., Kobayakawa, R., Tanifuji, M., Sakano, H., Chen, W.R., et al. (2012). Parallel Mitral and Tufted Cell Pathways Route Distinct Odor Information to Different Targets in the Olfactory Cortex. *J. Neurosci.* 32, 7970-7985.
- Igarashi, K.M., Lu, L., Colgin, L.L., Moser, M.-B., and Moser, E.I. (2014). Coordination of entorhinal-hippocampal ensemble activity during associative learning. *Nature* 510, 143-147.
- Imai, T. (2014). Construction of functional neuronal circuitry in the olfactory bulb. *Semin Cell Dev Biol* 35, 180-188.
- Imai, T., and Sakano, H. (2008). Odorant receptor-mediated signaling in the mouse. *Curr Opin Neurobiol* 18, 251-260.
- Imayoshi, I., Sakamoto, M., Ohtsuka, T., Takao, K., Miyakawa, T., Yamaguchi, M., Mori, K., Ikeda, T., Itohara, S., and Kageyama, R. (2008). Roles of continuous neurogenesis in the structural and functional integrity of the adult forebrain. *Nat Neurosci* 11, 1153-1161.
- Ince, P. (2001). Dementia with Lewy bodies. *Adv Exp Med Biol* 487, 135-145.
- Irvine, G.I., Logan, B., Eckert, M., and Abraham, W.C. (2006). Enriched environment exposure regulates excitability, synaptic transmission, and LTP in the dentate gyrus of freely moving rats. *Hippocampus* 16, 149-160.
- Ishida, Y., Shirokawa, T., Miyaishi, O., Komatsu, Y., and Isobe, K. (2000). Age-dependent changes in projections from locus coeruleus to hippocampus dentate gyrus and frontal cortex. *European Journal of Neuroscience* 12, 1263-1270.

- Ishida, Y., Shirokawa, T., Komatsu, Y., and Isobe, K. (2001). Changes in cortical noradrenergic axon terminals of locus coeruleus neurons in aged F344 rats. *Neuroscience Letters* 307, 197-199.
- Islam, M.A., Fagundo, A.B., Arcelus, J., Agüera, Z., Jiménez-Murcia, S., Fernández-Real, J.M., Tinahones, F.J., de la Torre, R., Botella, C., Frühbeck, G., et al. (2015). Olfaction in eating disorders and abnormal eating behavior: a systematic review. *Front. Psychol.* 6.
- Iurilli, G., and Datta, S.R. (2017). Population Coding in an Innately Relevant Olfactory Area. *Neuron* 93, 1180-1197.e7.
- Izquierdo, A., Brigman, J.L., Radke, A.K., Rudebeck, P.H., and Holmes, A. (2017). The neural basis of reversal learning: An updated perspective. *Neuroscience* 345, 12-26.
- Jacob, S.N., and Nienborg, H. (2018). Monoaminergic Neuromodulation of Sensory Processing. *Front. Neural Circuits* 12.
- Jagust, W. (2013). Vulnerable Neural Systems and the Borderland of Brain Aging and Neurodegeneration. *Neuron* 77, 219-234.
- Jenkins, L., Myerson, J., Joerding, J.A., and Hale, S. (2000). Converging evidence that visuospatial cognition is more age-sensitive than verbal cognition. *Psychology and Aging*.
- Jiang, Y., Gong, N.N., Hu, X.S., Ni, M.J., Pasi, R., and Matsunami, H. (2015). Molecular profiling of activated olfactory neurons identifies odorant receptors for odors in vivo. *Nature Neuroscience* 18, 1446-1454.
- Jin, K., Sun, Y., Xie, L., Batteur, S., Mao, X.O., Smelick, C., Logvinova, A., and Greenberg, D.A. (2003). Neurogenesis and aging: FGF-2 and HB-EGF restore neurogenesis in hippocampus and subventricular zone of aged mice. *Aging Cell* 2, 175-183.
- Johnson, D.M.G., Illig, K.R., Behan, M., and Haberly, L.B. (2000). New Features of Connectivity in Piriform Cortex Visualized by Intracellular Injection of Pyramidal Cells Suggest that "Primary" Olfactory Cortex Functions Like "Association" Cortex in Other Sensory Systems. *J. Neurosci.* 20, 6974-6982.
- Jones, R.N., Manly, J., Glymour, M.M., Rentz, D.M., Jefferson, A.L., and Stern, Y. (2011). Conceptual and measurement challenges in research on cognitive reserve. *J Int Neuropsychol Soc* 17, 593-601.
- Jones, S.V., Choi, D.C., Davis, M., and Ressler, K.J. (2008). Learning-Dependent Structural Plasticity in the Adult Olfactory Pathway. *J. Neurosci.* 28, 13106-13111.
- Joussain, P., Rouby, C., and Bensafi, M. (2014). A pleasant familiar odor influences perceived stress and peripheral nervous system activity during normal aging. *Front Psychol* 5.
- Jurado, M.B., and Rosselli, M. (2007). The Elusive Nature of Executive Functions: A Review of our Current Understanding. *Neuropsychol Rev* 17, 213-233.
- Kahana-Zweig, R., Geva-Sagiv, M., Weissbrod, A., Secundo, L., Soroker, N., and Sobel, N. (2016). Measuring and Characterizing the Human Nasal Cycle. *PLOS ONE* 11, e0162918.
- Kamath, V., Paksarian, D., Cui, L., Moberg, P.J., Turetsky, B.I., and Merikangas, K.R. (2018). Olfactory processing in bipolar disorder, major depression, and anxiety. *Bipolar Disorders* 20, 547-555.
- Kandel, E.R. (2001). The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. *Science* 294, 1030-1038.

- Kaneda, H., Maeshima, K., Goto, N., Kobayakawa, T., Ayabe-Kanamura, S., and Saito, S. (2000). Decline in Taste and Odor Discrimination Abilities with Age, and Relationship between Gustation and Olfaction. *Chemical Senses* 25, 331-337.
- Kaneko, N., Okano, H., and Sawamoto, K. (2006). Role of the cholinergic system in regulating survival of newborn neurons in the adult mouse dentate gyrus and olfactory bulb. *Genes to Cells* 11, 1145-1159.
- Kaneko, N., Sawada, M., and Sawamoto, K. (2017). Mechanisms of neuronal migration in the adult brain. *Journal of Neurochemistry* 141, 835-847.
- Kapoor, V., Provost, A.C., Agarwal, P., and Murthy, V.N. (2016). Activation of raphe nuclei triggers rapid and distinct effects on parallel olfactory bulb output channels. *Nature Neuroscience* 19, 271-282.
- Kass, M.D., Rosenthal, M.C., Pottackal, J., and McGann, J.P. (2013). Fear Learning Enhances Neural Responses to Threat-Predictive Sensory Stimuli. *Science* 342, 1389-1392.
- Kass, M.D., Czarnecki, L.A., and McGann, J.P. (2018). Stable olfactory sensory neuron in vivo physiology during normal aging. *Neurobiology of Aging* 69, 33-37.
- Katzman, R., Terry, R., DeTeresa, R., Brown, T., Davies, P., Fuld, P., Renbing, X., and Peck, A. (1988). Clinical, pathological, and neurochemical changes in dementia: A subgroup with preserved mental status and numerous neocortical plaques. *Annals of Neurology* 23, 138-144.
- Kayser, R. (1895). Die exacte Messung der Inftdurchgangigkeit der nase. *Archev for Laryngol Rhinol.* 3, 101-120.
- Kebschull, J.M., Silva, P.G. da, Reid, A.P., Peikon, I.D., Albeanu, D.F., and Zador, A.M. (2016). High-Throughput Mapping of Single-Neuron Projections by Sequencing of Barcoded RNA. *Neuron* 91, 975-987.
- Keiger, C.J.H., and Walker, J.C. (2000). Individual variation in the expression profiles of nicotinic receptors in the olfactory bulb and trigeminal ganglion and identification of $\alpha 2$, $\alpha 6$, $\alpha 9$, and $\beta 3$ transcripts. *Biochemical Pharmacology* 59, 233-240.
- Kelsch, W., Lin, C.-W., and Lois, C. (2008). Sequential development of synapses in dendritic domains during adult neurogenesis. *PNAS* 105, 16803-16808.
- Kelsch, W., Lin, C.-W., Mosley, C.P., and Lois, C. (2009). A Critical Period for Activity-Dependent Synaptic Development during Olfactory Bulb Adult Neurogenesis. *J. Neurosci.* 29, 11852-11858.
- Kelsch, W., Sim, S., and Lois, C. (2010). Watching Synaptogenesis in the Adult Brain. *Annual Review of Neuroscience* 33, 131-149.
- Kempadoo, K.A., Mosharov, E.V., Choi, S.J., Sulzer, D., and Kandel, E.R. (2016). Dopamine release from the locus coeruleus to the dorsal hippocampus promotes spatial learning and memory. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113, 14835-14840.
- Kempermann, G. (2019). Environmental enrichment, new neurons and the neurobiology of individuality. *Nat Rev Neurosci* 20, 235-245.
- Kempermann, G., Kuhn, H.G., and Gage, F.H. (1998). Experience-Induced Neurogenesis in the Senescent Dentate Gyrus. *The Journal of Neuroscience* 18, 3206-3212.
- Kempermann, G., Gage, F.H., Aigner, L., Song, H., Curtis, M.A., Thuret, S., Kuhn, H.G., Jessberger, S., Frankland, P.W., Cameron, H.A., et al. (2018). Human Adult Neurogenesis: Evidence and Remaining Questions. *Cell Stem Cell* 23, 25-30.

- Kerr, K.M., Agster, K.L., Furtak, S.C., and Burwell, R.D. (2007). Functional neuroanatomy of the parahippocampal region: The lateral and medial entorhinal areas. *Hippocampus* 17, 697-708.
- Kershaw, J.C., and Mattes, R.D. (2018). Nutrition and taste and smell dysfunction. *World Journal of Otorhinolaryngology - Head and Neck Surgery* 4, 3-10.
- Kesner, R.P., and Churchwell, J.C. (2011). An analysis of rat prefrontal cortex in mediating executive function. *Neurobiology of Learning and Memory* 96, 417-431.
- Kikuta, S., Sato, K., Kashiwadani, H., Tsunoda, K., Yamasoba, T., and Mori, K. (2010). Neurons in the anterior olfactory nucleus pars externa detect right or left localization of odor sources. *PNAS* 107, 12363-12368.
- Kimmelman, C.P. (1994). The risk to olfaction from nasal surgery. *The Laryngoscope* 104, 981-988.
- Klanker, M., Feenstra, M., and Denys, D. (2013). Dopaminergic control of cognitive flexibility in humans and animals. *Frontiers in Neuroscience* 7, 201.
- Kleene, S.J. (2008). The Electrochemical Basis of Odor Transduction in Vertebrate Olfactory Cilia. *Chemical Senses* 33, 839-859.
- Klenoff, J.R., and Greer, C.A. (1998). Postnatal development of olfactory receptor cell axonal arbors. *J Comp Neurol* 390, 256-267.
- Knierim, J.J., Neunuebel, J.P., and Deshmukh, S.S. (2014). Functional correlates of the lateral and medial entorhinal cortex: objects, path integration and local-global reference frames. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 369, 20130369.
- Kohli, P., Soler, Z.M., Nguyen, S.A., Muus, J.S., and Schlosser, R.J. (2016). The Association Between Olfaction and Depression: A Systematic Review. *Chemical Senses* 41, 479-486.
- Kollndorfer, K., Kowalczyk, K., Hoche, E., Mueller, C.A., Pollak, M., Trattmig, S., and Schöpf, V. (2014). Recovery of Olfactory Function Induces Neuroplasticity Effects in Patients with Smell Loss. *Neural Plasticity* 2014, e140419.
- Kollndorfer, K., Fischmeister, F.Ph.S., Kowalczyk, K., Hoche, E., Mueller, C.A., Trattmig, S., and Schöpf, V. (2015). Olfactory training induces changes in regional functional connectivity in patients with long-term smell loss. *NeuroImage: Clinical* 9, 401-410.
- Kondo, K., Suzukawa, K., Sakamoto, T., Watanabe, K., Kanaya, K., Ushio, M., Yamaguchi, T., Nibu, K.-I., Kaga, K., and Yamasoba, T. (2010). Age-related changes in cell dynamics of the postnatal mouse olfactory neuroepithelium: Cell proliferation, neuronal differentiation, and cell death. *Journal of Comparative Neurology* 518, 1962-1975.
- Kondo, K., Kikuta, S., Ueha, R., Suzukawa, K., and Yamasoba, T. (2020). Age-Related Olfactory Dysfunction: Epidemiology, Pathophysiology, and Clinical Management. *Front. Aging Neurosci.* 12.
- Kondo, M., Takei, Y., and Hirokawa, N. (2012). Motor Protein KIF1A Is Essential for Hippocampal Synaptogenesis and Learning Enhancement in an Enriched Environment. *Neuron* 73, 743-757.
- Konishi, K., Etchamendy, N., Roy, S., Marighetto, A., Rajah, N., and Bohbot, V.D. (2013). Decreased functional magnetic resonance imaging activity in the hippocampus in favor of the caudate nucleus in older adults tested in a virtual navigation task. *Hippocampus* 23, 1005-1014.
- Konstantinidis, I., Hummel, T., and Larsson, M. (2006). Identification of unpleasant odors is independent of age. *Arch Clin Neuropsychol* 21, 615-621.

- Konstantinidis, I., Tsakiropoulou, E., Bekiaridou, P., Kazantzidou, C., and Constantinidis, J. (2013). Use of olfactory training in post-traumatic and postinfectious olfactory dysfunction. *The Laryngoscope* *123*, E85-E90.
- Konstantinidis, I., Tsakiropoulou, E., and Constantinidis, J. (2016). Long term effects of olfactory training in patients with post-infectious olfactory loss. *Rhin* *54*, 170-175.
- Kosaka, T., and Kosaka, K. (2011). "Interneurons" in the olfactory bulb revisited. *Neuroscience Research* *69*, 93-99.
- Kraemer, S., and Apfelbach, R. (2004). Olfactory sensitivity, learning and cognition in young adult and aged male Wistar rats. *Physiology & Behavior* *81*, 435-442.
- Kraeuter, A.-K., Guest, P.C., and Sarnyai, Z. (2019). The Y-Maze for Assessment of Spatial Working and Reference Memory in Mice. *Pre-Clinical Models: Techniques and Protocols* 105-111.
- Krmpotić-nemanić, J. (1969). Presbycusis, Presbystasis and Presbyosmia as Consequences of the Analogous Biological Process. *Acta Oto-Laryngologica* *67*, 217-223.
- Kromer, J., Hummel, T., Pietrowski, D., Giani, A.S., Sauter, J., Ehninger, G., Schmidt, A.H., and Croy, I. (2016). Influence of HLA on human partnership and sexual satisfaction. *Sci Rep* *6*, 32550.
- Kuhn, H.G., Dickinson-Anson, H., and Gage, F.H. (1996). Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J. Neurosci.* *16*, 2027-2033.
- Kulkarni, V.A., Jha, S., and Vaidya, V.A. (2002). Depletion of norepinephrine decreases the proliferation, but does not influence the survival and differentiation, of granule cell progenitors in the adult rat hippocampus. *European Journal of Neuroscience* *16*, 2008-2012.
- Kumar, A., Rani, A., Tchigranova, O., Lee, W.-H., and Foster, T.C. (2012). Influence of late-life exposure to environmental enrichment or exercise on hippocampal function and CA1 senescent physiology. *Neurobiology of Aging* *33*, 828.e1-828.e17.
- Kwapis, J.L., Alagband, Y., Kramár, E.A., López, A.J., Vogel Ciernia, A., White, A.O., Shu, G., Rhee, D., Michael, C.M., Montellier, E., et al. (2018). Epigenetic regulation of the circadian gene *Per1* contributes to age-related changes in hippocampal memory. *Nat Commun* *9*, 3323.
- Lafreniere, D., and Mann, N. (2009). Anosmia: Loss of Smell in the Elderly. *Otolaryngologic Clinics of North America* *42*, 123-131.
- Lagier, S., Panzanelli, P., Russo, R.E., Nissant, A., Bathellier, B., Sassoè-Pognetto, M., Fritschy, J.-M., and Lledo, P.-M. (2007). GABAergic inhibition at dendrodendritic synapses tunes γ oscillations in the olfactory bulb. *PNAS* *104*, 7259-7264.
- Lane, G., Zhou, G., Noto, T., and Zelano, C. (2020). Assessment of direct knowledge of the human olfactory system. *Experimental Neurology* *329*, 113304.
- Larsson, M., Öberg, C., and Bäckman, L. (2006). Recollective experience in odor recognition: Influences of adult age and familiarity. *Psychological Research* *70*, 68-75.
- Larsson, M., Hedner, M., Papenberg, G., Seubert, J., Bäckman, L., and Laukka, E.J. (2016). Olfactory memory in the old and very old: relations to episodic and semantic memory and APOE genotype. *Neurobiology of Aging* *38*, 118-126.
- Laska, M., and Teubner, P. (1999). Olfactory Discrimination Ability for Homologous Series of Aliphatic Alcohols and Aldehydes. *Chemical Senses* *24*, 263-270.

- Lazarini, F., and Lledo, P.-M. (2011). Is adult neurogenesis essential for olfaction? *Trends in Neurosciences* 34, 20–30.
- Lazarini, F., Mouthon, M.-A., Gheusi, G., Chaumont, F. de, Olivo-Marin, J.-C., Lamarque, S., Abrous, D.N., Boussin, F.D., and Lledo, P.-M. (2009). Cellular and Behavioral Effects of Cranial Irradiation of the Subventricular Zone in Adult Mice. *PLOS ONE* 4, e7017.
- Le Jeune, H., Aubert, I., Jourdan, F., and Quirion, R. (1995). Comparative laminar distribution of various autoradiographic cholinergic markers in adult rat main olfactory bulb. *Journal of Chemical Neuroanatomy* 9, 99–112.
- Lee, A.C., Tian, H., Grosmaître, X., and Ma, M. (2009). Expression Patterns of Odorant Receptors and Response Properties of Olfactory Sensory Neurons in Aged Mice. *Chemical Senses* 34, 695–703.
- Lee, D.H., Lee, P., Seo, S.W., Roh, J.H., Oh, M., Oh, J.S., Oh, S.J., Kim, J.S., and Jeong, Y. (2019). Neural substrates of cognitive reserve in Alzheimer’s disease spectrum and normal aging. *NeuroImage* 186, 690–702.
- Lehrner, J., Marwinski, G., Lehr, S., Johren, P., and Deecke, L. (2005). Ambient odors of orange and lavender reduce anxiety and improve mood in a dental office. *Physiology & Behavior* 86, 92–95.
- Lehrner, J.P., Glück, J., and Laska, M. (1999). Odor Identification, Consistency of Label Use, Olfactory Threshold and their Relationships to Odor Memory over the Human Lifespan. *Chemical Senses* 24, 337–346.
- Lemon, N., Aydin-Abidin, S., Funke, K., and Manahan-Vaughan, D. (2009). Locus Coeruleus Activation Facilitates Memory Encoding and Induces Hippocampal LTD that Depends on β -Adrenergic Receptor Activation. *Cerebral Cortex* 19, 2827–2837.
- Lepousez, G., Nissant, A., Bryant, A.K., Gheusi, G., Greer, C.A., and Lledo, P.-M. (2014). Olfactory learning promotes input-specific synaptic plasticity in adult-born neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111, 13984–13989.
- Lester, A.W., Moffat, S.D., Wiener, J.M., Barnes, C.A., and Wolbers, T. (2017). The Aging Navigational System. *Neuron* 95, 1019–1035.
- Levinson, M., Kolenda, J.P., Alexandrou, G.J., Escanilla, O., Cleland, T.A., Smith, D.M., and Linster, C. (2020). Context-dependent odor learning requires the anterior olfactory nucleus. *Behav Neurosci* 134, 332–343.
- Li, G., Linster, C., and Cleland, T.A. (2015). Functional differentiation of cholinergic and noradrenergic modulation in a biophysical model of olfactory bulb granule cells. *Journal of Neurophysiology* 114, 3177–3200.
- Li, S., Jin, M., Zhang, D., Yang, T., Koeglsperger, T., Fu, H., and Selkoe, D.J. (2013). Environmental Novelty Activates β 2-Adrenergic Signaling to Prevent the Impairment of Hippocampal LTP by A β Oligomers. *Neuron* 77, 929–941.
- Li, X., Yu, B., Sun, Q., Zhang, Y., Ren, M., Zhang, X., Li, A., Yuan, J., Madisen, L., Luo, Q., et al. (2018). Generation of a whole-brain atlas for the cholinergic system and mesoscopic projectome analysis of basal forebrain cholinergic neurons. *PNAS* 115, 415–420.
- Li, X., Tong, M., Wang, L., Qin, Y., Yu, H., and Yu, Y. (2020). Age-Dependent Activation and Neuronal Differentiation of Lgr5+ Basal Cells in Injured Olfactory Epithelium via Notch Signaling Pathway. *Front. Aging Neurosci.* 12.

- Li, Y., Xu, J., Liu, Y., Zhu, J., Liu, N., Zeng, W., Huang, N., Rasch, M.J., Jiang, H., Gu, X., et al. (2017). A distinct entorhinal cortex to hippocampal CA1 direct circuit for olfactory associative learning. *Nature Neuroscience* 20, 559-570.
- Linck, V.M., da Silva, A.L., Figueiró, M., Caramão, E.B., Moreno, P.R.H., and Elisabetsky, E. (2010). Effects of inhaled Linalool in anxiety, social interaction and aggressive behavior in mice. *Phytomedicine* 17, 679-683.
- Linster, C. (2019). Cellular and network processes of noradrenergic modulation in the olfactory system. *Brain Research* 1709, 28-32.
- Linster, C., and Cleland, T.A. (2009). Glomerular microcircuits in the olfactory bulb. *Neural Networks* 22, 1169-1173.
- Linster, C., and Cleland, T.A. (2016). Neuromodulation of olfactory transformations. *Current Opinion in Neurobiology* 40, 170-177.
- Linster, C., and Devore, S. (2012). Noradrenergic and cholinergic modulation of olfactory bulb sensory processing. *Front. Behav. Neurosci.* 6.
- Linster, C., and Escanilla, O. (2019). Noradrenergic effects on olfactory perception and learning. *Brain Research* 1709, 33-38.
- Linster, C., Johnson, B.A., Yue, E., Morse, A., Xu, Z., Hingco, E.E., Choi, Y., Choi, M., Messiha, A., and Leon, M. (2001). Perceptual Correlates of Neural Representations Evoked by Odorant Enantiomers. *J. Neurosci.* 21, 9837-9843.
- Linster, C., Nai, Q., and Ennis, M. (2011). Nonlinear effects of noradrenergic modulation of olfactory bulb function in adult rodents. *Journal of Neurophysiology* 105, 1432-1443.
- Linster, C., Midroit, M., Forest, J., Thenaisie, Y., Cho, C., Richard, M., Didier, A., and Mandairon, N. (2020). Noradrenergic Activity in the Olfactory Bulb Is a Key Element for the Stability of Olfactory Memory. *J. Neurosci.* 40, 9260-9271.
- Liu, B., Luo, Z., Pinto, J.M., Shiroma, E.J., Tranah, G.J., Wirdefeldt, K., Fang, F., Harris, T.B., and Chen, H. (2019a). Relationship Between Poor Olfaction and Mortality Among Community-Dwelling Older Adults. *Ann Intern Med* 170, 673-681.
- Liu, K.Y., Acosta-Cabronero, J., Cardenas-Blanco, A., Loane, C., Berry, A.J., Betts, M.J., Kievit, R.A., Henson, R.N., Düzel, E., Howard, R., et al. (2019b). In vivo visualization of age-related differences in the locus coeruleus. *Neurobiology of Aging* 74, 101-111.
- Livmore, A., and Laing, D.G. (1996). Influence of training and experience on the perception of multicomponent odor mixtures. *J Exp Psychol Hum Percept Perform* 22, 267-277.
- Livneh, Y., and Mizrahi, A. (2011). Long-term changes in the morphology and synaptic distributions of adult-born neurons. *Journal of Comparative Neurology* 519, 2212-2224.
- Lledo, P.-M., and Saghatelian, A. (2005). Integrating new neurons into the adult olfactory bulb: joining the network, life-death decisions, and the effects of sensory experience. *Trends in Neurosciences* 28, 248-254.
- Lledo, P.-M., Merkle, F.T., and Alvarez-Buylla, A. (2008). Origin and function of olfactory bulb interneuron diversity. *Trends in Neurosciences* 31, 392-400.
- Logue, S.F., and Gould, T.J. (2014). The neural and genetic basis of executive function: Attention, cognitive flexibility, and response inhibition. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 123, 45-54.

- Loo, A.T., Youngentob, S.L., Kent, P.F., and Schwob, J.E. (1996). The aging olfactory epithelium: Neurogenesis, response to damage, and odorant-induced activity. *International Journal of Developmental Neuroscience* *14*, 881-900.
- Lundström, J.N., Boesveldt, S., and Albrecht, J. (2011). Central Processing of the Chemical Senses: An Overview. *ACS Chem. Neurosci.* *2*, 5-16.
- Luo, J., Daniels, S.B., Lenington, J.B., Notti, R.Q., and Conover, J.C. (2006). The aging neurogenic subventricular zone. *Aging Cell* *5*, 139-152.
- Mackay-Sim, A., and Kittel, P. (1991). Cell dynamics in the adult mouse olfactory epithelium: a quantitative autoradiographic study. *J. Neurosci.* *11*, 979-984.
- Malik, R., and Chattarji, S. (2012). Enhanced intrinsic excitability and EPSP-spike coupling accompany enriched environment-induced facilitation of LTP in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Journal of Neurophysiology* *107*, 1366-1378.
- Malnic, B., Hirono, J., Sato, T., and Buck, L.B. (1999). Combinatorial Receptor Codes for Odors. *Cell* *96*, 713-723.
- Manaye, K.F., McIntire, D.D., Mann, D.M.A., and German, D.C. (1995). Locus coeruleus cell loss in the aging human brain: A non-random process. *The Journal of Comparative Neurology* *358*, 79-87.
- Mandairon, N., Stack, C., Kiselycznyk, C., and Linster, C. (2006a). Enrichment to odors improves olfactory discrimination in adult rats. *Behavioral Neuroscience* *120*, 173-179.
- Mandairon, N., Ferretti, C.J., Stack, C.M., Rubin, D.B., Cleland, T.A., and Linster, C. (2006b). Cholinergic modulation in the olfactory bulb influences spontaneous olfactory discrimination in adult rats. *European Journal of Neuroscience* *24*, 3234-3244.
- Mandairon, N., Peace, S., Karnow, A., Kim, J., Ennis, M., and Linster, C. (2008). Noradrenergic modulation in the olfactory bulb influences spontaneous and reward-motivated discrimination, but not the formation of habituation memory. *Eur. J. Neurosci.* *27*, 1210-1219.
- Mandairon, N., Sultan, S., Rey, N., Kermen, F., Moreno, M., Busto, G., Farget, V., Messaoudi, B., Thevenet, M., and Didier, A. (2009). A computer-assisted odorized hole-board for testing olfactory perception in mice. *Journal of Neuroscience Methods* *180*, 296-303.
- Mandairon, N., Sultan, S., Nouvian, M., Sacquet, J., and Didier, A. (2011). Involvement of Newborn Neurons in Olfactory Associative Learning? The Operant or Non-operant Component of the Task Makes All the Difference. *J. Neurosci.* *31*, 12455-12460.
- Mandairon, N., Kuczewski, N., Kermen, F., Forest, J., Midroit, M., Richard, M., Thevenet, M., Sacquet, J., Linster, C., and Didier, A. (2018). Opposite regulation of inhibition by adult-born granule cells during implicit versus explicit olfactory learning. *Elife* *7*, e34976.
- Manella, L.C., Petersen, N., and Linster, C. (2017). Stimulation of the Locus Ceruleus Modulates Signal-to-Noise Ratio in the Olfactory Bulb. *J. Neurosci.* *37*, 11605-11615.
- Manesse, C., Bellil, D., Ferdenzi, C., Rouby, C., Faure, F., and Moustafa, B. (2018). A new training protocol to improve olfaction and quality of life in patients with dysosmia: a proof of concept study. (Paris, France), p.
- Manesse, C., Ferdenzi, C., Mantel, M., Sabri, M., Bessy, M., Fournel, A., Faure, F., Bellil, D., Landis, B.M., Hugentobler, M., et al. (2021). The prevalence of olfactory deficits and

- their effects on eating behavior from childhood to old age: A large-scale study in the French population. *Food Quality and Preference* 93, 104273.
- Marien, M.R., Colpaert, F.C., and Rosenquist, A.C. (2004). Noradrenergic mechanisms in neurodegenerative diseases: a theory. *Brain Research Reviews* 45, 38-78.
- Marrone, D.F., Ramirez-Amaya, V., and Barnes, C.A. (2012). Neurons generated in senescence maintain capacity for functional integration. *Hippocampus* 22, 1134-1142.
- Martin, C., Gervais, R., Hugues, E., Messaoudi, B., and Ravel, N. (2004). Learning Modulation of Odor-Induced Oscillatory Responses in the Rat Olfactory Bulb: A Correlate of Odor Recognition? *J. Neurosci.* 24, 389-397.
- Maslov, A.Y., Barone, T.A., Plunkett, R.J., and Pruitt, S.C. (2004). Neural Stem Cell Detection, Characterization, and Age-Related Changes in the Subventricular Zone of Mice. *J. Neurosci.* 24, 1726-1733.
- Mather, M., and Harley, C.W. (2016). The Locus Coeruleus: Essential for Maintaining Cognitive Function and the Aging Brain. *Trends in Cognitive Sciences* 20, 214-226.
- Mather, M., Clewett, D., Sakaki, M., and Harley, C.W. (2016). Norepinephrine ignites local hotspots of neuronal excitation: How arousal amplifies selectivity in perception and memory. *Behavioral and Brain Sciences* 39.
- Mazurek, A., Bhoopathy, R.M., Read, J.C.A., Gallagher, P., and Smulders, T.V. (2015). Effects of age on a real-world What-Where-When memory task. *Front. Aging Neurosci.* 7.
- McGaughy, J., Ross, R.S., and Eichenbaum, H. (2008). Noradrenergic, but not cholinergic, deafferentation of prefrontal cortex impairs attentional set-shifting. *Neuroscience* 153, 63-71.
- McLean, J.H., and Shipley, M.T. (1991). Postnatal development of the noradrenergic projection from locus coeruleus to the olfactory bulb in the rat. *Journal of Comparative Neurology* 304, 467-477.
- McLean, J.H., Shipley, M.T., Nickell, W.T., Aston-Jones, G., and Reyher, C.K. (1989). Chemoanatomical organization of the noradrenergic input from locus coeruleus to the olfactory bulb of the adult rat. *J. Comp. Neurol.* 285, 339-349.
- McLean, J.H., Darby-King, A., and Paterno, G.D. (1995). Localization of 5-HT_{2A} receptor mRNA by in situ hybridization in the olfactory bulb of the postnatal rat. *Journal of Comparative Neurology* 353, 371-378.
- McNamara, A.M., Cleland, T.A., and Linster, C. (2004). Characterization of the Synaptic Properties of Olfactory Bulb Projections. *Chemical Senses* 29, 225-233.
- Meisami, E., Mikhail, L., Baim, D., and Bhatnagar, K.P. (1998). Human Olfactory Bulb: Aging of Glomeruli and Mitral Cells and a Search for the Accessory Olfactory Bulba. *Annals of the New York Academy of Sciences* 855, 708-715.
- Meister, M. (2015). On the dimensionality of odor space. *ELife* 4, e07865.
- Midroit, M., Thevenet, M., Fournel, A., Sacquet, J., Bensafi, M., Breton, M., Chalençon, L., Cavellius, M., Didier, A., and Mandairon, N. (2018). Non-imaged based method for matching brains in a common anatomical space for cellular imagery. *Journal of Neuroscience Methods* 304, 136-145.
- Midroit, M., Chalençon, L., Renier, N., Milton, A., Thevenet, M., Sacquet, J., Breton, M., Forest, J., Noury, N., Richard, M., et al. (2021). Neural processing of the reward value of pleasant odorants. *Current Biology* 31, 1592-1605.e9.

- Ming, G., and Song, H. (2011). Adult Neurogenesis in the Mammalian Brain: Significant Answers and Significant Questions. *Neuron* 70, 687-702.
- Mirich, J.M., Williams, N.C., Berlau, D.J., and Brunjes, P.C. (2002). Comparative study of aging in the mouse olfactory bulb. *Journal of Comparative Neurology* 454, 361-372.
- Mirza, N., Kroger, H., and Doty, R.L. (1997). Influence of Age on the 'Nasal Cycle.' *The Laryngoscope* 107, 62-66.
- Mizrahi, A. (2007). Dendritic development and plasticity of adult-born neurons in the mouse olfactory bulb. *Nat Neurosci* 10, 444-452.
- Mobley, A.S., Bryant, A.K., Richard, M.B., Brann, J.H., Firestein, S.J., and Greer, C.A. (2013). Age-dependent regional changes in the rostral migratory stream. *Neurobiology of Aging* 34, 1873-1881.
- Mobley, A.S., Rodriguez-Gil, D.J., Imamura, F., and Greer, C.A. (2014). Aging in the olfactory system. *Trends Neurosci* 37, 77-84.
- Moffat, S.D. (2009). Aging and Spatial Navigation: What Do We Know and Where Do We Go? *Neuropsychol Rev* 19, 478.
- Moffat, S.D., Elkins, W., and Resnick, S.M. (2006). Age differences in the neural systems supporting human allocentric spatial navigation. *Neurobiology of Aging* 27, 965-972.
- Mombaerts, P., Wang, F., Dulac, C., Chao, S.K., Nemes, A., Mendelsohn, M., Edmondson, J., and Axel, R. (1996). Visualizing an Olfactory Sensory Map. 12.
- Mora-Gallegos, A., Rojas-Carvajal, M., Salas, S., Saborío-Arce, A., Fornaguera-Trías, J., and Brenes, J.C. (2015). Age-dependent effects of environmental enrichment on spatial memory and neurochemistry. *Neurobiology of Learning and Memory* 118, 96-104.
- Moran, D.T., Rowley, J.C., Jafek, B.W., and Lovell, M.A. (1982). The fine structure of the olfactory mucosa in man. *J Neurocytol* 11, 721-746.
- Morcom, A.M., and Henson, R.N.A. (2018). Increased Prefrontal Activity with Aging Reflects Nonspecific Neural Responses Rather than Compensation. *J Neurosci* 38, 7303-7313.
- Moreno, M., Richard, M., Landrein, B., Sacquet, J., Didier, A., and Mandairon, N. (2014). Alteration of olfactory perceptual learning and its cellular basis in aged mice. *Neurobiology of Aging* 35, 680-691.
- Moreno, M.M., Linster, C., Escanilla, O., Sacquet, J., Didier, A., and Mandairon, N. (2009). Olfactory perceptual learning requires adult neurogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 17980-17985.
- Moreno, M.M., Bath, K., Kuczewski, N., Sacquet, J., Didier, A., and Mandairon, N. (2012). Action of the Noradrenergic System on Adult-Born Cells Is Required for Olfactory Learning in Mice. *Journal of Neuroscience* 32, 3748-3758.
- Morgenstern, N.A., Lombardi, G., and Schinder, A.F. (2008). Newborn granule cells in the ageing dentate gyrus. *The Journal of Physiology* 586, 3751-3757.
- Mori, K., and Yoshihara, Y. (1995). Molecular recognition and olfactory processing in the mammalian olfactory system. *Progress in Neurobiology* 45, 585-619.
- Moriizumi, T., Tsukatani, T., Sakashita, H., and Miwa, T. (1994). Olfactory disturbance induced by deafferentation of serotonergic fibers in the olfactory bulb. *Neuroscience* 61, 733-738.

- Morris, J.C., Roe, C.M., Xiong, C., Fagan, A.M., Goate, A.M., Holtzman, D.M., and Mintun, M.A. (2010). APOE predicts amyloid-beta but not tau Alzheimer pathology in cognitively normal aging. *Ann Neurol* 67, 122-131.
- Morrison, J.H., and Baxter, M.G. (2012). The ageing cortical synapse: hallmarks and implications for cognitive decline. *Nature Reviews Neuroscience* 13, 240-250.
- Morrison, F.G., Dias, B.G., and Ressler, K.J. (2015). Extinction reverses olfactory fear-conditioned increases in neuron number and glomerular size. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112, 12846-12851.
- Moss, M., Cook, J., Wesnes, K., and Duckett, P. (2003). Aromas of rosemary and lavender essential oils differentially affect cognition and mood in healthy adults. *International Journal of Neuroscience* 113, 15-38.
- Moss, M., Hewitt, S., Moss, L., and Wesnes, K. (2008). Modulation of cognitive performance and mood by aromas of peppermint and ylang-ylang. *Int J Neurosci* 118, 59-77.
- Mouly, A.-M., Elaagouby, A., and Ravel, N. (1995). A study of the effects of noradrenaline in the rat olfactory bulb using evoked field potential response. *Brain Research* 681, 47-57.
- Mouret, A., Gheusi, G., Gabellec, M.-M., Chaumont, F. de, Olivo-Marin, J.-C., and Lledo, P.-M. (2008). Learning and Survival of Newly Generated Neurons: When Time Matters. *J. Neurosci.* 28, 11511-11516.
- Mouton, P.R., Pakkenberg, B., Gundersen, H.J.G., and Price, D.L. (1994). Absolute number and size of pigmented locus coeruleus neurons in young and aged individuals. *Journal of Chemical Neuroanatomy* 7, 185-190.
- Murphy, C., Morgan, C.D., Geisler, M.W., Wetter, S., Covington, J.W., Madowitz, M.D., Nordin, S., and Polich, J.M. (2000). Olfactory event-related potentials and aging: normative data. *International Journal of Psychophysiology* 36, 133-145.
- Muzerelle, A., Scotto-Lomassese, S., Bernard, J.F., Soiza-Reilly, M., and Gaspar, P. (2016). Conditional anterograde tracing reveals distinct targeting of individual serotonin cell groups (B5-B9) to the forebrain and brainstem. *Brain Struct Funct* 221, 535-561.
- Nagayama, S., Enerva, A., Fletcher, M.L., Masurkar, A.V., Igarashi, K.M., Mori, K., and Chen, W.R. (2010). Differential Axonal Projection of Mitral and Tufted Cells in the Mouse Main Olfactory System. *Front. Neural Circuits* 4.
- Nagayama, S., Homma, R., and Imamura, F. (2014). Neuronal organization of olfactory bulb circuits. *Front. Neural Circuits* 8.
- Nagel, I.E., Preuschhof, C., Li, S.-C., Nyberg, L., Bäckman, L., Lindenberger, U., and Heekeren, H.R. (2011). Load Modulation of BOLD Response and Connectivity Predicts Working Memory Performance in Younger and Older Adults. *Journal of Cognitive Neuroscience* 23, 2030-2045.
- Nai, Q., Dong, H.-W., Hayar, A., Linster, C., and Ennis, M. (2009). Noradrenergic Regulation of GABAergic Inhibition of Main Olfactory Bulb Mitral Cells Varies as a Function of Concentration and Receptor Subtype. *Journal of Neurophysiology* 101, 2472-2484.
- Nai, Q., Dong, H.W., Linster, C., and Ennis, M. (2010). Activation of $\alpha 1$ and $\alpha 2$ noradrenergic receptors exert opposing effects on excitability of main olfactory bulb granule cells. *Neuroscience* 169, 882-892.
- Naka, F., Shiga, T., Yaguchi, M., and Okado, N. (2002). An enriched environment increases noradrenaline concentration in the mouse brain. *Brain Research* 924, 124-126.

- Nakashima, T., Kimmelman, C.P., and Snow, J.B. (1984). Structure of human fetal and adult olfactory neuroepithelium. *Arch Otolaryngol* 110, 641-646.
- Nedelescu, H., Chowdhury, T.G., Wable, G.S., Arbuthnott, G., and Aoki, C. (2017). Cerebellar sub-divisions differ in exercise-induced plasticity of noradrenergic axons and in their association with resilience to activity-based anorexia. *Brain Structure and Function* 222, 317-339.
- Negoias, S., Croy, I., Gerber, J., Puschmann, S., Petrowski, K., Joraschky, P., and Hummel, T. (2010). Reduced olfactory bulb volume and olfactory sensitivity in patients with acute major depression. *Neuroscience* 169, 415-421.
- Neidl, R., Schneider, A., Bousiges, O., Majchrzak, M., Barbelivien, A., de Vasconcelos, A.P., Dorgans, K., Doussau, F., Loeffler, J.-P., Cassel, J.-C., et al. (2016). Late-Life Environmental Enrichment Induces Acetylation Events and Nuclear Factor κ B-Dependent Regulations in the Hippocampus of Aged Rats Showing Improved Plasticity and Learning. *J Neurosci* 36, 4351-4361.
- Newman, L.A., Darling, J., and McGaughy, J. (2008). Atomoxetine reverses attentional deficits produced by noradrenergic deafferentation of medial prefrontal cortex. *Psychopharmacology* 200, 39-50.
- Nickerson, D., and Newhall, S.M. (1943). A Psychological Color Solid*. *J. Opt. Soc. Am., JOSA* 33, 419-422.
- Nilssen, E.S., Doan, T.P., Nigro, M.J., Ohara, S., and Witter, M.P. (2019). Neurons and networks in the entorhinal cortex: A reappraisal of the lateral and medial entorhinal subdivisions mediating parallel cortical pathways. *Hippocampus* 29, 1238-1254.
- Nissant, A., and Pallotto, M. (2011). Integration and maturation of newborn neurons in the adult olfactory bulb--from synapses to function. *Eur. J. Neurosci.* 33, 1069-1077.
- Nissant, A., Bardy, C., Katagiri, H., Murray, K., and Lledo, P.-M. (2009). Adult neurogenesis promotes synaptic plasticity in the olfactory bulb. *Nat Neurosci* 12, 728-730.
- Nissim, N.R., O'Shea, A.M., Bryant, V., Porges, E.C., Cohen, R., and Woods, A.J. (2017). Frontal Structural Neural Correlates of Working Memory Performance in Older Adults. *Front. Aging Neurosci.* 8.
- Nordin, S., and Brämerson, A. (2008). Complaints of olfactory disorders: epidemiology, assessment and clinical implications. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology* 8, 10-15.
- Nyberg, L., Maitland, S.B., Rönnlund, M., Bäckman, L., Dixon, R.A., Wahlin, Å., and Nilsson, L.-G. (2003). Selective adult age differences in an age-invariant multifactor model of declarative memory. *Psychology and Aging* 18, 149-160.
- Nyberg, L., Lövdén, M., Riklund, K., Lindenberger, U., and Bäckman, L. (2012). Memory aging and brain maintenance. *Trends Cogn Sci* 16, 292-305.
- Obernier, K., Tong, C.K., and Alvarez-Buylla, A. (2014). Restricted nature of adult neural stem cells: re-evaluation of their potential for brain repair. *Front. Neurosci.* 8.
- O'Dell, T.J., Connor, S.A., Gelinias, J.N., and Nguyen, P.V. (2010). Viagra for your synapses: Enhancement of hippocampal long-term potentiation by activation of beta-adrenergic receptors. *Cellular Signalling* 22, 728-736.
- O'Dell, T.J., Connor, S.A., Guglietta, R., and Nguyen, P.V. (2015). β -Adrenergic receptor signaling and modulation of long-term potentiation in the mammalian hippocampus. *Learn. Mem.* 22, 461-471.

- Ohm, T.G., Busch, C., and Bohl, J. (1997). Unbiased Estimation of Neuronal Numbers in the Human Nucleus Coeruleus during Aging. *Neurobiology of Aging* 18, 393-399.
- Olsson, M.J., Lundström, J.N., Kimball, B.A., Gordon, A.R., Karshikoff, B., Hosseini, N., Sorjonen, K., Olgart Höglund, C., Solares, C., Soop, A., et al. (2014). The Scent of Disease: Human Body Odor Contains an Early Chemosensory Cue of Sickness. *Psychol Sci* 25, 817-823.
- Paik, S.I., Lehman, M.N., Seiden, A.M., Duncan, H.J., and Smith, D.V. (1992). Human Olfactory Biopsy: The Influence of Age and Receptor Distribution. *Archives of Otolaryngology-Head & Neck Surgery* 118, 731-738.
- Pallotto, M., Nissant, A., Fritschy, J.-M., Rudolph, U., Sassoè-Pognetto, M., Panzanelli, P., and Lledo, P.-M. (2012). Early Formation of GABAergic Synapses Governs the Development of Adult-Born Neurons in the Olfactory Bulb. *J. Neurosci.* 32, 9103-9115.
- Panagiotopoulos, G., Naxakis, S., Papavasiliou, A., Filipakis, K., Papatheodorou, G., and Goumas, P. (2005). Decreasing nasal mucus Ca⁺⁺ improves hyposmia. *Rhinology* 43, 5.
- Pang, T.Y.C., and Hannan, A.J. (2013). Enhancement of cognitive function in models of brain disease through environmental enrichment and physical activity. *Neuropharmacology* 64, 515-528.
- Park, D.C., Lautenschlager, G., Hedden, T., Davidson, N.S., Smith, A.D., and Smith, P.K. (2002). Models of visuospatial and verbal memory across the adult life span. *Psychol Aging* 17, 299-320.
- Parrish-Aungst, S., Shipley, M.T., Erdelyi, F., Szabo, G., and Puche, A.C. (2007). Quantitative analysis of neuronal diversity in the mouse olfactory bulb. *Journal of Comparative Neurology* 501, 825-836.
- Patel, R.C., and Larson, J. (2009). Impaired olfactory discrimination learning and decreased olfactory sensitivity in aged C57Bl/6 mice. *Neurobiology of Aging* 30, 829-837.
- Penker, S., Licht, T., Hofer, K.T., and Rokni, D. (2020). Mixture Coding and Segmentation in the Anterior Piriform Cortex. *Front. Syst. Neurosci.* 14.
- Pernecky, R., Kempermann, G., Korczyn, A.D., Matthews, F.E., Ikram, M.A., Scarmeas, N., Chetelat, G., Stern, Y., and Ewers, M. (2019). Translational research on reserve against neurodegenerative disease: consensus report of the International Conference on Cognitive Reserve in the Dementias and the Alzheimer's Association Reserve, Resilience and Protective Factors Professional Interest Area working groups. *BMC Medicine* 17.
- Perry, R., Terry, R., Watson, L.K., and Ernst, E. (2012). Is lavender an anxiolytic drug? A systematic review of randomised clinical trials. *Phytomedicine* 19, 825-835.
- Persson, J., Nyberg, L., Lind, J., Larsson, A., Nilsson, L.-G., Ingvar, M., and Buckner, R.L. (2006). Structure-Function Correlates of Cognitive Decline in Aging. *Cerebral Cortex* 16, 907-915.
- Peteanu, L., and Alvarez-Buylla, A. (2002). Maturation and Death of Adult-Born Olfactory Bulb Granule Neurons: Role of Olfaction. *J. Neurosci.* 22, 6106-6113.
- Petzold, G.C., Hagiwara, A., and Murthy, V.N. (2009). Serotonergic modulation of odor input to the mammalian olfactory bulb. *Nature Neuroscience* 12, 784-791.

- Phillips, C. (2017). Lifestyle Modulators of Neuroplasticity: How Physical Activity, Mental Engagement, and Diet Promote Cognitive Health during Aging. *Neural Plasticity* 2017, e3589271.
- Poe, G.R., Foote, S., Eschenko, O., Johansen, J.P., Bouret, S., Aston-Jones, G., Harley, C.W., Manahan-Vaughan, D., Weinshenker, D., Valentino, R., et al. (2020). Locus coeruleus: a new look at the blue spot. *Nature Reviews Neuroscience* 21, 644-659.
- Pointer, M.R., and Attridge, G.G. (1998). The number of discernible colours. *Color Research & Application* 23, 52-54.
- Porter, J., Craven, B., Khan, R.M., Chang, S.-J., Kang, I., Judkewitz, B., Volpe, J., Settles, G., and Sobel, N. (2007). Mechanisms of scent-tracking in humans. *Nature Neuroscience* 10, 27-29.
- van Praag, H. van, Kempermann, G., and Gage, F.H. (2000). Neural consequences of environmental enrichment. *Nat Rev Neurosci* 1, 191-198.
- Prenderville, J.A., Kennedy, P.J., Dinan, T.G., and Cryan, J.F. (2015). Adding fuel to the fire: the impact of stress on the ageing brain. *Trends in Neurosciences* 38, 13-25.
- Proserpio, C., de Graaf, C., Laureati, M., Pagliarini, E., and Boesveldt, S. (2017). Impact of ambient odors on food intake, saliva production and appetite ratings. *Physiology & Behavior* 174, 35-41.
- Purves, D., Augustine, G.J., Fitzpatrick, D., Hall, W., LaMantia, A.-S., and White, L. (2019). *Neurosciences* (De Boeck Supérieur).
- Quint, C., Temmel, A.F.P., Hummel, T., and Ehrenberger, K. (2002). The quinoxaline derivative caroverine in the treatment of sensorineural smell disorders: a proof-of-concept study. *Acta Otolaryngol* 122, 877-881.
- Rabell, J.E., Mutlu, K., Noutel, J., Olmo, P.M. del, and Haesler, S. (2017). Spontaneous Rapid Odor Source Localization Behavior Requires Interhemispheric Communication. *Current Biology* 27, 1542-1548.e4.
- Rampon, C., Tang, Y.-P., Goodhouse, J., Shimizu, E., Kiyin, M., and Tsien, J.Z. (2000). Enrichment induces structural changes and recovery from nonspatial memory deficits in CA1 NMDAR1-knockout mice. *Nat Neurosci* 3, 238-244.
- Rao, M.S., Hattiangady, B., Abdel-Rahman, A., Stanley, D.P., and Shetty, A.K. (2005). Newly born cells in the ageing dentate gyrus display normal migration, survival and neuronal fate choice but endure retarded early maturation. *European Journal of Neuroscience* 21, 464-476.
- Rasmussen, K., Morilak, D.A., and Jacobs, B.L. (1986). Single Unit Activity of Locus Coeruleus Neurons in the Freely Moving Cat. I. During Naturalistic Behaviors and in Response to Simple and Complex Stimuli. *Brain Research* 371, 11.
- Ravel, N., Elaagouby, A., and Gervais, R. (1994). Scopolamine injection into the olfactory bulb impairs short-term olfactory memory in rats. *Behavioral Neuroscience* 108, 317-324.
- Rawson, N.E., Gomez, G., Cowart, B.J., Kriete, A., Pribitkin, E., and Restrepo, D. (2012). Age-associated loss of selectivity in human olfactory sensory neurons. *Neurobiology of Aging* 33, 1913-1919.
- Raz, N., and Daugherty, A.M. (2018). Pathways to Brain Aging and Their Modifiers: Free-Radical-Induced Energetic and Neural Decline in Senescence (FRIENDS) Model - A Mini-Review. *GER* 64, 49-57.

- Reden, J., Lill, K., Zahnert, T., Haehner, A., and Hummel, T. (2012). Olfactory function in patients with postinfectious and posttraumatic smell disorders before and after treatment with vitamin A: A double-blind, placebo-controlled, randomized clinical trial. *The Laryngoscope* 122, 1906-1909.
- Reed, B.R., Mungas, D., Farias, S.T., Harvey, D., Beckett, L., Widaman, K., Hinton, L., and DeCarli, C. (2010). Measuring cognitive reserve based on the decomposition of episodic memory variance. *Brain* 133, 2196-2209.
- Reuter-Lorenz, P.A., Jonides, J., Smith, E.E., Hartley, A., Miller, A., Marshuetz, C., and Koeppel, R.A. (2000). Age Differences in the Frontal Lateralization of Verbal and Spatial Working Memory Revealed by PET. *Journal of Cognitive Neuroscience* 12, 174-187.
- Rey, N.L., Sacquet, J., Veyrac, A., Jourdan, F., and Didier, A. (2012). Behavioral and cellular markers of olfactory aging and their response to enrichment. *Neurobiology of Aging* 33, 626.e9-626.e23.
- Rhodes, M.G. (2004). Age-Related Differences in Performance on the Wisconsin Card Sorting Test: A Meta-Analytic Review. *Psychology and Aging* 19, 482-494.
- Richard, M.B., Taylor, S.R., and Greer, C.A. (2010). Age-induced disruption of selective olfactory bulb synaptic circuits. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 15613-15618.
- Ridderinkhof, K.R., Span, M.M., and van der Molen, M.W. (2002). Perseverative Behavior and Adaptive Control in Older Adults: Performance Monitoring, Rule Induction, and Set Shifting. *Brain and Cognition* 49, 382-401.
- Robertson, I.H. (2013). A noradrenergic theory of cognitive reserve: implications for Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging* 34, 298-308.
- Rocheftort, C., and Lledo, P.-M. (2005). Short-term survival of newborn neurons in the adult olfactory bulb after exposure to a complex odor environment. *European Journal of Neuroscience* 22, 2863-2870.
- Rocheftort, C., Gheusi, G., Vincent, J.-D., and Lledo, P.-M. (2002). Enriched Odor Exposure Increases the Number of Newborn Neurons in the Adult Olfactory Bulb and Improves Odor Memory. *J. Neurosci.* 22, 2679-2689.
- Rochet, M., El-Hage, W., Richa, S., Kazour, F., and Atanasova, B. (2018). Depression, Olfaction, and Quality of Life: A Mutual Relationship. *Brain Sciences* 8, 80.
- Roesch, M.R., Stalnaker, T.A., and Schoenbaum, G. (2007). Associative Encoding in Anterior Piriform Cortex versus Orbitofrontal Cortex during Odor Discrimination and Reversal Learning. *Cerebral Cortex* 17, 643-652.
- Rolls, E.T., and Baylis, L.L. (1994). Gustatory, olfactory, and visual convergence within the primate orbitofrontal cortex. *J. Neurosci.* 14, 5437-5452.
- Rolls, E.T., Kringelbach, M.L., and Araujo, I.E.T.D. (2003). Different representations of pleasant and unpleasant odours in the human brain. *European Journal of Neuroscience* 18, 695-703.
- Rönnlund, M., Nyberg, L., Bäckman, L., and Nilsson, L.-G. (2005). Stability, Growth, and Decline in Adult Life Span Development of Declarative Memory: Cross-Sectional and Longitudinal Data From a Population-Based Study. *Psychology and Aging* 20, 3-18.
- Root, C.M., Denny, C.A., Hen, R., and Axel, R. (2014). The participation of cortical amygdala in innate, odour-driven behaviour. *Nature* 515, 269-273.

- Royet, J.-P., Zald, D., Versace, R., Costes, N., Lavenne, F., Koenig, O., and Gervais, R. (2000). Emotional Responses to Pleasant and Unpleasant Olfactory, Visual, and Auditory Stimuli: a Positron Emission Tomography Study. *J. Neurosci.* 20, 7752-7759.
- Royet, J.P., Hudry, J., Zald, D.H., Godinot, D., Grégoire, M.C., Lavenne, F., Costes, N., and Holley, A. (2001). Functional Neuroanatomy of Different Olfactory Judgments. *NeuroImage* 13, 506-519.
- Sadacca, B.F., Wikenheiser, A.M., and Schoenbaum, G. (2017). Toward a theoretical role for tonic norepinephrine in the orbitofrontal cortex in facilitating flexible learning. *Neuroscience* 345, 124-129.
- Sanai, N., Nguyen, T., Ihrie, R.A., Mirzadeh, Z., Tsai, H.-H., Wong, M., Gupta, N., Berger, M.S., Huang, E., Garcia-Verdugo, J.-M., et al. (2011). Corridors of migrating neurons in the human brain and their decline during infancy. *Nature* 478, 382-386.
- Sara, S.J. (2009). The locus coeruleus and noradrenergic modulation of cognition. *Nature Reviews Neuroscience* 10, 211-223.
- Sara, S.J., and Bouret, S. (2012). Orienting and Reorienting: The Locus Coeruleus Mediates Cognition through Arousal. *Neuron* 76, 130-141.
- Sara, S.J., Vankov, A., and Hervé, A. (1994). Locus coeruleus-evoked responses in behaving rats: A clue to the role of noradrenaline in memory. *Brain Research Bulletin* 35, 457-465.
- Satz, P., Cole, M.A., Hardy, D.J., and Rassovsky, Y. (2011). Brain and cognitive reserve: mediator(s) and construct validity, a critique. *J Clin Exp Neuropsychol* 33, 121-130.
- Schiffman, S., and Pasternak, M. (1979). Decreased Discrimination of Food Odors in the Elderly. *Journal of Gerontology* 34, 73-79.
- Schiffman, S.S., and Graham, B.G. (2000). Taste and smell perception affect appetite and immunity in the elderly. *Eur J Clin Nutr* 54, S54-S63.
- Schiffman, S.S., Moss, J., and Erickson, R.P. (1976). Thresholds of food odors in the elderly. *Experimental Aging Research* 2, 389-398.
- Schiffman, S.S., Suggs, M.S., and Sattely-Miller, E.A. (1995a). Effect of pleasant odors on mood of males at midlife: Comparison of African-American and European-American men. *Brain Research Bulletin* 36, 31-37.
- Schiffman, S.S., Sattely-Miller, E.A., Suggs, M.S., and Graham, B.G. (1995b). The effect of pleasant odors and hormone status on mood of women at midlife. *Brain Research Bulletin* 36, 19-29.
- Schilit Nitenson, A., Stackpole, E.E., Truszkowski, T.L.S., Midroit, M., Fallon, J.R., and Bath, K.G. (2015). Fragile X Mental Retardation Protein Regulates Olfactory Sensitivity But Not Odorant Discrimination. *Chemical Senses* 40, 345-350.
- Schilit Nitenson, A., Manzano Nieves, G., Poeta, D.L., Bahar, R., Rachofsky, C., Mandairon, N., and Bath, K.G. (2019). Acetylcholine Regulates Olfactory Perceptual Learning through Effects on Adult Neurogenesis. *IScience* 22, 544-556.
- Schoenbaum, G., Chiba, A.A., and Gallagher, M. (2000). Changes in Functional Connectivity in Orbitofrontal Cortex and Basolateral Amygdala during Learning and Reversal Training. *J. Neurosci.* 20, 5179-5189.
- Schoenbaum, G., Nugent, S.L., Saddoris, M.P., and Setlow, B. (2002). Orbitofrontal lesions in rats impair reversal but not acquisition of go, no-go odor discriminations. *NeuroReport* 13, 885-890.

- Schoenbaum, G., Setlow, B., Saddoris, M.P., and Gallagher, M. (2006). Encoding Changes in Orbitofrontal Cortex in Reversal-Impaired Aged Rats. *Journal of Neurophysiology* 95, 1509-1517.
- Schoenbaum, G., Roesch, M.R., Stalnaker, T.A., and Takahashi, Y.K. (2009). A new perspective on the role of the orbitofrontal cortex in adaptive behaviour. *Nat Rev Neurosci* 10, 885-892.
- Schofield, P.W., Logroschino, G., Andrews, H.F., Albert, S., and Stern, Y. (1997). An association between head circumference and Alzheimer's disease in a population-based study of aging and dementia. *Neurology* 49, 30-37.
- Scholz, J., Klein, M.C., Behrens, T.E.J., and Johansen-Berg, H. (2009). Training induces changes in white-matter architecture. *Nat Neurosci* 12, 1370-1371.
- Schriever, V.A., Lehmann, S., Prange, J., and Hummel, T. (2014). Preventing Olfactory Deterioration: Olfactory Training May Be of Help in Older People. *Journal of the American Geriatrics Society* 62, 384-386.
- Schubert, C.R., Fischer, M.E., Pinto, A.A., Klein, B.E.K., Klein, R., and Cruickshanks, K.J. (2017a). Odor detection thresholds in a population of older adults. *The Laryngoscope* 127, 1257-1262.
- Schubert, C.R., Fischer, M.E., Pinto, A.A., Klein, B.E.K., Klein, R., Tweed, T.S., and Cruickshanks, K.J. (2017b). Sensory Impairments and Risk of Mortality in Older Adults. *The Journals of Gerontology: Series A* 72, 710-715.
- Schubert, C.R., Cruickshanks, K.J., Fischer, M.E., Chen, Y., Klein, B.E.K., Klein, R., and Pinto, A.A. (2017c). Sensory Impairments and Cognitive Function in Middle-Aged Adults. *The Journals of Gerontology: Series A* 72, 1087-1090.
- Schwarz, L.A., and Luo, L. (2015a). Organization of the Locus Coeruleus-Norepinephrine System. *Current Biology* 25, R1051-R1056.
- Schwarz, L.A., and Luo, L. (2015b). Organization of the Locus Coeruleus-Norepinephrine System. *Current Biology* 25, R1051-R1056.
- Schwarz, L.A., Miyamichi, K., Gao, X.J., Beier, K.T., Weissbourd, B., DeLoach, K.E., Ren, J., Ibanes, S., Malenka, R.C., Kremer, E.J., et al. (2015). Viral-genetic tracing of the input-output organization of a central noradrenaline circuit. *Nature* 524, 88-92.
- Schwob, J.E., and Price, J.L. (1978). The cortical projection of the olfactory bulb: development in fetal and neonatal rats correlated with quantitative variations in adult rats. *Brain Research* 151, 369-374.
- Schwob, J.E., Jang, W., Holbrook, E.H., Lin, B., Herrick, D.B., Peterson, J.N., and Coleman, J.H. (2017). Stem and progenitor cells of the mammalian olfactory epithelium: Taking poietic license. *Journal of Comparative Neurology* 525, 1034-1054.
- Scott, J.W., Sherrill, L., Jiang, J., and Zhao, K. (2014). Tuning to Odor Solubility and Sorption Pattern in Olfactory Epithelial Responses. *J. Neurosci.* 34, 2025-2036.
- Segura, B., Baggio, H.C., Solana, E., Palacios, E.M., Vendrell, P., Bargalló, N., and Junqué, C. (2013). Neuroanatomical correlates of olfactory loss in normal aged subjects. *Behavioural Brain Research* 246, 148-153.
- Seubert, J., Freiherr, J., Djordjevic, J., and Lundström, J.N. (2013). Statistical localization of human olfactory cortex. *NeuroImage* 66, 333-342.
- Sevelinges, Y., Gervais, R., Messaoudi, B., Granjon, L., and Mouly, A.-M. (2004). Olfactory fear conditioning induces field potential potentiation in rat olfactory cortex and amygdala. *Learn Mem* 11, 761-769.

- Shen, J., Kassir, M.A., Wu, J., Zhang, Q., Zhou, S., Xuan, S.Y., Li, Q., Ye, Y., and Hu, J. (2013). MR Volumetric Study of Piriform-Cortical Amygdala and Orbitofrontal Cortices: The Aging Effect. *PLOS ONE* 8, e74526.
- Shepherd, G. (2004). *The Synaptic Organization of the Brain* (Oxford University Press).
- Shepherd, G.M., Chen, W.R., Willhite, D., Migliore, M., and Greer, C.A. (2007). The olfactory granule cell: From classical enigma to central role in olfactory processing. *Brain Research Reviews* 55, 373–382.
- Shiotani, K., Tanisumi, Y., Murata, K., Hirokawa, J., Sakurai, Y., and Manabe, H. (2020). Tuning of olfactory cortex ventral tenia tecta neurons to distinct task elements of goal-directed behavior. *ELife* 9, e57268.
- Shiple, M.T., and Adamek, G.D. (1984). The connections of the mouse olfactory bulb: A study using orthograde and retrograde transport of wheat germ agglutinin conjugated to horseradish peroxidase. *Brain Research Bulletin* 12, 669–688.
- Shiple, M.T., Halloran, F.J., and de la Torre, J. (1985). Surprisingly rich projection from locus coeruleus to the olfactory bulb in the rat. *Brain Res.* 329, 294–299.
- Simpson, J., and Kelly, J.P. (2011). The impact of environmental enrichment in laboratory rats—Behavioural and neurochemical aspects. *Behavioural Brain Research* 222, 246–264.
- Smith, C.G. (1942). Age incidence of atrophy of olfactory nerves in man. A contribution to the study of the process of ageing. *Journal of Comparative Neurology* 77, 589–595.
- Snyder, J.S. (2019). Recalibrating the Relevance of Adult Neurogenesis. *Trends in Neurosciences* 42, 164–178.
- Sorrells, S.F., Paredes, M.F., Cebrian-Silla, A., Sandoval, K., Qi, D., Kelley, K.W., James, D., Mayer, S., Chang, J., Auguste, K.I., et al. (2018). Human hippocampal neurogenesis drops sharply in children to undetectable levels in adults. *Nature* 555, 377–381.
- Sosulski, D.L., Bloom, M.L., Cutforth, T., Axel, R., and Datta, S.R. (2011). Distinct representations of olfactory information in different cortical centres. *Nature* 472, 213–216.
- Spalding, K.L., Bergmann, O., Alkass, K., Bernard, S., Salehpour, M., Huttner, H.B., Boström, E., Westerlund, I., Vial, C., Buchholz, B.A., et al. (2013). Dynamics of Hippocampal Neurogenesis in Adult Humans. *Cell* 153, 1219–1227.
- Srinivasan, S., and Stevens, C.F. (2018). The distributed circuit within the piriform cortex makes odor discrimination robust. *Journal of Comparative Neurology* 526, 2725–2743.
- Stalnaker, T.A., Cooch, N.K., and Schoenbaum, G. (2015). What the orbitofrontal cortex does not do. *Nature Neuroscience* 18, 620–627.
- Stanton, P.K., and Sarvey, J.M. (1987). Norepinephrine regulates long-term potentiation of both the population spike and dendritic EPSP in hippocampal dentate gyrus. *Brain Research Bulletin* 18, 115–119.
- Stein, L.R., O'Dell, K.A., Funatsu, M., Zorumski, C.F., and Izumi, Y. (2016). Short-term environmental enrichment enhances synaptic plasticity in hippocampal slices from aged rats. *Neuroscience* 329, 294–305.
- Stern, Y. (2002). What is cognitive reserve? Theory and research application of the reserve concept. *Journal of the International Neuropsychological Society* 8, 448–460.
- Stern, Y. (2009). Cognitive reserve. *Neuropsychologia* 47, 2015–2028.

- Stern, Y., Barnes, C.A., Grady, C., Jones, R.N., and Raz, N. (2019). Brain reserve, cognitive reserve, compensation, and maintenance: operationalization, validity, and mechanisms of cognitive resilience. *Neurobiology of Aging* 83, 124-129.
- Stern, Y., Arenaza-Urquijo, E.M., Bartrés-Faz, D., Belleville, S., Cantilon, M., Chetelat, G., Ewers, M., Franzmeier, N., Kempermann, G., Kremen, W.S., et al. (2020). Whitepaper: Defining and investigating cognitive reserve, brain reserve, and brain maintenance. *Alzheimer's & Dementia* 16, 1305-1311.
- Stevens, J.C., and Cain, W.S. (1987). Old-age deficits in the sense of smell as gauged by thresholds, magnitude matching, and odor identification. *Psychol Aging* 2, 36-42.
- Stevens, J.C., and Dadarwala, A.D. (1993). Variability of olfactory threshold and its role in assessment of aging. *Percept Psychophys* 54, 296-302.
- Stevens, S.S., and Davis, H. (1938). *Hearing: its psychology and physiology* (Oxford, England: Wiley).
- Stevens, J.C., Plantinga, A., and Cain, W.S. (1982). Reduction of odor and nasal pungency associated with aging. *Neurobiology of Aging* 3, 125-132.
- Stevens, J.C., Cain, W.S., and Demarque, A. (1990). Memory and identification of simulated odors in elderly and young persons. *Bull. Psychon. Soc.* 28, 293-296.
- Stevenson, R.J. (2010). An Initial Evaluation of the Functions of Human Olfaction. *Chemical Senses* 35, 3-20.
- Straube, T., Korz, V., Balschun, D., and Frey, J.U. (2003). Requirement of β -adrenergic receptor activation and protein synthesis for LTP-reinforcement by novelty in rat dentate gyrus. *The Journal of Physiology* 552, 953-960.
- Sultan, S., Mandairon, N., Kermen, F., Garcia, S., Sacquet, J., and Didier, A. (2010). Learning-dependent neurogenesis in the olfactory bulb determines long-term olfactory memory. *The FASEB Journal* 24, 2355-2363.
- Suzukawa, K., Kondo, K., Kanaya, K., Sakamoto, T., Watanabe, K., Ushio, M., Kaga, K., and Yamasoba, T. (2011). Age-related changes of the regeneration mode in the mouse peripheral olfactory system following olfactotoxic drug methimazole-induced damage. *Journal of Comparative Neurology* 519, 2154-2174.
- Tait, D.S., Bowman, E.M., Neuwirth, L.S., and Brown, V.J. (2018). Assessment of intradimensional/extradimensional attentional set-shifting in rats. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 89, 72-84.
- Takeuchi, T., Duszkiewicz, A.J., Sonneborn, A., Spooner, P.A., Yamasaki, M., Watanabe, M., Smith, C.C., Fernández, G., Deisseroth, K., Greene, R.W., et al. (2016). Locus coeruleus and dopaminergic consolidation of everyday memory. *Nature* 537, 357-362.
- Tanabe, T., Iino, M., and Takagi, S.F. (1975). Discrimination of odors in olfactory bulb, pyriform-amygdaloid areas, and orbitofrontal cortex of the monkey. *Journal of Neurophysiology* 38, 1284-1296.
- Theofilas, P., Ehrenberg, A.J., Dunlop, S., Di Lorenzo Alho, A.T., Nguy, A., Leite, R.E.P., Rodriguez, R.D., Mejia, M.B., Suemoto, C.K., Ferretti-Rebustini, R.E.D.L., et al. (2017). Locus coeruleus volume and cell population changes during Alzheimer's disease progression: A stereological study in human postmortem brains with potential implication for early-stage biomarker discovery. *Alzheimer's & Dementia* 13, 236-246.

- Thomas-Danguin, T., Rouby, C., Sicard, G., Vigouroux, M., Farget, V., Johanson, A., Bengtson, A., Hall, G., Ormel, W., De Graaf, C., et al. (2003). Development of the ETOC: a European test of olfactory capabilities. *Rhinology* 41, 142-151.
- Thomé, A., Gray, D.T., Erickson, C.A., Lipa, P., and Barnes, C.A. (2016). Memory impairment in aged primates is associated with region-specific network dysfunction. *Mol Psychiatry* 21, 1257-1262.
- Toepper, M. (2017). Dissociating Normal Aging from Alzheimer's Disease: A View from Cognitive Neuroscience. *Journal of Alzheimer's Disease* 57, 331-352.
- Trincherro, M.F., Buttner, K.A., Sulkes Cuevas, J.N., Temprana, S.G., Fontanet, P.A., Monzón-Salinas, M.C., Ledda, F., Paratcha, G., and Schinder, A.F. (2017). High Plasticity of New Granule Cells in the Aging Hippocampus. *Cell Rep* 21, 1129-1139.
- Trincherro, M.F., Herrero, M., Monzón-Salinas, M.C., and Schinder, A.F. (2019). Experience-Dependent Structural Plasticity of Adult-Born Neurons in the Aging Hippocampus. *Front. Neurosci.* 13.
- Tsang, H.W.H., and Ho, T.Y.C. (2010). A systematic review on the anxiolytic effects of aromatherapy on rodents under experimentally induced anxiety models. *Rev Neurosci* 21, 141-152.
- Tsuji, T., Tsuji, C., Lozic, M., Ludwig, M., and Leng, G. (2019). Coding of odors in the anterior olfactory nucleus. *Physiological Reports* 7, e14284.
- Tzeng, W.-Y., Figarella, K., and Garaschuk, O. (2021). Olfactory impairment in men and mice related to aging and amyloid-induced pathology. *Pflugers Arch - Eur J Physiol* 473, 805-821.
- Ueha, R., Shichino, S., Ueha, S., Kondo, K., Kikuta, S., Nishijima, H., Matsushima, K., and Yamasoba, T. (2018). Reduction of Proliferating Olfactory Cells and Low Expression of Extracellular Matrix Genes Are Hallmarks of the Aged Olfactory Mucosa. *Front. Aging Neurosci.* 10.
- Valero, J., Paris, I., and Sierra, A. (2016). Lifestyle Shapes the Dialogue between Environment, Microglia, and Adult Neurogenesis. *ACS Chem. Neurosci.* 7, 442-453.
- Veyrac, A., Didier, A., Colpaert, F., Jourdan, F., and Marien, M. (2005). Activation of noradrenergic transmission by α 2-adrenoceptor antagonists counteracts deafferentation-induced neuronal death and cell proliferation in the adult mouse olfactory bulb. *Experimental Neurology* 194, 444-456.
- Veyrac, A., Nguyen, V., Marien, M., Didier, A., and Jourdan, F. (2007). Noradrenergic control of odor recognition in a nonassociative olfactory learning task in the mouse. *Learning & Memory* 14, 847-854.
- Veyrac, A., Sacquet, J., Nguyen, V., Marien, M., Jourdan, F., and Didier, A. (2009). Novelty determines the effects of olfactory enrichment on memory and neurogenesis through noradrenergic mechanisms. *Neuropsychopharmacology* 34, 786-795.
- Veyrac, A., Allerborn, M., Gros, A., Michon, F., Raguét, L., Kenney, J., Godinot, F., Thevenet, M., Garcia, S., Messaoudi, B., et al. (2015). Memory of Occasional Events in Rats: Individual Episodic Memory Profiles, Flexibility, and Neural Substrate. *J. Neurosci.* 35, 7575-7586.
- Vieweg, P., Stangl, M., Howard, L.R., and Wolbers, T. (2015). Changes in pattern completion - A key mechanism to explain age-related recognition memory deficits? *Cortex* 64, 343-351.

- Vinera, J., Kermen, F., Sacquet, J., Didier, A., Mandairon, N., and Richard, M. (2015). Olfactory perceptual learning requires action of noradrenaline in the olfactory bulb: comparison with olfactory associative learning. *Learning & Memory* 22, 192-196.
- Wagatsuma, A., Okuyama, T., Sun, C., Smith, L.M., Abe, K., and Tonegawa, S. (2018). Locus coeruleus input to hippocampal CA3 drives single-trial learning of a novel context. *PNAS* 115, E310-E316.
- Walter, J., Keiner, S., Witte, O.W., and Redecker, C. (2011). Age-related effects on hippocampal precursor cell subpopulations and neurogenesis. *Neurobiology of Aging* 32, 1906-1914.
- Wang, C., Liu, F., Liu, Y.-Y., Zhao, C.-H., You, Y., Wang, L., Zhang, J., Wei, B., Ma, T., Zhang, Q., et al. (2011). Identification and characterization of neuroblasts in the subventricular zone and rostral migratory stream of the adult human brain. *Cell Res* 21, 1534-1550.
- Wang, H.W., Wysocki, C.J., and Gold, G.H. (1993). Induction of olfactory receptor sensitivity in mice. *Science* 260, 998-1000.
- Wang, J., Eslinger, P.J., Smith, M.B., and Yang, Q.X. (2005). Functional Magnetic Resonance Imaging Study of Human Olfaction and Normal Aging. *The Journals of Gerontology: Series A* 60, 510-514.
- Wang, J., Sun, X., and Yang, Q.X. (2017). Early Aging Effect on the Function of the Human Central Olfactory System. *The Journals of Gerontology: Series A* 72, 1007-1014.
- Waterhouse, B.D., and Navarra, R.L. (2019). The locus coeruleus-norepinephrine system and sensory signal processing: A historical review and current perspectives. *Brain Research* 1709, 1-15.
- von der Weid, B., Rossier, D., Lindup, M., Tuberosa, J., Widmer, A., Col, J.D., Kan, C., Carleton, A., and Rodriguez, I. (2015). Large-scale transcriptional profiling of chemosensory neurons identifies receptor-ligand pairs in vivo. *Nature Neuroscience* 18, 1455-1463.
- Weiler, E., and Farbman, A.I. (1997). Proliferation in the Rat Olfactory Epithelium: Age-Dependent Changes. *J. Neurosci.* 17, 3610-3622.
- Wesson, D.W., and Wilson, D.A. (2011). Sniffing out the contributions of the olfactory tubercle to the sense of smell: Hedonics, sensory integration, and more? *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 35, 655-668.
- Wheeler, A.L., Teixeira, C.M., Wang, A.H., Xiong, X., Kovacevic, N., Lerch, J.P., McIntosh, A.R., Parkinson, J., and Frankland, P.W. (2013). Identification of a functional connectome for long-term fear memory in mice. *PLoS Comput Biol* 9, e1002853.
- Whitman, M.C., and Greer, C.A. (2007). Synaptic Integration of Adult-Generated Olfactory Bulb Granule Cells: Basal Axodendritic Centrifugal Input Precedes Apical Dendrodendritic Local Circuits. *Journal of Neuroscience* 27, 9951-9961.
- Whitman, M.C., and Greer, C.A. (2009). Adult neurogenesis and the olfactory system. *Progress in Neurobiology* 89, 162-175.
- Wilson, D.A., and Sullivan, R.M. (2011). Cortical Processing of Odor Objects. *Neuron* 72, 506-519.
- Wilson, I.A., Ikonen, S., Gallagher, M., Eichenbaum, H., and Tanila, H. (2005). Age-Associated Alterations of Hippocampal Place Cells Are Subregion Specific. *J. Neurosci.* 25, 6877-6886.

- Wilson, R.S., Beckett, L.A., Barnes, L.L., Schneider, J.A., Bach, J., Evans, D.A., and Bennett, D.A. (2002). Individual differences in rates of change in cognitive abilities of older persons. *Psychol Aging* 17, 179-193.
- Wilson, R.S., Arnold, S.E., Tang, Y., and Bennett, D.A. (2006). Odor Identification and Decline in Different Cognitive Domains in Old Age. *NED* 26, 61-67.
- Wilson, R.S., Nag, S., Boyle, P.A., Hizek, L.P., Yu, L., Buchman, A.S., Schneider, J.A., and Bennett, D.A. (2013). Neural reserve, neuronal density in the locus ceruleus, and cognitive decline. *Neurology* 80, 1202-1208.
- Wimmer, M.E., Hernandez, P.J., Blackwell, J., and Abel, T. (2012). Aging impairs hippocampus-dependent long-term memory for object location in mice. *Neurobiology of Aging* 33, 2220-2224.
- Winston, M.J., Kim, S.J., Oh, E.S., and Lin, S.Y. (2020). Predictive value of olfactory impairment for cognitive decline among cognitively normal adults. *The Laryngoscope* 130, 840-847.
- Wise, S.P. (2008). Forward frontal fields: phylogeny and fundamental function. *Trends in Neurosciences* 31, 599-608.
- Woods, N.I., Stefanini, F., Apodaca-Montano, D.L., Tan, I.M.C., Biane, J.S., and Kheirbek, M.A. (2020). The Dentate Gyrus Classifies Cortical Representations of Learned Stimuli. *Neuron* 107, 173-184.e6.
- Xiang, L., Harel, A., Gao, H., Pickering, A.E., Sara, S.J., and Wiener, S.I. (2019). Behavioral correlates of activity of optogenetically identified locus coeruleus noradrenergic neurons in rats performing T-maze tasks. *Sci Rep* 9, 1361.
- Xu, L., Liu, J., Wroblewski, K.E., McClintock, M.K., and Pinto, J.M. (2020). Odor Sensitivity Versus Odor Identification in Older US Adults: Associations With Cognition, Age, Gender, and Race. *Chemical Senses* 45, 321-330.
- Yamaguchi, M., and Mori, K. (2005). Critical period for sensory experience-dependent survival of newly generated granule cells in the adult mouse olfactory bulb. *PNAS* 102, 9697-9702.
- Yang, W., and Sun, Q.-Q. (2015). Hierarchical organization of long-range circuits in the olfactory cortices. *Physiological Reports* 3, e12550.
- Yoder, W.M., Gaynor, L.S., Burke, S.N., Setlow, B., Smith, D.W., and Bizon, J.L. (2017). Interaction between age and perceptual similarity in olfactory discrimination learning in F344 rats: relationships with spatial learning. *Neurobiol Aging* 53, 122-137.
- Yousem, D.M., Geckle, R.J., Bilker, W.B., and Doty, R.L. (1998). Olfactory Bulb and Tract and Temporal Lobe Volumes: Normative Data across Decades. *Annals of the New York Academy of Sciences* 855, 546-555.
- Záborszky, L., Carlsen, J., Brashear, H.R., and Heimer, L. (1986). Cholinergic and GABAergic afferents to the olfactory bulb in the rat with special emphasis on the projection neurons in the nucleus of the horizontal limb of the diagonal band. *Journal of Comparative Neurology* 243, 488-509.
- Zahodne, L.B., Manly, J.J., Brickman, A.M., Narkhede, A., Griffith, E.Y., Guzman, V.A., Schupf, N., and Stern, Y. (2015). Is residual memory variance a valid method for quantifying cognitive reserve? A longitudinal application. *Neuropsychologia* 77, 260-266.

- Zerbi, V., Floriou-Servou, A., Markicevic, M., Vermeiren, Y., Sturman, O., Privitera, M., von Ziegler, L., Ferrari, K.D., Weber, B., De Deyn, P.P., et al. (2019). Rapid Reconfiguration of the Functional Connectome after Chemogenetic Locus Coeruleus Activation. *Neuron* 103, 702-718.e5.
- Zhu, M.-Y., Wang, W.-P., Iyo, A.H., Ordway, G.A., and Kim, K.-S. (2005). Age-associated changes in mRNA levels of Phox2, norepinephrine transporter and dopamine β -hydroxylase in the locus coeruleus and adrenal glands of rats. *Journal of Neurochemistry* 94, 828-838.
- Ziaei, M., Salami, A., and Persson, J. (2017). Age-related alterations in functional connectivity patterns during working memory encoding of emotional items. *Neuropsychologia* 94, 1-12.
- Zimnik, N.C., Treadway, T., Smith, R.S., and Araneda, R.C. (2013). α (1A)-Adrenergic regulation of inhibition in the olfactory bulb. *J Physiol* 591, 1631-1643.
- Zocher, S., Overall, R.W., Lesche, M., Dahl, A., and Kempermann, G. (2021). Environmental enrichment preserves a young DNA methylation landscape in the aged mouse hippocampus. *Nat Commun* 12, 3892.

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1. Organisation de l'épithélium olfactif.	7
Figure 2. Organisation du réseau neuronal du bulbe olfactif.....	9
Figure 3. Les différentes étapes du processus de neurogenèse adulte dans le bulbe olfactif.	13
Figure 4. Chronologie du développement des contacts synaptiques des nouveaux neurones granulaires dans le bulbe olfactif.....	15
Figure 5. Distribution des projections neuromodulatrices sur le bulbe olfactif.....	20
Figure 6. Organisation générale du système olfactif.....	24
Figure 7. Résumé des déficits olfactifs liés au vieillissement chez l'humain et le rongeur..	38
Figure 8. Bases cellulaires du vieillissement olfactif.....	42
Figure 9. Mécanismes pouvant médier la réserve cognitive (RC).	55
Figure 10. Le Locus Coeruleus, principal noyau noradrénergique du système nerveux....	57
Figure 11. Schéma récapitulatif des résultats de l'étude 1.	170
Figure 12. Schéma récapitulatif des résultats de l'étude 2.	171