



HAL
open science

Étude de la signalisation de l'homéoprotéine OTX2 dans les cortex piriforme et visuel adultes pour la maturation des interneurons et la plasticité fonctionnelle

Rachel Gibel-Russo

► To cite this version:

Rachel Gibel-Russo. Étude de la signalisation de l'homéoprotéine OTX2 dans les cortex piriforme et visuel adultes pour la maturation des interneurons et la plasticité fonctionnelle. Neurosciences [q-bio.NC]. Sorbonne Université, 2022. Français. NNT : 2022SORUS172 . tel-03813802

HAL Id: tel-03813802

<https://theses.hal.science/tel-03813802v1>

Submitted on 13 Oct 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.

Sorbonne Université

École doctorale Cerveau, cognition, comportement (Paris)

Centre interdisciplinaire de recherche en biologie

Etude de la signalisation de l'homéoprotéine OTX2 dans les cortex piriforme et visuel adultes pour la maturation des interneurons et la plasticité fonctionnelle

Par Rachel Gibel-Russo

Thèse de doctorat de Sciences du vivant

Dirigée par Ariel Di Nardo

Présentée et soutenue publiquement le 30/06/2022

Devant un jury composé de :

BACCI, Alberto

LAMONERIE, Thomas

PAPY-GARCIA, Dulce

MANDAIRON, Nathalie

DI NARDO, Ariel

Président

Rapporteur

Rapporteuse

Examinatrice

Directeur



« Qu'importe que le vent hurle, la montagne jamais ne ploie devant lui »
Mulan, 1998

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier chaleureusement les membres de mon jury pour leur implication dans l'examen de mon travail de thèse et, plus particulièrement mes deux rapporteurs, Dulce Papy-Garcia et Thomas Lamonerie pour m'avoir accordé leur temps pour la relecture, leur conseil et leur bienveillance envers mon manuscrit.

Ariel, depuis notre tout premier entretien en visio, de mon master jusqu'à maintenant tu m'as toujours témoigné ta confiance, accompagné au mieux et répondu à mes très voire trop nombreuses questions au fil de ces dernières années. Au sein du laboratoire, j'ai eu la chance d'encadrer de nombreux étudiants de divers horizons, de réaliser de nombreuses expériences et de ne jamais abandonner malgré les nombreuses difficultés que l'on rencontre tous en biologie. Je suis très reconnaissante de la chance que j'ai eu d'être dans cette équipe incroyable et je te remercie infiniment pour cela.

Alain, merci de m'avoir accueillie au sein de ton laboratoire. Merci pour nos discussions drôles, improbables, scientifiques et toutes celles que nous avons échangé. Merci pour ta disponibilité et ton écoute, merci d'avoir su m'accompagner aux côtés d'Ariel, de m'avoir encouragé et aiguillé dans mes expériences et mes projets. Je mesure aussi et surtout la chance que j'ai eu que tu puisses corriger mon manuscrit et être si bienveillant et élogieux sur mon écriture. Merci infiniment pour tout, tout simplement.

Olivia, chose promise, chose due. Je ne sais pas vraiment par où commencer et là je t'entends déjà me dire « Et bah, par le commencement ! ». Merci à toi d'avoir toujours sauvé mes manips, de m'avoir aidé quasiment tous les jours, je dirai même de m'avoir laissé utiliser ton cerveau, c'est tellement mieux quand on utilise celui des autres hahaha. Merci d'avoir été d'un soutien sans faille, et de m'avoir aussi bousculé de temps à autre et soutenue quand j'en avais cruellement besoin. Tu es le pilier du laboratoire, sans aucun doute, et nous le savons tous. J'espère que je ne te manquerai pas trop en tout cas, moi, tu me manqueras énormément. Ne change pas (même si je sais que ce n'est définitivement pas au programme), reste toujours cette OB que nous adorons tant et qui est notre tout au laboratoire.

Mes petits poulets du laboratoire,

Davben, mon frère d'adoption, tu as été un pilier pour l'équipe et un pilier pour moi, on s'est autant déchiré qu'aimé (enfin non plus aimé quand même). Merci pour tous ces débats improbables, toutes nos discussions, nos pauses, nos soirées. Merci pour avoir fait de moi peut-être une personne un chouia meilleure et merci aussi de m'avoir soutenue dans tes moments de grande bonté.

BimBim, merci pour tes rires, pour nos discussions et tout cet amour que tu donnes sans compter. Merci aussi pour ces manips que tu as faites pour moi en mode bg (ref), merci pour ta bienveillance et ton côté si mims, merci d'être restée encore un peu à nos côtés.

Tom-Tom et Rania, merci à vous deux déjà de nous supporter au quotidien et je sais que bon ce n'est pas facile des fois pour vous. Merci pour votre gentillesse, nos rires et certaines fois nos engueulades (je parle pour Tom là). Merci d'avoir participé à cette incroyable aventure qu'a été pour moi le Collège.

Camille, merci à toi pour ton self control et « tes enclenchements » à répétition, pour nos rires et ton soutien, tu es si mims.

Rajou, Julia, Ken merci pour nos discussions et vos encouragements au fil de ces années.

Merci à tous les anciens membres du laboratoire, aux stagiaires et particulièrement à Clémentine qui a été incroyable et qui a été pour moi la crème de la crème des stagiaires et qui aura sans aucun doute une carrière incroyable.

Merci à Francine à qui j'ai « bien cassé les pieds », à Maya, Sandrine, Vincent, aux plateformes du CIRB et à tout le CIRB en général.

Ma Mélax et ma Vaness, voilà je vais pleurer merci les filles. Merci à vous deux, on a été et on est un beau trio et je mesure la chance de vous compter comme mes plus précieuses amies. Je vais faire court car il me faudrait des pages et des pages pour vous remercier sur tous les points sur lesquels vous m'avez upgradé. Je suis juste tellement reconnaissante de vous avoir rencontré, et j'ai hâte de voir ce que ces années donneront. La veine et les poumons on a dit...

Javi, tu as été si patient avec ma mauvaise foi et j'en passe. Merci, merci, merci, tu as et tu es un exemple, merci pour ta bienveillance, pour tes conseils, pour nos discussions. Merci d'avoir fait ce petit bout de chemin de science à mes côtés. T'es le best Javi et moi ta pref I know.

Damino, merci pour m'avoir si bien formé, merci pour nos discussions, ton soutien et nos rires (même si des fois tu n'as pas trop envie de rire hahaha).

Hadhemox, tu es une personne incroyable et j'ai adoré travailler avec toi, je te remercie infiniment pour tes si bons conseils ; ton chapeau de sorcière, pour toutes nos discussions, pour tous ces beaux moments passés ensemble et il y'en aura encore beaucoup.

À Benjamin, Lydie et Gabriel, merci pour toutes ces années où vous avez dû me supporter. Merci à vous pour m'avoir tant accompagné et aidé depuis toutes ces années, je souhaite à tous d'être entouré de personnes telles que vous.

À Morgane et Dominique, merci pour cette année et celles passées. Merci infiniment pour tout ce que vous avez fait pour moi, pour avoir eu confiance et cru en moi. Je n'ai pas de mots, juste une dette éternelle envers vous.

Merci à mes amis, ceux d'Annecy, de Grenoble, de Paris et d'ailleurs qui ont tous à leur niveau œuvré pour que je sois la meilleure version de moi-même.

À la Puquerie, vous m'avez tant apporté et continuez à le faire, ces années ont été incroyables à vos côtés et mes années de thèse n'auraient pas été si belles sans vous.

À ma famille, mes parents, mon frère et mes sœurs qui ont toujours été là et m'ont toujours soutenue, je vous aime inconditionnellement. Merci à ma famille d'Outre-mer, qui est incroyable et si parfaite à mes yeux.

À Richard, merci pour ton amour et ces belles années à tes côtés, ton soutien sans faille peu importe les difficultés et les épreuves. Merci à Véronique et Gérald pour nos discussions, votre soutien et votre bienveillance.

À la doums.

Merci infiniment à tous ceux qui m'ont accompagné, épaulé et supporté dans cette belle aventure.

Mamie, merci pour cet amour que tu m'as donné, pour tous ces souvenirs que je nourrirai pour toujours, merci d'avoir été la meilleure d'entre toutes, tu es un modèle, mon modèle de force et d'inspiration. Je te chérirai toujours dans mon cœur, je t'aime immensément et cette thèse est pour toi.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES ILLUSTRATIONS	X
LISTE DES ABREVIATIONS	XII
INTRODUCTION	1
I. LES PERIODES CRITIQUES DE PLASTICITE	3
a. Les périodes critiques au cours du développement	3
b. Modèles de plasticité	3
i. La vision binoculaire	3
ii. La carte glomérulaire	5
c. Mécanismes cellulaires et moléculaires de la plasticité corticale	5
II. LES RESEAUX PERINEURONNAUX	9
a. Découverte des PNN	10
b. Structure des glycosaminoglycanes	11
c. Organisation en protéoglycanes	12
d. Biosynthèse des glycosaminoglycanes	14
e. La matrice extracellulaire, une structure dynamique	17
f. Distribution des PNN dans le CNS	18
i. Les structures corticales	18
ii. L'amygdale	18
iii. L'hippocampe	19
iv. Le cervelet	19
v. La moelle épinière	19
g. Fonctions physiologiques dans le cerveau post-natal	20
i. Une barrière physique qui protège des agressions	20
ii. Un véritable partenaire de liaison moléculaire	22
iii. Un frein à la mobilité des récepteurs	23
III. LES HOMEOPROTEINES	23
a. La découverte des homéoprotéines	23
b. Les homéoprotéines Otx1 et Otx2 contrôlent le développement du CNS	26
c. Les homéoprotéines, facteurs de transcription aux propriétés remarquables	27
i. L'internalisation des homéoprotéines : Antennapedia	27
ii. La sécrétion des homéoprotéines : EN2	30
iii. Bloquer le transfert des homéoprotéines	32
d. Action paracrine de l'homéoprotéine OTX2 dans la plasticité	32
i. Le transfert d'OTX2 régule la plasticité	32
ii. OTX2 reconnaît spécifiquement les GAG sulfatés des PNN	34

iii. Une boucle de rétrocontrôle positive entre OTX2 et les PNN	36
iv. La réouverture de la plasticité chez l'adulte	38
IV. LE SYSTEME OLFACTIF, UN SYSTEME SENSORIEL SINGULIER	39
a. Les molécules odorantes	39
b. L'organisation du système olfactif, structure et fonction	42
i. Les caractéristiques uniques des voies olfactives	42
ii. La neurogenèse adulte, longtemps mise en doute et pourtant essentielle	46
iii. La neurogenèse adulte, précurseurs et intégration au réseau du OB	47
iv. La sélection neuronale et la plasticité, une relation connexe	48
c. Le cortex piriforme, circuit et plasticité	48
i. Du bulbe olfactif au cortex piriforme	48
ii. Le cortex piriforme, un système sensoriel à part	49
iii. Origine et subdivisions du cortex piriforme	51
iv. Organisation neuroanatomique du cortex piriforme	52
V. OBJECTIFS DE LA THESE	55
RÉSULTATS	57
DISCUSSION - CONCLUSION	104
I. OTX2 ET LA MATURATION DU CORTEX PIRIFORME	106
II. MIMES DE GAG ET HOMEOPROTEINES	115
III. QUELS MECANISMES POUR OTX2 ?	119
RÉFÉRENCES	124
ANNEXES	163

Liste des illustrations

Figure 1. Séquence des périodes critiques dans le cerveau de souris _____	3
Figure 2. Périodes critiques de dominance oculaire _____	4
Figure 3. La CP est dictée par la fonction du GABA _____	6
Figure 4. Diversité des neurones GABAergiques dans le néocortex _____	7
Figure 5. Localisation des neurones dans les couches du cortex _____	8
Figure 6. Dessin de réseaux périneuronaux observés sur différents types neuronaux _	10
Figure 7. Unités disaccharides typiques des chaînes de GAG du système nerveux____	11
Figure 8. Complexité et variabilité de la famille des lecticanes _____	13
Figure 9. Biosynthèse des glycosaminoglycanes _____	15
Figure 10. Les PNN limitent la plasticité des neurones par les mécanismes suivants : _	21
Figure 11. SEMA3A et OTX2 s'accumulent dans les PNN _____	23
Figure 12. Mutation homéotique d'Antennapedia _____	24
Figure 13. Structure et interaction de l'homéodomaine avec l'ADN _____	25
Figure 14. Signaux de sécrétion et d'internalisation des homéoprotéines _____	28
Figure 15. Modèle d'internalisation de la troisième hélice d'Antennapedia _____	29
Figure 16. L'homéoprotéine EN2 est transférée entre les cellules <i>in vitro</i> _____	30
Figure 17. Mécanismes du transfert intercellulaire des homéoprotéines _____	31
Figure 18. OTX2 s'accumule préférentiellement dans les cellules PV dans l'ensemble du cortex_____	33
Figure 19. OTX2 contrôle la période critique de la dominance oculaire _____	34
Figure 20. Alignement de motifs consensus de liaison au GAG présents dans un sous-ensemble d'homéoprotéines _____	35
Figure 21. Séquence d'OTX2 nécessaire à la reconnaissance des sucres complexes ____	35
Figure 22. Boucle de rétroaction positive Otx2-PNN dans la régulation de la plasticité de la CP _____	36
Figure 23. Modèle à deux seuils du contrôle de la plasticité par OTX2 _____	37
Figure 24. Méthodes de réouverture de plasticité en interférant avec OTX2 _____	39
Figure 25. Organisation synaptique du système olfactif, de l'épithélium au bulbe olfactif _____	41
Figure 26. Voies de transduction de l'olfaction_____	42

Figure 27. Dessin schématique du OB, montrant l'organisation laminaire, les principaux types de cellules et le circuit neuronal de base	43
Figure 28. Synapses réciproques dendrodendritiques entre les interneurons OB et les cellules mitrales/à panache	44
Figure 29. Les voies parallèles des cellules mitrales et des cellules à panache du OB au OC	45
Figure 30. Neurogenèse dans la SVZ chez la souris	46
Figure 31. Réseau auto-associatif	50
Figure 32. Localisation relative et connectivité des aires corticales olfactives chez le rongeur	51
Figure 33. Cytoarchitecture du cortex piriforme	53
Figure 34. Caractérisation corticale des cellules PV	54
Figure 35. Altération de la maturation du cortex piriforme chez les souris APP-PS1	107
Figure 36. La neurogenèse adulte du bulbe olfactif chez les souris <i>PV::CRE;scFvOtx2^{tglo}</i>	109
Figure 37. Modèle du contrôle de la plasticité par OTX2 dans le V1 (1) et le PC (2)	111
Figure 38. La plasticité cérébrale dépend du niveau d'expression de PV	112
Figure 39. Dans le PC, l'accumulation de CAT315 est lente et dépendante d'OTX2	115
Figure 40. Schéma des séquences linéaires et branchés	116
Figure 41 : Structure de l'homéoprotéine OTX2	118
Figure 42. Transfert intercellulaire des homéoprotéines	119
Figure 43. La Cx30 partenaire ou cible d'OTX2 ?	120
Tableau 1. Le classement des unités disaccharidiques des chaînes CS dépend de leurs schémas de sulfatation	16
Tableau 2. Exemples de composés odorants	40

Liste des abréviations

A1	Cortex auditif primaire
ACO	Noyau amygdaloïde cortical antérieur
ADAM	Désintégrine et métalloprotéinase
ADAMTS	Désintégrine et métalloprotéinase à motif thrombospondines
AMPA	Acide alpha-amino-3-hydroxy-5méthyl-4-isoxazoleproptionique
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
AON	Noyau antérieur olfactif
AONd	Noyau antérieur olfactif dorsale
AONpE	Noyau antérieur olfactif <i>pars externa</i>
AONpV	Noyau antérieur olfactif posteroventrale
aPC	Cortex piriforme antérieur
aPCd	Cortex piriforme antérieur dorsal
aPCv	Cortex piriforme antérieur ventral
aPCvR	Cortex piriforme antérieur ventrorostrale
Assn	Entrée associative intracorticale
BDNF	Brain-Derived Neurotrophic Factor
ChABC	Chondroïtinase ABC
CB	Calbindine
Chpf	Facteur de polymérisation de la chondroïtine
Chst	Carbohydre sulfotransferase
Chsy	Chondroïtine sulfate synthase
CNS	Système nerveux central
COVID-19	Maladie à coronavirus 2019
CP	Période critique
CPG	Cellule périglomérulaire
CR	Calrétinine
CSF	Liquide cérébro-spinal
CSPG	Chondroïtine sulfate protéoglycane
DP	Cellule pyramidale profonde
En	Engrailed
FGF	Facteur de croissance des fibroblastes
G	Cellule neurogliaforme
GABA	Acide γ -aminobutyrique
GAD	Glutamate décarboxylase
GAG	Glycosaminoglycanes
Gal	Galactose
GalNAc	N-acétylgalactosamine
GC	Cellule granulaire
GluA	Acide glucuronique
GlcNac	N-acétylglucosamine
H	Cellule horizontale
HA	Hyaluronane
Hapln	Hyaluronan- and proteoglycan-binding protein
HAS	Hyaluronane synthase
HS	Héparane sulfate
HSPG	Héparane sulfate protéoglycane
Htr	Récepteur sérotoninergique
IdoA	Acide iduronique

IP3	1,4,5-triphosphate
KS	Kératane sulfate
KSPG	Kératane sulfate protéoglycane
LGN	Corps géniculé latéral
LOT	Tractus olfactif latéral
LTD	Dépression à long terme
M	Cellule multipolaire
MD	Occlusion monoculaire
MEC	Matrice extracellulaire
mEC	Cortex entorhinal médian
MMP	Métalloprotéinase matricielle
mPFC	Cortex préfrontal médian
M/T	Cellule mitrale/à panache unique
nLOT	Noyau du tractus olfactif latéral
OSN	Neurone sensoriel olfactif
OB	Bulbe olfactif
OC	Cortex olfactif
OFC	Cortex orbitofrontal
OR	Récepteur olfactif
OTCaP	Tubercule olfactif antérolatérale
OTCO	Tubercule olfactif cortical
Otd	Orthodenticle
Otx	Orthodenticle homeobox
PC	Cortex piriforme
PG	Protéoglycane
PIP2	Phosphatidylinositol diphosphate
PLCO	Noyau amygdaloïde cortical postérolatéral
pPC	Cortex piriforme postérieur
PG	Protéoglycane
PNN	Réseau périneuronaux
PSA	Acide alpha 2,8-polysialique
PV	Parvalbumine
RCPG	Récepteur couplé aux protéines G
RMS	Courant migratoire rostral
scFv	Anticorps simple-chaine
SL	Cellule semi-lunaire
Sema3A	Semaphorine-3-A
SOM	Somatostatine
SP	Cellule pyramidale superficielle
SVZ	Zone sous-ventriculaire
TIMP	Inhibiteur tissulaire des métalloprotéinases
Tn-C	Ténascine-C
Tn-R	Ténascine-R
tPA	Protéine activatrice du plasminogène de type tissulaire
TT	Tenia tecta
V1	Cortex visuel primaire
VIP	Peptide vasoactif intestinal
WFA	<i>Lectine Wisteria Floribunda</i>

INTRODUCTION

I. Les périodes critiques de plasticité

a. Les périodes critiques au cours du développement

Des polyglottes aux virtuoses, les performances humaines découlent de la qualité de la mise en place des circuits neuronaux au cours de l'expérience précoce. Ainsi, bien que l'apprentissage soit possible tout au long de la vie, il est facilité au cours de fenêtres temporelles de plasticité appelées périodes critiques (CP). Les CP impliquent un remodelage de la connectivité neuronale et sont cruciales pour l'adaptation optimale du cerveau à son environnement. Ces CP sont uniques et par conséquent, ne se reproduiront pas à un stade ultérieur. Si un organisme n'est pas exposé au stimulus approprié pendant une CP, il peut être difficile, voire impossible, de développer par la suite certaines fonctions associées. Les CP sont asynchrones. Celles des aires primaires sensorielles telles que les aires olfactives, auditives ou visuelles sont plus précoces que celles des aires motrices ou cognitives (Figure 1) (Hensch and Bilimoria, 2012). Bien que de plus en plus étudiées chez l'humain, les CP contrôlant des modalités sensorielles primaires chez les animaux sont les mieux comprises.

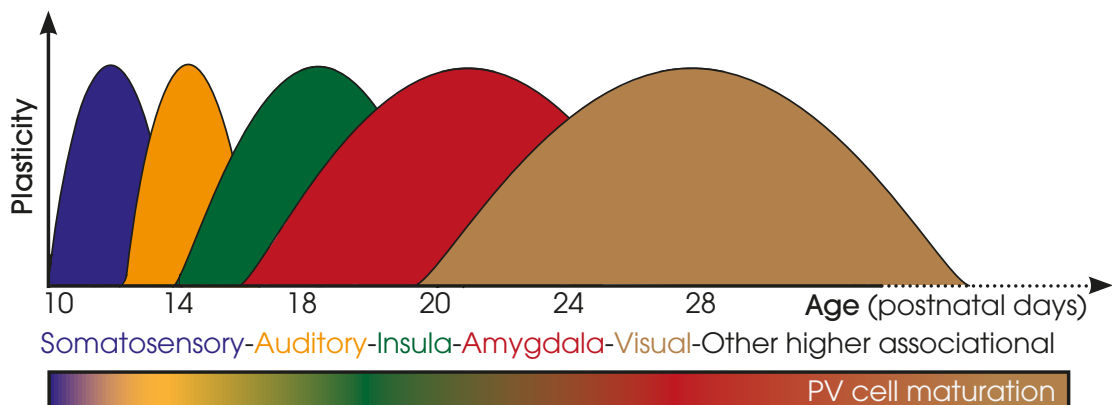


Figure 1. Séquence des périodes critiques dans le cerveau de souris

Les fenêtres temporelles du pic de plasticité dans le cortex somatosensoriel, le cortex auditif primaire (A1), le cortex insulaire, l'amygdale, le cortex visuel primaire (V1) et les zones cognitives supérieures sont gouvernées par la maturation respective des circuits à parvalbumine. (Adapté de (Reh et al., 2020a)).

b. Modèles de plasticité

i. La vision binoculaire

Les CP ont été observées dans divers systèmes et chez plusieurs espèces (Hensch, 2004). Mais depuis les travaux pionniers de Hubel et Wiesel il y a 50 ans, chez le chat, la CP a été principalement étudiée dans le V1 binoculaire. Hubel et Wiesel ont montré que les entrées des

deux yeux sont en concurrence lorsqu'elles convergent pour la première fois vers des neurones individuels dans la zone binoculaire du V1 (Wiesel and Hubel, 1963). Des entrées inégales provenant des deux yeux au début de la vie perturbent l'organisation binoculaire typique des afférences thalamo-corticales et produisent un déficit permanent de l'acuité visuelle, appelé amblyopie touchant 2 à 5% de la population humaine (Lewis and Maurer, 2009). Chez le rongeur, la dominance oculaire présente un biais typique vers l'œil controlatéral. Pendant la CP, la privation monoculaire n'affecte pas l'œil en lui-même, ni le corps géniculé latéral (LGN) mais modifie les afférences dans la couche IV du V1 avec diminution du nombre d'afférences venues du LGN correspondant à l'œil fermé, au profit de celles correspondant à l'œil resté ouvert.

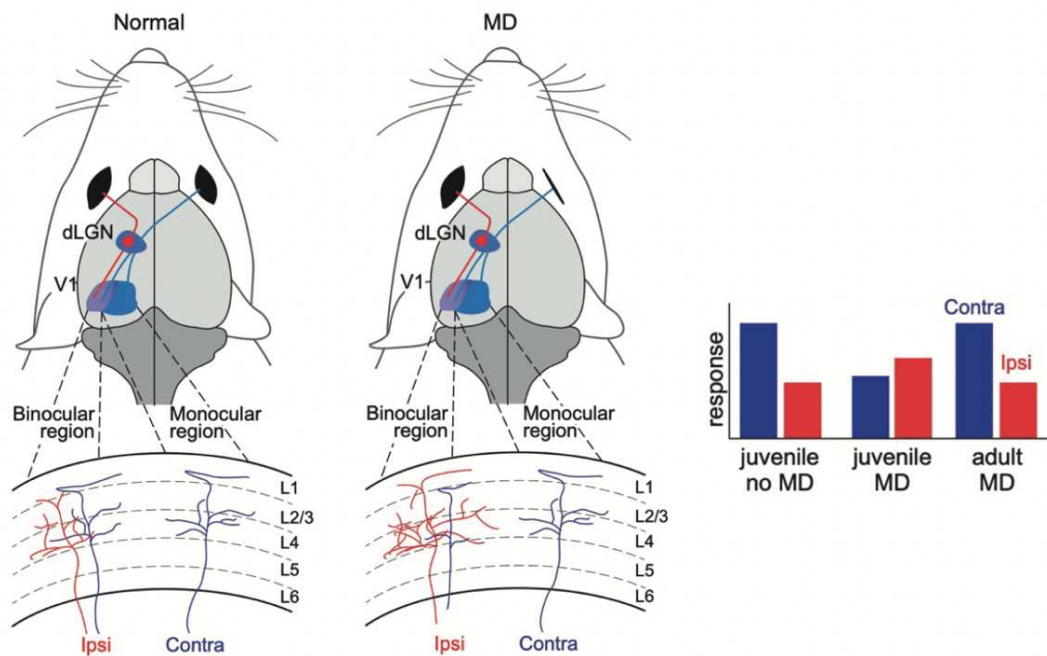


Figure 2. Périodes critiques de dominance oculaire

Pendant la CP, l'arborescence des neurones peut être fortement modifiée pour altérer la connectivité. Chez la souris, les afférences thalamiques (dLGN) de l'œil ipsilatéral (en rouge) et de l'œil controlatéral (en bleu) sont en compétition dans la région binoculaire du V1. La MD d'une souris juvénile diminue les afférences de l'œil controlatéral et ainsi la réponse associée dans le V1. Aucune modification de réponse n'est observée après une MD chez l'adulte. (Extrait de (Di Nardo et al., 2018).

La dominance oculaire se déplace alors vers l'œil ipsilatéral resté ouvert (Figure 2) (Wiesel and Hubel, 1963; LeVay et al., 1978). Chez les rongeurs, en réalisant des occlusions monoculaires (MD) à différents âges, il a été établi que la CP pour la vision binoculaire débute au 20^{ème} jour

postnatal (P20) soit 6 jours après l'ouverture des yeux, atteint un pic de plasticité à P30 et décline rapidement après P40 (Fagiolini et al., 1994; Gordon and Stryker, 1996). Avant et après cette CP, la réponse à la privation monoculaire est très limitée.

ii. La carte glomérulaire

La plupart des systèmes sensoriels présentent des CP dépendantes de l'expérience sensorielle. En revanche, le système olfactif conserve des niveaux élevés de plasticité tout au long de la vie, probablement en raison de la neurogenèse continue des neurones sensoriels dans l'épithélium nasal et des interneurons inhibiteurs dans le bulbe olfactif (OB). Dans ce système, les preuves de l'existence de CP sont alors mitigées. Bien que l'identité des récepteurs olfactifs (OR) soit à l'origine de la formation des cartes glomérulaires, il a été proposé qu'une CP non conventionnelle indépendante de l'expérience sensorielle serait également impliquée (Ma et al., 2014; Tsai and Barnea, 2014). L'activité neuronale ne semble pas jouer un rôle prépondérant à l'inverse de l'expression des OR. Les neurones sensoriels olfactifs (OSN) exprimant un même OR particulier se reconnaissent (attraction homotypique) et forment des faisceaux axonaux communs qui convergent vers les mêmes glomérules au niveau du bulbe olfactif (Vassalli et al., 2002; Nguyen et al., 2007). Cependant, les mécanismes présidant à cette convergence restent encore mal compris, il pourrait s'agir d'interactions directement médiées par l'axone lui-même (Barnea et al., 2004) ou par l'une des molécules d'adhésion cellulaire impliquées dans le guidage des axones des OSN (Mori and Sakano, 2011).

c. Mécanismes cellulaires et moléculaires de la plasticité corticale

La balance excitation-inhibition détermine le codage neuronal des CP sensorielles. Cette balance est ajustée dynamiquement par les circuits des couches corticales où les connexions inhibitrices se développent plus tardivement que les excitatrices (Turrigiano and Nelson, 2004). C'est la maturation des circuits inhibiteurs locaux qui est responsable de l'ouverture et de la fermeture des CP (Figure 1) (Fagiolini and Hensch, 2000; Hensch, 2005).

Des gènes distincts codent les deux isoformes de l'enzyme de synthèse du GABA, l'acide glutamique décarboxylase (GAD) (Soghomonian and Martin, 1998). Responsable de 90% de la synthèse de GABA, GAD67 est localisée dans les somas et les dendrites des cellules. Les souris knock-out pour GAD67 meurent à la naissance. À l'inverse, GAD65 est ancrée aux vésicules synaptiques et peut-être recrutée lorsqu'une synthèse supplémentaire de GABA est nécessaire. Pendant une activité neuronale intense, GAD65 permet de répondre à des

changements rapides de la demande synaptique. Ainsi, les souris knock-out pour *GAD65* sont-elles viables et présentent des concentrations de GABA ainsi qu'une dominance oculaire normales. En revanche, dans ces souris, une privation monoculaire pendant la CP n'a pas d'effet. Cependant, l'utilisation de diazépam qui active les récepteurs inhibiteurs GABA_A, rétablit l'inhibition et restaure la plasticité (Hensch et al., 1998). D'ailleurs, il est remarquable de constater que la restauration de la plasticité est possible à tout âge chez les souris Knock-out *GAD65*, soulignant l'importance du niveau approprié de la transmission inhibitrice dans la CP du V1.

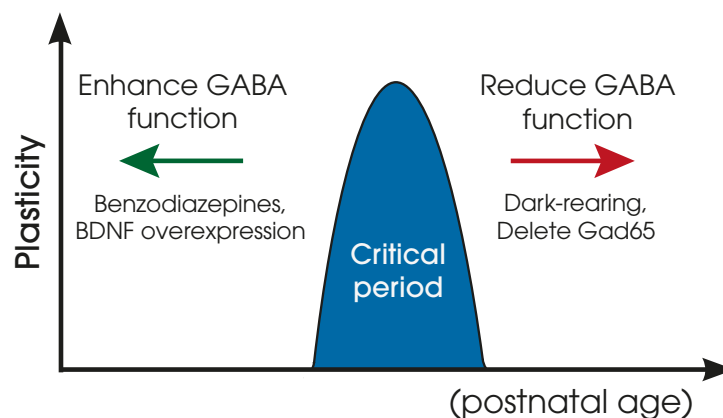


Figure 3. La CP est dictée par la fonction du GABA

La CP peut être avancée en augmentant la transmission du GABA (flèche verte) ou retardée en réduisant son fonctionnement (flèche rouge). (Adapté de (Hensch, 2005)).

L'environnement extracellulaire peut réguler la temporalité de la CP. Par exemple, l'acide alpha 2,8-polysialique (PSA) lié à la molécule d'adhésion des cellules neurales (PSA-NCAM) empêche la maturation prématurée du circuit inhibiteur. L'expression de PSA dans le V1 de la souris diminue peu après l'ouverture des yeux. La disparition prématurée de PSA favorise la maturation des interneurons GABAergiques et déclenche une CP précoce de la dominance oculaire (Di Cristo et al., 2007).

Similairement, le début de la CP peut être accéléré par le diazépam, un agoniste GABAergique (Fagiolini and Hensch, 2000; Iwai et al., 2003) ou la surexpression du facteur neurotrophique dérivé du cerveau (BDNF) (Castrén et al., 1992; Huang et al., 1999) qui renforce prématurément l'inhibition quand l'animal ouvre les yeux. L'activité neuronale est étroitement liée au niveau d'expression du BDNF. Le BDNF active son récepteur TrkB et contribue à la maturation du circuit inhibiteur (Huang et al., 1999). Ainsi, l'élevage d'animaux sans expérience visuelle depuis la naissance réduit les niveaux d'expressions de BDNF (Castrén et

al., 1992) et la transmission médiée par le GABA dans le V1 (Chen et al., 2001; Morales et al., 2002), retardant alors le pic de plasticité (Figure 3). Cependant, chez de tels animaux, l'utilisation de diazépam, la surexpression ou la sécrétion de BDNF grâce à l'utilisation de milieux enrichis améliorant les conditions d'élevage, restaurent une cinétique normale de la CP. Ainsi, l'inhibition GABAergique est-elle suffisante pour déclencher l'ouverture puis la fermeture de la CP même en l'absence totale de stimulation visuelle.

De multiples facteurs de signalisation ayant des origines neuronales, gliales ou extracorticales sont aussi impliqués dans le déclenchement et la fermeture de la CP. Ils participent à la maturation des interneurons GABAergiques à parvalbumine (PV), consolidant ainsi les circuits neuronaux (Gibel-Russo et al., 2022). Les interneurons GABAergiques constituent 20% des neurones corticaux. Cependant ils présentent une forte diversité au niveau de leur morphologie, de leur localisation, de leurs propriétés physiologiques et dans l'expression de certains gènes. On distingue trois grandes classes d'interneurons corticaux : les PV, les somatostatines (SOM) et ceux à récepteurs sérotoninergiques (Figure 4).

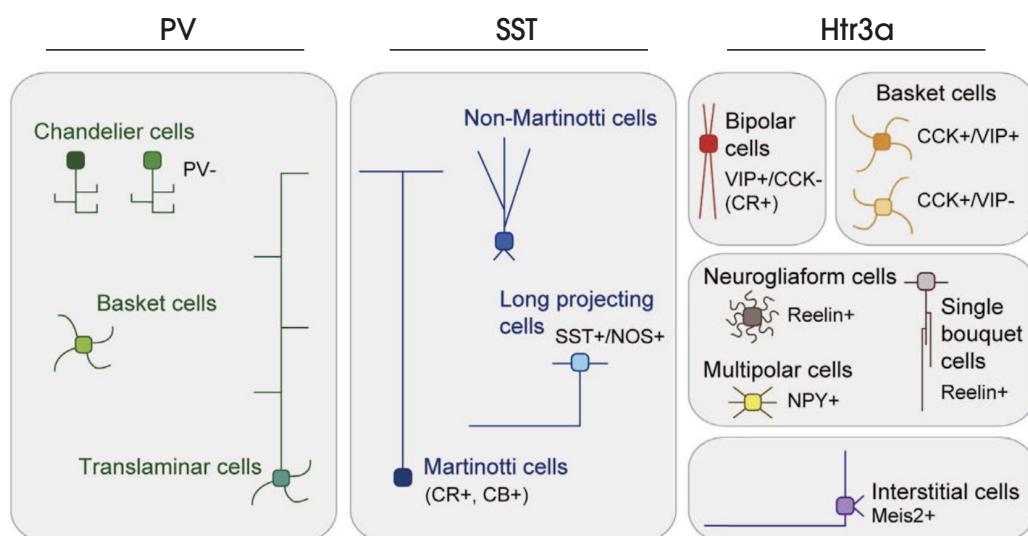


Figure 4. Diversité des neurones GABAergiques dans le néocortex

Schémas décrivant les principales classes d'interneurons corticaux dans le néocortex chez la souris. Les interneurons peuvent être organisés en trois grandes classes basées sur l'expression de PV, SST, et du récepteur sérotoninergiques 3A (Htr3a). Une petite fraction des cellules en panier PV exprime également la SST. (Extrait de (Lim et al., 2018)).

La plus grande classe d'interneurons corticaux est caractérisée par l'expression de PV, une protéine impliquée dans la signalisation calcique et structurellement proche de la calmoduline et de la troponine C, deux protéines qui, comme PV, fixent le calcium. Les cellules PV se

partagent en trois sous-classes principales ; les cellules en panier qui innervent le corps cellulaire et les dendrites proximales des neurones pyramidaux, les cellules en chandelier qui innervent le segment initial de l'axone des neurones pyramidaux et les interneurons translaminaires qui ciblent les neurones pyramidaux sur plusieurs couches corticales. Ces trois types de cellules PV se différencient aussi par leurs propriétés anatomiques, biophysiques et synaptiques (Tremblay et al., 2016; Lim et al., 2018).

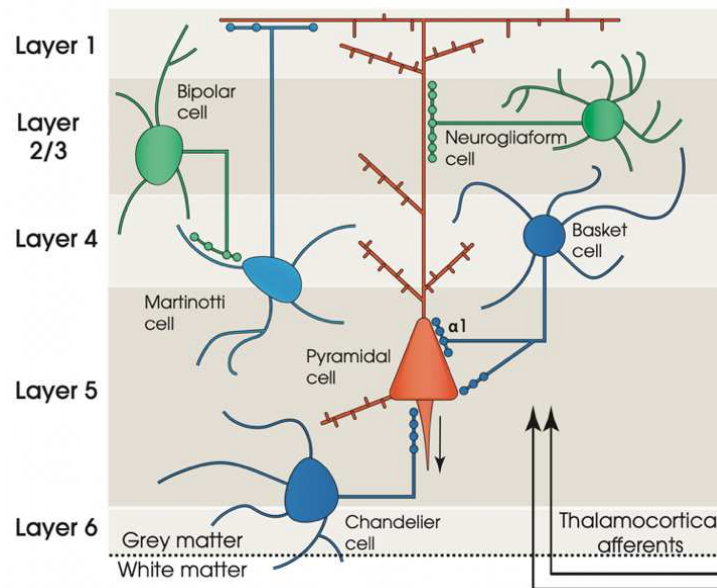


Figure 5. Localisation des neurones dans les couches du cortex

Diversité des interneurons et organisation du V1 en six couches (notées de 1 à 6). Les cellules PV sont des interneurons en paniers (Basket cell, en bleu) présents majoritairement dans la couche IV du V1. Leurs synapses sur le soma des cellules pyramidales, impliquent les récepteurs somatiques GABA_A contenant la sous-unité $\alpha 1$. Elles participent à la régulation de la plasticité associée à la CP. (Adapté de (Marín, 2012)).

Présentes dans les couches II à VI et enrichies dans les couches IV et V, les cellules PV en panier forment un réseau richement interconnecté, étendent l'inhibition latérale aux cellules pyramidales voisines, influencent le déclenchement des potentiels d'action et orchestrent des oscillations rythmiques (Figure 5) (Bartos et al., 2007; Sohal et al., 2009; Packer and Yuste, 2011; Hu et al., 2014b). Elles émettent des potentiels d'action à des vitesses élevées en partie grâce à des canaux potassiques de la sous-famille Kv3 (Hensch, 2005). La perturbation ciblée du gène Kv3.1, réduit l'activité de décharge rapide des cellules PV entraînant, comme le knock-out de *GAD65*, une altération de la plasticité de la dominance oculaire (Hensch, 2005). L'inhibition des cellules pyramidales par les cellules PV implique les récepteurs somatiques GABA_A contenant la sous-unité $\alpha 1$ (Figure 5) (Fagiolini et al., 2004).

Contrairement aux cellules pyramidales excitatrices d'origine ventriculaire du télencéphale dorsal, les interneurons sont générés dans les éminences ganglionnaires du télencéphale ventral et leur migration se poursuit pendant plusieurs mois après la naissance dans le cerveau humain (Paredes et al., 2016). De ce fait, la formation des circuits inhibiteurs est généralement plus lente que celle des cellules pyramidales (Lodato et al., 2011). Cependant, une fois matures, les cellules inhibitrices, à décharge rapide, sont les premières à répondre à la privation sensorielle (Yazaki-Sugiyama et al., 2009; Aton et al., 2013; Kuhlman et al., 2013). La maturation et le maintien des cellules PV sont extrêmement sensibles à l'expérience et à l'environnement moléculaire de la cellule (Takesian and Hensch, 2013). La maturation asynchrone des cellules PV entre les régions du cortex contribue au déroulement séquentiel des CP (del Río et al., 1994). Sans expérience, le nombre et la force des synapses PV sur les cellules pyramidales sont réduits, les propriétés de la membrane des cellules PV restent immatures et la structuration de sa matrice extracellulaire en filet périneuronale ou perineuronal net (PNN) est retardée (Chattopadhyaya et al., 2004; Katagiri et al., 2007; Ye and Miao, 2013).

Il est essentiel de comprendre que la balance entre excitation et inhibition (E/I balance) atteinte à la fin de la CP par la maturation des systèmes inhibiteurs est nécessaire au maintien de l'état non plastique du cerveau adulte. L'inhibition restreint la plasticité chez l'adulte, comme le démontre l'augmentation de plasticité qui suit une diminution du niveau de GABA (Harauzov et al., 2010). La maturation des cellules PV dépend de l'environnement, comme cela a été discuté, mais aussi de programmes de maturation intrinsèques. Ainsi, la transplantation d'interneurones immatures dans le V1 adulte, rouvre la CP. Cette nouvelle CP émerge lorsque les cellules transplantées atteignent un âge qui correspond à celui de l'ouverture de la plasticité de la CP dans le système visuel du donneur (Southwell et al., 2010; Tang et al., 2014).

II. Les réseaux périneuronaux

La matrice extracellulaire (ECM) est un assemblage complexe de macromolécules, dont de divers protéoglycanes et de l'acide hyaluronique, qui remplit l'espace extracellulaire de tous les tissus et organes. L'ECM représente 10 à 20 % du volume du cerveau et joue un rôle important dans le développement, la plasticité et la pathophysiologie de cet organe (Cragg, 1979). L'ECM est dynamique, réorganisée par la biosynthèse de ses composants et leur dégradation par diverses protéases et glycanases. Il existe trois organisations principales de cette matrice : en feuillets avec un rôle de frontière entre les cellules endothéliales et le parenchyme cérébral (par

exemple celle des méninges), diffuse au sein du parenchyme et formant la matrice interstitielle neurale, enfin condensée en PNN enrichis en glycosaminoglycanes (GAG) (Lau et al., 2013).

a. Découverte des PNN

Les PNN ont été décrits pour la première fois par Camille Golgi en 1893, puis par Ramón y Cajal en 1897 (Figure 6). La description historique des PNN est qu'il s'agit d'une « couverture finement réticulaire »^a « d'un aspect finement granuleux »^b qui adhère intimement à la surface du corps cellulaire et des dendrites proximales, à l'exclusion du segment initial de l'axone de certains neurones du cerveau adulte.

^a «...un sottile rivestimento, ..., avente forma reticolare o di strato continuo, ... interessante non soltanto i corpi cellulari, ma anche i loro prolungamenti, ... »

Camillo Golgi, 1893

^b «de aspecto finamente granuloso con los más resolventes objetivos...»

Ramón y Cajal, 1897

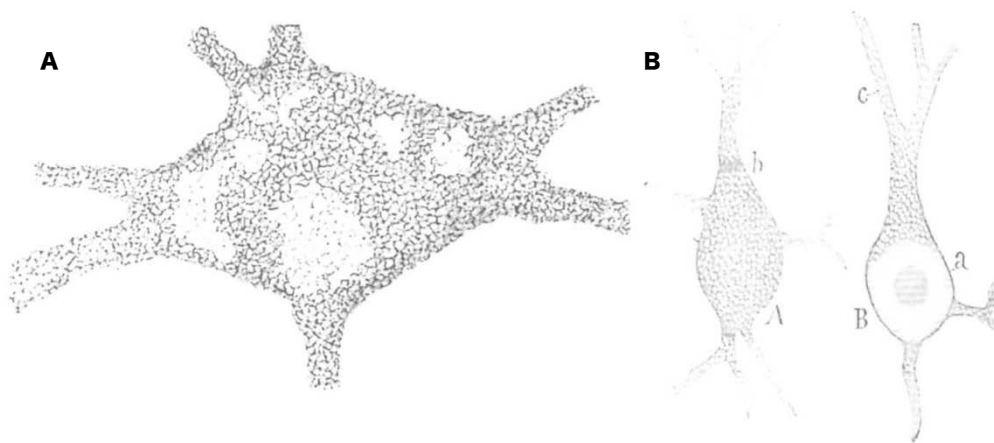


Figure 6. Dessin de réseaux périneuronaux observés sur différents types neuronaux

(A) Cellule nerveuse de la corne antérieure de moelle épinière de chat (Golgi, 1893). (B) Neurone de cortex de chat adulte (Ramón y Cajal, 1897).

Les PNN se présentent sous la forme d'un nid d'abeille ou d'une maille qui délimite de petits compartiments alvéolaires polygonaux (Golgi, 1893, 1898; Lugaro, 1895; Ramón y Cajal, 1897). Ainsi, ils ont été interprétés comme des espaces à travers lesquels les terminaisons nerveuses contactent la surface des cellules nerveuses (Lugaro, 1895; Held, 1902). Observés autour des interneurons et moins fréquemment autour des cellules pyramidales dans

l'ensemble du CNS (van 't Spijker and Kwok, 2017), ils ont été identifiés dans de nombreux organismes, tels que la souris, le rat, l'opossum, le singe et l'humain (Sonntag et al., 2015). De nombreux anticorps ont été développés afin de détecter le cœur protéique ou les sucres complexes des PNN. Aujourd'hui, la technique histologique la plus courante pour les identifier est l'utilisation de la lectine agglutinine de *Wisteria floribunda* (WFA) qui reconnaît la N-acétylgalactosamine des chaînes de sucre présentes dans la grande majorité (~80%) des PNN.

b. Structure des glycosaminoglycanes

Les polysaccharides complexes sont les principaux constituants de la matrice extracellulaire eucaryote et plus généralement, de l'environnement extracellulaire.

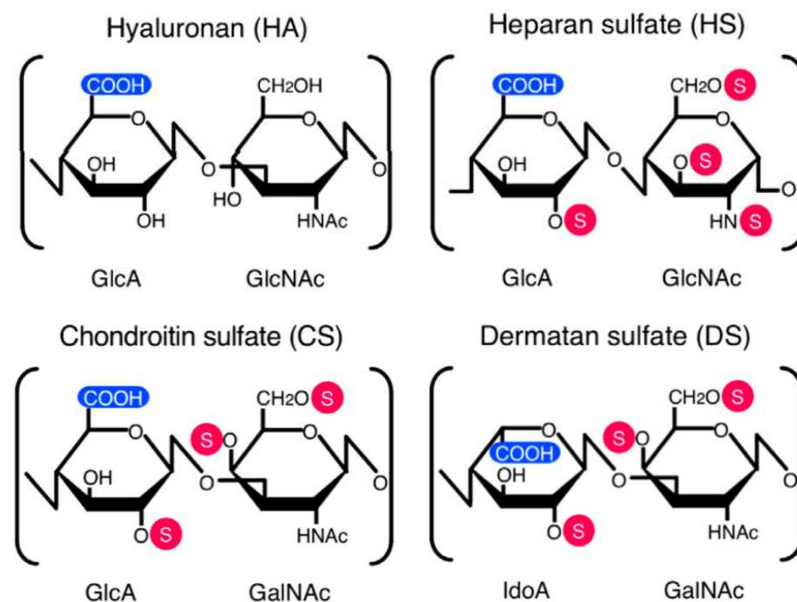


Figure 7. Unités disaccharidiques typiques des chaînes de GAG du système nerveux

Le HA est un polymère linéaire comprenant des résidus de GlcA et de GlcNAc. Les chaînes d'HS sont similaires à celles du HA mais peuvent être sulfatées. Les chaînes de CS sont sulfatées et constituées de résidus de GlcA et de GalNAc. Le DS est un stéréoisomère du CS comprenant de l'IdoA au lieu de GlcA. (Adapté de (Mikami and Kitagawa, 2013).

Les GAG constituent une classe majeure de polysaccharides complexes extracellulaires. Ce sont des polymères acides linéaires, chargés négativement, composés de plusieurs dizaines ou centaines de répétitions d'unités disaccharidiques diversement sulfatées. Ces complexes ont un poids moléculaire de quelques kDa à plusieurs dizaines de milliers de kDa. Les disaccharides sont formés par liaisons glycosidiques entre un sucre aminé et un acide uronique. Les sucres

aminés qui composent les GAG sont le N-acétylglucosamine (GlcNAc) ou N-acétylgalactosamine (GalNAc) liés à un deuxième ose : l'acide glucuronique (GlcA), iduronique (IdoA) ou le galactose (Gal). La nature du motif répété détermine la nature du GAG. Ainsi, il existe quatre types de GAG : hyaluronane (HA), chondroïtine sulfate (CS)/dermatane sulfate (DS), héparane sulfate (HS) et kératine sulfate (KS) (Figure 7). Le CS et l'HS sont les principaux composants de l'ECM dans le CNS. La stoechiométrie CS:HS est généralement 9:1, mais seulement 7:3 au sein des PNN (Deepa et al., 2006).

Le HA est le seul GAG exempt de sulfate et libre d'attachement à un groupement protéique (Toole, 2000). Il est composé de centaines de répétitions de GlcA et GlcNAc liés par une liaison glycosidique (1→3) (Meyer 1951). Il est essentiel à la formation des PNN comme le démontre leur destruction par traitement à la hyaluronidase (Köppe et al., 1997).

À l'inverse du HA, les autres GAG sont sulfatés et peuvent être attachés à un cœur protéique. C'est le cas de l'HS de même composition que le HA mais dont les résidus GlcA et GlcNAc sont liés par une liaison osidique (1→4). Le CS et le DS assemblés par une liaison glycosidique (1→3) sont composés de répétitions de GlcA et GalNAc pour le CS et IdoA et GalNAc pour le DS. Enfin, le KS est structuré par un Gal lié au GlcNAc par une liaison osidique (1→4).

c. Organisation en protéoglycanes

La liaison des GAG (à l'exception du HA) à un cœur protéique forme un complexe appelé protéoglycane (PG). On parlera de Chondroïtine Sulfate Proteoglycan (CSPG) et, par la même logique, de DSPG, KSPG et HSPG. Les fonctions biologiques des PG dépendent à la fois de la protéine centrale, de la longueur, du nombre et de la composition des chaînes de GAG (Margolis and Margolis, 1989; Bandtlow and Zimmermann, 2000). Plus de 30 protéines centrales de PG ont été isolées jusqu'à présent, avec des tailles allant de 10 kDa à 500 kDa (Silbert and Sugumar, 2002). Dans le CNS, les CSPG représentent le groupe le plus abondant. Les principaux CSPG sont les protéines de la famille lecticanes (Figure 8). Ayant une origine neuronale ou gliale (Asher et al., 2000, 2002; Bandtlow and Zimmermann, 2000), la famille des lecticanes est composée des neurocans, brevicans, aggrecans et versicans (Figure 8) (Margolis et al., 1996), également appelées hyalectanes pour leur interaction avec le HA et les lectines. Nécessaire à la formation des PNN, l'aggrecan (Giamanco et al., 2010; Kwok et al., 2010) est présent sur presque tous les neurones entourés de PNN, tandis que les autres lecticanes ne sont présents que dans des sous-populations de neurones entourés de PNN (Galtrey et al., 2008). Les membres de la famille des lecticanes diffèrent par le nombre des chaînes latérales

de GAG attachées à la protéine centrale et par la protéine centrale elle-même. En position N-terminale des lecticanes, deux domaines globulaires G1 et G2 interagissent avec le HA via des protéines de la famille des Hapln (Figure 8). Le domaine globulaire G3, en position C-terminale, est lui-même divisible en 3 différents domaines : EGF, lectine et CRP-like (Yamaguchi, 2000). Le domaine lectine permet une interaction de forte affinité avec différentes protéines de la MEC, notamment avec le domaine fibronectine de type III des ténascines (Rauch et al., 1997; Day et al., 2004).

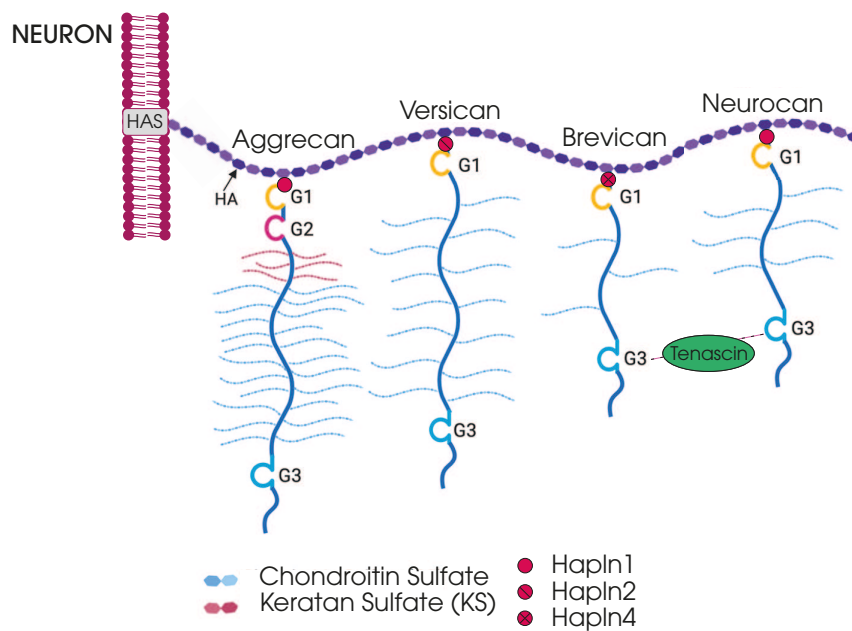


Figure 8. Complexité et variabilité de la famille des lecticanes

Représentation des différentes lecticanes : aggrecan, versican, brevican et neurocan. Les lecticanes s'attachent au HA qui est synthétisé par l'hyaluronane synthase (HAS). Les domaines globulaires G1 et G2 interagissent avec le HA via des protéines de la famille des Hapln. Tandis que l'aggrecan lie des centaines de chaînes de CS, le neurocan ou le brevican n'en lient qu'une dizaine. Tous les PG diffèrent par leurs chaînes latérales, leurs longueurs et leurs schémas de sulfatation des GAG, ce qui ajoute ainsi à leur complexité. (Adapté de (Walimbe and Panitch, 2020)).

La famille des ténascines comprend quatre membres (Degen et al., 2021). Dans le CNS, les formes majoritaires sont la ténascine-C (TN-C) et la ténascine-R (TN-R) exprimées par les neurones et la glie. La TN-C est un trimère qui s'assemble en paires et peut lier six domaines G3 du cœur protéique en même temps. Quant à la TN-R, elle effectue seulement trois liaisons simultanées à G3 mais ces liaisons sont cependant plus affines que celles de la TN-C. La diversité des ténascines est amplifiée par les épissages alternatifs et l'action des métalloprotéinases. La TN-R est nécessaire à la condensation de la matrice extracellulaire en

PNN et, de ce fait, les souris knock-out pour la *Tnr* présentent une faible condensation des PNN (Brückner et al., 2000).

La famille des Hapln possède également quatre membres. Ces protéines de liaison se lient au HA (Figure 8) (Spicer et al., 2003). Au sein du CNS, on trouve Hapln1, Hapln2 et Hapln4. Les formes Hapln1 et Hapln4 sont présentes dans les PNN et sont synthétisées par ces neurones. En revanche, Hapln2 est plus communément retrouvée au niveau des nœuds de Ranvier (Oohashi et al., 2015).

Outre les lecticanes, d'autres CSPG jouent un rôle important dans les fonctions physiologiques du CNS. Le neuron-gial antigen 2 (NG2) exprimé par la microglie, les macrophages activés et les cellules précurseurs des oligodendrocytes est une molécule transmembranaire exprimée à la surface des cellules (Berry et al.; Dou and Levine, 1994; Jones et al., 2002). Le phosphacan/RPTP $\zeta\beta$ exprimé par les neurones, les astrocytes et les oligodendrocytes est un récepteur phosphatase transmembranaire qui, une fois clivé, est libéré dans l'ECM. Il contient des chaînes latérales CS et/ou KS (Margolis et al., 1996; Hoshino et al., 2014). La décorine, exprimée par les neurones et les astrocytes, est un petit protéoglycane riche en leucine, qui porte à la fois des chaînes DS et CS (Hocking et al., 1998; Davies et al., 2004; Minor et al., 2008).

d. Biosynthèse des glycosaminoglycanes

La biosynthèse des sucres complexes est un processus dynamique régulé enzymatiquement permettant l'hétérogénéité structurelle de ces molécules (Prydz and Dalen, 2000). L'assemblage des chaînes de GAG commence dans le réticulum endoplasmique et se termine dans l'appareil de Golgi. Il est initié par la synthèse d'un tétrasaccharide Xylose-Galactose-Galactose-Glucuronate appelé région de liaison GAG-protéine, commun aux chaînes HS et CS, et lié de manière covalente à des résidus sérine spécifiques dans différentes protéines centrales (Figure 9) (Sugahara et al., 2003). Après cette première étape, les unités monosaccharidiques Gal, GlcA, GlcNAc et GalNAc sont transférées des précurseurs de nucléotides de sucre (UDP-Gal, UDP-GlcA, UDP-GlcNAc et UDP-GalNAc) à la région de liaison conduisant à l'allongement de la chaîne. La distinction entre le CS et le HS se réalise dès le premier ose transféré sur le tétrasaccharide commun (Figure 9). Si l'élongation est initiée par le transfert d'un GalNAc (par la GalNAcT-I) il y a formation de CS, et si elle l'est par le transfert d'un GlcNAc (par le GlcNAcT-I) le GAG formé est un HS (Silbert and Sugumaran, 2002). Par la suite, au niveau

du Golgi, l'élongation du GAG se réalise par la GalNAcT-II, la GlcNAcT-II ou la GlcAT-II pour l'ajout d'un GalNAc, d'un GlcNAc ou d'un GlcA, respectivement (Figure 9).

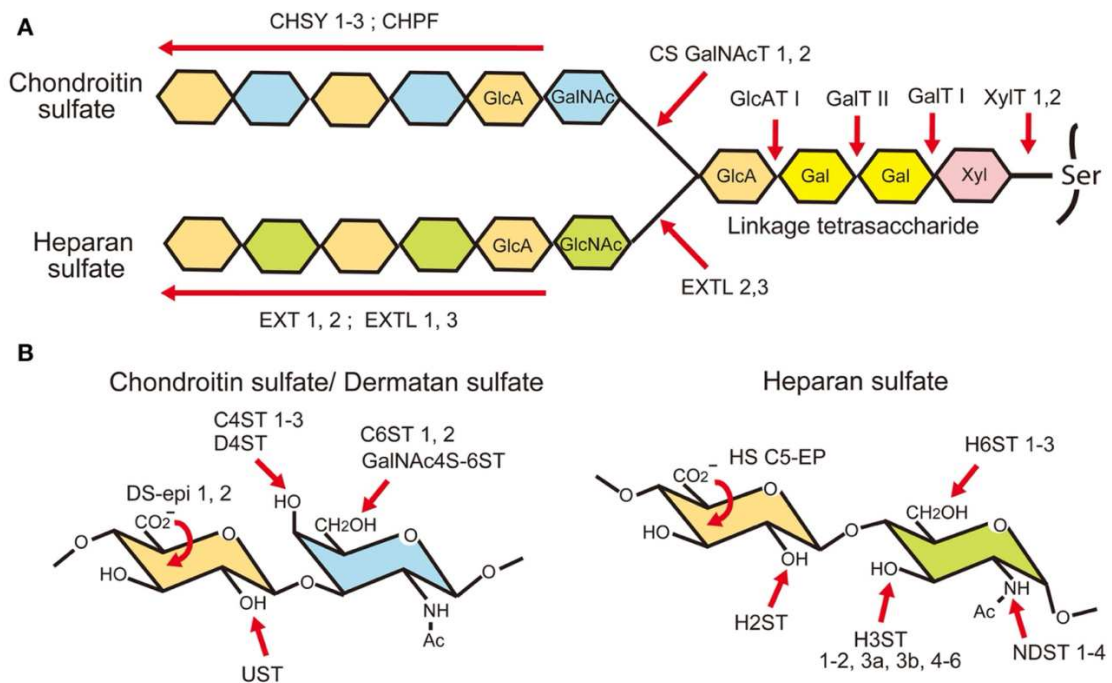


Figure 9. Biosynthèse des glycosaminoglycanes

(A) Les chaînes de CS et d'HS sont attachées de façon covalente aux protéines centrales du PG par un tétrasaccharide de liaison. La biosynthèse d'une chaîne de chondroïtine commence par l'ajout d'un résidu GalNAc au tétrasaccharide de liaison par les CSGalNAcT1, 2. Ensuite, les GlcA et GalNAc sont copolymérisés par les chondroïtines sulfates synthases (CHSY-1, -2, -3) et le facteur de polymérisation de la chondroïtine (CHPF). Lorsqu'un résidu GlcNAc est ajouté au tétrasaccharide de liaison à la place du GalNAc par EXTL3, une chaîne d'héparane est polymérisée par les membres de la famille EXT. (B) Pendant la polymérisation, les chaînes sont modifiées par des réactions de sulfatation et d'épimérisation par de nombreuses enzymes de modification des GAG. (Extrait de (Maeda, 2015)).

Les HS et CS se différencient ensuite en chaînes matures sous l'action de diverses enzymes qui catalysent de nombreuses réactions. La modification du squelette des glycanes est assurée par les épimérasés et les sulfotransférases tandis que l'élongation et la polymérisation des chaînes de GAG sont assurées par les glycosyltransférases. Les sulfotransférases catalysent le transfert d'un groupe sulfate de 3'phosphoadénosine-5'phosphosulfate aux chaînes de GAG en croissance. La fonction des HS et des CS est déterminée par leurs motifs de sulfatation. Les chaînes HS présentent souvent des alternances de régions sulfatées et non sulfatées, créant ainsi des régions impliquées dans la reconnaissance de molécules cibles, telles que les facteurs de croissance (Rapraeger et al., 1994; Davies et al., 2003). Ces régions portent des charges

différentes et sont susceptibles de favoriser des conformations structurales nécessaires à des interactions protéiques spécifiques (Gallagher and Turnbull, 1992). Les CS ont tendance à être plus uniformément sulfatés que les HS ; la sulfatation en position C-2 de l'acide uronique et en position C-4 ou C-6 du GalNAc crée cinq formes différentes de disaccharide (Tableau 1).

Tableau 1. Le classement des unités disaccharidiques des chaînes CS dépend de leurs schémas de sulfatation

	CS-O	GlcA – GalNAc	
chst11/12/13	CS-A	GlcA – GalNAc (4S)	
chst3	CS-B ou DS	IdoA (2S) – GalNAc (4S)	
	CS-C	GlcA – GalNAc (6S)	
	CS-D	GlcA (2S) – GalNAc (6S)	chst15
	CS-E	GlcA - GalNAc (4S, 6S)	CS2S/UST

Le CS-O, forme non sulfatée, peut être sulfaté en C-4 du GalNAc par la 4-O-sulfotransférase de type C4ST-1/2/3 (carbohydate sulfotransferase (Chst11/12/13)). Le produit formé est le CS-A. Cependant, si le CS-O est sulfaté en C-6 du GalNAc par la C6ST-1 (Chst3), le produit formé sera le CS-C. Ces formes monosulfatées peuvent accepter une deuxième sulfatation. Pour le CS-A, le GalNAc peut être sulfaté une deuxième fois en C-6 par le GalNAc4S-6ST (Chst15) et conduire au CS-E. Dans le cas du CS-C, c'est le GlcA qui est le site de la seconde sulfatation en C-2 par le CS2S/UST, ce qui conduit au CS-D (Tableau 1). Ces formes différenciellement sulfatées sont à l'origine de la diversité des chaînes de GAG qui sous-tend celle de leurs fonctions biologiques (Sugahara et al., 2003; Habuchi et al., 2004). Outre la sulfatation, GlcA peut être épimérisé en acide L-iduronique (idoA), il devient alors le CS-B, également appelé DS. Le HA quant à lui est synthétisé et sécrété dans l'espace extracellulaire par les HAS (Figure 8). Situées sur la membrane plasmique, les HAS ancrent les PNN à la surface cellulaire (Carulli et al., 2007). Il existe trois isoformes de HAS qui synthétisent, à des vitesses différentes, des chaînes de HA de différentes longueurs (Spicer et al., 1997; Itano et al., 1999). Les isoformes de HAS ont des expressions spatio-temporelles différentes et confèrent une structure et une résistance mécanique différentes aux PNN (Carulli et al., 2006; Galtrey et al., 2008).

e. La matrice extracellulaire, une structure dynamique

L'ECM est une structure dynamique, constamment remodelée en réponse à divers signaux. Le clivage des composants de l'ECM est le principal processus de remodelage de l'ECM. Il est important pour réguler l'abondance, la composition et la structure de l'ECM, ainsi que pour libérer des molécules biologiquement actives. L'ECM peut être clivée par différentes familles de protéases.

La protéine activatrice du plasminogène de type tissulaire (tPA) est une sérine-protéase exprimée par les neurones et les oligodendrocytes (Louessard et al., 2016). La protéolyse par le tPA permet la motilité des épines en fonction de l'expérience, par dégradation de l'ECM et des protéines d'adhésion cellulaire. Le tPA convertit le plasminogène en plasmine qui, à son tour, non seulement dégrade l'ECM mais active les métalloprotéinases, les chimiokines et les facteurs neurotrophiques, tels que le BDNF (Hensch, 2005; Tsuji et al., 2005). Les métalloprotéinases sont une famille d'endopeptidases se liant au zinc (famille des "metzincines") et dégradant sélectivement les PG, les facteurs de croissance, les cytokines, les chimiokines, les protéines associées à la myéline et les molécules d'adhésion cellulaire dans l'ECM et les PNN (Huntley, 2012). Il existe trois familles de métalloprotéinases : les désintégrines et les métalloprotéinases (ADAM) dont les ADAM à motifs thrombospondine (ADAMTS) et les métalloprotéinases matricielles (MMP). Au sein de ces groupes, on dénombre 21 ADAM, 19 ADAMTS et 25 MMP. Parmi les ADAMTS secrétées, certaines ont une activité de dégradation pour l'aggrécane et d'autres CSPG au sein de l'ECM et des PNN des cellules PV (Kelwick et al., 2015). La majorité de ces ADAMTS est secrétée par les astrocytes, leur expression par les neurones reste controversée, mis à part pour ADAMTS-8 et -15 (Rossier et al., 2015). Les MMP peuvent être activées par le tPA et éliminées par les inhibiteurs tissulaires des métalloprotéinases (TIMP). Bien que plusieurs MMP soient présentes dans le cerveau, la MMP9 est la seule secrétée par les neurones et l'ensemble de la glie (Reinhard et al., 2015). La MMP9 régule à la fois la plasticité fonctionnelle et le remodelage de l'ECM en façonnant l'environnement péricellulaire et synaptique et en activant des molécules de signalisation. Il a été montré que la MMP9 secrétée par la microglie peut remodeler les PNN dans les paradigmes de plasticité adulte (Venturino et al., 2021). Les souris knock-out pour *MMP9* présentent une plasticité atténuée pendant les CP et des altérations de la morphologie de la microglie (Kelly et al., 2015). Outre leur rôle d'hydrolyse des aggrécans entre les domaines G1 et G2 et les brevicans au niveau du cœur protéique proche du domaine G1,

l'activité des MMP permet la libération de molécules entravant la croissance neuritique. De récentes études ont montré que l'inhibition des MMP2 et MMP9 limite ou promeut la plasticité du V1 adulte en fonction des conditions de l'expérimentation (Akol et al., 2022).

f. Distribution des PNN dans le CNS

Au sein du CNS, les PNN sont retrouvés dans plusieurs régions corticales, l'amygdale, l'hippocampe, le cervelet et la moelle épinière. Les approches d'hydrolyse via les enzymes bactériennes Chondroitinase ABC (ChABC), clivant les chaînes CS, et hyaluronidase, digérant sélectivement le HA, ont permis d'étudier les rôles fonctionnels des PNN (Brückner et al., 1998; Deepa et al., 2006).

i. Les structures corticales

Dans le cortex, les PNN sont présents dans les cortex sensoriel, moteur, préfrontal et temporal. Ils sont présents majoritairement dans les couches II à V corticales (Brückner et al., 1999), enrichis dans la couche IV pour le V1 et les couches II et III pour le cortex entorhinal médian (mEC) (Lensjø et al., 2017). La maturation des PNN varie également entre les régions corticales, la maturation étant plus précoce dans le mEC que dans le V1 (Ye and Miao, 2013; Lensjø et al., 2017). Dans le V1, la formation des PNN peut être retardée par l'obscurité (Pizzorusso et al., 2002). La privation de stimuli par un élevage à l'obscurité perturbe la formation des PNN, retardant ainsi la CP et donc la maturation des circuits neuronaux dans le V1 (Pizzorusso et al., 2002, 2006; Hensch, 2004). De plus, la plasticité dans le V1 et le A1 peut être restaurée chez l'adulte en supprimant les PNN par un traitement ChABC (Pizzorusso et al., 2002) et hyaluronidase respectivement (Happel et al., 2014). Ainsi, cela suggère que le CS et le HA présents dans les PNN sont essentiels au contrôle de la plasticité corticale. En outre, la sulfatation des CS contrôle aussi la plasticité dans les cortex somatosensoriel et visuel comme le montrent des études chez la souris knock-in *C6ST-1* (Miyata et al., 2012). De plus, chez les souris knock-out *Hapln1* où le nombre des PNN est réduit, la dépression à long terme (LTD) est facilitée. Ces changements de plasticité améliorent la mémoire à long terme des souris knock-out *Hapln1* (Romberg et al., 2013).

ii. L'amygdale

La relation entre les PNN et la CP existe ailleurs dans le CNS. Dans l'amygdale, les PNN enveloppent à la fois des interneurones inhibiteurs (PV, calbindine (CB)) et des neurones excitateurs. Leur développement coïncide avec un changement dans la régulation de la mémoire

de la peur (Gogolla et al., 2009). Ce changement au cours du développement spécifie une période pendant laquelle le cerveau jeune, capable d'effacer les souvenirs de la peur, évolue vers un cerveau mature où les souvenirs persistent et ne peuvent plus être effacés. Le traitement par la ChABC efface la mémoire de la peur. Les PNN de l'amygdale sont à la fois nécessaires à la protection et au renouvellement des souvenirs de la peur (Gogolla et al., 2009).

iii. L'hippocampe

Dans l'hippocampe, une forte densité de PNN se trouve dans le CA2 comparé aux autres régions hippocampiques (Kochlamazashvili et al., 2010; Jansen et al., 2017; Lensjø et al., 2017). Les PNN se trouvent autour des cellules PV et autour des neurones pyramidaux (Yamada et al., 2015; Carstens et al., 2016). À l'instar des résultats obtenus dans l'amygdale et le cortex, l'élimination des PNN via la ChABC et la hyaluronidase dans l'hippocampe perturbe la formation des souvenirs de la peur (Hysin et al., 2013). Dans les modèles animaux d'épilepsie du lobe temporal, l'état épileptique entraîne une réorganisation synaptique dans l'hippocampe, qui réduit l'expression des PNN (McRae and Porter, 2012).

iv. Le cervelet

Dans le cervelet, les PNN se trouvent dans le cortex cérébelleux, les noyaux latéraux et les noyaux basolatéraux (Mabuchi et al., 2001 ; Lafarga et al., 1984 ; Blosa et al., 2016). Ils entourent les grands neurones excitateurs de Golgi (Carulli et al., 2006) et les cellules de Purkinje (Mabuchi et al., 2001) qui expriment la PV. La formation et le maintien des PNN dans le cervelet dépendent de l'activité (Brückner and Grosche, 2001; Foscarin et al., 2011). L'enrichissement environnemental des souris adultes augmente la taille des terminaisons axonales des cellules de Purkinje et réduit la densité des PNN (Foscarin et al., 2011). Chez les souris déficientes en Hapln1, les PNN sont perturbés et les terminaisons axonales des cellules de Purkinje sont plus nombreuses (Foscarin et al., 2011). La dégradation des PNN par la ChABC dans le cervelet de rats adultes entraîne un bourgeonnement important des neurites de Purkinje et donc une plasticité anatomique accrue (Corvetto and Rossi, 2005).

v. La moelle épinière

Les PNN sont présents dans la moelle épinière. Ils se trouvent principalement autour des interneurons, ainsi qu'autour de 30% des motoneurons (Smith et al., 2015) de la corne ventrale et autour de 20% des neurones de la corne dorsale (Galtrey et al., 2008). L'épaisseur des PNN dans la moelle épinière augmente avec l'exercice, ce qui suggère qu'une activité

synaptique plus élevée peut élargir les PNN (Smith et al., 2015). Le traitement par ChABC dans la moelle épinière rétablit la plasticité, ce qui permet la récupération des fonctions des membres antérieurs après une lésion de la moelle épinière (Galtrey et al., 2007; Wang et al., 2011). Ainsi, les PNN agissent-ils comme un frein moléculaire à la plasticité aussi dans la moelle épinière.

g. Fonctions physiologiques dans le cerveau post-natal

Bien que la relation entre les PNN et la plasticité ait été bien établie dans le CNS, les mécanismes restent encore mal compris. Néanmoins, il a été proposé que les PNN agiraient comme une barrière physique entre le neurone et l'espace extracellulaire, un partenaire de liaison pour les molécules interagissant avec les neurones et qu'ils limiteraient la mobilité latérale des molécules sur la membrane neuronale.

i. Une barrière physique qui protège des agressions

L'activité neuronale est un acteur majeur de la régulation de la condensation des PNN. Ainsi, l'élevage des animaux dès la naissance dans l'obscurité retarde la maturation des PNN dans le V1. À l'inverse, une dépolarisation chronique suite à une stimulation potassique participe au développement des PNN autour des interneurons de rat en culture (Dityatev et al., 2007). La structure polyanionique des PNN, liée au HA et aux CS, leur confèrent des propriétés de tampon cationique créant un microenvironnement autour des neurones (Figure 10) (Brückner et al., 1993; Härtig et al., 1999). Ils protègent aussi le neurone du stress oxydatif (Suttkus et al., 2014) et des protéines toxiques (Miyata et al., 2007). Les PNN se condensent principalement autour des cellules PV qui sont des neurones très actifs et à décharge rapide. Les cycles rapides de dépolarisation-repolarisation imposent une demande métabolique élevée et une augmentation de la densité mitochondriale rendant les cellules PV sensibles au stress oxydatif (Cabungcal et al., 2013). Les PNN limitent alors la toxicité inhérente à leur activité élevée et tamponnent les cations impliqués dans la neurotransmission (Figure 10). La condensation du réseau PNN est altérée chez les lignées knock-out pour l'*aggrecan*, la *Tnr* et *hapln1* et la protection contre le stress oxydatif causé par le Fe^{2+} est alors abolie (Suttkus et al., 2014). Une étude récente chez des souris quadruple knock-out *brevican*, *neurocan*, *Tnr* et *Tnc* a montré que la perturbation des PNN dans le V1, altère l'organisation des synapses inhibitrices et réduit le nombre de cellules PV (Mueller-Buehl et al., 2022). En revanche, les interneurons à calrétinine (CR) qui ne semblent pas être enveloppés par les PNN ne présentent aucune altération (Mueller-Buehl et al., 2022). De la même manière, la suppression des PNN par la ChABC modifie l'activité des

cellules PV (Carceller et al., 2020) et augmente leur vulnérabilité au stress oxydatif, ce qui n'est pas le cas des autres interneurons à CB et CR (Cabungcal et al., 2013).

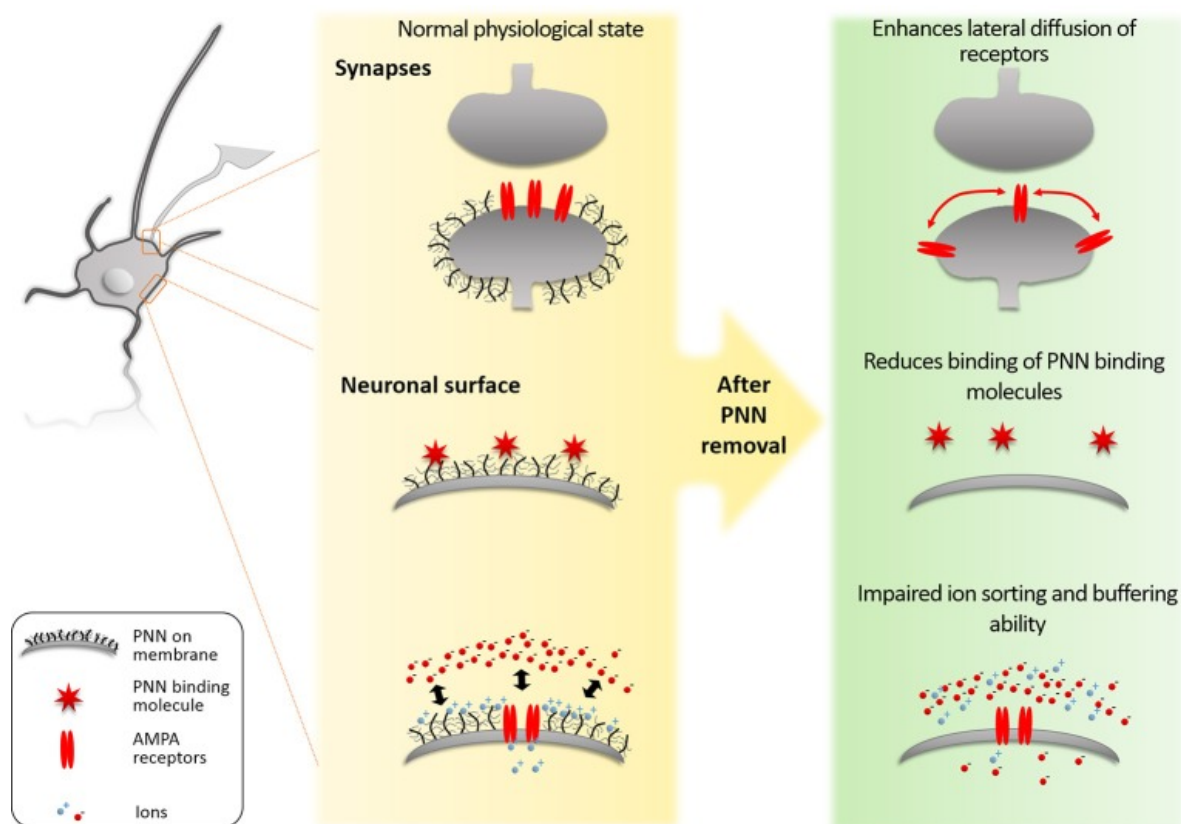


Figure 10. Les PNN limitent la plasticité des neurones par les mécanismes suivants :

(1) Les PNN limitent la plasticité synaptique. Ils empêchent la diffusion latérale des récepteurs AMPA, diminuant ainsi la capacité à échanger des récepteurs désensibilisés dans la synapse contre de nouveaux récepteurs extrasynaptiques. Le traitement par la ChABC perturbe les PNN, rétablissant des états de plasticité juvénile. (2) Les PNN se lient spécifiquement à des protéines telles que SEMA3A et OTX2. Ces liaisons régulent les protéines de la matrice et empêchent les nouvelles entrées synaptiques. (3) Les PNN agissent comme une barrière physique en triant et tamponnant les ions à la surface des neurones. La charge anionique élevée des PNN repousse les ions et les molécules anioniques tel que l'oxygène réactif tandis qu'elle attire les ions et les molécules cationiques créant un réservoir ionique. Cette barrière est une protection face au stress oxydatif et contribue au fonctionnement synaptique. (Extrait de (van 't Spijker and Kwok, 2017)).

Les PNN protègent aussi les neurones de la toxicité du peptide β -amyloïde (Miyata et al., 2007) et on n'observe aucun effet neurotoxique de ce peptide sur les neurones entourés de PNN, à l'inverse de ceux qui en sont dépourvus. Ainsi, l'utilisation de ChABC augmente-t-elle la mort neuronale causée par le peptide (Morawski et al., 2012).

Outre son rôle de protection des neurones, les PNN inhibent la croissance des neurites et empêchent ainsi la formation de synapses. Les CSPG, l'un des principaux composants des PNN, ont une forte activité inhibitrice. Après une lésion du CNS, ils sont surexprimés dans la cicatrice gliale qui se forme au niveau de la blessure, où ils agissent comme une barrière pour limiter la régénération neuronale (Cheah et al., 2016; Shinozaki et al., 2016). À l'inverse, la digestion des CSPG par la ChABC améliore la régénération axonale (Shinozaki et al., 2016).

ii. Un véritable partenaire de liaison moléculaire

Outre leur rôle de molécules barrières, les CSPG peuvent, au même titre que les HSPG, lier des facteurs de croissance. Par exemple, la midkine et le FGF-2, se lient-ils spécifiquement au CS-E qui est enrichi dans les PNN par rapport à l'ECM (Deepa et al., 2002). De même, la molécule chimio-répulsive Semaphorine-3a (Sema3A) se lie-t-elle aux PNN via le CS-E (Figure 10, 11) (Dick et al., 2013) et un traitement à la ChABC déstabilise cette interaction (Vo et al., 2013). Le facteur de nécrose tumorale (TSG-6) se lie au HA et le stabilise (Baranova et al., 2011). Après une lésion de la moelle épinière, son expression est augmentée et il a été proposé qu'il stabiliserait les PNN dans la cicatrice gliale (Coulson-Thomas et al., 2016). Les différents composants des PNN peuvent aussi réguler l'activité synaptique en se liant à des canaux ou des récepteurs. La TN-R, via son épitope HNK-1, se lie aux récepteurs GABA et régule la plasticité synaptique (Bukalo et al., 2007). Le HA module l'activité des canaux calciques postsynaptiques de type L (Kochlamazashvili et al., 2010). Le brevican régule celle des canaux potassiques et des récepteurs AMPA (Favuzzi et al., 2017). La pentraxine neuronale 2 (Nptx2), éliminée par le traitement à la ChABC, contrôle la plasticité en participant au regroupement des récepteurs AMPA (Pelkey et al., 2015). Finalement, les PNN peuvent capturer la SEMA3A qui stabilise les contacts synaptiques des cellules PV (de Winter et al., 2016) et le facteur de transcription orthodenticle homeobox 2 (Otx2) qui, une fois internalisé, module leur maturation (Figure 10, 11) (Beurdeley et al., 2012b). Cette internalisation et son rôle dans la maturation des cellules PV dans le cortex et la régulation de la plasticité seront détaillés dans la section suivante « Les homéoprotéines ».

iii. Un frein à la mobilité des récepteurs

La mobilité des récepteurs AMPA participe à la modulation de la transmission synaptique. L'échange de récepteurs entre les domaines membranaires synaptiques et extra-synaptiques contribue à la régulation du nombre de récepteurs au niveau des synapses.

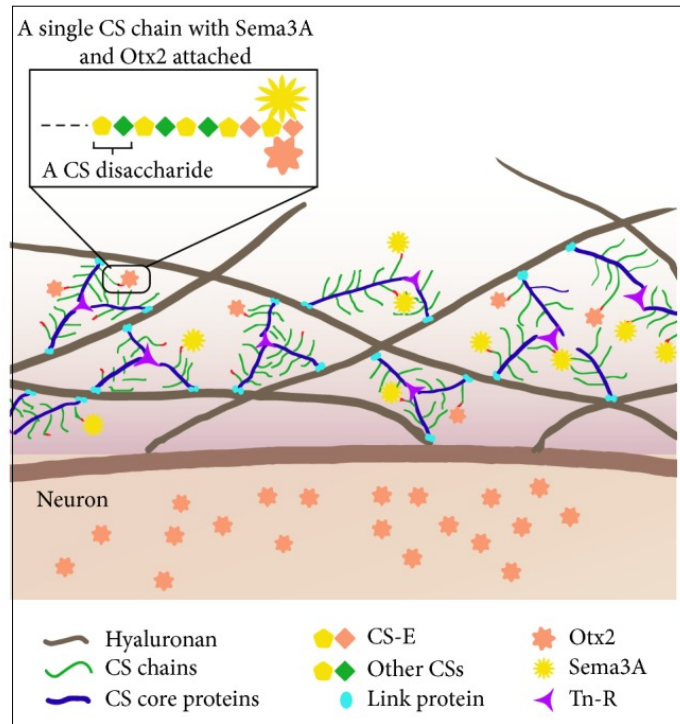


Figure 11. SEMA3A et OTX2 s'accumulent dans les PNN

La TN-R agit comme une protéine de réticulation entre plusieurs protéines centrales CS associées aux molécules de HA. SEMA3A et OTX2 se lient préférentiellement aux chaînes CS-E attachées aux protéines centrales CS. Après liaison au PNN, OTX2 peut se déplacer dans le neurone, tandis que SEMA3A semble résider dans le PNN en s'ancrant au CS-E. (Extrait de (de Winter et al., 2016)).

III. Les homéoprotéines

a. La découverte des homéoprotéines

Les homéoprotéines constituent une classe majeure de facteurs de transcription actifs tout au long du développement et chez l'adulte. Les homéoprotéines sont des acteurs clés des réseaux génétiques qui établissent le plan du corps et régulent la morphologie et la physiologie aux niveaux cellulaire et multicellulaire. Elles sont encodées par les homéogènes, dont les gènes homéotiques, famille de gènes découverte pour ses fonctions au cours du développement

embryonnaire précoce, en particulier pour leur rôle dans la mise en place de l'axe antéro-postérieur des arthropodes et des vertébrés.



Figure 12. Mutation homéotique d'Antennapedia

Drosophila mutée (à gauche) et non mutée (à droite) pour Antennapedia avec un remplacement des antennes par des pattes. (Photographie de F.R Turner, Indiana University).

Les premières observations des homéogènes ont été réalisées par William Bateson à partir de 1894 en étudiant les variations intraspécifiques chez des insectes puis chez des végétaux. Parmi ses observations, il constata que ces différents organismes présentaient des variations par rapport au plan général de l'espèce. Il a remarqué que la mutation d'un homéogène conduit à une homéose, c'est-à-dire l'apparition d'un organe ou d'un membre bien formé, mais situé à un endroit anormal. Un homéogène est donc défini par rapport au phénotype qu'il entraîne lorsqu'il est muté, et non par sa séquence nucléotidique. Retrouvé dans plusieurs embranchements, ce processus a été particulièrement étudié chez la drosophile *Drosophila melanogaster* à partir d'une étude de mutants homéotiques qui substituent un segment corporel à un autre, totalement ou partiellement. Il a été démontré que huit homéogènes organisés en deux grands ensembles Antennapedia et Bithorax étaient impliqués dans la différenciation et la spécification de la partie proximale et distale de l'animal respectivement. La mutation du complexe Bithorax conduit au remplacement du troisième segment thoracique par le deuxième conduisant à une mouche dont les haltères sont remplacés par une paire d'aile (Bridges and Morgan, 1923; Lewis, 1978). Tandis que la mutation du complexe Antennapedia entraîne un remplacement des antennes par des pattes (Figure 12) (Gehring, 1987).

Les études sur Antennapedia ont conduit à la découverte d'une séquence de 180 paires de bases, l'homéoboîte hautement conservée chez tous les homéogènes. Découverts chez les invertébrés, les vertébrés, les champignons et les plantes, il est à noter que tous les gènes à homéoboîte ne sont pas nécessairement des homéogènes, c'est-à-dire que leurs mutations ne conduisent pas à

un phénotype homéotique et inversement. Ainsi, les gènes *Bicoid*, *Engrailed (En)*, *Fushi Tarazu* ou encore *Pax*, qui sont des gènes du développement ayant des homéoboîtes ne sont pas des homéogènes, et chez les végétaux les gènes entraînant des phénotypes homéotiques ne possèdent pas l'homéoboîte.

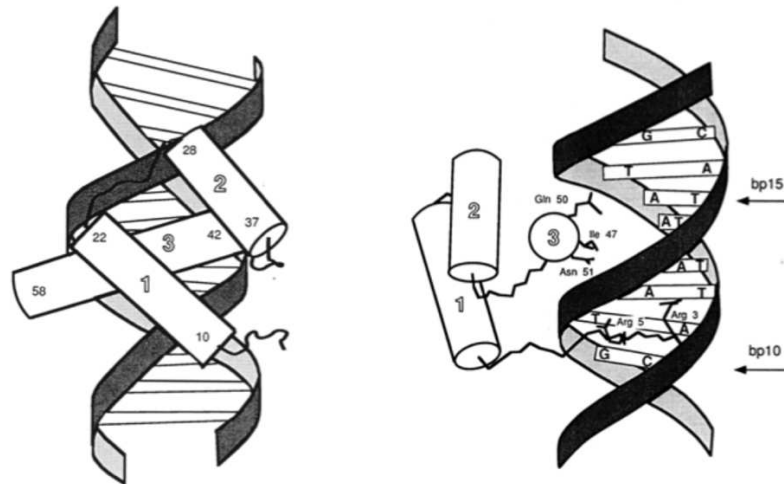


Figure 13. Structure et interaction de l'homéodomaine avec l'ADN

L'homéodomaine possède trois hélices α (1, 2 et 3) les deux premières hélices sont antiparallèles et la troisième perpendiculaire aux deux premières. L'hélice 3 interagit avec le grand sillon de l'ADN tandis que la partie N-terminale de l'homéodomaine interagit au niveau du petit sillon (Extrait de (Kissinger et al., 1990)).

Les homéoprotéines, encodées par les gènes à homéoboîte sont des activateurs ou répresseurs de la transcription génique. L'homéoboîte encode une séquence très conservée de 60 acides aminés, appelée homéodomaine, qui se lie par trois régions hélicales à l'ADN (Figure 13) (McGinnis et al., 1984; Kissinger et al., 1990). L'homéodomaine dirige la fixation des homéoprotéines, seules ou en complexe, sur des séquences promotrices et leur permet de réguler la transcription de cibles génétiques spécifiques. Classées en différentes familles et sous-familles en fonction de la conservation des séquences d'acides aminés à l'intérieur et à l'extérieur de l'homéodomaine (Derelle et al., 2007), les homéoprotéines partagent d'autres domaines conservés, appelés codomains, qui servent de médiateurs aux interactions protéine-protéine ou protéine-ADN. Ces complexes confèrent un degré plus élevé de spécificité de régulation par une action combinée au niveau des structures cibles. (Keleher et al., 1989; Stern et al., 1989; Hayashi and Scott, 1990; Jiang et al., 1991).

La famille des homéoprotéines a été définie comme l'ensemble des protéines possédant un homéodomaine similaire à celui décrit chez *Antennapedia*. C'est ainsi qu'elle inclue des

homéoprotéines qui ne participent pas à la définition de l'identité d'une région, et n'ont donc pas une action homéotique, telle que définie par les mutations éponymes. Constituée d'environ 300 membres, la famille des homéoprotéines exerce des fonctions importantes au cours du développement du CNS. Par exemple, chez les vertébrés, une perte de fonction d'*En-1* est à l'origine d'un développement incomplet du mésencéphale (Joyner, 1996). De plus, chez la drosophile, l'inactivation d'orthodenticle (*Otd*), entraîne la perte des segments antérieurs de la tête où *Otd* est exprimé. Dans certains cas, certaines structures sensorielles sont également perdues, notamment les ocelles, organes de détection de la lumière. *Otd* agit comme un gène gap, c'est-à-dire un gène nécessaire au développement d'une section de l'organisme (Finkelstein et al., 1990; Cohen and Jürgens, 1991; Hirth et al., 1995). *Otd* possède des homologues chez les vertébrés nommés *Otx1* et *Otx2* (Simeone et al., 1992, 1993) et le patron d'expression d'*Otx2* dans le développement embryonnaire de la souris est similaire à celui d'*Otd* chez la drosophile. On dit qu'*Otd* et *Otx2* sont orthologues, homologues entre deux espèces distinctes, alors qu'*Otx1* et *Otx2* sont paralogues, homologues à l'intérieur de la même espèce, mais *Otx1* n'a pas d'orthologue chez les arthropodes. Chez les embryons de souris, *Otx1* et *Otx2* sont tous deux exprimés dans les organes sensoriels au cours du développement.

b. Les homéoprotéines *Otx1* et *Otx2* contrôlent le développement du CNS

Les ARNm *Otx2* sont détectés chez la souris dès le 3^{ème} jour embryonnaire (E3,5) dans toutes les cellules de la masse interne de la blastula, cellules à partir desquelles l'embryon se formera (Kimura et al., 2001). Avant la gastrulation, au stade E5,5, *Otx2* est transcrit dans l'ensemble de l'endoderme viscéral et de l'épiblaste. Au fur et à mesure de la progression de la ligne primitive, qui est l'épaississement cellulaire définissant le plan de symétrie bilatérale, l'expression d'*Otx2* est progressivement limitée au tiers antérieur de l'embryon. À E7,5, après la gastrulation et l'induction neurale, *Otx2* est exprimé dans les trois feuillets embryonnaires et en particulier dans la plaque neurale rostrale à l'origine du télencéphale, du diencéphale et du mésencéphale (Acampora et al., 2001). *Otx2* présente également une expression prédominante dans les plexus choroïdes dès leur mise en place à E9,5 et s'y maintient jusqu'à l'âge adulte (Simeone et al., 1993; Courtois et al., 2003). Les souris *Otx2*^{-/-} présentent des hydrocéphalies et des ventricules latéraux dilatés dues à un excès de liquide cérébro-spinal (CSF) (Makiyama et al., 1997). *Otx2* est nécessaire à la formation des plexus choroïdes mais aussi à leur bon fonctionnement dans le cadre du développement du cerveau (Johansson et al., 2013). *Otx2* est exprimé tout au long du chemin visuel ; dans la rétine, le noyau géniculé latéral du thalamus et

le colliculus supérieur (Nothias et al., 1998). Une inactivation totale d'*Otx2* est létale très tôt dans le développement du fait de la perte des régions cérébrales rostrales, comme cela a été aussi observée pour les ganglions cérébraux de la drosophile après invalidation d'*Otd*. Cependant, les souris hétérozygotes pour *Otx2* sont viables et fertiles (Martinez-Morales et al., 2001; Koike et al., 2007).

Chez l'embryon de souris, l'expression d'*Otx1* débute à E8.5 dans l'épithélium du futur prosencéphale et mésencéphale (Simeone et al., 1992). Au cours de la régionalisation du cerveau, les domaines d'expression d'*Otx1* et d'*Otx2* sont semblables. Néanmoins, *Otx2* disparaît du télencéphale dorsal à E10,5 alors que l'expression d'*Otx1* y est maintenue au niveau de la zone ventriculaire corticale et des cellules progénitrices des neurones des couches V et VI du cortex (Simeone et al., 1993; Frantz et al., 1994). Les souris *Otx1*^{-/-} sont viables, souffrent de crises d'épilepsie spontanées et présentent des anomalies touchant principalement le cortex télencéphalique et le développement des organes sensoriels visuels et auditifs (Acampora et al., 1995). De plus, à l'âge adulte, ces souris présentent une réduction considérable de l'épaisseur du cortex et du nombre de cellules corticales, soulignant ainsi le rôle d'*Otx1* dans le développement du cerveau antérieur.

c. Les homéoprotéines, facteurs de transcription aux propriétés remarquables

Les homéoprotéines sont traditionnellement définies comme des facteurs de transcription à action cellulaire-autonome. Leurs actions seraient donc limitées à la cellule dans laquelle elles sont exprimées. Cependant, les travaux initiés dès le début des années 90 par le laboratoire d'Alain Prochiantz ont permis de révéler des propriétés cellulaires non conventionnelles des homéoprotéines, jusqu'alors inconnues.

i. L'internalisation des homéoprotéines : Antennapedia

La première observation ayant conduit à la démonstration de ce rôle non conventionnel des homéoprotéines est l'internalisation par des neurones de l'homéodomaine d'Antennapedia, ajouté au milieu de culture, sans altération de la membrane plasmique (Joliot et al., 1991b; Le Roux et al., 1993). Une fois internalisé, l'homéodomaine d'Antennapedia conserve une activité biologique ; sa liaison à l'ADN chasse les homéoprotéines endogènes de leurs sites génomiques (Le Roux et al., 1995) et conduit à une modification morphologique des neurones (Joliot et al., 1991b). Une région précise de l'homéodomaine de 16 acides aminés, nommée pénétratine,

correspondant à la troisième hélice α , est nécessaire et suffisante pour son internalisation (Figure 14) (Derossi et al., 1994). Les propriétés d'internalisation de la pénétratine ont été largement étudiées et sont maintenant bien décrites. Cette internalisation ne nécessite pas d'énergie, puisqu'elle se produit à 4°C, et ne requiert aucun récepteur chirale de surface (Derossi et al., 1996).

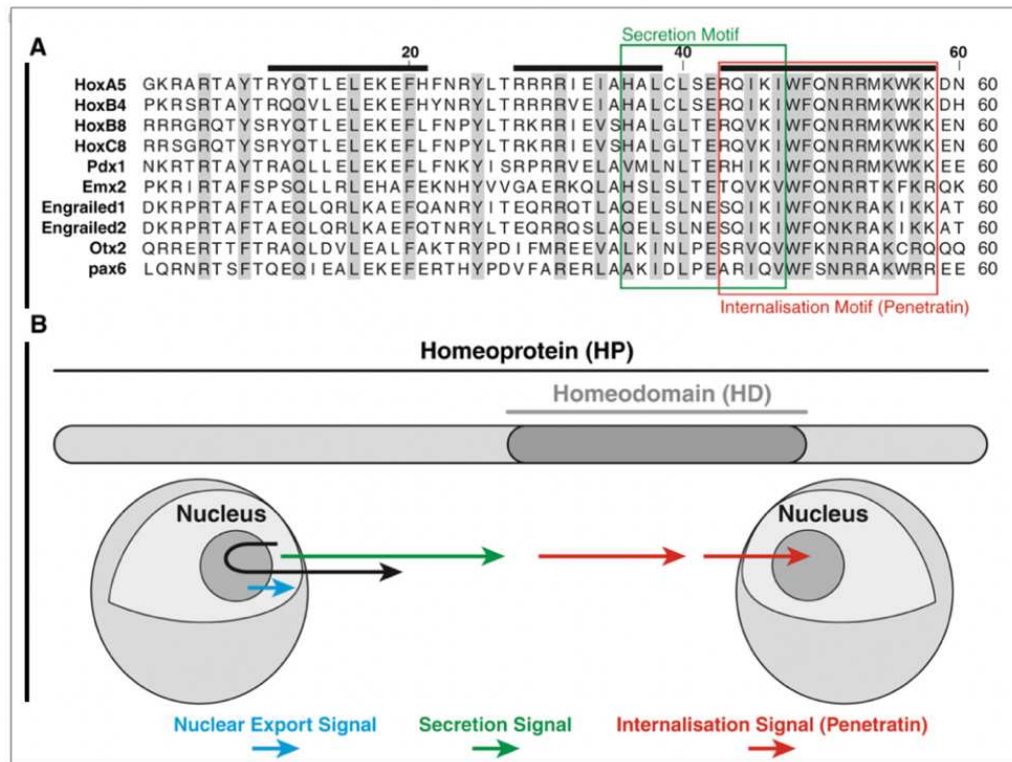


Figure 14. Signaux de sécrétion et d'internalisation des homéoprotéines

(A) Alignement des séquences des 60 acides aminés composant l'homéodomaine de dix homéoprotéines ayant une activité cellulaire non-autonome. La séquence d'internalisation correspond à la troisième hélice de l'homéodomaine, et la séquence de sécrétion ($\Delta 1$) s'étend de la fin de l'hélice 2 jusqu'au début de l'hélice 3. Les trois hélices sont indiquées par des lignes foncées en gras. (B) Une séquence d'exportation du noyau et de sécrétion et une séquence d'internalisation régissent l'activité cellulaire non-autonome des homéoprotéines. (Extrait de (Spatazza et al., 2013a).

Cependant, les charges négatives à la surface des cellules sont importantes pour l'internalisation, l'homéodomaine d'Antennapedia étant préférentiellement capturé *in vitro* par les neurones exprimant le PSA (Joliot et al., 1991a). Enfin, la substitution de deux tryptophanes par deux phénylalanines diminue fortement la translocation, ce qui suggère que l'internalisation de la troisième hélice n'est pas uniquement basée sur son seul caractère amphiphile (Derossi et al., 1994). Sachant que la troisième hélice est la région la plus conservée de l'homéodomaine

parmi toutes homéoprotéines, on pourrait conjecturer que la capacité d'internalisation d'Antennapedia est partagée par d'autres homéoprotéines. Et, en effet, que soit dans le cas d'homéodomains seuls ou de protéines entières, cette propriété d'internalisation a été rapidement démontrée pour un nombre limité d'homéoprotéines comme EN1/2, EMX1/2, HOXA5, HOXB4, HOXC8, PAX6 ou OTX2 (Figure 14) (Volovitch et al., 1993; Chatelin et al., 1996; Joliot et al., 1998; Prochiantz and Joliot, 2003). Certains aspects de l'internalisation, comme l'indépendance énergétique et le résidu tryptophane en position 48 semblent être partagés entre la pénétratine et les homéoprotéines complètes (Chatelin et al., 1996; Joliot et al., 1998; Brunet et al., 2005; Ibad et al., 2011).

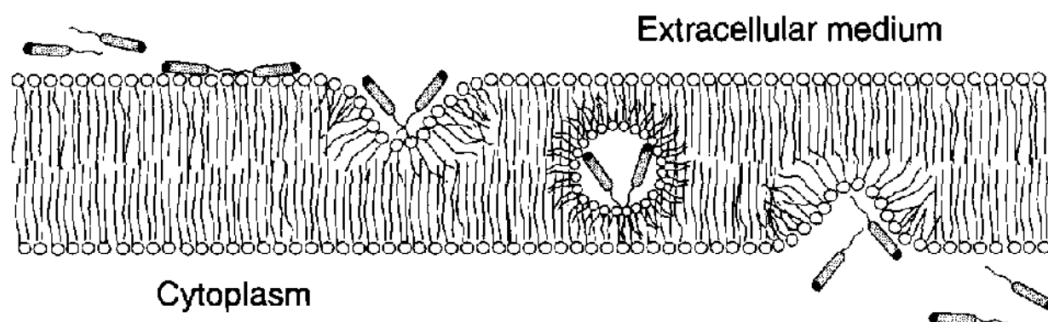


Figure 15. Modèle d'internalisation de la troisième hélice d'Antennapedia

Les peptides interagissent avec les phospholipides chargés négativement sur le côté extérieur de la membrane. La déstabilisation de la bicouche entraîne la formation de micelles inverses et une internalisation de la 3^{ème} hélice. (Extrait de (Derossi et al., 1998)).

Un modèle d'internalisation en deux étapes a été proposé. La première étape est la liaison du peptide aux glucides et/ou lipides membranaires chargés négativement (Christiaens et al., 2002; Lensink et al., 2005; Jiao et al., 2009). Une deuxième étape consiste en une déstabilisation transitoire de la membrane induite par l'insertion du tryptophane 48 dans la bicouche lipidique conduisant à des structures lipidiques intermédiaires de types micelles inversées (Figure 15) (Berlose et al., 1996; Christiaens et al., 2002; Dupont et al., 2007).

Au fil des années, de nouveaux modèles ont été proposés, un d'entre eux implique une courbure de la membrane plasmique conduisant à des invaginations mimant un processus d'endocytose classique (Maniti et al., 2012) et l'autre, plus récent, postule que le nombre d'acides aminés chargés positivement influence la capacité d'internalisation des peptides. Ils transloquent alors via des pores d'eau qu'ils créent dans la membrane cellulaire (Trofimenko et al., 2021).

Néanmoins, à ce jour, de nombreuses interrogations persistent dans la compréhension des mécanismes d'internalisation des homéoprotéines.

ii. La sécrétion des homéoprotéines : EN2

De même que pour son internalisation, la sécrétion des homéoprotéines n'est pas canonique. La plupart des études de sécrétion ont été réalisées sur l'homéoprotéine EN2. Dans un essai de coculture, EN2 exprimée par les cellules COS-7 est sécrétée dans le milieu de culture puis internalisée par les neurones voisins. La détection de la protéine dans les neurones montre qu'un transfert intercellulaire a eu lieu (Figure 16) (Joliot et al., 1998).

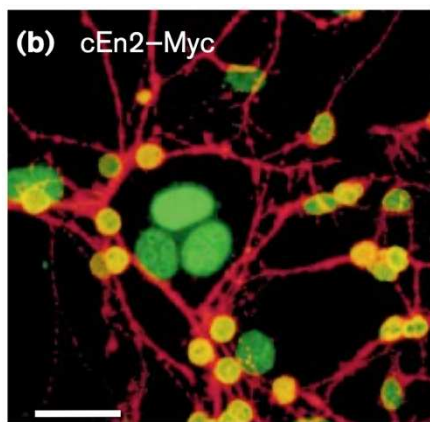


Figure 16. L'homéoprotéine EN2 est transférée entre les cellules *in vitro*

Des cellules COS-7 exprimant EN2 et ayant un tag Myc (cEn2-Myc, Myc en vert) sont cocultivées avec des neurones E15 (NCAM en rouge). Après 48h, la protéine marquée est retrouvée dans les neurones. Barre d'échelle 10 μ m. (Adapté de (Joliot et al., 1998)).

Cette sécrétion est dépendante d'un court motif de 11 acides aminés (appelé Δ 1), hautement conservé parmi les homéoprotéines, se situant à la fin de la seconde hélice jusqu'au début de la troisième (Figure 14). Il s'agit d'une sécrétion non-conventionnelle n'impliquant pas la voie classique réticulum/Golgi, et non modifiée par la brefeldin A, agent inhibiteur de cette voie. En l'absence de Δ 1, EN2 n'est pas sécrétée (Joliot et al., 1998). Le chevauchement du domaine Δ 1 sur une séquence d'exportation nucléaire démontre que la sécrétion ultérieure d'EN2 nécessite une étape nucléaire préalable (Figure 14) (Nakielny and Dreyfuss, 1997). Au fil des ans, un nombre croissant de protéines sécrétées ne suivant pas la voie classique a été répertorié. La découverte de voies de sécrétion non-conventionnelles de protéines a démontré que les homéoprotéines ne sont pas les seules à partager cette capacité, longtemps un objet de controverse, à transférer entre cellules (Rabouille, 2017). La sécrétion d'EN2 est similaire à la sécrétion de protéines non conventionnelles de type I, initialement décrite pour le facteur de croissance des fibroblastes-2 (FGF2) (La Venuta et al., 2015) et la protéine Tat du VIH (Debaisieux et al., 2012). Cette sécrétion se produit par translocation directe à travers la membrane plasmique et nécessite une interaction avec le phosphatidylinositol diphosphate

(PIP2) au niveau du feuillet interne de la membrane (Figure 17). L'internalisation d'EN2 nécessite également la liaison au PIP2 (Amblard et al., 2020; Cardon et al., 2021), ce qui suggère que l'entrée et la sortie utilisent des mécanismes de translocation membranaire similaires (Figure 17).

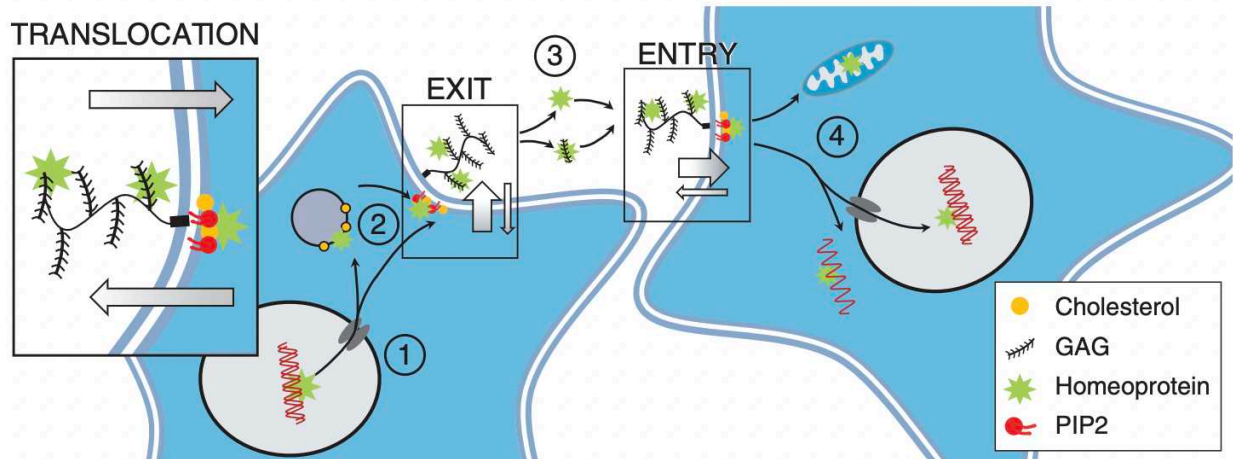


Figure 17. Mécanismes du transfert intercellulaire des homéoprotéines

(1) La sécrétion des homéoprotéines nécessite une étape nucléaire puis cytosolique. (2) Le transfert sur le feuillet interne de la membrane plasmique est assuré par des interactions avec des vésicules enrichies en cholestérol. L'homéoprotéine s'associe alors à des domaines enrichis en cholestérol/PIP2. (3) Sur la face extracellulaire, l'interaction avec les GAG contrôle l'extraction de l'homéoprotéine. (4) Lors de l'internalisation, le cholestérol et le PIP2 permettent l'entrée et l'accumulation de l'homéoprotéine dans divers organites intracellulaires. (Extrait de (Di Nardo et al., 2020)).

Étant donné le haut degré de conservation de la séquence de l'homéodomaine, le mécanisme de transfert d'EN2, étudié *in vitro*, est possiblement partagé par la plupart des homéoprotéines qui circulent. De façon notable, sur les 162 homéoprotéines testées sur des cultures cellulaires HeLa et neuronales embryonnaires *in vivo*, le transfert intercellulaire a été confirmé pour 152 d'entre elles (Lee et al., 2019). Les homéoprotéines extracellulaires se lient à la membrane plasmique avant leur internalisation cellulaire. Le caractère cationique de l'homéodomaine leur confère la capacité d'établir des interactions électrostatiques avec les acides nucléiques et leur permet aussi une interaction avec les phospholipides et glucides chargés négativement et localisés à la surface des cellules. Comme la PSA qui facilite la reconnaissance des neurones (Joliot et al., 1991b), les GAG à la surface cellulaire contribueraient ainsi à concentrer les homéoprotéines à la surface des neurones (Cardon et al., 2021), non sans participer, nous le verrons, à une reconnaissance plus spécifique entre homéoprotéines distinctes et sous-types cellulaires.

Enfin, il est intéressant de noter que la sécrétion atypique des homéoprotéines est un processus sujet à régulation. Par exemple, la phosphorylation d'une séquence riche en sérine (SRD) par la caséine kinase 2 (CDK2) inhibe la sécrétion d'EN2 (Maizel et al., 2002). Étant donné que la séquence SRD est située en dehors de l'homéodomaine, elle n'est pas conservée à l'identique parmi les homéoprotéines. Reposant sur des mécanismes communs liés à des séquences contenues dans l'homéodomaine, on pourrait supposer que le transfert obéisse à un mode de régulation spécifique pour chaque homéoprotéine. On peut alors envisager que la régulation de la sécrétion et de l'internalisation pourrait se réaliser à plusieurs niveaux ; du noyau jusqu'à la reconnaissance des sucres complexes. Cependant, les mécanismes régulateurs, et leur spécificité selon les homéoprotéines et les cellules donneuses ou acceptrices, restent à explorer.

iii. Bloquer le transfert des homéoprotéines

Comme énoncé précédemment, les domaines de sécrétion et d'internalisation des homéoprotéines, $\Delta 1$ et pénétratine respectivement, assurent l'activité cellulaire non-autonome. Leur présence dans le domaine de fixation à l'ADN rend impossible l'introduction de mutations qui viseraient l'activité non-autonome sans perturber les fonctions autonomes. Afin d'étudier spécifiquement l'activité non-autonome, le laboratoire a développé des anticorps « simple-chaîne » (scFv), qui une fois sécrétés dans le milieu, neutralisent les homéoprotéines extracellulaires ciblées. Ceci a permis de démontrer l'implication de PAX6 dans le développement de l'œil chez le poisson zèbre (Lesaffre et al., 2007), la migration des précurseurs d'oligodendrocytes chez le poulet (Di Lullo et al., 2011) et celle des cellules Cajal-Retzius dans le neocortex embryonnaire de souris (Kaddour et al., 2020). La même stratégie a permis de démontrer que la signalisation par EN1/2 est nécessaire au patron des projections entre rétine et toit optique chez la grenouille et le poulet (Brunet et al., 2005; Wizenmann et al., 2009) et à la morphogénèse d'une structure (anterior cross vein) dans le disque embryonnaire de l'aile de la drosophile (Layalle et al., 2011). Un scFv dirigé contre OTX2 a été utilisée pour analyser le rôle non autonome de cette homéoprotéine dans la physiologie de la rétine (Moya and Ibad, 2021) et le contrôle de la plasticité corticale (Bernard et al., 2016a).

d. Action paracrine de l'homéoprotéine OTX2 dans la plasticité

i. Le transfert d'OTX2 régule la plasticité

L'homéoprotéine OTX2 représente à ce jour une des exemples, avec EN et PAX6, le plus étudié du rôle physiologique du transfert intercellulaire des homéoprotéines. Il a été démontré que le locus d'*Otx2* est inactif dans le cortex (Spatazza et al., 2013b). Ainsi OTX2 cortical proviendrait

de sources extracorticales (Sugiyama et al., 2008, 2009; Kim et al., 2014). Parmi ces sources, les cellules épendymaires du plexus choroïde sécrètent OTX2 dans le CSF. OTX2 diffuse alors dans le parenchyme cérébral où elle est internalisée préférentiellement par les cellules PV de plusieurs régions corticales (Figure 18). Il a été démontré qu'OTX2 régulait la plasticité du V1, du A1, et du cortex préfrontal médian (mPFC) (Sugiyama et al., 2008; Lee et al., 2017).

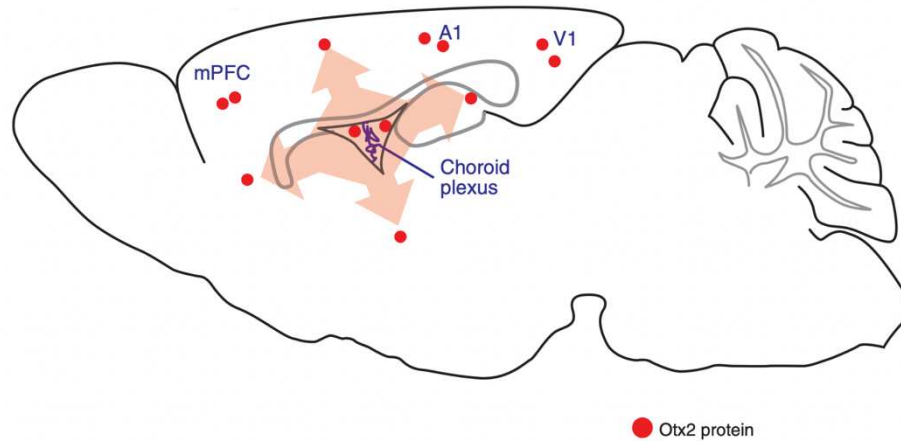


Figure 18. OTX2 s'accumule préférentiellement dans les cellules PV dans l'ensemble du cortex

OTX2 est exprimée dans le plexus choroïde, sécrétée dans le CSF et s'accumule dans tout le cortex, y compris dans le V1, A1 et mPFC. Dans le parenchyme, il s'accumule dans les cellules PV grâce à des interactions spécifiques avec les PNN. (Adapté de (Di Nardo et al., 2018).

Les premières études ont été réalisées sur la plasticité de la dominance oculaire du V1. L'infusion exogène d'OTX2 ou le blocage de la forme endogène accélère ou retarde respectivement la CP dans le V1 (Figure 19). Faiblement détectée avant la CP, OTX2 s'accumule progressivement dans les cellules PV pendant la CP puis persiste à l'âge adulte. De façon intéressante, chez les souris *Otx2* hétérozygotes, la CP de la dominance oculaire est retardée ce qui démontre qu'une réduction de 50 % de la protéine OTX2 est suffisante pour modifier la cinétique de maturation des cellules PV (Sugiyama et al., 2008). En conclusion, l'accumulation d'OTX2 par les cellules PV contribue à leur maturation et, par conséquent, régule l'apparition de la CP pour la vision binoculaire.

L'internalisation d'OTX2 par les cellules PV dépend d'une liaison à haute affinité avec les GAG au sein des PNN qui entourent ces cellules. L'élimination des PNN par la ChABC (digérant les chaînes de GAG) réactive la plasticité dans le cortex adulte (Pizzorusso et al., 2002) et réduit la quantité d'OTX2 endogène dans les cellules PV (Beurdeley et al., 2012b). De

la même manière, une altération des PNN due à une dérégulation redox empêche l'internalisation d'OTX2 par les cellules PV (Morishita et al., 2015). On peut donc en conclure que les sucres complexes des PNN participent à la reconnaissance spécifique d'OTX2 précédant son internalisation.

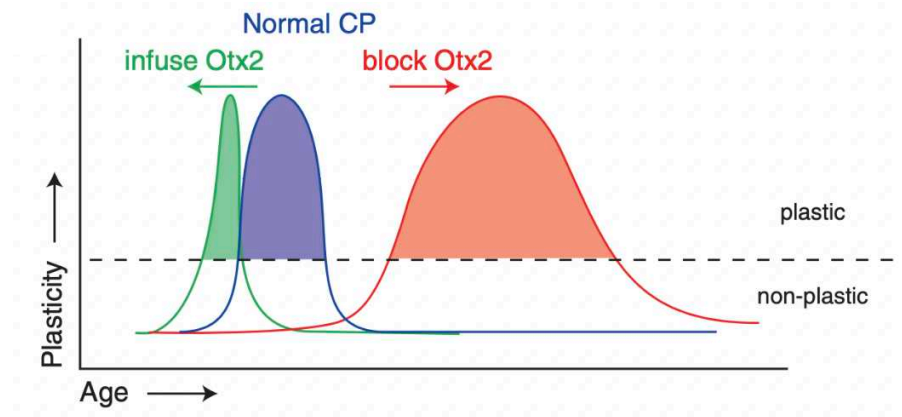


Figure 19. OTX2 contrôle la période critique de la dominance oculaire

L'ouverture et la fermeture des fenêtres normales de la CP chez les souris de type sauvage (en violet) peuvent être accélérées par des infusions corticales d'OTX2 (en vert) ou retardées par le blocage extracellulaire de l'OTX2 endogène (en orange). (Extrait de ((Di Nardo et al., 2018).

ii. OTX2 reconnaît spécifiquement les GAG sulfatés des PNN

Un motif de liaison aux GAG dans OTX2 chevauche la première hélice de l'homéodomaine, et des séquences similaires ont été repérées dans plusieurs homéoprotéines (Figure 20). Ceci suggère l'existence d'un 'code sucre' pour la reconnaissance des homéoprotéines qui guiderait la spécificité cellulaire du transfert et l'activité non autonome de ces protéines (Prochiantz and Di Nardo, 2015). Dans la séquence d'OTX2, un doublet arginine-lysine (RK) situé juste en amont de l'homéodomaine joue un rôle important dans la structure consensuelle caractéristique des domaines de liaison aux GAG (Cardin and Weintraub) et est nécessaire à la reconnaissance des cellules PV décorées de PNN (Figure 20). L'identification de ce domaine a conduit à la synthèse d'un peptide de 15 acides aminés (RKQRRERTTFRAQL) appelé peptide RK afin de souligner l'importance des acides aminés RK dans la reconnaissance des GAG.

		GAG-motif														
CHX-10	134	R	K	R	R	H	R	T	I	F	T	S	Y	Q	L	
DLX-1	114	K	K	I	R	K	P	R	T	I	Y	S	S	L	Q	L
DLX-4	108	R	K	L	R	K	P	R	T	I	Y	S	S	L	Q	L
GSC	152	R	R	K	R	R	H	R	T	I	F	T	D	E	Q	L
HOX-A13	310	R	R	G	R	K	K	R	V	P	Y	T	K	V	Q	L
NKX-2.5	129	R	R	R	R	K	P	R	V	L	F	S	Q	A	Q	V
OTX2	36	R	K	Q	R	R	E	R	T	T	F	T	R	A	Q	L
PITX2	77	K	R	Q	R	R	Q	R	T	H	F	T	S	Q	Q	L
PITX3	54	K	K	Q	R	R	Q	R	T	H	F	T	S	Q	Q	L
PRX-2	84	K	K	K	Q	R	R	N	R	T	T	F	N	S	S	Q

Figure 20. Alignement de motifs consensuels de liaison au GAG présents dans un sous-ensemble d'homéoprotéines

Les doublets RK, RR, KR ou KK, en amont de l'homéodomaine, sont en position N-terminale des motifs de liaison potentielle au GAG. Chez OTX2, ce motif assure sa reconnaissance des GAG des PNN des cellules PV. Répétons-le, cela suggère l'existence d'un 'code sucre' pour la reconnaissance de leurs cellules cibles par les homéoprotéines sécrétées. (Adapté de (Prochiantz and Di Nardo, 2015)).

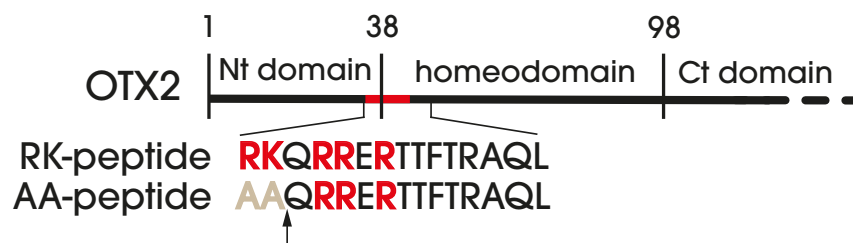


Figure 21. Séquence d'OTX2 nécessaire à la reconnaissance des sucres complexes

Dans sa région N-terminale, OTX2 porte un doublet RK (en rouge) juste avant l'homéodomaine (flèche). Le remplacement par deux AA à la place de RK diminue l'affinité d'OTX2 pour les GAG des PNN. (Adapté de (Beurdeley et al., 2012b)).

Injecté *in vivo*, ce peptide entre en compétition avec l'OTX2 endogène et bloque son transfert dans les cellules PV. On observe alors une baisse de l'expression de PV et de l'assemblage des PNN, conduisant à une réouverture de la plasticité de la dominance oculaire (Beurdeley et al., 2012b). De façon intéressante, le remplacement de ce doublet par deux alanines (AA) abolit la spécificité de reconnaissance d'OTX2 pour les PNN (Figure 21) (Beurdeley et al., 2012b). Chez la lignée transgénique *Otx2^{+AA}*, l'action cellulaire non-autonome d'OTX2 est altérée (Bernard et al., 2014), avec un retard de l'ouverture, puis de la fermeture de la CP (Lee et al., 2017).

Il est communément admis que le schéma de sulfatation des chaînes de glycanes code des informations spécifiques pour la liaison des facteurs de croissance et des morphogènes, tels que FGF, BMP, Wnt et Hedgehog (Lin, 2004). Comme l'a démontré le laboratoire, OTX2 ne fait pas exception. La reconnaissance d'OTX2 par les PNN dépend du patron de sulfatation des CS, le peptide RK ayant une forte affinité pour les formes disulfatées CS-D et CS-E (Beurdeley et al., 2012b). *In vivo*, favoriser génétiquement la synthèse du CS-C au détriment du CS-E entraîne une réduction d'accumulation d'OTX2 dans les cellules PV (Miyata et al., 2012).

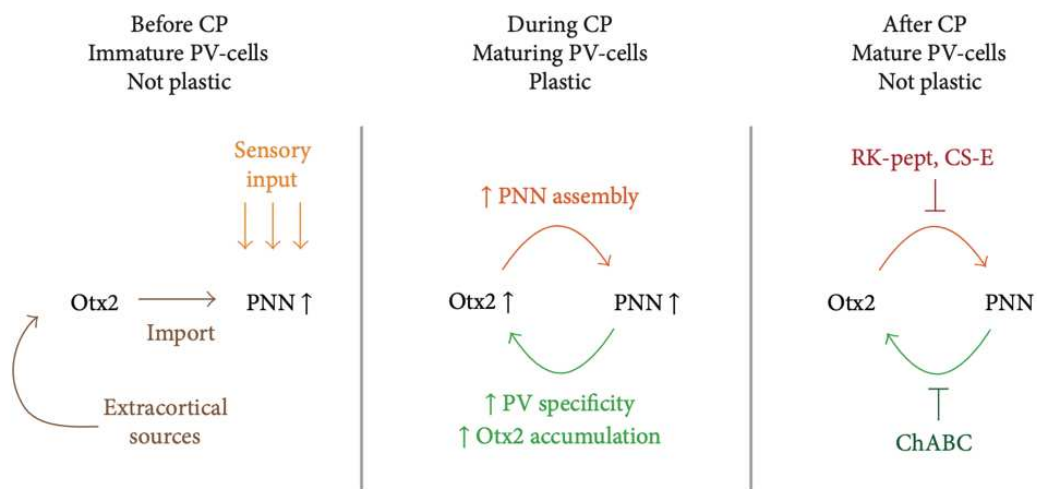


Figure 22. Boucle de rétroaction positive Otx2-PNN dans la régulation de la plasticité de la CP

Au début de la CP, l'activité sensorielle induit la formation initiale des PNN permettant l'internalisation de l'OTX2 extracorticale par les cellules PV. Pendant la CP, l'augmentation de la concentration d'OTX2 dans les cellules PV renforce l'assemblage des PNN. À leur tour, les PNN renforcent l'accumulation spécifique d'OTX2 dans les cellules PV. Chez l'adulte, le transfert constant d'OTX2 dans les cellules PV, assuré par la boucle de rétroaction positive entre l'homéoprotéine et les PNN, maintient un état mature, consolidé et non plastique. La déstabilisation de l'interaction Otx2-PNN chez l'adulte rouvre une fenêtre de plasticité dans le V1. (Extrait de (Bernard and Prochiantz, 2016)).

iii. Une boucle de rétrocontrôle positive entre OTX2 et les PNN

La présence des PNN autour des cellules PV est responsable de l'internalisation préférentielle d'OTX2 dans ces cellules et, inversement, l'internalisation d'OTX2 renforce cet assemblage (Figure 22). L'infusion précoce d'OTX2 dans le V1 avant l'initiation de la CP pour la dominance oculaire, accélère l'expression des PNN, conduisant à une ouverture précoce de la plasticité (Sugiyama et al., 2008). De plus, dans des conditions d'élevage dans l'obscurité qui retardent la maturation des cellules PV (Tropea et al., 2006; Katagiri et al., 2007), la perfusion

directe d'OTX2 dans le V1 accroît la quantité de PNN autour des cellules PV et ouvre la plasticité (Sugiyama et al., 2008). L'effet inverse est observé chez les souris knock-out conditionnelles *Otx2^{lox/lox}* chez lesquelles la quantité d'OTX2 est réduite dans le V1 : ces souris, qui ont une CP de dominance oculaire retardée, montrent également un retard dans la maturation des PNN (Spatazza et al., 2013b). Ceci confirme qu'OTX2 est nécessaire et suffisant pour déclencher la maturation des PNN (Figure 22).

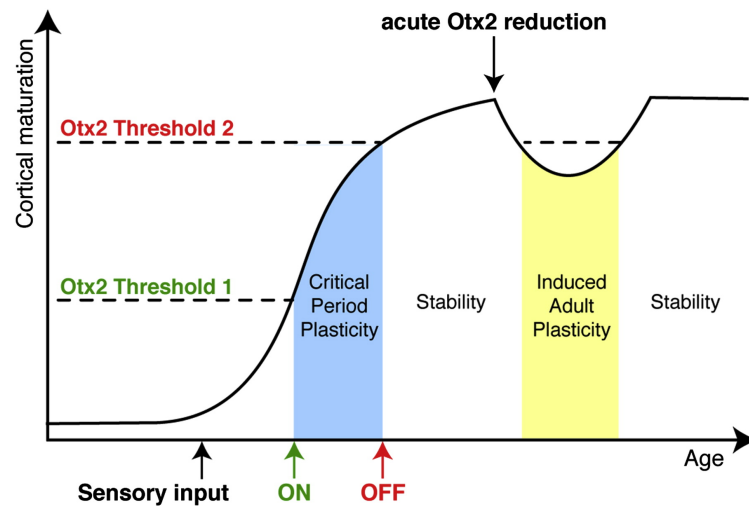


Figure 23. Modèle à deux seuils du contrôle de la plasticité par OTX2

L'accumulation d'OTX2 dans les cellules PV entraîne une maturation corticale. À partir d'un premier seuil d'accumulation d'OTX2, il y a ouverture de la fenêtre de plasticité. Le franchissement du second seuil entraîne une fermeture de la plasticité et le maintien de l'état non-plastique du cerveau adulte. Une réduction d'OTX2 chez l'adulte entraîne une induction transitoire de la plasticité. (Extrait de (Prochiantz and Di Nardo, 2015)).

Un seul allèle d'*Otx2*, n'est pas suffisant pour induire la plasticité dans le V1 (Sugiyama et al., 2008). À l'inverse, une petite réduction (entre 10 et 30%) de la quantité d'OTX2 est suffisante pour rouvrir la plasticité chez l'adulte. Ceci suggère l'existence d'une fenêtre physiologique pour l'action d'OTX2, reposant sur deux seuils (Figure 23). Un premier seuil pour ouvrir et un second pour fermer la plasticité, rappelant le modèle morphogénétique de type « drapeau français » de Lewis Wolpert (Wolpert, 1969). La CP est déclenchée dès lors qu'OTX2 capturée par les cellules PV atteint un premier seuil, puis se referme ensuite lorsqu'OTX2 dont l'internalisation est catalysée par la condensation des PNN atteint un second seuil (Figure 22) (Spatazza et al., 2013b). OTX2 est ainsi responsable de l'ouverture et de la fermeture de la CP visuelle et du maintien, à l'âge adulte, d'un état non-plastique du V1 (Figure 23).

iv. La réouverture de la plasticité chez l'adulte

Dans un cerveau adulte, la plasticité est limitée. Notre modèle stipule que le cerveau est intrinsèquement plastique et que cette plasticité morphologique et physiologique du cerveau adulte est atténuée (de manière réversible) par des freins moléculaires après la fermeture de la CP (Takesian and Hensch, 2013). Une fois les circuits corticaux matures, ces freins moléculaires progressivement recrutés au cours de la CP sont responsables de la restriction de la plasticité et de la fermeture de la CP. Ils sont la conséquence d'une interaction réciproque entre les modifications structurelles (assemblage des PNN, myélinisation, ...) et fonctionnelles (maturation et stabilisation des récepteurs et canaux ioniques) qui régulent la neurotransmission (Nabel and Morishita, 2013). Néanmoins, la plasticité peut être rouverte après les CP avec différents modèles impliquant OTX2 de façon directe ou non. L'élimination totale des PNN à l'aide de la ChABC a démontré que les PNN sont essentiels au maintien de l'état non plastique chez l'adulte (Pizzorusso et al., 2002). Cependant, cette méthode est brutale et manque de précision, agissant sans distinction sur les CS présents dans la matrice diffuse ou condensée en PNN. Par voie de conséquence, d'autres méthodes de réouverture ciblent soit OTX2, en le déplaçant à sa source, dans le plexus choroïde (Spatazza et al., 2013b) ou en perturbant son interaction avec la ECM (Figure 24). OTX2 peut être séquestré soit par expression d'un anticorps spécifique (Bernard et al., 2016a), soit après l'infusion d'un analogue synthétique du CS-E (hexasaccharide) (Despras et al., 2013), soit en bloquant les sites de reconnaissance d'OTX2 sur les GAG grâce au peptide RK. Ainsi, moduler les niveaux d'accumulation d'OTX2 dans les cellules PV est un outil de la régulation de la plasticité du cortex cérébral adulte.

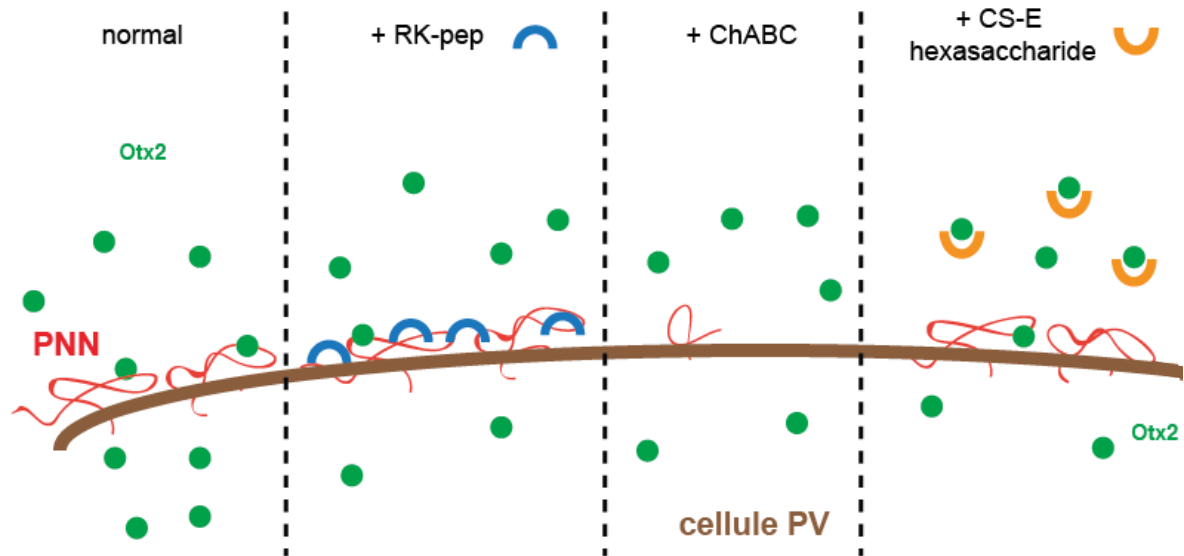


Figure 24. Méthodes de réouverture de plasticité en interférant avec OTX2

La perturbation de la liaison au PNN diminue la quantité d'OTX2 dans le V1. L'interaction est modifiée en digérant les PNN (ChABC), en bloquant l'interaction d'OTX2 avec les PNN (peptide RK) ou en séquestrant OTX2 dans le milieu extracellulaire (CS-E synthétique). (Adapté de la thèse de Damien Testa).

IV. Le système olfactif, un système sensoriel singulier

« Je suis triste de ne pouvoir photographier les odeurs. J'aurais voulu, hier, photographier celles de l'armoire à épicerie de Grand-Mère. » Ainsi s'exprimait le peintre et photographe français Jacques-Henri Lartigue dans ses *Mémoires sans mémoire*. Contrairement à la couleur de cette armoire qu'il aurait pu photographier, Jacques-Henri Lartigue ne pouvait fixer, représenter et transmettre l'odeur de cette armoire. Nous sommes démunis lorsqu'il s'agit de décrire une odeur ou de faire partager les sensations qu'elle suscite. Pourquoi ne peut-on que les nommer ? Comment se forme la représentation des odeurs ? Comment sont-elles perçues, détectées ou discriminées ? La connaissance des mécanismes moléculaires qui sous-tendent le traitement de l'information olfactive permet d'apporter des éléments de réponse à ces questions.

a. Les molécules odorantes

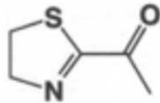
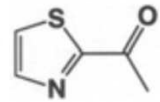
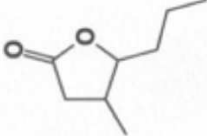
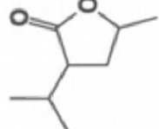
Le système olfactif reconnaît une vaste gamme de molécules qui pourvoient des informations vitales sur son environnement à un individu, lui permettant d'exprimer des réponses émotionnelles, motivationnelles et comportementales adaptées. De nombreuses informations telles que la localisation des proies et des prédateurs, l'état sexuel, hormonal et reproductif des

partenaires d'accouplement, et le niveau d'agressivité des rivaux sont traitées le long du circuit neuronal du système olfactif et traduites en sorties comportementales nécessaires. On peut alors se demander comment le nez organise ce mélange complexe d'informations olfactives ?

Tout d'abord, il me faut définir ce qu'est une odeur. Une odeur est une perception qui résulte de l'activation du système olfactif par une ou plusieurs substances chimiques odorantes. Ces substances sont des molécules organiques, de faible masse moléculaire (<300 Da) qui, au cours de la respiration, atteignent la muqueuse nasale et provoquent un stimulus. Les molécules odorantes sont volatiles, relativement solubles dans l'eau mais néanmoins lipophiles (Ohloff, 1994). Cependant, pour les poissons, les odorants sont généralement solubles et non volatiles. En outre, un odorant pour une espèce n'en est pas nécessairement un pour d'autres comme l'illustre le cas du CO₂ détecté par les souris et les insectes, mais pas par les humains.

Tableau 2. Exemples de composés odorants

Certains composés présentent des structures proches et des odeurs voisines (en vert) ou éloignées (en noir). (Adapté de (Meierhenrich et al., 2005)).

Nom	Structure	Odeur
2-acétyl-thiazoline		Pop-corn
2-acétyl-thiazole		Céréales, pop-corn
4-pentyl-butyrolactone		Noix de coco
Dérivé du menthol		Mentholé

Depuis le poète philosophe Titus Lucretius Carus jusqu'au milieu du XXe siècle, de nombreuses théories ont tentées d'expliquer la relation odeur/perception. Cependant, seule la théorie du récepteur stéréospécifique a été prouvée par la découverte de la famille des récepteurs olfactifs (OR) en 1991 (Buck and Axel, 1991). Cette famille comprend des milliers de protéines, chacune codée par le gène correspondant et chacune reconnaissant un groupe fonctionnel spécifique. L'odeur résulte de l'activité des molécules odorantes, seules ou au sein d'une

combinaison. Le répertoire olfactif est très varié. Il comprend des molécules aliphatiques et aromatiques ayant des groupes fonctionnels divers (Belitz et al., 1999). L'odeur d'une molécule n'est pas strictement déterminée par sa configuration spatiale. Ainsi, certaines molécules structurellement proches ont des odeurs très différentes alors que des molécules différentes peuvent évoquer des odeurs similaires (Tableau 2). Par ailleurs, certains énantiomères ont des odeurs proches ; le (R)-limonène sent l'orange et le (S)-limonène le citron, alors que d'autres ont des odeurs très différentes ; la (R)-carvone sent la menthe et la (S)-carvone sent l'aneth ou le cumin (Laska, 1999).

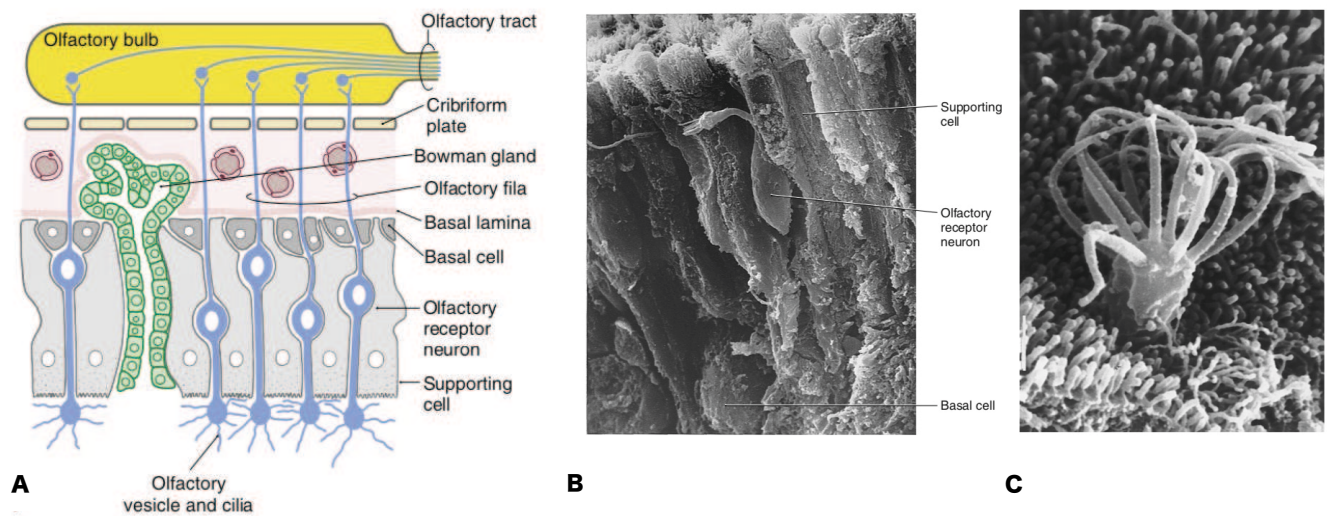


Figure 25. Organisation synaptique du système olfactif, de l'épithélium au bulbe olfactif

(A) Dessin schématique de l'épithélium olfactif. (B) Micrographies électroniques à balayage de l'épithélium olfactif humain montrant ses types cellulaires caractéristiques et les cils d'un OSN (C). (Adapté de (Simpson and Sweazey, 2015)).

En raison de la complexité des molécules odorantes, le concept d'odotope en analogie avec celui d'épitope a été proposé. Un odotope est la région d'une molécule odorante qui est spécifiquement reconnue par un site de liaison d'un OR. Une seule molécule peut avoir plusieurs odotopes et interagir avec plusieurs OR. De ce fait, un récepteur donné peut répondre à plusieurs odorants (Duchamp-Viret et al., 2000). Ainsi, les identités des différentes odeurs sont-elles codées par différentes combinaisons de récepteurs. Étant donné le nombre immense de combinaisons possibles d'OR, ce modèle permet la discrimination d'un nombre et d'une variété presque illimités d'odeurs différentes.

b. L'organisation du système olfactif, structure et fonction

i. Les caractéristiques uniques des voies olfactives

Les principaux événements de la détection des odeurs se produisent dans un neuroépithélium spécialisé situé dans la cavité nasale. Trois types de cellules sont prédominantes dans cet épithélium : le OSN, la cellule sustentaculaire, ou de soutien, et la cellule basale qui est une cellule souche assurant le renouvellement cellulaire tout au long de la vie (Figure 25) (Moulton and Beidler, 1967; Graziadei et al., 1979). Les OSN sont bipolaires : un unique processus dendritique s'étend jusqu'à la surface apicale de la muqueuse où il expose des cils spécialisés sur lesquels des OR transmembranaires interagissent avec les molécules odorantes inhalées (Figure 25) (Buck and Axel, 1991).

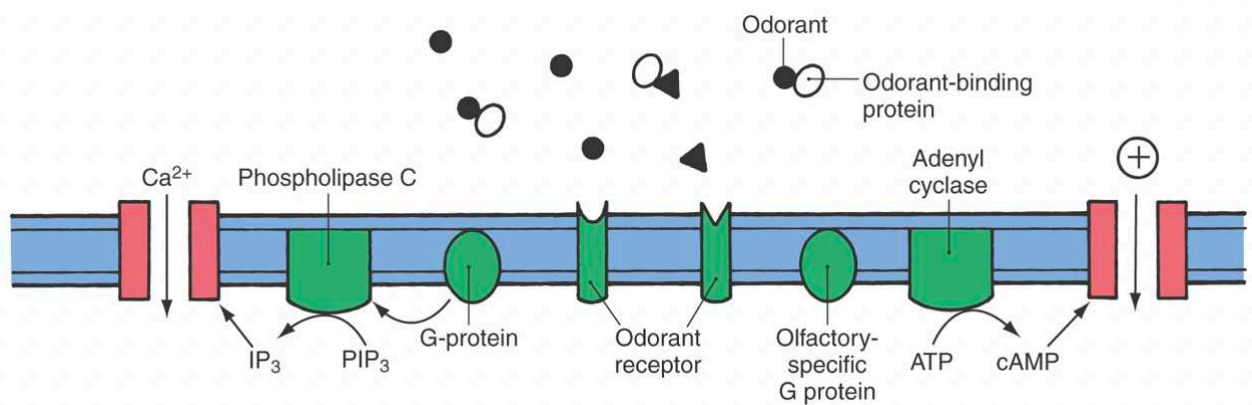


Figure 26. Voies de transduction de l'olfaction

Les substances odorantes sont transportées dans le mucus par des protéines de liaison. L'interaction de l'odorant à son récepteur sur les cils des OSN active une voie de second messenger impliquant soit l'AMP cyclique (AMPc), soit l'inositol 1,4,5-trisphosphate (IP3). Ces deux voies conduisent à l'ouverture de canaux cationiques membranaires et à la dépolarisation des OSN. (Extrait de (Simpson and Sweazey, 2015)).

Avec plus de 1400 gènes chez les mammifères, les OR appartiennent à la plus grande famille de récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) et ainsi à la plus grande famille de gènes de tout le génome. L'association des récepteurs olfactifs à la protéine G_{olf} assure l'activation de l'adénylate cyclase déclenchant la formation d'AMPc et l'ouverture des canaux ioniques $Na^+ - K^+$, ce qui dépolarise le OSN (Figure 26) (Pace et al., 1985; Sklar et al., 1986; Nakamura and Gold, 1987; Dhallan et al., 1990; Firestein et al., 1991). L'ablation sélective des cils entraîne la perte des réponses olfactives (Bronshtein and Minor, 1977). Les cellules sustentaculaires jouent un rôle essentiel dans le cheminement des molécules odorantes comme le démontre les nombreux cas de patients anosmiques à la suite d'une contamination par la COVID-19 (Brann

et al., 2020). En infectant ces cellules, le virus déclenche une réponse immunitaire brutale qui bloque la signalisation olfactive ; il y a alors perte d'odorat. Si l'inflammation est sévère, le liquide inflammatoire détruit les tissus infectés mais aussi potentiellement les neurones olfactifs à proximité. Au pôle basal de chaque OSN, un axone non myélinisé synapse avec un neurone de projection excitateur de second ordre, une cellule mitrale ou une cellule à panache unique (M/T) et des interneurons inhibiteurs dans des régions denses en neuropile dans le bulbe olfactif (OB). Ces régions sont appelées glomérules olfactifs ; elles constituent le premier relais central du système olfactif.

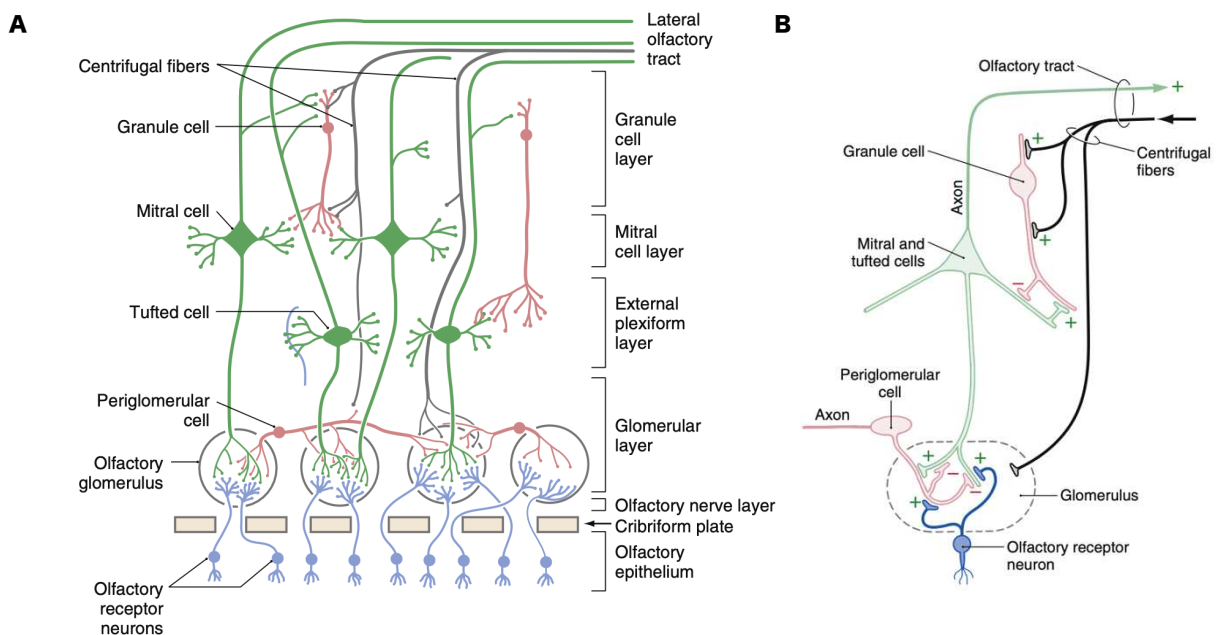


Figure 27. Dessin schématique du OB, montrant l'organisation laminaire, les principaux types de cellules et le circuit neuronal de base

(A) Les neurones récepteurs sont représentés en bleu, les interneurons en rouge, les neurones efférents du bulbe en vert et les fibres centrifuges en noir. (B) Connectivité des principaux types cellulaires de l'épithélium et du OB. Les synapses excitatrices (+) sont représentées en vert et les synapses inhibitrices (-) en rouge. L'action des axones des neurones pyramidaux du OC dans le glomérule n'est pas clairement établie. (Extrait de (Simpson and Sweazey, 2015)).

Dans le OB, les axones des OSN exprimant le même récepteur convergent vers un petit nombre de structures sphériques appelés glomérules où ils synapsent avec les dendrites distales d'une M/T (Figure 27) (Mori, 1987). Chaque glomérule, et la dendrite d'une M/T qui lui est associée forment un ensemble structurel et fonctionnel appelé unité glomérulaire. Le ratio de convergence est de 5000 OSN par glomérule chez les rongeurs. Cette convergence élevée permet d'augmenter la sensibilité et la discrimination de la détection des odeurs (Su et al.,

2009). Chaque OB contient environ 1800 unités glomérulaires ayant une organisation topographique stéréotypée, formant ainsi des cartes glomérulaires (Mori and Sakano, 2011). En ce sens, le OB ressemble aux aires sensorielles primaires du néocortex dans lesquelles les colonnes fonctionnelles sont organisées spatialement et forment des cartes sensorielles. Outre sa structure singulière et unique, le nombre même des interneurons du OB n'a pas son pareil. En effet, à l'inverse de la plupart des régions cérébrales, où un petit nombre de neurones inhibiteurs locaux régule l'activité d'un plus grand nombre de neurones de projection excitateurs, cette relation est inversée dans le OB. Les neurones inhibiteurs locaux sont deux fois plus nombreux que les M/T (Kaplan et al., 1985; Parrish-Aungst et al., 2007). Les cellules granulaires (GC) et les cellules périglomérulaires (PGC) sont les deux populations les plus abondantes des interneurons locaux du OB (Mori, 1987; Shepherd, 2004).

La structure synaptique caractéristique du OB est la synapse réciproque dendrodendritique, entre les interneurons et les neurones de projection. Contrairement aux synapses classiques entre axones et dendrites, les dendrites des interneurons du OB forment des synapses avec les dendrites des M/T. La synapse dendrodendritique est constituée d'une synapse excitatrice glutamatergique M/T vers la GC et d'une synapse inhibitrice GABAergique de la GC vers la M/T (Figure 28).

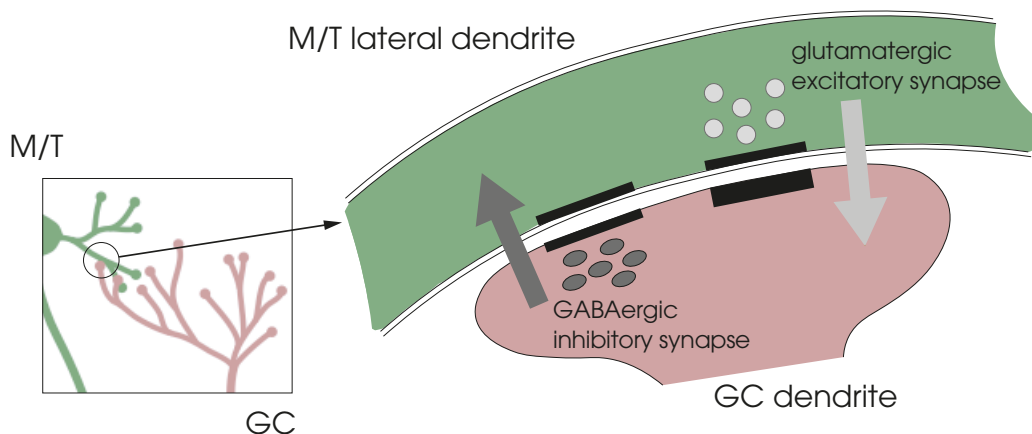


Figure 28. Synapses réciproques dendrodendritiques entre les interneurons OB et les cellules mitrales/à panache

Schéma d'une synapse dendrodendritique réciproque entre la dendrite latérale d'une M/T et la dendrite apicale d'une cellule granulaire (GC). Une synapse excitatrice glutamatergique M/T-GC et une synapse inhibitrice GABAergique GC-M/T se font face. Les densités synaptiques et les vésicules synaptiques sont en noir et en nuance de gris respectivement. (Adapté de (Yamaguchi, 2014)).

Les GC établissent des synapses avec des cellules appartenant à la même unité glomérulaire et des cellules appartenant à des unités glomérulaires différentes, permettant ainsi la modulation de l'activité des cellules excitatrices au sein des unités glomérulaires et entre elles.

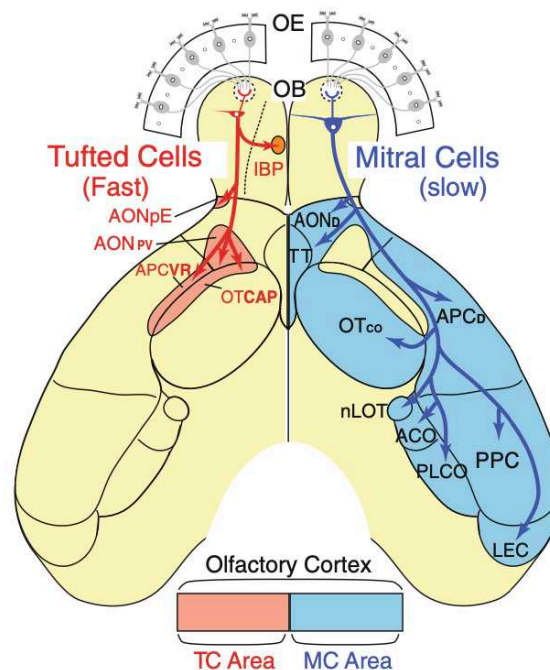


Figure 29. Les voies parallèles des cellules mitrales et des cellules à panache du OB au OC

Les projections distinctes des M/T suggèrent l'existence de voies parallèles dans le système olfactif central. Dans le cortex olfactif, les cellules à panache (en rouge) acheminent les informations olfactives rapides vers la partie externe du noyau olfactif antérieur (AONpE), la partie postéroventrale du noyau olfactif antérieur (AONPV), la partie antérolatérale du tubercule olfactif (OTCaP) et la partie ventrorostrale du aPC (APCVR). En revanche, les cellules mitrales (en cyan) acheminent largement les informations olfactives plus lentes vers la partie dorsale du noyau olfactif antérieur (AOND), la partie corticale du tubercule olfactif (OTCO), la partie dorsale du aPC (APCD), le tenia tecta (TT), pPC, cortex entorhinal latéral (LEC), noyau du tractus olfactif latéral (nLOT), noyau amygdaloïde cortical antérieur (ACO) et noyau amygdaloïde cortical postérolatéral (PLCO). (Extrait de (Nagayama et al., 2014)).

Les GC reçoivent également des entrées synaptiques glutamatergiques des cellules pyramidales du cortex olfactif (OC) via des synapses axodendritiques (Figure 27). Ainsi, les GC sont-elles excitées à la fois par les entrées sensorielles olfactives transmises par les M/T via les synapses dendrodendritiques et par les activités des cellules pyramidales du OC via les synapses axodendritiques descendantes. Finalement, les axones des M/T sont fasciculés et forment le tractus olfactif latéral (LOT) assurant ainsi le transfert de l'information olfactive vers le OC le long de l'axe antéro-postérieur comprenant le noyau antérieur olfactif, le tubercule olfactif, le

cortex piriforme (PC), le noyau amygaloïde cortical antérieur, le cortex péri-amygdalien et le cortex entorhinal latéral (Figure 29) (Haberly, 2001; Brunjes et al., 2005; Sanchez-Andrade and Kendrick, 2009).

ii. La neurogenèse adulte, longtemps mise en doute et pourtant essentielle

Pendant plus d'un siècle, il a été considéré que la structure du cerveau adulte demeurait fixe et que les cellules nerveuses n'étaient pas remplacées, contrairement aux autres cellules du corps. Néanmoins, après 50 ans de débat, il est aujourd'hui admis que le cerveau de nombreux mammifères adultes, y compris les primates, génère de nouveaux neurones : on parle de neurogenèse adulte. Cette neurogenèse adulte a été mise en évidence dans le gyrus denté de l'hippocampe puis dans le OB (Altman, 1963, 1969; Altman and Das, 1965). Ces travaux ont alors été au centre de nombreuses polémiques divisant ainsi la communauté scientifique jusqu'à ce que d'autres équipes confirment l'existence de la neurogenèse adulte chez le rat (Bayer et al., 1982) puis chez le canari (Goldman and Nottebohm, 1983). Depuis la présence de la neurogenèse adulte a été prouvée dans de nombreuses espèces (Amrein, 2015).

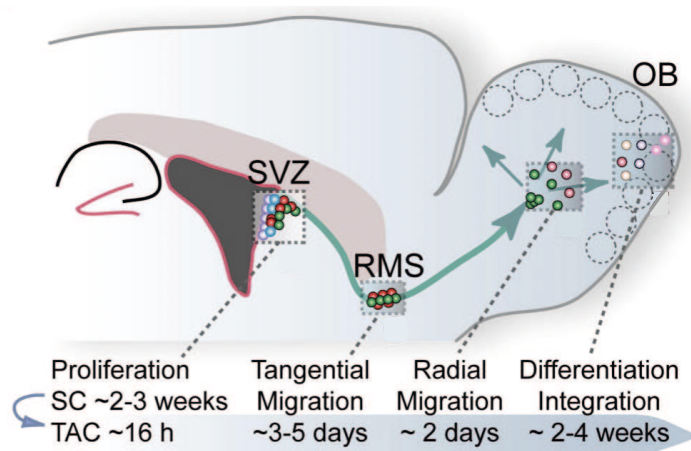


Figure 30. Neurogenèse dans la SVZ chez la souris

Schéma d'une coupe sagittale du cerveau contenant la SVZ et le RMS. Les neuroblastes sont générés dans la SVZ et migrent vers le OB en suivant les voies indiquées par les flèches. Abréviations : SC ; cellules souches de type astrocyte, TAC ; cellules amplificatrices de transit. (Extrait de (Khodosevich et al., 2013)).

Dans le système olfactif, les OSN de l'épithélium nasal et les interneurons du OB sont continuellement générés ; il y a alors perte des anciennes cellules et incorporation des nouvelles dans les circuits neuronaux (Lledo et al., 2006). Il est à noter que le renouvellement cellulaire

n'entrave pas le ciblage axonal des OSN, ainsi l'organisation topographique des glomérules est maintenue (Gogos et al., 2000). Le renouvellement cellulaire des OSN est essentiel au maintien des circuits neuronaux ; il permet de compenser la perte des OSN endommagés dû à l'exposition continue de nombreux stimuli nocifs externes tels que des infections virales ou les produits chimiques de notre environnement. Contrairement aux OSN, le renouvellement des interneurons du OB assure un meilleur remodelage de la connectivité neuronale des circuits neuronaux du OB : les nouveaux interneurons du OB sont régulés de manière plastique par l'expérience sensorielle olfactive et l'état comportemental de l'animal, ce qui soutient l'idée que leur renouvellement contribue à la plasticité des circuits neuronaux. Cependant, bien que le concept de neurogenèse continue chez l'adulte ait été confirmé chez l'animal, il reste très controversé chez l'humain. En raison de difficultés méthodologiques, les études *in vivo* peinent à trancher sur l'existence ou non de la neurogenèse dans le cerveau humain. En outre, les études réalisées chez l'homme donnent des résultats contradictoires, ce qui ajoute encore à l'ambiguïté entourant le concept de neurogenèse adulte chez l'homme (Spalding et al., 2013; Boldrini et al., 2018; Sorrells et al., 2018; Moreno-Jiménez et al., 2019).

iii. La neurogenèse adulte, précurseurs et intégration au réseau du OB

Produits dans la zone sous-ventriculaire (SVZ) des ventricules latéraux, les précurseurs des interneurons du OB migrent le long d'une voie spécifique appelée le courant migratoire rostral (RMS) vers le OB, où ils se différencient en GC et PGC (Figure 30). Les précurseurs des interneurons dans la SVZ sont hétérogènes et se différencient en sous-types distincts d'interneurons selon leur position dans la SVZ (Merkle et al., 2007). La production des interneurons du OB atteint un pic à la fin de la période embryonnaire et au début de la période néonatale, puis se poursuit de manière substantielle à l'âge adulte. Nonobstant, le nombre d'interneurons du OB nés à l'âge adulte est important : chez le rongeur, au moins dix mille neurones entrent dans le OB chaque jour (Alvarez-Buylla et al., 2001; Winner et al., 2002; Lledo et al., 2006), ce qui correspond à environ 1 % du nombre total d'interneurons du OB. Comme les GC embryonnaires et néonatales, les GC adultes reçoivent des contacts synaptiques glutamatergiques des deux mêmes sources principales : les M/T et les cellules pyramidales du OC. Tous les nouveaux interneurons de l'OB ne sont pas incorporés de manière stable dans le circuit neuronal. Dans des conditions physiologiques normales, seule la moitié des nouveaux GC survivent un mois après leur génération, l'autre moitié étant éliminée par apoptose (Petreanu and Alvarez-Buylla, 2002; Winner et al., 2002; Yamaguchi and Mori, 2005).

iv. La sélection neuronale et la plasticité, une relation connexe

Au cours du développement embryonnaire, la sélection neuronale est cruciale puisqu'elle permet un traitement optimal de l'information en affinant le circuit neuronal (Buss et al., 2006). À l'âge adulte, cette sélection neuronale reste active. En effet, le dérèglement de l'apoptose des interneurons du OB nés à l'âge adulte perturbe la capacité de discrimination des odeurs (Mouret et al., 2009). La survie des néo-neurons du OB ne suit aucun déterminisme particulier, et c'est l'expérience sensorielle olfactive qui régule leur destin. L'environnement enrichi en odeurs augmente le taux de survie des GC nés à l'âge adulte (Rochefort et al., 2002), à l'inverse des souris anosmiques où le taux de survie de ces mêmes cellules diminue (Petreanu and Alvarez-Buylla, 2002). D'ailleurs, il est à noter que l'occlusion partielle d'une entrée sensorielle unilatérale, suffit à moduler l'efficacité de l'apoptose des nouvelles GC (Corotto et al., 1994; Saghatelian et al., 2005; Yamaguchi and Mori, 2005; Mandairon et al., 2006). De façon intéressante, il a été montré que l'existence des GC nouvellement formées dépend d'une CP. La privation sensorielle pendant les 14 à 28 jours qui suivent la neurogenèse réduit considérablement la survie des cellules, alors qu'une privation avant ou après cette période n'a aucun effet significatif (Yamaguchi and Mori, 2005). Cette fenêtre temporelle correspond à la période où les nouvelles GC établissent des contacts synaptiques avec les neurones préexistants (Petreanu and Alvarez-Buylla, 2002; Carleton et al., 2003; Whitman and Greer, 2007; Kelsch et al., 2008, 2010; Katagiri et al., 2011), suggérant ainsi l'importance de l'établissement des contacts synaptiques.

c. Le cortex piriforme, circuit et plasticité

i. Du bulbe olfactif au cortex piriforme

Contrairement à la voie sensorielle classique où l'information sensorielle est d'abord relayée dans le thalamus avant d'atteindre le néocortex, le LOT formé par les M/T transmet les signaux olfactifs directement du OB vers l'ensemble du OC (Mitsui et al., 2011). Il a été proposé que ces cellules qui forment deux voies parallèles de projection dans le OC (Haberly and Price, 1977) ont des rôles distincts dans la transmission des signaux olfactifs (Nagayama et al., 2014). Les cellules à panache unique véhiculent des informations odorantes rapides dans la partie antérieure du cortex olfactif à l'inverse des cellules mitrales qui transmettent des informations olfactives plus lentes vers la partie postérieure du cortex olfactif (Figure 29).

Le cortex piriforme (PC) est le plus grand récepteur cortical des projections directes du OB. C'est une structure corticale très importante du cerveau des rongeurs, représentant jusqu'à 10%

du volume cortical chez certaines espèces. Le PC se projette extensivement : les axones des cellules pyramidales font synapses dans l'ensemble du OC ainsi que dans l'amygdale, le thalamus et plusieurs subdivisions du cortex préfrontal (Johnson et al., 2000b; Ekstrand et al., 2001; Meyer et al., 2006; Kerr et al., 2007). Bien que l'on s'accorde généralement pour dire que cette zone est impliquée dans le traitement d'ordre supérieur des informations olfactives, sa fonction semble complexe et méconnue. Contrairement aux structures corticales primaires des autres systèmes sensoriels qui se consacrent au traitement d'un seul type d'information sensorielle, le PC possède une architecture hautement auto-associative, avec un vaste réseau d'interconnexions au sein de ses diverses sous-régions et entre elles (Figure 31).

ii. Le cortex piriforme, un système sensoriel à part

Dans la plupart des systèmes sensoriels, l'organisation spatiale est essentielle au fonctionnement du système. De cette manière, l'organisation spatiale rétinotopique, tonotopique et somatotopique est maintenue dans les systèmes visuel, auditif et somatosensoriel, respectivement. Cela signifie que l'emplacement spatial des neurones activés dans les sous-régions de la voie sensorielle fournit certaines informations sur le stimulus. Cependant, au-delà du OB, il n'existe pas d'organisation odotopique. Dans ce système, on suppose que l'information n'est pas codée par la localisation des cellules mais par l'activation d'une large population distribuée de neurones corticaux. Le PC est en ce sens un circuit de réseau auto-associatif, comme l'hippocampe (Marr, 1971; Haberly, 2001). Il participe à la discrimination, à l'association, et à l'apprentissage des odeurs (Bekkers and Suzuki, 2013). La reconnaissance des objets dans un paysage sensoriel est alors façonnée par l'expérience sensorielle (Fournier et al., 2015). Le PC reconnaît les caractéristiques moléculaires d'une stimulation olfactive et les transforme en représentations d'odeurs holistiques (Figure 31) (Haberly and Bower, 1989; Wilson and Stevenson, 2003; Wilson and Sullivan, 2011). Les connexions supposées aléatoires du OB au PC suggèrent que les représentations d'odeurs dans le PC sont acquises par l'expérience. Le PC serait capable de détecter des odeurs en les comparant à une librairie d'odeurs acquise précédemment (Wilson and Sullivan, 2011). Il fonctionne comme un outil de mémoire optimisé dans le stockage de représentations synaptiques d'odeurs (Barkai et al., 1994). Il a d'ailleurs été rapporté que des lésions du PC affectent la capacité de mémorisation ou de rétention des informations olfactives lors d'une tâche de discrimination (Staubli et al., 1987). Dans ce réseau, l'exposition initiale à un stimulus olfactif active des ensembles spécifiques de GC et M/T du OB qui activent un réseau spécifique de cellules pyramidales du

PC. La synergie des activations des synapses afférentes et de synapses de fibres d'association intrinsèques induit une potentialisation à long terme, stockée comme un patron. En conséquence, s'il y a réexposition au même stimulus ou à un stimulus partiellement dégradé, les synapses des fibres d'association intrinsèques potentialisées permettront l'achèvement du schéma. La sortie corticale correspondra alors à celle originale, le stimulus étant reconnu par le réseau (Figure 31). Cette connectivité singulière permet un encodage simple de nombreux stimuli différents qui active plusieurs ensembles de neurones proches.

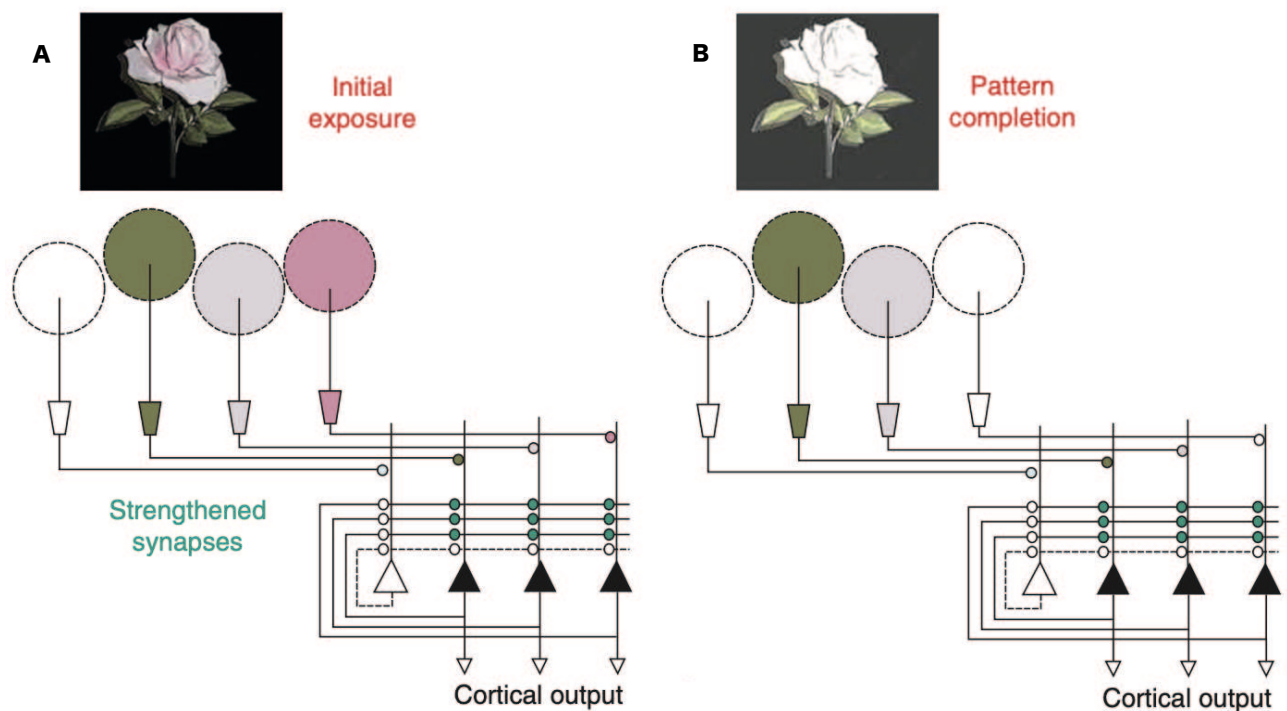


Figure 31. Réseau auto-associatif

(A) L'exposition initiale à un stimulus olfactif active des modèles spécifiques de M/T du OB qui, à leur tour, activent un modèle de cellules pyramidales dans le PC. L'excitation coïncidente de synapses afférentes spécifiques et de synapses de fibres d'association intrinsèques (points verts) induit une potentialisation à long terme stockée comme un modèle du schéma expérimental. (B) Lors d'une réexposition au même stimulus incomplet, les synapses des fibres d'association intrinsèques potentialisées permettent l'achèvement du schéma et une sortie corticale correspondante à l'original, signifiant la reconnaissance du stimulus. (Extrait de (Wilson, 2009)).

Des estimations récentes suggèrent qu'un odorant donné activera 3 à 15 % des neurones corticaux piriformes (Stettler and Axel, 2009), bien que des ensembles composés de 50 à 100 neurones (Miura et al., 2012) puissent être suffisants pour coder des odeurs uniques. Étant donné que l'on suppose que le PC compte plus de 50 000 neurones pyramidaux (Neville and

Haberly, 2004), cela permet un nombre presque illimité de représentations d'ensemble superposées de différentes odeurs.

iii. Origine et subdivisions du cortex piriforme

Le PC du mot latin *pirum*, poire est souvent appelé cortex olfactif primaire. C'est un paléocortex conservé au cours de l'évolution qui partage des caractéristiques communes avec le cortex des reptiles qui sont organisés en trois couches minces (Aboitiz et al., 2002; Shepherd, 2011; Fournier et al., 2015). Situé bilatéralement dans la partie ventrolatérale du télencéphale, il reçoit une entrée directe du OB via le LOT.

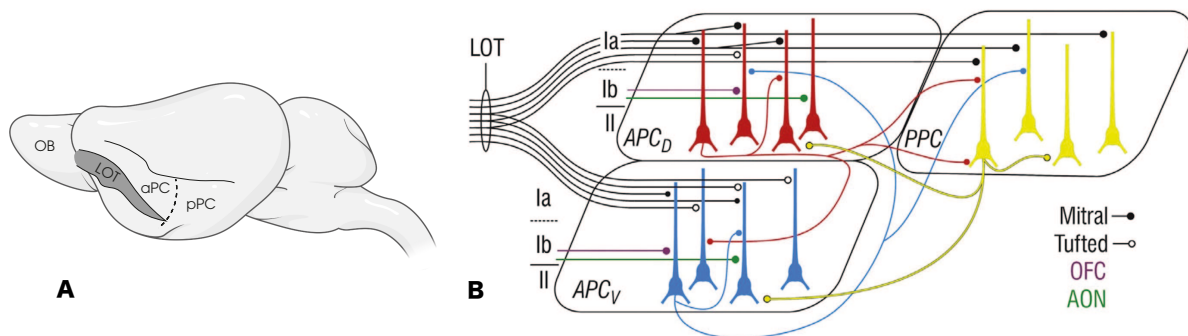


Figure 32. Localisation relative et connectivité des aires corticales olfactives chez le rongeur

(A) Vue ventrolatérale du cerveau de rat montrant le bulbe olfactif (OB), le tractus olfactif latéral (LOT), et les limites approximatives du PC antérieur (aPC) et du PC postérieur (pPC). (B) Circuit du cortex piriforme. Les collatérales des axones des M/T sortent du LOT et font synapses sur la partie la plus distale des dendrites apicales des cellules pyramidales dans la couche Ia du PC. L'aPC_v est la région qui reçoit la majorité des projections des cellules à panache. Les axones des cellules à panache ne se projettent pas vers le pPC. Outre les axones du cortex orbitofrontal (OFC) et du noyau antérieur olfactif (AON) qui se projettent dans la couche Ib de l'aPC, les dendrites des cellules pyramidales de la couche Ib reçoivent des projections associatives du cortex piriforme, souvent originaires de la même sous-région que la cellule cible. Ces entrées sont auto-associatives. (Adapté de (Illig and Wilson, 2014)).

Le PC est la plus grande zone du cortex olfactif et peut être divisé en trois subdivisions principales : le cortex piriforme antérieur ventral (aPC_v), dorsal (aPC_d) et le cortex piriforme postérieur (pPC). Ces sous régions reçoivent des entrées différentes, ont des architectures intrinsèques distinctes et ont des sorties uniques. Par exemple, le aPC_v est la seule sous-région du PC qui reçoit des projections des cellules à panache unique, et elle reçoit plus de fibres associatives provenant du PC que les autres sous-régions (Figure 32). De façon plus générale, à l'inverse du pPC, le aPC reçoit plus d'entrée afférentes du OB est moins d'entrées associatives

(Litaudon et al., 2003; Luna and Morozov, 2012; Maier et al., 2012). Ainsi, le aPC assure la représentation des caractéristiques élémentaires d'une odeur, tandis que le pPC unifie ces représentations élémentaires dans des ensembles perceptifs (Gottfried, 2006, 2010; Zelano et al., 2011).

iv. Organisation neuroanatomique du cortex piriforme

La structure trilaminaire du PC est organisée comme suit :

La couche I, dite fibrillaire, contient de nombreux axones et dendrites mais seulement quelques corps cellulaires. La partie la plus superficielle (couche Ia) reçoit les axones afférents du LOT, tandis que la partie la plus profonde (couche Ib) reçoit les fibres associatives de l'intérieur du PC. À l'inverse, la couche II est densément peuplée de somas de neurones glutamatergiques, les principales cellules d'entrée du PC. Cette couche est également divisée en couche IIa superficielle et couche IIb plus profonde et reçoit des fibres associatives du PC. Finalement, la couche III contient une plus faible densité de corps cellulaires et, comme la couche Ib et II, une forte densité de fibres associatives (Figure 33). La connectivité du CP est cependant très complexe, et en ce sens, il a été observé des différences d'épaisseurs entre les régions aPC et pPC. Par exemple, la couche Ia du pPC est nettement plus fine que dans l'aPC, et à l'inverse, le pPC a une couche Ib beaucoup plus épaisse que l'aPC, ce qui démontre une nouvelle fois la composante associative importante du pPC comparé au aPC.

Comme dans la plupart des autres structures corticales, les principaux neurones du PC sont des neurones de projections pyramidaux glutamatergiques, et des interneurons locaux GABAergiques. Les cellules glutamatergiques localisées dans les couches II sont appelées cellules pyramidales superficielles (SP) et semi-lunaires (SL) et celles de la couche III sont appelées cellules pyramidales profondes (DP). Les interneurons sont retrouvés dans les trois couches. Les cellules horizontales (H) et neurogliaformes (G) sont localisées dans les couches I et les cellules bipolaires (B) et multipolaires (M) dans les couches II et III, respectivement (Figure 33). Les H et G reçoivent l'entrée du LOT et assurent l'inhibition directe des dendrites apicales distales des cellules SL et SP. Les cellules B et M assurent la rétro-inhibition dans les couches plus profondes. Les B sont VIP⁺, les M elles, sont CB⁺, PV⁺ ou SOM⁺ (Suzuki and Bekkers, 2010a).

Bien qu'il existe de nombreuses preuves circonstanciées du rôle des interneurons dans le fonctionnement normal du PC, les détails de leur participation restent encore mal compris. De manière générale, les interneurons pourraient contrôler trois composantes différentes du réseau neuronal ; les entrées dendritiques ; les sorties axonales ; et les connexions à longue distance entre les assemblées d'interneurones (Zhang et al., 2006).

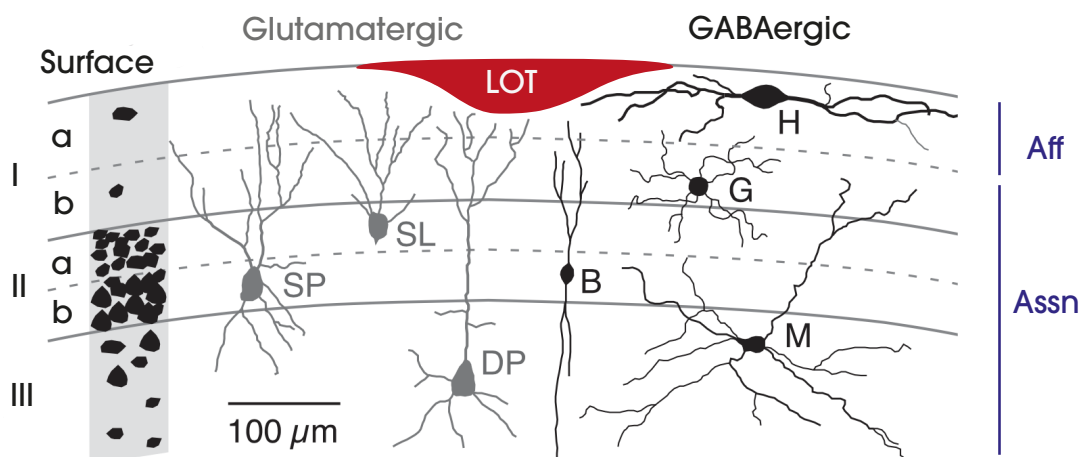


Figure 33. Cytoarchitecture du cortex piriforme

À gauche, une représentation schématisée de la densité des somas neuronaux dans chaque couche, montrant une forte densité de cellules dans la couche II et une plus faible densité de neurones dans les couches I et III. Les cellules glutamatergiques sont représentées en gris et les GABAergiques en noir. Les cellules semi-lunaires (SL) et pyramidales superficielles (SP) sont concentrées dans les couches IIa et IIb, respectivement. Elles reçoivent les afférences du LOT dans la couche Ia (Aff). Les cellules pyramidales profondes (DP) se trouvent en plus faible densité dans la couche III. Les cellules SP, SL et DP reçoivent des entrées associatives intracorticales (Assn). Les interneurones GABAergiques sont distribués de manière plus éparse et uniforme dans toutes les couches. Abréviations : H, horizontal ; G, neurogliaforme ; B, bipolaire ; M, multipolaire. Les G et H reçoivent les afférences du LOT. On présume que les B et les M reçoivent des entrées Assn. (Adapté de (Neville and Haberly, 2004)).

Un exemple du contrôle des entrées dendritiques par les interneurones du PC est illustré par leur participation à l'induction de la LTP associative entre les voies afférentes et d'association du PC. Les interneurones seraient réfractaires à la LTP (Kanter and Haberly, 1993; Kapur et al., 1997) et leur inhibition, contrôlée par les systèmes neuromodulateurs cholinergique et monoaminergique, améliorerait l'apprentissage olfactif (Haberly and Bower, 1989; Patil and Hasselmo, 1999; Linster and Hasselmo, 2001).

Quant à l'existence de connexions à longue distance, elle est suggérée par l'émission d'oscillations électriques dans le PC lors d'une tâche olfactive (Wilson, 2001; Neville and Haberly, 2003). D'ailleurs, des oscillations similaires ont été observées dans l'hippocampe et le néocortex, avec participation des interneurones (Whittington and Traub, 2003; Buzsáki and Draguhn, 2004; Antonoudiou et al., 2020; Doelling and Assaneo, 2021). Ainsi, les interneurones du PC auraient la même activité de synchronisation du réseau. Il est à souligner que ce processus est fondamental puisqu'il permet d'augmenter de façon considérable

l'efficacité de la transmission synaptique au niveau des structures cibles sur une période courte et contribue de ce fait à l'apprentissage olfactif (Laurent, 2002; Schaefer et al., 2006).

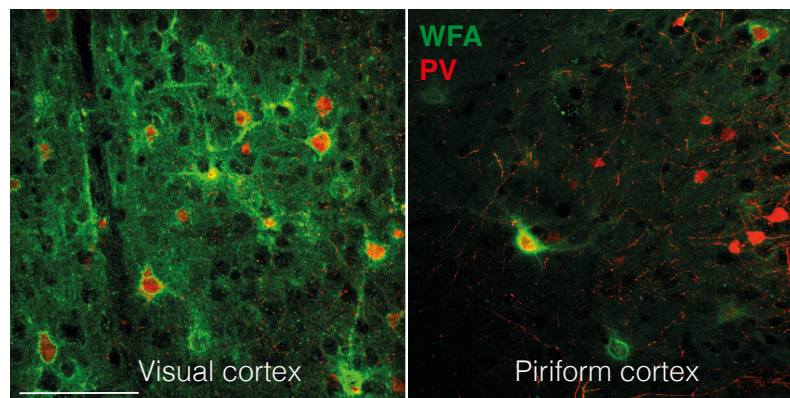


Figure 34. Caractérisation corticale des cellules PV

Chez les souris adultes P90, la maturation des cellules PV et l'accumulation des PNN est dissemblable entre le V1 (Visual cortex) et PC (Piriform cortex), avec une expression plus forte dans le V1. Barre d'échelle 100 μm .

Finalement, il semble que les interneurons puissent réguler les sorties axonales. Rappelons tout d'abord qu'au même titre que l'hippocampe, le PC est fortement épileptogène (Cheng et al., 2020). Il n'est donc pas surprenant que l'inhibition limite l'excitabilité excessive dans le PC dans plusieurs modèles d'épilepsie (De Curtis et al., 1994; Gavrilovici et al., 2006; Cheng et al., 2020). Les IPSP, ou potentiel postsynaptique inhibiteur, permettraient de limiter les crises épileptiformes en empêchant l'excès de stimulation des neurones pyramidaux (Haberly and Sutula, 1992). En outre, le fonctionnement de l'inhibition du PC a récemment fait l'objet d'une grande attention et de plus en plus d'études s'intéressent à en décortiquer les mécanismes. Il a été proposé que les circuits inhibiteurs contrôlent de façon laminaire et spécifique l'inhibition des cellules pyramidales SL et SP (Jiang et al., 2021a). L'inhibition serait spécifique aux sous-types d'interneurones et les interneurons PV seraient les médiateurs principaux de l'inhibition récurrente du PC (Jiang et al., 2021a). D'autres études ont également montré que la force de l'inhibition sur les cellules pyramidales augmente le long de l'axe rostro-caudal (Luna and Pettit, 2010) et serait régulée par des microcircuits inhibiteurs VIP (Canto-Bustos et al., 2022). Les interneurons VIP seraient alors les médiateurs d'un circuit désinhibiteur qui contrôle la plasticité synaptique pendant la formation des représentations olfactives. Il reste néanmoins à ce jour de nombreuses interrogations sur le rôle des interneurons PV du PC, qui à bien des égards reste une *terra incognita*.

V. Objectifs de la thèse

Les CP sont des fenêtres développementales facilitant la plasticité et l'apprentissage. Étant transitoire, une fois fermée, la plasticité corticale dépendante de l'activité est compromise. Les régions corticales assurant des fonctions distinctes, ont des CP asynchrones, dûes à la maturation respective des cellules PV de chaque aire. La maturation des cellules PV est dépendante de l'accumulation d'OTX2 et de l'expression des PNN qui les entourent. Alors que la formation de PNN coïncidant avec la fermeture de la CP a bien été documentée dans les cortex V1, mPFC et A1 (Spatazza et al., 2013b; Lee et al., 2017), nous avons observé un enrichissement faible en PNN dans le PC de souris adultes (Figure 34). Un cerveau adulte est peu plastique, néanmoins la faible quantité de PNN dans le PC laisse penser qu'il conserverait un haut degré de plasticité même à l'âge adulte. Le premier objectif de ma thèse était de comprendre la relation entre OTX2, les cellules PV et les PNN dans le PC et de comprendre comment ces différents éléments régulent la plasticité corticale olfactive et le comportement de l'animal.

La compréhension des mécanismes des CP pour les connaissances fondamentales et pour les stratégies thérapeutiques requiert de nouvelles méthodes précises. La reconnaissance des GAG par OTX2 est responsable de l'ouverture et de la fermeture des CP. Le second objectif de ma thèse était d'étudier des imitations stables de GAG qui séquestrent préférentiellement OTX2 dans l'ECM, bloquant ainsi son activité cellulaire non-autonome.

RÉSULTATS

Non-cell autonomous OTX2 in the piriform cortex regulates parvalbumin cells and olfactory-driven behavior

Rachel Gibel-Russo, Philippe Mailly, Ariel A. Di Nardo*

Centre for Interdisciplinary Research in Biology (CIRB), Collège de France, CNRS, INSERM, Labex MemoLife, PSL Research University, Paris, France

*Correspondence: ariel.dinardo@college-de-france.fr

Abstract

Periods of plasticity during postnatal development allow cortical functions to adjust in response to the environment. Critical period timing is governed by the maturation of parvalbumin interneurons, a process that is regulated in part by non-cell autonomous activity of the OTX2 homeoprotein transcription factor. The transfer of OTX2 into parvalbumin interneurons regulates the opening and closure of critical periods in primary and higher-order cortices. Here, we find that the adult mouse piriform cortex displays particularly low maturation of parvalbumin interneurons that very gradually increases in aged animals. Viral modulation of OTX2 levels in the piriform cortex directly affect parvalbumin expression and extracellular perineuronal nets. Reducing OTX2 transfer to piriform cortex parvalbumin interneurons alters the expression of genes implicated in perineuronal nets and disrupts olfactory-driven memory.

Keywords

parvalbumin, perineuronal nets, homeoprotein, homeodomain, piriform cortex, single-chain antibody

Introduction

The piriform cortex (PCx) is a three-layered paleocortex which receives sensory inputs from the olfactory bulb (OB) and plays significant roles in odor perception and odor-driven behaviors. Contrary to sensory regions within the six-layered neocortex, such as the primary visual (V1) or primary auditory (A1) cortices, which have defined topographic inputs and subsequent outputs to higher-order sensory regions, the PCx is an associative region with diffuse sensory inputs (Johnson et al., 2000; Shepherd, 2011; Bekkers and Suzuki, 2013; Giessel and Datta, 2014; Klingler, 2017). It is divided into anterior (aPCx) and posterior (pPCx) regions that differ in connectivity and function (Neville and Haberly, 2004), with the aPCx receiving dense OB afferents to instruct odor identity, and the pPCx receiving fewer OB afferents and encoding odor qualities and associations. These circuits receive inputs from other olfactory areas as well as associative areas, such as medial prefrontal cortex (mPFC), hippocampus (HC), and basolateral amygdala (BLA), and also receive recurrent inputs from within the PCx. Local GABAergic interneurons provide feedforward inhibition, feedback inhibition, and disinhibition in the PCx for the enhancement of weak input signals, the prevention of hyper-excitability, and other functions required for shaping odor representations and associative responses (Poo and Isaacson, 2009; Franks et al., 2011; Large et al., 2018; Frank et al., 2019; Jiang et al., 2021; Suzuki et al., 2022). Parvalbumin (PV) interneurons in the PCx are located in the deeper layers L2 and L3 and provide feedback inhibition to L1b, L2 and L3 pyramidal cells (Johanning et al., 2009; Suzuki and Bekkers, 2010). While their function in PCx circuitry is not completely understood, they have similar roles to neocortex PV cells, as recent studies have shown that these PV cells regulate spike activity, backpropagation, and induction of NMDA-dependent associative long-term potentiation (Johanning et al., 2009; Large et al., 2016; Jiang et al., 2021; Canto-Bustos et al., 2022).

In the neocortex, PV cell maturation during juvenile postnatal brain development drives critical periods of heightened plasticity that shape neural circuits according to the surrounding environmental and biological constraints (Reh et al., 2020). In primary sensory areas, PV cells residing in layer IV receive thalamocortical inputs and regulate action potentials and backpropagation through feedforward inhibition of local pyramidal cells (Hensch, 2005). The timing of critical periods depends on the cortical region and the quality of sensory activity. For example, upon hearing onset, thalamocortical refinement occurs in A1 during a critical period from postnatal day (P) 12 to P15 in mice that can modify tonal response strength and topographic mapping (Takesian et al., 2018). These unique critical periods occur across modalities and in higher-order cortical areas, such as mPFC, from early childhood to

adolescence. Owing to the associative role of the PCx, and the ongoing learning of odors, the rodent PCx unsurprisingly shows sustained adult plasticity (Wilson and Sullivan, 2011; Chapuis and Wilson, 2012) but the existence of critical periods remains unaddressed.

PV cell maturation is required for the onset of critical periods throughout the cortex, with subsequent closure of critical periods involving sustained PV cell activity and consolidated circuitry, and providing gamma band oscillation for inter-region coherence (Reh et al., 2020). This consolidated state is maintained by molecular breaks of plasticity, which include myelination and condensed extracellular matrix perineuronal nets (PNNs) surrounding PV cells (Fawcett et al., 2019; Testa et al., 2019). While PNNs are detected throughout the adult brain, some PV cells in the HC CA3 region are devoid of PNNs and show dynamic PV expression reflective of their level of plasticity allowing for continued adult learning (Donato et al., 2013). Indeed, removal of breaks in non-plastic cortex can allow for adult plasticity: reduction of PNNs in V1 permits recovery from amblyopia in rodent models (Pizzorusso et al., 2006; Beurdeley et al., 2012). While recent studies suggest PV cells within PCx can express PNNs (Ueno et al., 2019), it is unclear whether a critical period occurs in the PCx. Firstly, PCx cytoarchitecture is more similar to that of the HC, with feedback PV cells in a three-layered structure (Shepherd, 2011). Secondly, the PCx is unique in that it is within two synapses of direct sensory input and yet performs associative functions. The PCx lacks odor-driven topography and the sparsely activated unique ensembles of neurons drift in time independently of odor (Schoonover et al., 2021). Finally, the PCx receives input from the OB, which undergoes continued circuitry remodeling through adult neurogenesis that attenuates with age (Gheusi and Lledo, 2014). Thus, the PV cells within PCx are likely required to maintain dynamic range in activity during adulthood, which appears in contradiction with the reported existence of PNNs.

The maturation of PV cells in V1, A1, and mPFC has been shown to be regulated in part by the non-cell autonomous activity of the OTX2 homeoprotein transcription factor (Lee et al., 2017; Vincent et al., 2021). Its activity promotes PV expression and critical period onset and also participates in critical period closure through induction of PNN expression (Sugiyama et al., 2008; Beurdeley et al., 2012). OTX2 can potentially reach all corners of the brain as it is secreted into the cerebrospinal fluid (CSF) by the choroid plexus and transferred specifically into cortical PV cells (Spatazza et al., 2013). OTX2 has been detected throughout the cortex but its accumulation has not been reported in PCx. We find that OTX2 indeed accumulates in PCx PV cells and that modulating OTX2 levels affects olfactory-driven behavior and directly impacts PV and PNN expression, suggesting paleocortex feedback PV cells can be controlled by OTX2 similar to neocortex feedforward PV cells.

Materials & Methods

Animal management

All animal housing and experimental procedures were carried out in accordance with the recommendations of the European Economic Community (2010/63/UE) and the French National Committee (2013/118). This research (project n° 19086) was validated by the regional ethics committee (CEA 59) and authorized by the French Ministry of Higher Education, Research and Innovation. Adult C57BL/6J wildtype (WT) mice were obtained from Charles River Laboratories, while *PV::Cre* (strain n° 017320) and *Rosa-tdTomato* (*Ai14* strain n° 007914) reporter mice were generated from JAX founders. The *scFvOtx2^{tg/o}* mice were generated as previously described (Bernard et al., 2016). The double transgenic crosses (*PV::Cre;Rosa-tdTomato* and *PV::Cre;scFvOtx2^{tg/o}*) were generated in-house. Mice were housed with *ad libitum* access to food and water and under a 12h light/dark cycle. For surgical procedures, animals were anesthetized with xylazine (Rompun 2%, 5 mg/kg) and ketamine (Imalgene 500, 80 mg/kg) by intraperitoneal injection.

Stereotaxic injections

Adeno-associated viruses (AAV) were generated by Vector Biolabs (Malvern, PA, USA): AAV8(EF1a)-DIO-scFvOtx2-2A-GFP and AAV8(EF1a)-DIO-GFP-2A-Otx2. Unilateral or bilateral stereotaxic injections (bregma: x = 3.8 mm, y = ± 0.6 mm, z = 4 mm) of 0.5 µl high-titer AAV (~10¹³ GU/ml) were performed with a Hamilton syringe at a rate of 0.1 µl/min. Mice were used for histological and behavioral analysis at least 3 weeks after infection.

Quantitative RT-PCR

Mice were sacrificed by cervical dislocation and PCx was micro-dissected in ice-cold phosphate buffered saline (PBS) and frozen on dry ice. Total RNA was extracted with AllPrep DNA/RNA Mini Kit (Qiagen). cDNA was synthesized from total RNA with QuantiTect Reverse Transcription kit (Qiagen). Quantitative PCR reactions were carried out in triplicate with SYBR Green I Master Mix (Roche) on a LightCycler 480 system (Roche). Expression was calculated by using the 2^{-ΔΔCt} method with *Gapdh* as housekeeping reference gene. Primer sequences:

Adam10, F-GGGCTCTCCATGTAATGACTTC, R-CACAATCCACTCAGCAATGTTT

Adamts9, F-GTAAGCACCTTCCTAAGCCAC, R-GATCTGACAGCCCACATGCCTC

Tnr, F-TTGTGAGAGACAGCAGAGCG, R-TCTGTCTCTGCGTGTTGAGC

Mmp9, F-CATAGAGGAAGCCCATTACAGG, R-CCTGTCTACACCCACATTTGAC

Hapln1, F-ATGTAAGCGGAAGGCATTCTAA, R-AATCCTGGTGATTCTCAGCCTA
Hapln4, F-GGTGCACTGCAGACT, R-AGCGACCAAGAACCACAACA
Chst3, F-CCCCAAGATGGTCTCGTGTT, R-GCCCAGGCCCTGATTTTAGT
Chst7, F-GGGACTCGTCGAGGACAAAG, R-CCTTTAGGTTGAGGCCTGGG
Chst11, F-AAAGTATGTTGCACCCAGTCAT, R-GGATGGGATTGTAGAGCTCCTG
Chst13, F-TTTTCCAGGACATCAGCCCC, R-ACACCCTTATTGCAGTCGCA
Chst14, F-CATCCTATCGGAGATGAAACCC, R-GATAGGCCTCTAGGCTTAGGAT
Chst15, F-CATTCTGACCCAAGACTTCAT, R-AGTCTGAGTACAACCTCTCCAC
Gapdh, F-TGACGTGCCGCCTGGAGAAAC, R-CCGGCATCGAAGGTGGAAGAG

RNAscope fluorescent in situ hybridization

Mice were given a lethal dose of Euthazol and perfused transcardially (5 ml/min) with 15 ml of PBS followed by 15 ml of 4% paraformaldehyde (PFA) in PBS. Dissected brains were post-fixed in 4% PFA, PBS at 4 °C overnight and then rinsed extensively in PBS. Coronal vibratome sections (40 µm) were incubated with RNAscope hydrogen peroxide solution from Advanced Cell Diagnostics (ACD) for 10 min at room temperature (RT), rinsed in Tris-buffered saline with Tween (50 mM Tris-Cl, pH 7.6; 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20) at RT, collected on Super Frost plus microscope slides (Thermo Scientific), dried at RT for 1 h, rapidly immersed in ultrapure water, dried again at RT for 1 h, heated for 1 h at 60°C and dried at RT overnight. The next day, sections were immersed in ultrapure water, rapidly dehydrated with 100% ethanol, incubated at 100 °C for 15 minutes in RNAscope 1X Target Retrieval Reagent (ACD), washed in ultrapure water and dehydrated with 100% ethanol for 3 minutes at RT. Protease treatment was carried out using RNAscope Protease Plus solution (ACD) for 30 minutes at 40°C in a HybEZ oven (ACD). Sections were then washed in PBS before *in situ* hybridization using the RNAscope Multiplex Fluorescent V2 Assay (ACD). The PV probe (Mm-*Pvalb*-C2, ACD catalog #421931-C2) was hybridized for 2 h at 40 °C in a HybEZ oven, followed by incubation with signal amplification reagents according to manufacturer instructions. The images were acquired with a W1-CSU spinning-disk ZIESS Axio Observer Z1 microscope.

Immunohistochemistry

Anesthetized mice were perfused transcardially (5 ml/min) with 15 ml of PBS and 15 ml of 4% PFA, PBS. Dissected brains were post-fixed in 4% PFA, PBS at 4 °C overnight and then rinsed extensively in PBS. Fluorescent immunohistochemistry was performed on coronal vibratome sections (40 µm). Briefly, after permeabilization and blocking with PBS, 1% Triton, 5% fetal

bovine serum (FBS) for 45 min at RT, sections were incubated in PBS, 1% Triton, 5% FBS overnight at 4 °C with primary antibodies: anti-OTX2 (mouse monoclonal, in house, 1/50); anti-PV (rabbit polyclonal, Swant, 1/500); biotinylated *Wisteria floribunda* agglutinin (WFA; Sigma L1516, 1/500); anti-GFP (chicken polyclonal, Abcam, 1/800); and anti-cFos (rabbit monoclonal, Cell Signaling, 1/500). After 3 washes in PBS, secondary antibodies (Alexa Fluor-conjugated, Molecular Probes, 1/2000) were incubated for 90 min at RT. After 3 washes in PBS, sections were mounted in DAPI-fluoromount medium and kept at 4 °C. Images were acquired with either a ZEISS Axio Zoom.V16, Leica DM16000 SP5 confocal, or W1-CSU spinning-disk ZEISS Axio Observer Z1 microscope. Cell number and staining intensity were quantified with ImageJ and in-house macros.

Behavior analyses

Odor memory test

The 3-chambered testing apparatus consisted of a grey-colored PVC arena (dimensions $l \times d \times h$ in cm: 78 x 45 x 30) with a smaller central chamber and two external chambers. Two cylindrical cages (10.2 cm in diameter and 18 cm tall) containing odor balls were placed in the external chambers at least 10 cm away from the walls. The cages and the arena were thoroughly cleaned with 70 % ethanol between each trial. Clean 5 cm wooden balls containing a cotton swab were introduced into the cylindrical cages just prior to acquisition. The odors (Sigma Aldrich), 0.3% ethyl-butyrate and 0.3% limonene, were diluted in mineral oil (Sigma Aldrich).

For habituation, the mice were kept in their home cage and spent 4 h on Day 1 in the testing room without the experimenter. On Day 2, the mice spent 4 h in the testing room with the experimenter and were placed individually for 10 min in the arena without odor cages. Mice were returned to the housing area after each habituation phase. During the acquisition phase on Days 3 and 4, the mice were individually placed in the center chamber with both cages containing the same odor. Mouse movement was recorded for 5 min in the absence of the experimenter. On Days 3 and 4, two 5-min acquisition trials were performed spaced 3 h apart to provide a total of four acquisition trials. Mice were returned to the housing area after the daily trials.

For the memory test, the mice were water-deprived on Day 9 in order to increase motivation. On Day 10, mouse movement was recorded for 5 min in the arena with one chamber containing the acquisition odor and the other chamber containing a novel odor. The cages and the arena were thoroughly cleaned with 70% ethanol between each trial, and the location of the novel odor was alternated between chambers for subsequent trials. Odor investigation time was

defined as the amount of time the snout was directed towards an odor cage (within 45°) within a 2 cm radius. Novel odor preference was defined as the ratio of novel-odor to total-odor investigation time.

Odor-induced protein c-Fos staining

Odors were delivered using a 4-channel olfactometer (Automate Scientific). Clean air (pressure, 3 atm) was directed to 4 individual air lines each connected to a 10 mL glass bottle containing mineral oil (Sigma Aldrich) in which the odors were diluted. The bottles themselves were connected via Tygon tubing to computer-controlled (Arduino) solenoid valves (Valvelink, Automate Scientific). Four different freshly-prepared odors (Sigma Aldrich) were tested: empty bottle, 0.3% ethyl-butyrate, 0.3% hexanal, and 0.3% limonene. The testing apparatus consisted of a clear polycarbonate box (dimensions $l \times d \times h$ in cm: 37.5 x 23 x 10.5) with a 5 cm wooden ball placed at the exit of a scent port controlled by the olfactometer. The box was thoroughly cleaned, inside and out, with 70 % ethanol at the end of each trial. Clean wooden balls were introduced into the box at the beginning of each acquisition.

The mice were habituated to the testing room and the experimenter 24 h before the day of testing and were water-deprived to increase motivation. On the day of the trial, the mice were kept in their home cage and habituated to the wooden balls in the testing room. During the pre-trial phase, the mice were individually placed in the box for 10 min. They were then presented with each of the 4 odors 5 times randomly for 20 sec (trial) spaced by 40 sec (inter-trial interval, ITI). Mice were sacrificed by perfusion at either 0, 1.5, or 3 h after the end of the trial phase for histological analysis of cFos staining.

Statistical Analysis

All statistics were performed using Prism (version 9.3.0, GraphPad Software). Main effects and interactions with more than 2 groups were determined using analyses of variance (ANOVA) or 2-way ANOVA with Tukey's multiple comparison *post hoc* test. The *t*-test was used for single comparisons among two groups.

Results

PV cell maturation kinetics depends on brain structure and cell subtype

In order to facilitate quantification of PV intensity, we initially turned to the oft-used *PV::Cre x Rosa-tdTomato* (*PV-tdTom* hereafter) cross for genetic identification of PV cells independent of PV expression level (Donato et al., 2013; Tang et al., 2014). As PV is expressed in various regions throughout the brain, including V1, HC, BLA, mPFC and the PCx (Celio, 1990), we first sought to compare the distribution and maturation level of PV cells across these regions in adult P90 mice (Figure 1A-C). In *PV-tdTom* mice, the tdTomato red fluorescent protein (TOM) localizes throughout the cell and its expression level is not correlated with that of PV. We found a higher density of PV+ cells in V1, and a higher density of TOM+ cells in V1 and mPFC compared to the other regions (Figure 1B). Within the HC, we detect more PV+ and TOM+ cells in CA1-3 compared to the dentate gyrus (DG). Thus, the density of PV cells is clearly dependent on brain region, as previously shown (Kim et al., 2017; Bjerke et al., 2021). To evaluate the maturation level of PV cells in each region, we calculated the number of TOM+ cells that also stained for PV+ (Figure 1C), since this allows to count “immature” PV cells not expressing PV. We found PV cells in V1, BLA and CA1-3 to be significantly more “mature” than in DG, mPFC and PCx. To further evaluate PV cell maturation, we also performed WFA staining which detects the PNNs around “mature” PV cells (Figure 1C). Although this technique relies on detecting PV expression and will thus miss fully “immature” PV cells, such as the PV-TOM+ cells, the pattern PV cell maturation across regions was found to remain the same. Thus, we consider the PV+TOM+ and WFA+PV+ methods equally robust for quantifying PV cell maturation level, and that sustained inhibition driven by PV cells is likely less strong in the PCx compared to V1 and CA of P90 mice.

It is known that not all PV cells express TOM in *PV-tdTom* mice (Madisen et al., 2010) and that *PV::Cre* mice can provide low efficiency labeling in some brain regions (Nigro et al., 2021), but a recent study suggests there may be a high amount of overlap between TOM and PV expression in aPCx of adult *PV-tdTom* mice, although data was reported for one animal only (Large et al., 2016). To determine the level of heterogeneity in the PCx PV cell population, we calculated the level of PV staining intensity in both PV+TOM+ and PV+TOM- cells (Figure 1D). Surprisingly, we observed a bias of PV cell intensity toward the TOM+ population, suggesting that the most mature cells are TOM positive. Indeed, we also observed a similar bias for the intensity of WFA (Figure 1E), suggesting that the TOM+ cell population is a distinct cellular subpopulation of all PV cells. Furthermore, only ~50% of the PV cells express TOM in the PCx of P90 mice (Figure 1F). Given that the purpose of this study was to evaluate PV

cell maturation in the PCx, a region for which this has not been previously evaluated, we chose to not use *PV-tdTom* mice for subsequent in order to avoid potential bias in cell subtype. The *PV-tdTom* mouse model provides the advantage of detecting PV+ cells with very low PV expression levels, and in the adult PCx ~30% of TOM+ cells have undetectable levels of PV staining (PV-TOM+ group in Figure 1F). Thus, by ignoring the PV-TOM+ cell population, we may be missing information regarding the immature low-activity PV cells. However, this population only represents ~16% of detected PV cells in the PCx (Figure 1F). Thus, the quantification of PV staining levels in the PCx provides a fairly accurate picture of PV cell maturation despite not taking into account PV cells with undetectable levels of PV expression.

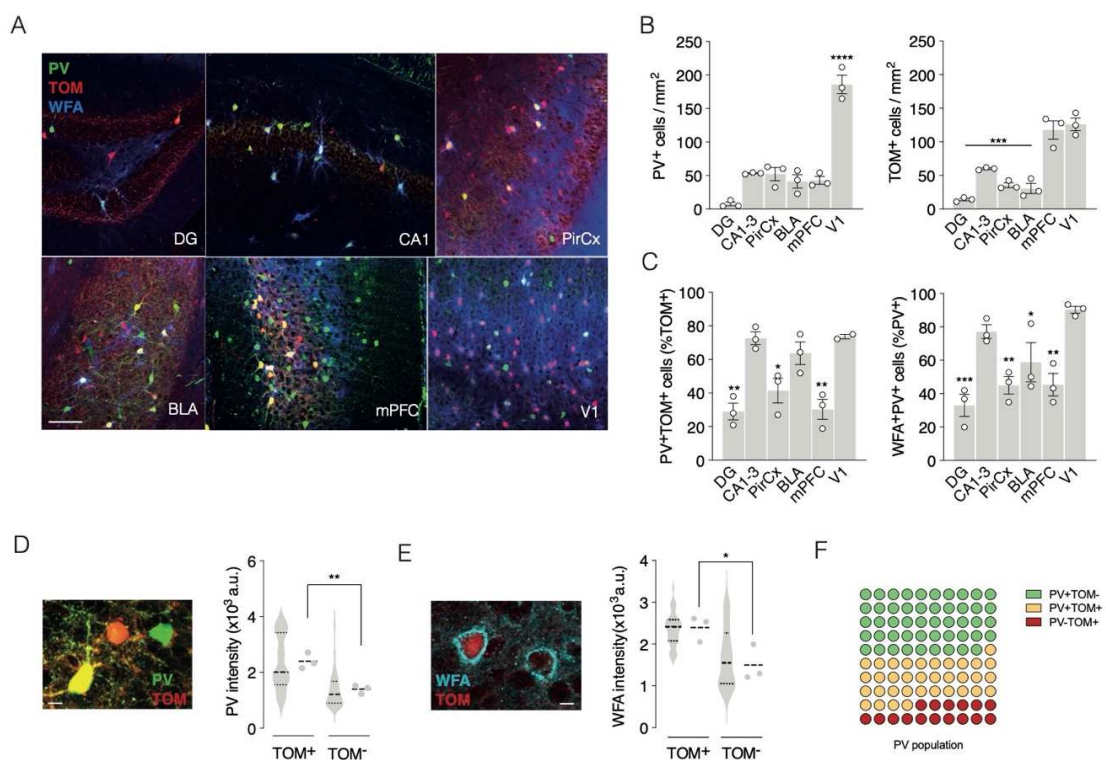


Figure 1. PV cell maturation kinetics depends on brain region and cell subtype in the PCx.

(A) Representative images of PV, TOM and WFA staining in the Hc (DG and CA1), PCx, BLA, mPFC, and V1 at P100 in *PV-tdTom* mice. (B) Number of PV and TOM positive (+) cells in the Hc (DG and CA1-3), PCx, BLA, mPFC, and V1 at P100 in *PV-tdTom* mice. (C) Percentages of TOM+ cells stained for PV and PV+ cells stained for WFA in the Hc (DG and CA1-3), PCx, BLA, mPFC, and V1 at P100 in *PV-tdTom* mice. (D) Representative image and quantification of PV staining intensity in TOM negative (TOM-) and TOM+ cells in PCx. Scale bar, 10 μ m. (E) Representative image and quantification of WFA staining intensity in TOM- and TOM+ cells in PCx. Scale bar, 10 μ m. (F) Distribution of TOM+ and TOM- cells in the identified PV cell population. All values \pm SEM; n = 3 mice per group; one-way ANOVA, post hoc Tukey's or Dunnett's test in (B, C); t-test in (D, E); * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Piriform cortex matures late and depends on non-cell-autonomous OTX2

Compared to V1 in which PNN formation is highly enriched after CP closure (Pizzorusso et al., 2002; Lee et al., 2017), we observed significantly reduced PNN enrichment in the PCx of adult mice (Figure 1C). Given that PNNs around PV cells are a hallmark of consolidation and reduced plasticity, we hypothesized that this associative cortex remains plastic at P90. To more fully characterize PV cells in this 3-layered region, we separated analysis between the aPCx and posterior PCx (pPCx) subregions, which have different cytoarchitecture and connectivity (Neville and Haberly, 2004), and focused on cortical layers 2 and 3 given the absence of PV cells in layer 1 (Ekstrand et al., 2001; Suzuki and Bekkers, 2010). We also analyzed PV cells in P400 mice to determine whether the PV expression kinetics beyond P100 is either stable or continues to mature. For both ages, we observed no differences between the aPCx and pPCx, but found a significant increase in the number of PV cells in both aPCx and pPCx at P400 (Figure 2A). Throughout the brain, PV cells are a heterogeneous population with varying degrees of PV expression showing different stages of maturity. Previous studies in the HC have shown that low or high PV states are associated with increased GABAergic or excitatory synaptic inputs to the PV cells themselves, respectively (Donato et al., 2013). The low state corresponds to a plastic state in contrast to the high state which suggests a consolidated state. Thus, we defined a PV cell classification based on the level of PV staining intensity. The distribution of PV cells is similar between PCx regions and depends on age (Figure 2B). In younger animals, the PV cell group with the lowest PV intensity (PV-low) represents almost 50% of the total number of PV cells, whereas in older animals, PV-low is the least represented class (Figure 2B).

Since OTX2 is secreted from the choroid plexus into the CSF, recognizes PNN, and is internalized in PV cells regulating their maturation in several cortices (Spatazza et al., 2013; Lee et al., 2017; Vincent et al., 2021), we thought that it could be potentially involved in PCx maturation. Similar to PV staining, both OTX2+ and WFA+ cell numbers increased with age (Figure 2C). Furthermore, the percentages of PV+ cells co-stained with WFA and the percentage of OTX2+ cells co-stained with PV also increased in P400 mice (Figure 2C). Taken together, these results show that the expression of PV and WFA and the accumulation of OTX2 is age-dependent, and that the PCx undergoes late maturation compared to other cortices. However, while the kinetics of the distribution of PV staining intensity do not differ between aPCx and pPCx, we observed a significant increase in WFA staining intensity at P400 compared to P100 only in the aPCx (Figure 2D), suggesting that it matures differently.

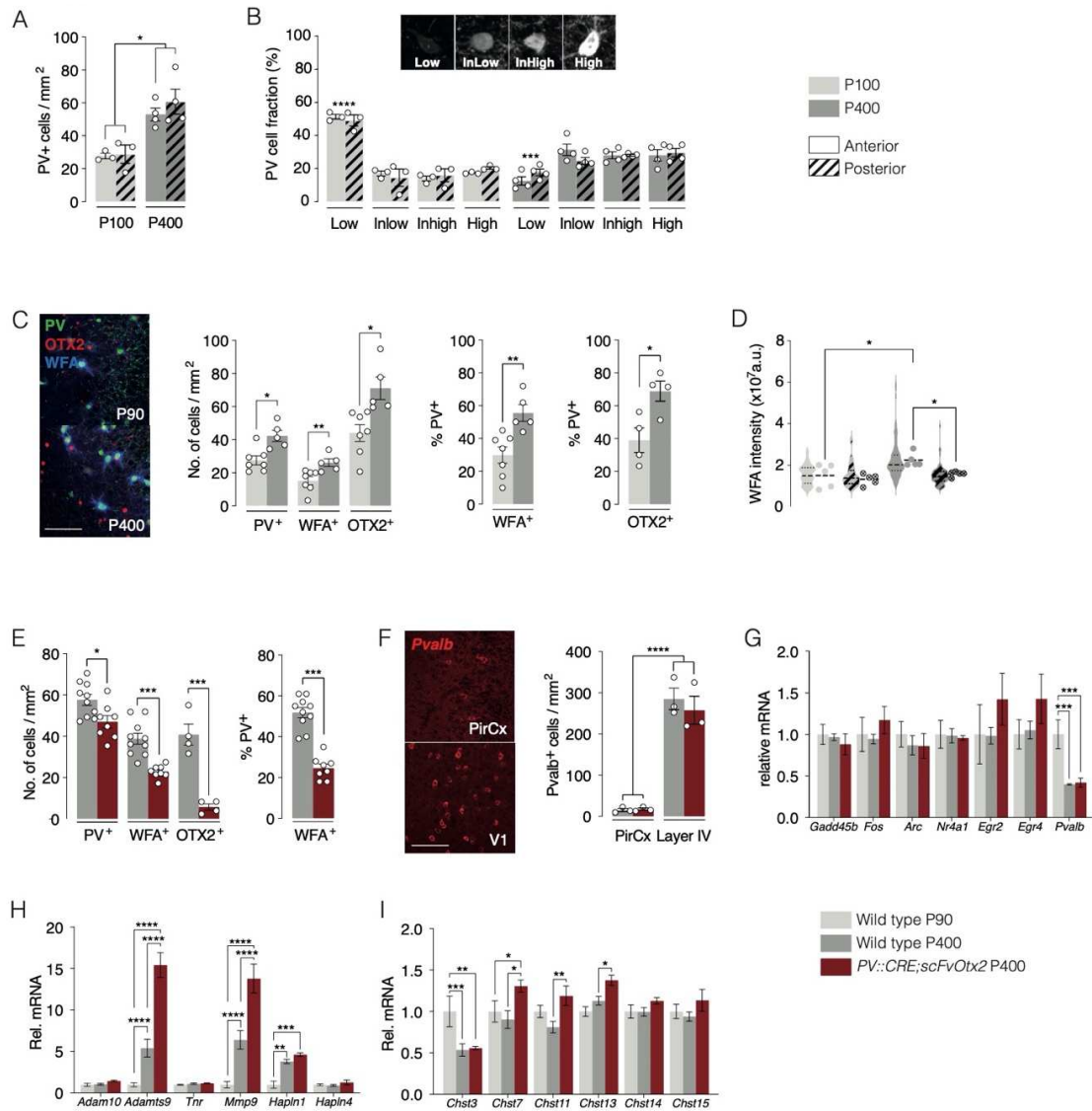


Figure 2. The piriform cortex matures late and depends on non-cell-autonomous OTX2.

(A) The number of PV⁺ cells in aPCx and pPCx at P100 and P400 (n = 3-4 mice per group). (B) The distribution of the level of PV staining intensity in aPCx and pPCx at P100 and P400. Inset shows example images of PV staining intensity for each category (from left to right: low-PV staining, intermediate-low-PV staining, intermediate-high-PV staining, high-PV staining; n = 3-4 mice per group). (C) Representative images and quantification of the number of PV⁺, WFA⁺, OTX2⁺ cells and percentage of PV⁺ cells stained with either WFA or OTX2 (n = 4-7 mice per group). (D) The intensity of WFA staining in PV⁺ cells (n = 5 mice per group). (E) The number of PV⁺, WFA⁺, and OTX2⁺ cells and the number of PV⁺ cells stained for WFA in P400 WT and *PV-scFvOtx2* mice (n = 4-10 mice per group). (F) Representative images and quantification of the number of cells expressing *Pvalb* mRNA in PCx and V1 layer IV of WT and *PV-scFvOtx2* P400 mice (n = 3 mice per group). Scale bar, 100 μ m. (G) Quantitative PCR analysis of plasticity-related genes and *Pvalb* (n = 4-5 mice per group). (H) Quantitative PCR analysis of ECM components (n = 4-5 mice per group). (I) Quantitative PCR analysis of *Chst* genes (n = 4-5 mice per group). All values \pm SEM; one-way ANOVA, post hoc Tukey's (A, D, F- I); two-way ANOVA in (B); *t*-test in (C, E); **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001.

To investigate the role of OTX2 in critical periods, we generated *PV::Cre;scFvOtx2^{tg/0}* knock-in mouse lines (*PV-scFvOtx2* hereafter) in which a neutralizing single-chain variable fragment (scFv) against OTX2 is secreted from PV cells and traps OTX2 in the extracellular milieu (Bernard et al., 2016). Blocking OTX2 prevents its recognition by PNN and thus its

accumulation around PV cells and subsequent internalization. To follow PV cell maturation, P400 PCx sections were stained for OTX2, PV, and WFA (Figure 2E). The expression of scFv-OTX2 reduces the number of OTX2+ cells by ~75%, the number of WFA+ cells by ~50%, and the number of PV+ cells by ~30%. Furthermore, the number of PV+ cells that have PNNs (WFA+PV+) is significantly reduced compared to WT (Figure 2E). To verify whether the reduction in the number of PV-stained cells was not due to a loss of PV cells, we performed RNAscope in situ hybridization (ISH) comparing V1 to PCx in both WT and *PV-scFvOtx2* mice (Figure 2F). We found no difference in *Pvalb* RNA levels between genotypes, suggesting that the decrease in PV cell number is due to a relative increase in the PV-low population that cannot be detected by PV staining. Thus, blocking extracellular OTX2 delays the maturation of the PCx suggesting that OTX2 could act as a regulator of PCx plasticity as it does in V1, A1, and mPFC (Lee et al., 2017; Vincent et al., 2021).

To determine whether the changes in PV and WFA staining observed at P400 in both WT and *PV-scFvOtx2* animals are due to altered expression of plasticity-related genes and genes related to PNN components, we quantified mRNA levels from micro-dissected PCx (aPCx and pPCx combined). The expression of plasticity-related genes did not differ between P90 and P400 WT mice, nor between P400 WT and *PV-scFvOtx2* mice (Figure 2G). However, PV expression decreased by more than 50% at P400, in both WT and *PV-scFvOtx2* mice (Figure 2G). Given that the number of PV-stained cells increase between P100 and P400 WT mice, this decrease in mRNA suggests that PV expression is largely regulated at the level of translation such that *Pvalb* mRNA and PV protein levels are not correlated.

PNNs are dynamic ECM structures composed of hyaluronan, chondroitin sulfate proteoglycans (CSPGs), and scaffolding proteins that typically condense around PV cells (Fawcett et al., 2019). The timely synthesis or degradation of ECM are important features of development, morphogenesis, tissue repair, and plasticity, and the ADAM and MMP families of extracellular proteases are often involved in ECM remodeling (Huntley, 2012; Kelwick et al., 2015), while tenascin-R (TNR) and the HAPLN family are involved in PNN stabilization (Deepa et al., 2006). Among the various genes we analyzed, *Adamts9*, *Mmp9*, and *Hapln1* are the only ones with significant increases in gene expression between P100 at P400 WT mice (Figure 2H), suggesting that the PCx PNN is reorganized in aged mice. The proteases and HAPLN1 should have opposing effects on PNN stability, but the net effect is an increase in PNNs with age (Figure 2B). On the other hand, *PV-scFvOtx2* mice have increased *Adamts9* and *Mmp9* expression compared to P400 WT mice, with no change in *Hapln1*, which could explain the observed decrease in PNNs in these mice (Figure 2E). Because OTX2 preferentially

recognizes di-sulfated CSPGs and participates in a feedback loop to increase PNN expression (Di Nardo et al., 2018), we also quantified the expression of chondroitin sulfate transferase (Chst) family. These enzymes add sulfates to *N*-acetylgalactosamine (GalNac) of chondroitin sulfate (CS) (Mikami and Kitagawa, 2013), leading to several CSPG subtypes for which the pattern of sulfation defines their charge structure, binding affinities, and biological functions (Kitagawa et al., 1997; Sugahara and Mikami, 2007; Testa et al., 2019). CHST3 and CHST7 sulfate at position 6 (6S) on GalNac, while CHST11, CHST13, and CHST14 sulfate at position 4 (4S) on GalNac, which can be subsequently sulfated on position 6 by CHST15 to give 4S/6S di-sulfated CS. The level of 6S has been shown to decrease with age, while the 4S/6S ratio increases with cortical maturation (Miyata et al., 2012). Only *Chst3* has altered expression and decreases in P400 WT mice (Figure 2I), which is consistent with decreasing 6S levels in neocortex with age (Miyata et al., 2012). While a similar decrease is also observed in *PV-scFvOtx2* mice, they also have increased expression of *Chst7*, *Chst11*, and *Chst13*, which provide mono-sulfated CSPGs (CS type-A and type-C) and the precursors for di-sulfated CSPGs (CS type-D and type-E). While we observe no change in *Chst15*, which provides di-sulfated CSPG (type-E) that bind OTX2 (Beurdeley et al., 2012; Miyata et al., 2012), the decreased OTX2 uptake by PV cells in *PV-scFvOtx2* mice is very likely affecting sulfation patterns in the ECM of the PCx.

The piriform cortex undergoes remodeling after acute reduction of OTX2 transfer

Because the *PV-scFvOtx2* mouse model results in brain-wide disruption of OTX2 transfer into PV cells, we performed acute OTX2 loss-of-function locally in PCx to ensure that our observations are due to intrinsic changes. We used a double-floxed inverse open (DIO) reading frame AAV8-EF1a-DIO-GFP-2A-scFvOtx2 virus injected in PCx of *PV::CRE* mice for conditional PV-cell-specific expression, and detected GFP expressing neurons in both aPCx (AP +1.5 from bregma) and pPCx (AP -0,5 from bregma) 3 weeks after injection at P90 (Figure 3A). As with the *PV-scFvOtx2* mice at P400, we observed an extensive loss of OTX2+ cells, and a ~50% loss of WFA+ cells. For PV+ cells, there was no difference in the aPCx while there was a significant decrease in the pPCx (Figure 3B). Nevertheless, scFvOtx2 expression decreased PV cell maturation in both aPCx and pPCx, as assessed by the decrease of WFA and OTX2 staining around and in PV cells, respectively (Figure 3C). Although the number of PV cells in aPCx was unchanged, the distribution in PV staining intensity was significantly shifted towards the low-intensity population (Figure 3D). This shift was even more dramatic in the pPCx. Furthermore, not only does the number of WFA+ cells decrease after scFvOTX2

expression (Figure 3B), but so does the average WFA staining intensity per cell (Figure 3E). While gene expression analysis showed no change in most genes, including *Pvalb*, there was a >6-fold increase in *Mmp9* expression (Figure 3F), reminiscent of the *Mmp9* expression increase in *PV-scFvOtx2* mice at P400 (Figure 2H). Moreover, the increase of *Chst14* after scFv-OTX2 expression shows that the sequestration of OTX2 impacts here again the sulfation patterns of CSPGs (Figure 3G). Taken together, these results suggest that blocking locally extracellular OTX2 decreases the maturation of PV cells in the PCx.

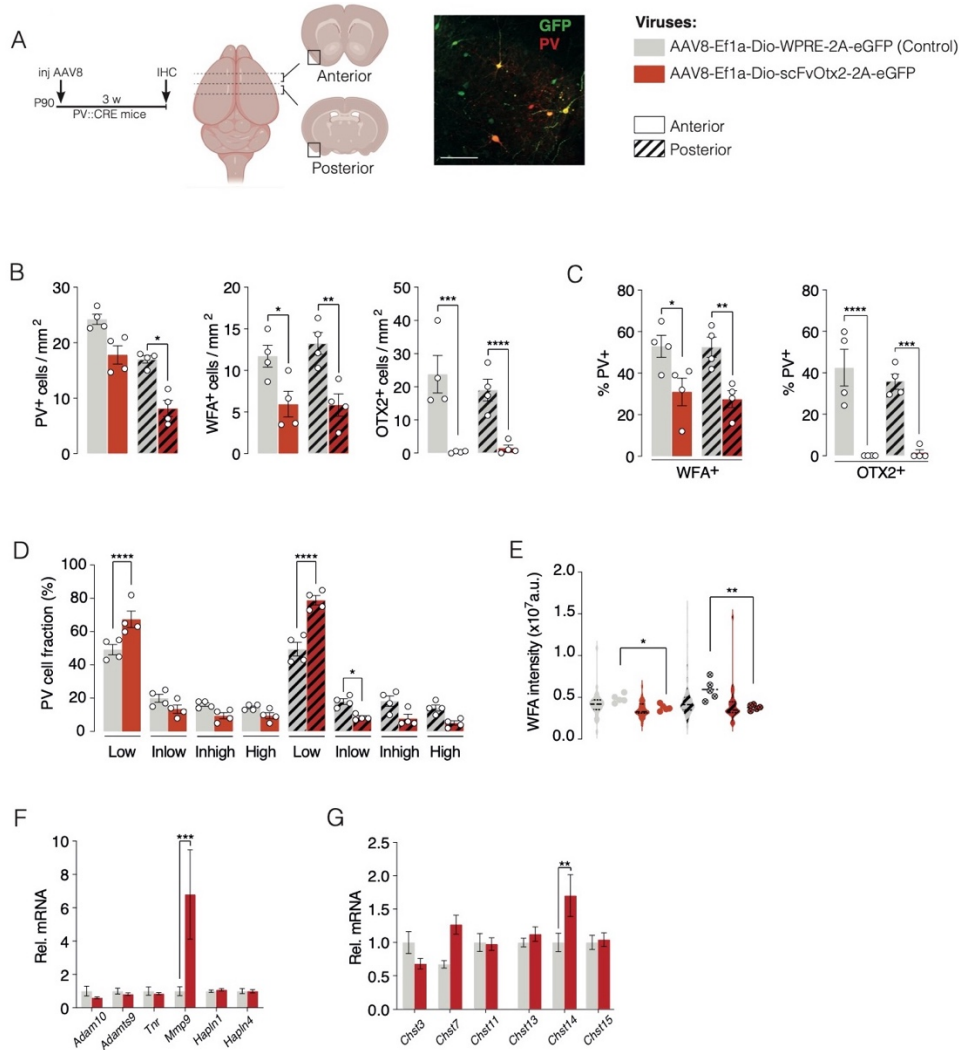


Figure 3. The piriform cortex undergoes remodeling through acute loss of function of OTX2.

(A) The injection paradigm and virus design. (B) The number of PV+, WFA+, and OTX2+ cells in the PCx of P90 *PV::CRE* mice, 3-weeks after stereotaxic injection of virus expressing *GFP* (control) or *scFv-Otx2* (n = 4 mice per group). (C) The quantification of PV cell maturation by the number of PV+ cells stained for either WFA or OTX2 (n = 4 mice per group). (D) The distribution of PV staining level (n = 4 mice per group). (E) The staining intensity of WFA in PV+ cells in PCx (n = 5 mice per group). (F, G) Quantitative PCR analysis of ECM components and *Chst* genes (n = 7-8 mice per group). All values \pm SEM; *t*-test; **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001.

Acute OTX2 expression triggers PV cell maturation

To further investigate the role of OTX2 in PCx maturation, we used a conditional AAV8-EF1a-DIO-GFP-2A-Otx2 virus in *PV::CRE* mice for acute OTX2 over-expression. We observed the same distribution in GFP expression in PCx as for loss-of-function injection (Figure 4A). Interestingly, we found that locally expressing OTX2 in PCx PV cells increases the number of PV+ cells only in pPCx and in both regions for WFA (Figure 4B), which is a pattern similar to OTX2 loss-of-function for which the number was decreased (Figure 3B). Here, this could be explained by the absence of a significant increase in OTX2+ cells in the aPCx (Figure 4B). In both aPCx and pPCx, the acute expression of OTX2 in PV cells triggers PV cell maturation, as shown by the increase in the number of PV+ cells surrounded by WFA or co-staining for OTX2

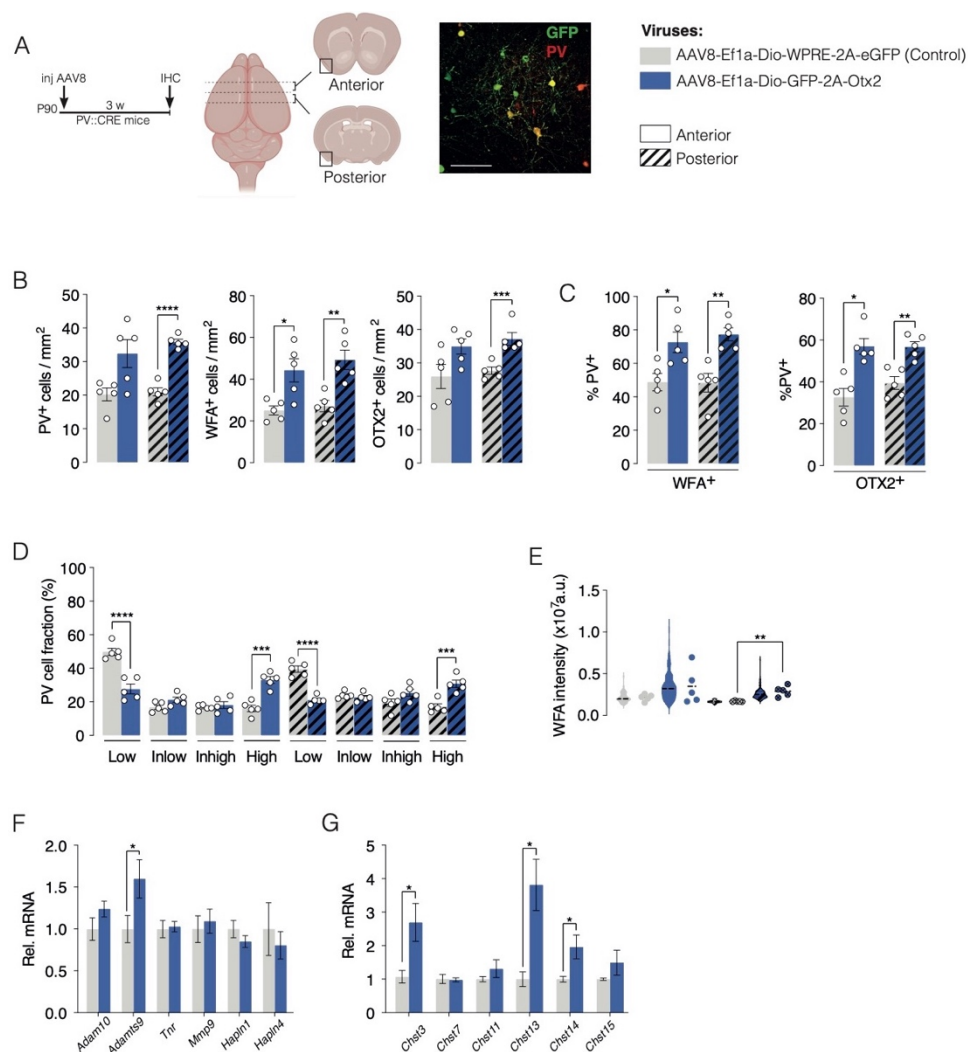


Figure 4. Acute OTX2 expression triggers PV cell maturation.

(A) The injection paradigm and virus design. (B) The number of PV+, WFA+ and OTX2+ cells in PCx of *PV::CRE* mice, 3-weeks after stereotaxic injection of virus expressing *GFP* (control) or *Otx2* ($n = 5$ mice per group). (C) The quantification of PV cell maturation by the number of PV+ cells stained for either WFA or OTX2 ($n = 5$ mice per group). (D) The distribution of PV staining level ($n = 5$ mice per group). (E) The staining intensity of WFA in PV+ cells in PCx ($n = 5$ mice per group). (F, G) Quantitative PCR analysis of ECM components and *Chst* genes ($n = 6-12$ mice per group). All values \pm SEM; *t*-test; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

(Figure 4C), and by the significant shift in PV staining intensity towards the high-intensity population (Figure 4D). While WFA intensity did not change in aPCx, it was increased in the pPCx (Figure 4E). Analysis of PNN component gene expression in PCx revealed an increase in *Adamts9* as well as *Chst3*, *Chst13*, and *Chst14* (Figure 4F-G), suggesting OTX2 overexpression causes PNN reorganization and changed sulfation patterns.

Impact of OTX2 in olfactory performance

To test whether acute changes in OTX2 levels within PV cells impacts PCx activity, we determined whether engaged olfaction by mice injected with AAV8-EF1a-DIO-GFP-2A-scFvOtx2 or AAV8-EF1a-DIO-GFP-2A-Otx2 showed altered cFos staining compared to control-injected mice (Figure 5A, S1). Mice were sacrificed either at 1.5 h, or 3 h after a 20-minute session involving random presentation of 4 different odors. While the number of cFos+ cells as well as cFos staining intensity increased in the PCx compared to untreated control mice, the effect was larger in pPCx (Figure 5B, S1). In mice injected with AAVs, we observed no change in cFos+ cell density in aPCx compared to control at 3h, but observed a significant decrease in the pPCx of the acute loss-of-function mice compared to control mice (Figure 5B). Interestingly, while cFos staining intensity increased in the PCx of all AAV-injected mice, the increase was significantly higher in GFP+ cells in the aPCx of both models, and in the pPCx of the loss-of-function model (Figure 5C). However, the overall intensity of PV staining was decreased in cFos+ cells across the PCx of the loss-of-function model compared to control and the gain-of-function model (Figure 5D), suggesting that reducing OTX2 transfer decreases PV staining but not activity.

To test whether acute decrease in OTX2 levels within PCx PV cells impacts animal behavior, we evaluated olfactory memory in mice injected with AAV8-EF1a-DIO-GFP-2A-scFvOtx2 compared to control-injected mice. Olfactory performance was evaluated at P100 using a 3-chambered odor preference test (Figure 5E). Odor memory was acquired by 4 different 5-minute sessions within 48 h during which the same odor was presented in both chambers. Odor memory was tested 4 days later by changing the odor in one chamber and measuring the time spent near the odors in each chamber (Figure 5F). The loss-of-function mice showed decreased overall olfactory interest by spending less time investigating the odors. Furthermore, they were significantly less interested in the novel odor compared to control mice, suggesting that reducing OTX2 transfer to the PCx PV cells decreases olfactory memory.

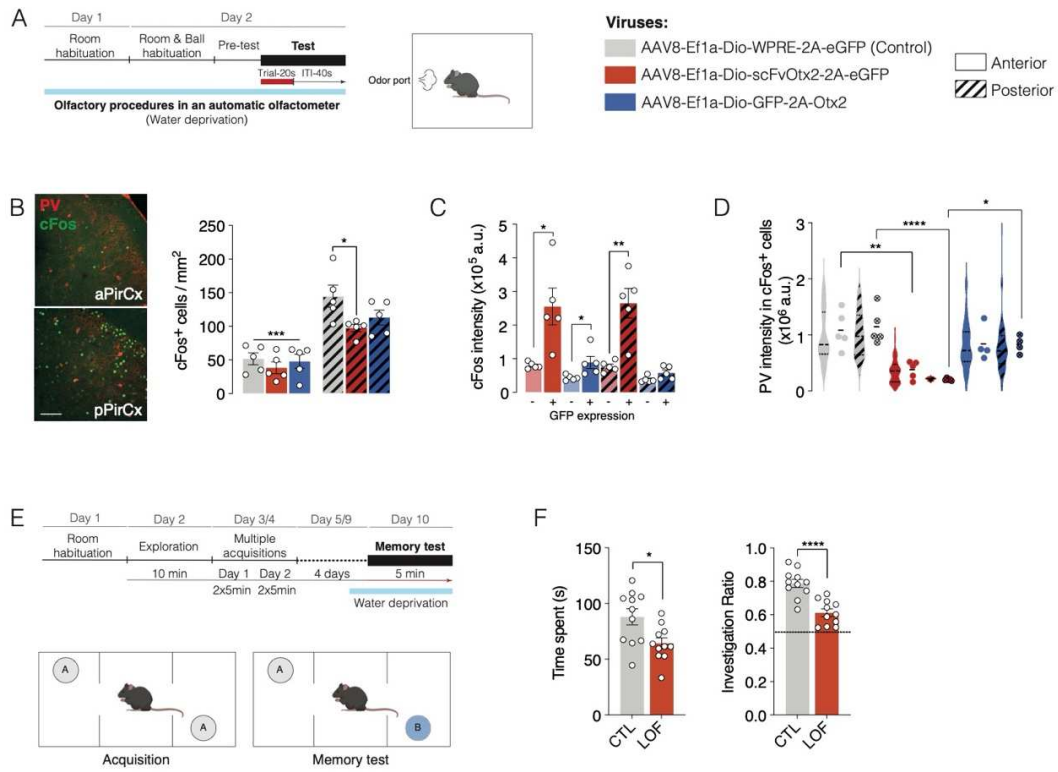


Figure 5. Altered olfactory memory through PV cells plasticity.

(A) Experimental paradigm for odor representation. (B) Representative images and quantification of the number of cFos+ cells in aPCx and pPCx, 3 h after odor representation in mice with virus expressing *GFP* (control), *scFvOtx2*, or *Otx2* ($n = 5$ mice per group). Scale bar, 100 μm . (C) cFos staining intensity in GFP- and GFP+ in aPCx and pPCx 3 h after odor representation in mice with virus expressing *GFP* (control), *scFvOtx2*, or *Otx2* ($n = 5$ mice per group). (D) PV staining intensity in cFos+ cells in aPCx and pPCx 3 h after odor representation in mice with virus expressing *GFP* (control), *scFvOtx2*, or *Otx2* ($n = 5$ mice per group). (E) Experimental paradigm for odor memory test. (F) Time spent exploring both novel and familiar odors during the memory test, and investigation ratios representing time spent exploring the novel odor. All mean ratios are significantly different from the chance level represented by the dashed line ($n = 11$ mice per group). All values \pm SEM; one-way ANOVA, post hoc Tukey's in (B-D); *t*-test in (F); * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

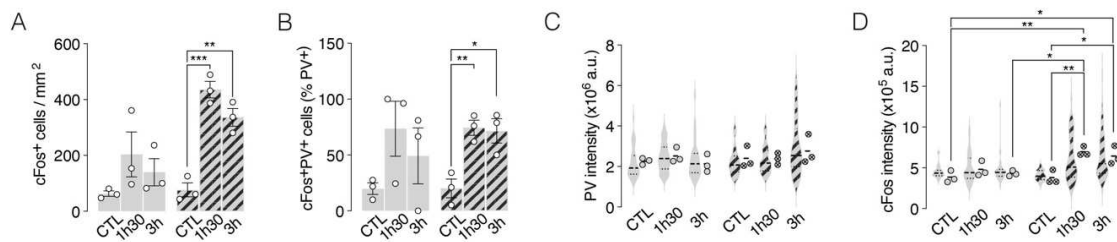


Figure S1. Analysis of cFos activation after olfaction in WT mice.

The quantification of cFos staining was carried out in aPCx (grey bars) and pPCx (striped bars) of untreated mice (control, CTL) and mice 1.5 or 3 h after odor presentation. (A) The number of cFos+ cells. (B) The percentage of PV+ cells co-stained with cFos. (C) The quantification of PV staining intensity. (D) The quantification of cFos staining intensity. All values \pm SEM; one-way ANOVA with post hoc Tukey's; $n = 3$ mice per group; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Discussion

In this study, we focused on the maturation of the PCx, a paleocortex that receives direct synaptic input from the OB, unlike sensory areas of the neocortex for which input is relayed through the thalamus. In the P90 adult PCx, PV cell maturation, as defined by PV and PNN expression, and PV cell density are similar to higher order cortical areas, such as mPFC, but do not reach the elevated levels of V1. At P90, V1 is considered non-plastic while the mPFC, which is implicated in juvenile critical periods, is likely heterogeneous in its plasticity owing to its associative networks. Thus, as expected, the associative nature of PCx results in PV maturation that aligns more with mPFC than with neocortical primary sensory areas. However, the non-patterned occurrence of PNNs in PCx suggests that microcircuits may experience critical periods, similar to the mPFC, although these may be protracted given that significant maturation is only observed at P400. These microcircuits may be dependent on the nature and source of long-range inputs, such as olfactory area nucleus, BLA, mPFC, HC and/or entorhinal cortex, and we did not discern a layer-specific pattern of PV cell activation within either aPCx or pPCx. Future tracing studies may shed light on whether distributed yet specific PV cell networks are stabilized and matured by specific inputs from PCx or other brain regions.

The absence of PV cell maturation in the PCx of *PV-scFvOtx2* mice and the direct influence of altered OTX2 levels on PV and PNN staining point to a role for OTX2 in regulating PCx PV cell maturation. Such OTX2 activity is complex and can occur at several levels by not only modulating the expression of PNN-related genes but also epigenetic-related genes such as *Gadd45b* (Hou et al., 2017; Lee et al., 2017; Sakai et al., 2017; Apulei et al., 2019). Long-term reduction of OTX2 in the PCx results in increased expression of *Adamts9* and *Mmp9*, which proteolyze proteoglycans (Huntley, 2012; Lemarchant et al., 2013) and would account for lower PNN levels through matrix reorganization in P400 mice. We also observed increased expression of *Chst7*, *Chst11*, and *Chst13*, which may alter the pattern of CSPG sulfation (Mikami and Kitagawa, 2013). Together, these changes in gene expression may account for the observed decrease in WFA staining. However, we have not tested all PNN-related enzymes and it remains possible that OTX2 affects the expression of other sulfation and epimerization enzymes as well as chondroitin synthesizing and polymerizing enzymes, such as *Chsy* and *Chpf*, respectively. Future RNA sequencing studies focused on PCx PV cells will be required to assess the extent of changes in gene expression caused by altering local OTX2 levels.

By directly expressing *Otx2* in PCx PV cells, not only did PV staining and PNN accumulation increase, but also the number of PV⁺ cells, suggesting that some PV cells are in a form of quiescence but nevertheless available when solicited. Furthermore, changes in PV

cell maturation were found to be region-dependent. Although viral expression was uniform throughout PCx, the effect of both loss- and gain-of-function paradigms was strongest in the pPCx. While changes in the distribution of PV staining levels, the number of OTX2+ cells, and the number of WFA+ cells were similar in aPCx and pPCx, the number of PV+ cells changed significantly only in pPCx. In addition, we find that OTX2 levels in PCx PV cells impact olfactory memory in adult mice. The behavioral paradigm consisted in several acquisition sessions followed by a memory test 4 days later. It is therefore possible that the poorer performance of mice with reduced OTX2 levels is related either to a learning deficit during the acquisition sessions or to a memory defect. To distinguish between these hypotheses, we could either increase the number of acquisition sessions to reinforce learning or shorten the time between acquisition and memory testing. At this juncture, we do not know whether or not there are critical periods of plasticity in the PCx. We have previously proposed a two-threshold model of plasticity based on the level of OTX2 accumulation in PV cells (Spatazza et al., 2013; Prochiantz and Di Nardo, 2015), and given the sensitivity to PV cells to OTX2 levels, it is likely that PCx plasticity is also based on a similar model but that the kinetics of OTX2 accumulation are slower.

Further work is needed to determine the role of PV cell activity for odor-driven behavior. Direct inhibition of PV cell activity in associative brain regions, such as mPFC or HC, can activate circuits that alter fear behavior (Donato et al., 2013; Courtin et al., 2014). PV cell activity is modulated by disinhibitory circuitry driven by VIP interneurons in the aPCx (Canto-Bustos et al., 2022), and similar VIP-controlled circuits exist in the HC for fear behavior and learning (Donato et al., 2013), and in the primary motor and visual cortices during motor learning (Donato et al., 2013; Fu et al., 2014). However, these forms of learning and plasticity may not be relatable to critical period plasticity given that VIP-mediated disinhibition is not implicated in critical period timing in sensory cortices (Takesian et al., 2018). Previous studies have shown rostral-caudal asymmetry in inhibition levels within aPCx, with prominent role for somatostatin interneurons (Luna and Pettit, 2010; Large et al., 2018). While we do not find differences in PV cell density or staining levels across the aPCx, the pPCx seems to be more plastic, with higher cFos levels after odor stimulation that are changed by reducing OTX2 levels.

How PV staining levels correlate with plasticity and affects behavior remains unknown, but a recent study using a mouse model for PV-cell-specific deletion of *Ntrk2* (gene for TrkB protein) showed delayed PV cell maturation and altered cortical networks in the PCx (Lau et al., 2022). While the impaired PV cell function resulted in aberrant spike patterns of PCx

pyramidal cells in response to sensory input and in a paradoxical decrease in overall network excitability (Lau et al., 2022), it remains possible that this impairment may be due to global changes in brain function given that the PV cell deletion of TrkB is brain-wide in their model. Another recent study involving optogenetic stimulation of slice preparation showed that recurrent inhibition from aPCx PV cells gated output in layer-specific manner and that functional plasticity driven by enhanced PV cell inhibition of superficial pyramidal cells (Jiang et al., 2021). Indeed, inactivation of aPCx PV cells can increase pyramidal cell firing rates and promote LTP (Canto-Bustos et al., 2022). Thus, PV cells have the potential to continually shape PCx output in response to sensory input. However, how this potential may change during aging remains to be addressed. Morphological changes in PV cells could alter the extent of feedback connections while PNNs may restrict functional plasticity and favor sub-networks with long-range connections to other olfactory or associative brain regions. How OTX2 regulates this heterogeneous population of interneurons, either by transcription, translation, or chromatin regulation (Di Nardo et al., 2018), remains to be discovered.

Acknowledgements

We would like to thank Yves Dupras for constructing the behavior apparatus, Clémentine Pesnel for technical help, David Benacom for scientific discussions, and Alain Prochiantz for scientific discussions and critical reading of the manuscript. Funding was provided by the Agence Nationale de la Recherche (ANR-18-CE16-0013-01) for supporting research costs and salaries.

References

- Apulei, J., Kim, N., Testa, D., Ribot, J., Morizet, D., Bernard, C., et al. (2019). Non-cell Autonomous OTX2 Homeoprotein Regulates Visual Cortex Plasticity Through Gadd45b/g. *Cereb. Cortex* 29, 2384–2395. doi:10.1093/cercor/bhy108.
- Bekkers, J. M., and Suzuki, N. (2013). Neurons and circuits for odor processing in the piriform cortex. *Trends Neurosci.* 36, 429–438. doi:10.1016/j.tins.2013.04.005.
- Bernard, C., Vincent, C., Testa, D., Bertini, E., Ribot, J., Di Nardo, A. A., et al. (2016). A Mouse Model for Conditional Secretion of Specific Single-Chain Antibodies Provides Genetic Evidence for Regulation of Cortical Plasticity by a Non-cell Autonomous Homeoprotein Transcription Factor. *PLoS Genet.* 12, e1006035. doi:10.1371/journal.pgen.1006035.
- Beurdeley, M., Spatazza, J., Lee, H. H. C., Sugiyama, S., Bernard, C., Di Nardo, A. A., et al. (2012). Otx2 binding to perineuronal nets persistently regulates plasticity in the mature visual cortex. *J. Neurosci.* 32, 9429–9437. doi:10.1523/JNEUROSCI.0394-12.2012.
- Bjerke, I. E., Yates, S. C., Laja, A., Witter, M. P., Puchades, M. A., Bjaalie, J. G., et al. (2021). Densities and numbers of calbindin and parvalbumin positive neurons across the rat and mouse brain. *iScience* 24, 101906. doi:10.1016/j.isci.2020.101906.
- Canto-Bustos, M., Friason, F. K., Bassi, C., and Oswald, A.-M. M. (2022). Disinhibitory Circuitry Gates Associative Synaptic Plasticity in Olfactory Cortex. *J. Neurosci.* 42, 2942–2950. doi:10.1523/JNEUROSCI.1369-21.2021.
- Celio, M. R. (1990). Calbindin D-28k and parvalbumin in the rat nervous system. *Neuroscience* 35, 375–475. doi:10.1016/0306-4522(90)90091-H.
- Chapuis, J., and Wilson, D. A. (2012). Bidirectional plasticity of cortical pattern recognition and behavioral sensory acuity. *Nat. Neurosci.* 15, 155–161. doi:10.1038/nn.2966.
- Courtin, J., Chaudun, F., Rozeske, R. R., Karalis, N., Gonzalez-Campo, C., Wurtz, H., et al. (2014). Prefrontal parvalbumin interneurons shape neuronal activity to drive fear expression. *Nature* 505, 92–96. doi:10.1038/nature12755.
- Deepa, S. S., Carulli, D., Galtrey, C., Rhodes, K., Fukuda, J., Mikami, T., et al. (2006). Composition of perineuronal net extracellular matrix in rat brain: A different disaccharide composition for the net-associated proteoglycans. *J. Biol. Chem.* 281, 17789–17800. doi:10.1074/jbc.M600544200.
- Di Nardo, A. A., Fuchs, J., Joshi, R. L., Moya, K. L., and Prochiantz, A. (2018). The physiology of homeoprotein transduction. *Physiol. Rev.* 98, 1943–1982. doi:10.1152/physrev.00018.2017.

- Donato, F., Rompani, S. B., and Caroni, P. (2013). Parvalbumin-expressing basket-cell network plasticity induced by experience regulates adult learning. *Nature* 504, 272–276. doi:10.1038/nature12866.
- Ekstrand, J. J., Domroese, M. E., Feig, S. L., Illig, K. R., and Haberly, L. B. (2001). Immunocytochemical analysis of basket cells in rat piriform cortex. *J. Comp. Neurol.* 434, 308–328. doi:10.1002/cne.1179.
- Fawcett, J. W., Oohashi, T., and Pizzorusso, T. (2019). The roles of perineuronal nets and the perinodal extracellular matrix in neuronal function. *Nat. Rev. Neurosci.* 20, 451–465. doi:10.1038/s41583-019-0196-3.
- Frank, T., Mönig, N. R., Satou, C., Higashijima, S., and Friedrich, R. W. (2019). Associative conditioning remaps odor representations and modifies inhibition in a higher olfactory brain area. *Nat. Neurosci.* 22, 1844–1856. doi:10.1038/s41593-019-0495-z.
- Franks, K. M., Russo, M. J., Sosulski, D. L., Mulligan, A. A., Siegelbaum, S. A., and Axel, R. (2011). Recurrent Circuitry Dynamically Shapes the Activation of Piriform Cortex. *Neuron* 72, 49–56. doi:10.1016/j.neuron.2011.08.020.
- Fu, Y., Tucciarone, J. M., Espinosa, J. S., Sheng, N., Darcy, D. P., Nicoll, R. A., et al. (2014). A Cortical Circuit for Gain Control by Behavioral State. *Cell* 156, 1139–1152. doi:10.1016/j.cell.2014.01.050.
- Gheusi, G., and Lledo, P.-M. (2014). “Adult Neurogenesis in the Olfactory System Shapes Odor Memory and Perception,” in *Progress in brain research*, 157–175. doi:10.1016/B978-0-444-63350-7.00006-1.
- Giessel, A. J., and Datta, S. R. (2014). Olfactory maps, circuits and computations. *Curr. Opin. Neurobiol.* 24, 120–132. doi:10.1016/j.conb.2013.09.010.
- Hensch, T. K. (2005). Critical period plasticity in local cortical circuits. *Nat. Rev. Neurosci.* 6, 877–888. doi:10.1038/nrn1787.
- Hou, X., Yoshioka, N., Tsukano, H., Sakai, A., Miyata, S., Watanabe, Y., et al. (2017). Chondroitin Sulfate Is Required for Onset and Offset of Critical Period Plasticity in Visual Cortex. *Sci. Rep.* 7, 12646. doi:10.1038/s41598-017-04007-x.
- Huntley, G. W. (2012). Synaptic circuit remodelling by matrix metalloproteinases in health and disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 13, 743–757. doi:10.1038/nrn3320.
- Jiang, H., Guo, A., Chiu, A., Li, H., Lai, C. S. W., and Lau, C. G. (2021). Target-specific control of piriform cortical output via distinct inhibitory circuits. *FASEB J.* 35, e21944. doi:10.1096/fj.202100757R.
- Johanning, F. W., Beed, P. S., Trimbuch, T., Bendels, M. H. K., Winterer, J., and Schmitz, D.

- (2009). Dendritic Compartment and Neuronal Output Mode Determine Pathway-Specific Long-Term Potentiation in the Piriform Cortex. *J. Neurosci.* 29, 13649–13661. doi:10.1523/JNEUROSCI.2672-09.2009.
- 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. doi:10.1523/JNEUROSCI.20-18-06974.2000.
- Kelwick, R., Desanlis, I., Wheeler, G. N., and Edwards, D. R. (2015). The ADAMTS (A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin motifs) family. *Genome Biol.* 16, 113. doi:10.1186/s13059-015-0676-3.
- Kim, Y., Yang, G. R., Pradhan, K., Venkataraju, K. U., Bota, M., García del Molino, L. C., et al. (2017). Brain-wide Maps Reveal Stereotyped Cell-Type-Based Cortical Architecture and Subcortical Sexual Dimorphism. *Cell* 171, 456-469.e22. doi:10.1016/j.cell.2017.09.020.
- Kitagawa, H., Tsutsumi, K., Tone, Y., and Sugahara, K. (1997). Developmental Regulation of the Sulfation Profile of Chondroitin Sulfate Chains in the Chicken Embryo Brain. *J. Biol. Chem.* 272, 31377–31381. doi:10.1074/jbc.272.50.31377.
- Klingler, E. (2017). Development and Organization of the Evolutionarily Conserved Three-Layered Olfactory Cortex. *eneuro* 4, ENEURO.0193-16.2016. doi:10.1523/ENEURO.0193-16.2016.
- Large, A. M., Kunz, N. A., Mielo, S. L., and Oswald, A. M. M. (2016). Inhibition by somatostatin interneurons in olfactory cortex. *Front. Neural Circuits* 10, 62. doi:10.3389/fncir.2016.00062.
- Large, A. M., Vogler, N. W., Canto-Bustos, M., Friason, F. K., Schick, P., and Oswald, A.-M. M. (2018). Differential inhibition of pyramidal cells and inhibitory interneurons along the rostrocaudal axis of anterior piriform cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 115, E8067–E8076. doi:10.1073/pnas.1802428115.
- Lau, C. G., Zhang, H., and Murthy, V. N. (2022). Deletion of TrkB in parvalbumin interneurons alters cortical neural dynamics. *J. Cell. Physiol.* 237, 949–964. doi:10.1002/jcp.30571.
- Lee, H. H. C., Bernard, C., Ye, Z., Acampora, D., Simeone, A., Prochiantz, A., et al. (2017). Genetic Otx2 mis-localization delays critical period plasticity across brain regions. *Mol. Psychiatry* 22, 680–688. doi:10.1038/mp.2017.1.

- Lemarchant, S., Pruvost, M., Montaner, J., Emery, E., Vivien, D., Kanninen, K., et al. (2013). ADAMTS proteoglycanases in the physiological and pathological central nervous system. *J. Neuroinflammation* 10, 899. doi:10.1186/1742-2094-10-133.
- Luna, V. M., and Pettit, D. L. (2010). Asymmetric rostro-caudal inhibition in the primary olfactory cortex. *Nat. Neurosci.* 13, 533–535. doi:10.1038/nn.2524.
- Madisen, L., Zwingman, T. A., Sunkin, S. M., Oh, S. W., Zariwala, H. A., Gu, H., et al. (2010). A robust and high-throughput Cre reporting and characterization system for the whole mouse brain. *Nat. Neurosci.* 13, 133–140. doi:10.1038/nn.2467.
- Mikami, T., and Kitagawa, H. (2013). Biosynthesis and function of chondroitin sulfate. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1830, 4719–4733. doi:10.1016/j.bbagen.2013.06.006.
- Miyata, S., Komatsu, Y., Yoshimura, Y., Taya, C., and Kitagawa, H. (2012). Persistent cortical plasticity by upregulation of chondroitin 6-sulfation. *Nat. Neurosci.* 15, 414–422. doi:10.1038/nn.3023.
- Neville, K. R., and Haberly, L. B. (2004). “Olfactory Cortex,” in *The Synaptic Organization of the Brain*, ed. G. M. Shepherd (Oxford University Press), 415–454. doi:10.1093/acprof:oso/9780195159561.003.0010.
- Nigro, M. J., Kirikae, H., Kjelsberg, K., Nair, R. R., and Witter, M. P. (2021). Not All That Is Gold Glitters: PV-IRES-Cre Mouse Line Shows Low Efficiency of Labeling of Parvalbumin Interneurons in the Perirhinal Cortex. *Front. Neural Circuits* 15. doi:10.3389/fncir.2021.781928.
- Pizzorusso, T., Medini, P., Berardi, N., Chierzi, S., Fawcett, J. W., and Maffei, L. (2002). Reactivation of Ocular Dominance Plasticity in the Adult Visual Cortex. *Science (80-.)*. 298, 1248–1251. doi:10.1126/science.1072699.
- Pizzorusso, T., Medini, P., Landi, S., Baldini, S., Berardi, N., and Maffei, L. (2006). Structural and functional recovery from early monocular deprivation in adult rats. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 8517–8522. doi:10.1073/pnas.0602657103.
- Poo, C., and Isaacson, J. S. (2009). Odor Representations in Olfactory Cortex: “Sparse” Coding, Global Inhibition, and Oscillations. *Neuron* 62, 850–861. doi:10.1016/j.neuron.2009.05.022.
- Prochiantz, A., and Di Nardo, A. A. (2015). Homeoprotein signaling in the developing and adult nervous system. *Neuron* 85, 911–25. doi:10.1016/j.neuron.2015.01.019.
- Reh, R. K., Dias, B. G., Nelson, C. A., Kaufer, D., Werker, J. F., Kolb, B., et al. (2020). Critical period regulation across multiple timescales. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 117, 23242–

23251. doi:10.1073/pnas.1820836117.
- Sakai, A., Nakato, R., Ling, Y., Hou, X., Hara, N., Iijima, T., et al. (2017). Genome-wide target analyses of Otx2 homeoprotein in postnatal cortex. *Front. Neurosci.* 11, 307. doi:10.3389/fnins.2017.00307.
- Schoonover, C. E., Ohashi, S. N., Axel, R., and Fink, A. J. P. (2021). Representational drift in primary olfactory cortex. *Nature* 594, 541–546. doi:10.1038/s41586-021-03628-7.
- Shepherd, G. M. (2011). The Microcircuit Concept Applied to Cortical Evolution: from Three-Layer to Six-Layer Cortex. *Front. Neuroanat.* 5, 30. doi:10.3389/fnana.2011.00030.
- Spatazza, J., Lee, H. H. C., DiNardo, A. A., Tibaldi, L., Joliot, A., Hensch, T. K., et al. (2013). Choroid-Plexus-Derived Otx2 Homeoprotein Constrains Adult Cortical Plasticity. *Cell Rep.* 3, 1815–1823. doi:10.1016/j.celrep.2013.05.014.
- Sugahara, K., and Mikami, T. (2007). Chondroitin/dermatan sulfate in the central nervous system. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 17, 536–545. doi:10.1016/j.sbi.2007.08.015.
- Sugiyama, S., Di Nardo, A. A., Aizawa, S., Matsuo, I., Volovitch, M., Prochiantz, A., et al. (2008). Experience-Dependent Transfer of Otx2 Homeoprotein into the Visual Cortex Activates Postnatal Plasticity. *Cell* 134, 508–520. doi:10.1016/j.cell.2008.05.054.
- Suzuki, N., and Bekkers, J. M. (2010). Inhibitory neurons in the anterior piriform cortex of the mouse: Classification using molecular markers. *J. Comp. Neurol.* 518, 1670–1687. doi:10.1002/cne.22295.
- Suzuki, N., Tantirigama, M. L., Aung, K. P., Huang, H. H., and Bekkers, J. M. (2022). Fast and slow feedforward inhibitory circuits for cortical odor processing. *Elife* 11, e73406. doi:10.7554/eLife.73406.
- Takesian, A. E., Bogart, L. J., Lichtman, J. W., and Hensch, T. K. (2018). Inhibitory circuit gating of auditory critical-period plasticity. *Nat. Neurosci.* 21, 218–227. doi:10.1038/s41593-017-0064-2.
- Tang, Y., Stryker, M. P., Alvarez-Buylla, A., and Espinosa, J. S. (2014). Cortical plasticity induced by transplantation of embryonic somatostatin or parvalbumin interneurons. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, 18339–18344. doi:10.1073/pnas.1421844112.
- Testa, D., Prochiantz, A., and Di Nardo, A. A. (2019). Perineuronal nets in brain physiology and disease. *Semin. Cell Dev. Biol.* 89, 125–135. doi:10.1016/j.semdb.2018.09.011.
- Ueno, H., Suemitsu, S., Murakami, S., Kitamura, N., Wani, K., Matsumoto, Y., et al. (2019). Layer-specific expression of extracellular matrix molecules in the mouse somatosensory and piriform cortices. *IBRO Reports* 6, 1–17. doi:10.1016/j.ibror.2018.11.006.

- Vincent, C., Gilabert-Juan, J., Gibel-Russo, R., Alvarez-Fischer, D., Krebs, M.-O., Le Pen, G., et al. (2021). Non-cell-autonomous OTX2 transcription factor regulates anxiety-related behavior in the mouse. *Mol. Psychiatry* 26, 6469–6480. doi:10.1038/s41380-021-01132-y.
- Wilson, D. A., and Sullivan, R. M. (2011). Cortical Processing of Odor Objects. *Neuron* 72, 506–519. doi:10.1016/j.neuron.2011.10.027.

Cysteic acid-rich peptides as bioactive glycosaminoglycan mimics

Rodrigue Marquant^{1†}, Rachel Gibel-Russo^{2†}, Damien Testa^{2†}, Jérôme Ribot², Solange Lavielle¹, Alain Prochiantz², Ariel A. Di Nardo^{2*}, Jean-Maurice Mallet^{1*}

¹Laboratoire des BioMolécules (LBM), Département de Chimie, École normale supérieure, PSL University, Sorbonne Université, CNRS UMR 7203, 24 rue Lhomond, 75005 Paris, France.

²Centre for Interdisciplinary Research in Biology (CIRB), Collège de France, CNRS UMR 7241 / INSERM U1050, PSL University, Labex Memolife, 11 place Marcelin Berthelot, 75005 Paris, France.

[†]These authors contributed equally.

*Corresponding authors: ariel.dinardo@college-de-france.fr, Jean-Maurice.Mallet@ens.fr

Abstract

Glycosaminoglycan (GAG) mimics with high specificity are lacking to probe GAG physiological functions, which include extracellular interactions that impact brain physiology. We have synthesized sulfonated peptide analogues of chondroitin sulfates that specifically interact with OTX2 and SEMA3A proteins, which are keys actors of critical period plasticity. When injected in adult mouse medial prefrontal cortex, these GAG mimics diffuse rapidly and remain stable for several days. Injection in adult mouse visual cortex induced histological and functional hallmarks of reopened brain plasticity for ocular dominance, confirming their potential for basic research and pharmacology.

Keywords

Homeoprotein, chondroitin sulfate proteoglycan, perineuronal net, sulfopeptide, cysteic acid

Introduction

GAGs are sulfated polysaccharides found on cell surfaces and in the extracellular matrix (ECM) where they interact with a large number of proteins (cytokines, growth factors, serpins, etc). Proteoglycans, such as chondroitin sulfate (CS) and heparan sulfate which predominate in biology, consist of a protein backbone to which are linked chains containing hundreds of disaccharide repeats. A fascinating characteristic of GAGs is that their polysaccharide units are modified through epimerisation, N- and O-sulfation, and deacetylation, and thus can be finely tuned for interactions. Consequently, they present non-regular sequences with specific affinity.

In postnatal brain development, specific sulfation patterns are crucial for the timing of critical periods, which are short windows in time during which a given neural circuit is highly plastic. These periods are necessary for proper environmental adaptation and arise from the maturation of cortical inhibitory GABAergic parvalbumin (PV) interneurons (Reh et al., 2020). This maturation is driven by non-cell autonomous activities of the Otx2 homeoprotein transcription factor: OTX2 is synthesized outside the cerebral cortex, transported in the extracellular milieu, and internalized specifically by PV cells (Di Nardo et al., 2020). This internalization specificity is mediated by disulfated CS type D (CS-D) or type E (CS-E, Fig. 1a) contained within a specialized ECM called perineuronal net (PNN) enwrapping these cells (Beurdeley et al., 2012; Miyata et al., 2012). Thus, plasticity timing is controlled in part by the interaction of GAGs with OTX2. Interfering with OTX2-GAG interactions provides an approach to disrupt critical periods for fundamental research and therapeutic applications (Prochiantz and Di Nardo, 2015).

To unravel the extraordinary complexity of GAG-protein interactions, defined compounds are necessary. Unfortunately, both the extraction of pure compounds from natural sources and the chemical or enzymatic synthesis of GAG fragments remain difficult and inefficient (low yield mixtures). However, protein binding to GAGs involves non-specific electrostatic and specific interactions for which correct space distribution of charges are critical (Johnson et al., 2006). Therefore, an effective strategy could involve a scaffold approach allowing for spatial presentation of sulfates and carboxylates. Modified natural and synthetic polymers along with peptide nanofibers have been proposed as GAG surrogates, but they lack sequence modulations and show mainly non-specific electrostatic interactions with proteins (Sangaj et al., 2010; Henry and Desai, 2014; Arslan et al., 2016; Malineni et al., 2017). Peptide mimics with sulfated tyrosine have nonetheless shown promise as heparin or heparan sulfate surrogates (Yamaguchi et al., 2008; Connell et al., 2012).

Previously, we used an approach based on a poly-lactose scaffold whereby the D-GalNAc in natural CS was replaced by D-Gal and the number of synthetic steps was reduced by half by starting from a lactose disaccharide (Despras et al., 2013). While a hexasaccharide (hexaCSE, Fig. 1b) showed promising mimicry, longer and more diverse oligosaccharides mimics with alternative scaffolds are now required. A promising approach for structure modulation involves peptides with either sulfated tyrosines (Maynard and Hubbell, 2005; Kim and Kiick, 2007) or sulfated serines (Vázquez-Campos et al., 2005), even though they show limited stability. Given that GAGs have an extended structure (e.g., heparin, PDB: 1hpn) with sulfates and carboxylates aligned along the main axis, we hypothesized that peptide analogues are ideal candidates for GAG mimics as they can provide a scaffold with spatially represented charges and are relatively easy to synthesize by a solid phase strategy.

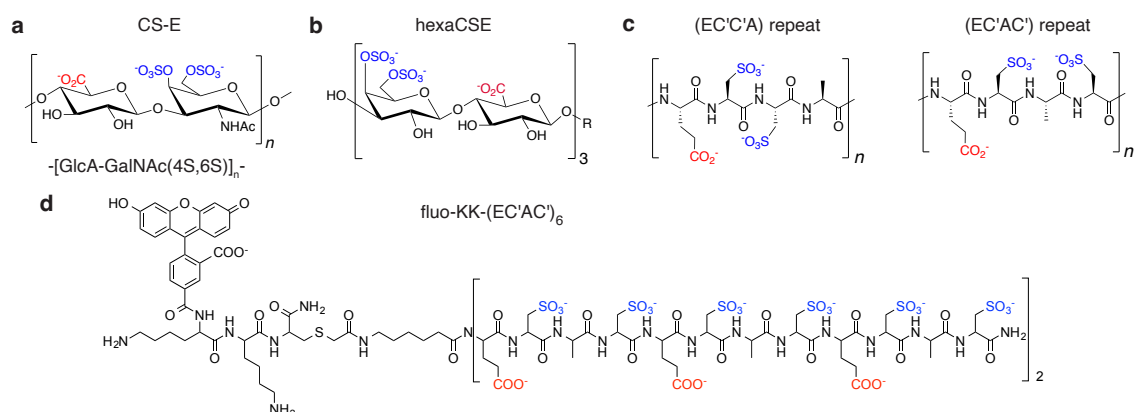


Figure 1. Chemical structure of repeat units.

(a) Chondroitin-4,6-sulfate, CS-E. (b) poly-lactose scaffold, hexaCSE (Despras et al., 2013). (c) The GAG mimic peptide scaffolds: EC'C'A and EC'AC', where C' represents cysteic acid. (d) The fluorescein-KK-(EC'AC')₆ structure.

Material and Methods

Peptide Chemistry

Peptide synthesis

Peptides were synthesized by solid-phase on an Applied Biosystems 433 using Rink Amide MBHA resin (100–200 mesh, 0.62 mmol/g) by Fmoc strategy on a 0.1 mmol scale and HBTU/DIEA coupling steps with 10 equiv of each amino acid (1 mmol): Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Cys(Trt)-OH, Fmoc-Ala-OH, and Fmoc-6-aminohexanoic acid (as a spacer at the *N*-terminus) were selected. The spacer and the biotin sulfone were coupled manually on the

peptidyl-resin on 0.05 mmol scale: removal of Fmoc group of the last residue by 20% piperidine in *N*-methyl-2-pyrrolidone (NMP) for 3 min, 5 min then 10 min, and then washes with NMP; coupling step by activation of Fmoc-6-aminohexanoic acid (5 equiv, 0.25 mmol) by HBTU (4.5 equiv) and DIEA (10 equiv) in NMP for 3 min and then addition of this activated solution on the resin, 3 h stirring at RT, then washes with NMP; removal of Fmoc group of the spacer by 20% piperidine in NMP (3 min, 5 min then 10 min), washing with NMP, overnight coupling with biotin sulfone, then washes (NMP, CH₂Cl₂, MeOH) and drying. Resin cleavage: mixture of TFA/water/ethanedithiol/triisopropylsilane (94/2.5/2.5/1, v/v) stirred with resin for 150 min at RT; resin was filtered off and the peptide was precipitated by diethyl ether and collected by centrifugation; pellet was suspended in water (insoluble) and lyophilized.

Fluorescein labeled KK-(EC'AC')₆ was prepared by coupling two peptides: bromoacetamido-Ahx-(EC'AC')₆ and 5(6)-carboxy-fluorescein-KKC-(NH₂). The first peptide bears a reactive bromoacetamido in N terminus, which was chosen to resist the oxidation protocol used for the preparation of cysteic acids in the EC'AC' sequence. Bromoacetic acid was coupled after activation by DIC (N,N'-Diisopropylcarbodiimide), (5eq Br-CH₂-COOH, 4,5 eq DIC, DMF), and protected from light. The second is a tripeptide composed of 2 lysines and a cysteine with a free SH group as a reactive group. A 5(6)-carboxy fluorescein was added in N-terminus position. These peptides were prepared according to the general protocol. The two peptides were combined in degassed ammonium bicarbonate buffer (pH 7.9) under inert atmosphere, protected from light, and the final conjugate was purified by HPLC (30 min gradient from 1 to 30 % CH₃CN (0.1 % TFA) in water with abs 220 nm. After lyophilization, the peptide was dissolved in milliQ water and neutralized (aq NaOH) to pH 7.9. The final concentration was 83 μM.

Peptide Oxidation

A performic acid solution (2 mL) was prepared at RT by mixing H₂O₂ (70 μl, 35% in water) with formic acid (1.93 mL, purity 99%). The resulting solution was stirred 1 h at RT then cooled (0 °C) before use. Peptide (10 mg) was dissolved in the performic solution (1 mL) at 0 °C (sonication needed for dispersion). After stirring for 15 h at 0 °C, the solution was diluted with water (6 mL) and neutralized with aq. ammonia (pH=7), and lyophilized.

Peptide purification and storage

Crude peptides were desalted on Sephadex G25 Fine (Pharmacia), with 10% acetic acid in water, and lyophilized. Peptides were purified with a HPLC preparative column (XBridge C18, 5 μ m, 19 mm x 50 mm) with Waters 600 pump and controller and Waters 2487 dual absorbance detector. Flow rate was 10 ml/min with eluent A (H₂O, 0.1% TFA) and eluent B (CH₃CN, 0.1% TFA). General elution conditions were isocratic 0% eluent B for 2.5 min then 0 to 10% gradient eluent B for 10 min. Pure fractions were lyophilized and stored at -20 °C. For biological evaluation, concentrated peptide solutions (ca. 3 mg/ml, ca. 1 mM) were prepared by dissolving in water (neutralization using concentrated aq. NaOH to pH 7) and kept at -20 °C.

Peptide characterization by MALDI-TOF

MALDI mass spectra were performed on a **4700 Proteomics Analyzer MALDI-TOF-TOF (AB Sciex), equipped with a 355-nm Nd-YAG laser (200 Hz), in linear negative mode, by using a guanidinium derivative, pyrenemethylguanidine (pmg), and a *p*-nitroaniline in EtOH matrix (Ohara et al., 2009).**

Animals

All animal procedures were carried out in accordance with the guidelines of the European Economic Community (2010/63/UE) and the French National Committee (2013/118). For surgical procedures, animals were anesthetized with Xylazine (Rompun 2%, 5 mg/kg) and Ketamine (Imalgene 1000, 80 mg/kg). This project (no. 00704.02) obtained approval from Ethics committee n° 59 of the French Ministry for Research and Higher Education.

Brain infusions and immunohistochemistry

Three-month-old C57BL/6J mice (Janvier) were infused for 7 days into V1 (lambda: x = 1.7 mm, y = 0 mm, z = 0.5 mm) with various concentrations of GAG mimics (4 pM, 400 pM and 4 μ M), using Alzet micro-osmotic pumps (0.5 μ L/h). Animals were then perfused with PBS and 4% paraformaldehyde. Cryostat sections (20 μ m) were incubated overnight with primary antibody anti-parvalbumin (rabbit, 1/500, Swant) and WFA-FITC (1/100, Vector), followed by secondary antibody anti-rabbit Alexa Fluor-546 (1/2000, Molecular Probes) for 1 h. Images were acquired with a Leica SP5 confocal microscope.

Brain injections and immunohistochemistry

Three-month-old C57BL/6J mice (Janvier) were injected into mPFC (lambda: x = 0,25 mm, y = 1,7 mm, z = 2,2 mm) and V1 (lambda: x = 1.7 mm, y = 0 mm, z = 0.5 mm) with 8 μ M of GAG mimics, using Hamilton syringe (0.1 μ L/min). Animals were then perfused with PBS and 4% paraformaldehyde. Vibratome sections (40 μ m) were incubated overnight with primary antibody anti-parvalbumin (rabbit, 1/500, Swant), biotinylated *Wisteria floribunda* agglutinin (Sigma L1516, 1/500), anti-FITC (goat, 1/1000, Abcam) and anti-OTX2 (mouse, 1/50, in house) followed by secondary antibody Alexa Fluor- conjugated (1/2000, Molecular Probes) for 1 h. Images were acquired with a W1 Spinning-disk microscope.

Dot blots

For competition assays, 400 pmol GAG mimic or hexaCSE (Despras et al., 2013) were incubated 30 min at 37°C in 100 mM ammonium acetate with 1 μ g of OTX2 protein (Bernard et al., 2014) and with 3 μ g of biotinylated RK-, AA- or SC-peptide (Eurogentec). Solutions were spotted on a nitrocellulose membrane (ThermoFisher Scientific) and biotin was detected with streptavidin-HRP (ThermoFisher Scientific) followed by chemiluminescence reaction (ThermoFisher Scientific). Membranes were digitized by Fujifilm LAS-4000 and quantified by densitometry with ImageJ.

Gel shift

OTX2 protein (0.1 μ g) was incubated at RT for 30 min with 40 fmol of biotinylated IRBP1 oligonucleotide (Eurogentec) and 4 pmol of (ECAC)₅ or hexaCSE in 50 ng/ μ l dIdC, PBS. Samples were separated on 6% native polyacrylamide gels at 100 V in TBE, transferred onto a nylon membrane (Roche) at 380 mA for 45 min, and UV crosslinked (120,000 μ J/cm², Amersham). LightShift Chemiluminescent EMSA Kit (ThermoFisher Scientific) was used for detection and membranes were digitized by Fujifilm LAS-4000 and quantified by densitometry with ImageJ.

Immunoprecipitation

Visual cortex of adult mice was dissected and lysed in homogenization buffer (0.32 M sucrose, 5 mM HEPES, 10 mM MgCl₂ and protease inhibitors). Samples were centrifuged (8 min, 1700 g) at 4°C and the supernatant was incubated 2 hours at 37°C with 5 nmol of GAG mimic. For the competition assay, GAG mimics were pre-incubated 30 min with 50 nmol of biotinylated RK-, AA- or SC-peptide at 37°C prior to incubation overnight at 4°C with streptavidin-coupled

Dynabeads (Life Technologies). The beads were then washed with homogenization buffer and heated 10 min at 95°C in Laemmli buffer (with DTT) to detach proteins for western blot analysis.

Western blot

Immunoprecipitated proteins were separated on NuPAGE 4-12% Bis-Tris pre-cast gels (Invitrogen) for 1 h at 200 V and transferred onto a methanol-activated PVDF membrane (Millipore) at 400 mA for 1 h. Membranes were blocked with 5% non-fat dry milk for 1 h before incubation with primary antibody anti-Sema3A (rabbit, 1/1000, Millipore) overnight at 4°C. Membranes were washed and incubated 1 h with secondary antibody anti-rabbit HRP-linked (Cell Signaling). Membranes were digitized by Fujifilm LAS-4000 and quantified by densitometry with ImageJ.

Monocular deprivation and surgery for intrinsic optical imaging

Mice were anesthetized with Xylazine (Rompun 2%, 5 mg/kg) and Ketamine (Imalgene 1000, 80 mg/kg). The area surrounding the contralateral eye (left eye) to be sutured was trimmed and wiped with 70% ethanol. Two mattress sutures were then placed and animals were checked daily to ensure sutures remained intact.

For optical imaging, mice were anesthetized with urethane (1.2 g/kg, i.p) and sedated with chlorprothixene (8 mg/kg, i.m.). Atropine (0.1 mg/kg) and dexamethasone (2 mg/kg) were injected subcutaneously. Mice were placed in a stereotaxic apparatus and the body temperature was maintained at 37°C. The exposed area was then covered by agarose (2.5%) and a glass coverslip.

Visual stimulation and optical imaging recording

Visual stimuli were randomly displayed on a 21" LCD monitor located 20 cm in front of the animal. Coordinates of the monitor were reprogrammed in order to maintain spatial and temporal frequencies constant across the visual field's eccentricities. Each stimulus consisted of oriented sine-wave gratings drifting in one direction perpendicular to the orientation at a temporal frequency of 1.5 Hz. Ten spatial frequencies (SFs) were tested, ranging from 0.0303 to 1 cycle per degree (cpd) in a logarithmic scale. Monocular stimuli were displayed for 5s. A grey screen was presented between trials for 10s. Each SF was displayed 16 times with a different orientation/direction.

Optical images of intrinsic signals were recorded with a Dalsa 1M60 CCD camera controlled with an Imager 3001 system (Optical Imaging Ltd). Images were acquired after a 2x2 pixels spatial binning with a resolution of $\approx 10.5 \mu\text{m}/\text{pixel}$ using a 135x50 mm tandem lens (Nikon) configuration. The focal plane was set 400 μm below the cortical surface, and intrinsic signals were acquired with a 700 nm illumination wavelength. The size of the recorded region was $\approx 2.5 \times 3.6 \text{ mm}$. Five frames of 1s duration each were stored right after the stimulus onset. For data analysis, the last three recorded frames, which correspond to the strongest intrinsic signal, were averaged and divided by the first recorded frame. The generalized indicator function method was applied to identify the stimulus-related activity patterns (Yokoo et al., 2001). An additional low-pass filter with a Gaussian kernel of 3 pixels SD was applied to smooth the data. The ipsilateral eye was stimulated, the area of interest was delineated over the primary visual cortex and the SF tuning curve in the binocular zone was calculated by averaging the response for each SF stimulus. This curve was least-square fitted to extract visual acuity. For each eye, the response integral (trapezoidal approximation) elicited by SFs was calculated. Ocular dominance values ranged between -1 and 1 (ipsilateral and contralateral eye response, respectively) and were calculated for each SF threshold with the contrast formula from the response integral of each eye.

Statistical analysis

Analysis was performed with Prism 6 (GraphPad). Single comparisons were made by t-test, whereas multiple group analyses were made by ANOVA followed by Tukey's posthoc test.

Results

A tetrapeptide can adopt a similar length to a CS disaccharide (0.8 nm). We chose to mimic disulfated CS, such a CS-E (Fig. 1a), by replacing each disaccharide unit with a tetrapeptide while keeping the chemistry as simple as possible: glutamate to mimic uronic carboxylate; two cysteic acids to mimic sulfates; and alanine for more rigidity (compared to glycine) and hydrophobicity. Thus, each repeating unit will present a carboxylate group and two sulfonate groups (same as 2:1 sulfate:carboxylate ratio for CS-E).

The sequences $(\text{ECCA})_n$ and $(\text{ECAC})_n$ ($n = 3-6$) were synthesized by Fmoc strategy on a Rink Amide MBHA resin. A 6-aminohexanoic acid (Ahx) spacer was introduced at the N-terminus and the peptidyl-resins were either acetylated (Ac) or acylated with a biotin sulfone (Biot(SO₂)). The peptides were cleaved from the resin by TFA and precipitated in diethyl ether

to give either Ac-Ahx-(ECAC)_n-NH₂, Ac-Ahx-(ECCA)_n-NH₂, Biot(SO₂)-Ahx-(ECAC)_n-NH₂, or Biot(SO₂)-Ahx-(ECCA)_n-NH₂. These precursors were oxidized with performic acid (Hirs, 1956; Moore, 1963) to give cysteic acid (C') peptides, then neutralized with aqueous ammonia resulting in GAG mimics (EC'AC')_n and (EC'C'A)_n (Fig. 1c), with either an acetyl or a biotin sulfone at the N-terminus and an amide at the C-terminus. Crude sulfopeptides were desalted on Sephadex G25, purified by reverse phase HPLC and characterized by mass spectroscopy. Attempts to purify the precursors prior to oxidation were unsuccessful due to insolubility. These GAG mimic peptides can be stored for months at -20 °C as sodium salts.

To evaluate affinity of the biotinylated (EC'C'A)_n and (EC'AC')_n libraries to OTX2 protein, we performed dot blots with nitrocellulose membranes for which sulfopeptide retention requires interaction with protein (Fig. 2a). While OTX2 binding did not favor one motif over the other, there was a clear increase in affinity as a function of n repeats (Fig. 2b). For comparison, dot blots were performed with hexaCSE, which was previously shown to bind OTX2 and interfere with its *in vivo* activity in the mouse brain (Despras et al., 2013). Sequences with n = 4 or 5 repeats were found to bind to OTX2 equally as well as hexaCSE, while those with n = 6 were found to bind 2- to 3-fold better.

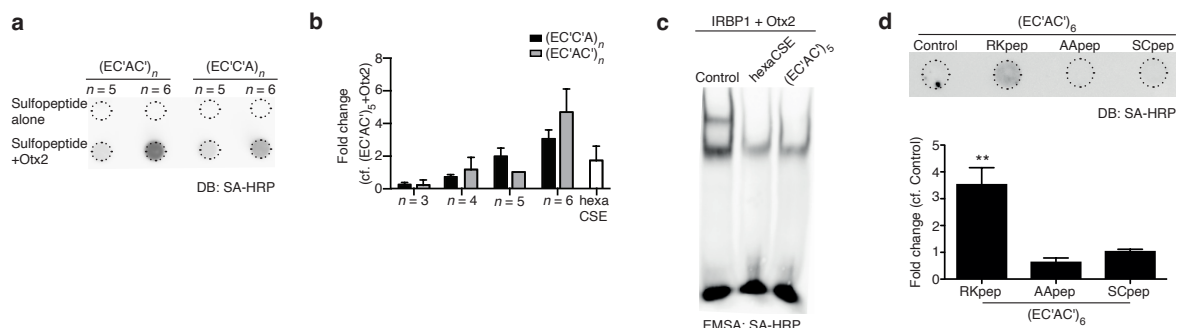


Figure 2. GAG mimics interact with OTX2.

(a) An example dot blot (DB) of biotinylated sulfopeptides incubated or not with OTX2 protein. **(b)** The quantification of DB chemiluminescence with at least 3 duplicate experiments per data point. **(c)** An electrophoretic mobility shift assay (EMSA) with biotinylated IRBP1 DNA probe and OTX2 protein shows loss of shift when incubated with hexaCSE and (EC'AC')₅. **(d)** Representative DB and quantification of (EC'AC')₆ incubated with GAG motif peptide (RKpep) or control peptides (AApep, SCpep). All values: N=3; mean ± SEM; one-way ANOVA with Bonferonni posthoc test; **P<0.01.

To confirm that biotinylated sulfopeptides interact with OTX2 through its previously identified GAG-binding site, we performed DNA chase and peptide binding experiments (Fig. 2c-e). In OTX2, a GAG-binding motif was identified in the first helix of its DNA-binding

domain (Beurdeley et al., 2012), thus specific binding of GAG molecules may interfere with DNA binding. Assays show that the (EC'AC')₅ mimic is able to chase the IRBP1 DNA probe from Otx2 to the same extent as biotinylated hexaCSE positive control (Fig. 2c). The GAG-binding site in OTX2 (RKQRRER) contains an arginine-lysine doublet (RK) which when mutated to an alanine doublet (AA), no longer binds ECM (Beurdeley et al., 2012) and causes critical period defects in the *Otx2*^{+/-AA} mouse model (Lee et al., 2017; Vincent et al., 2021). Dot blot assays with peptides (15-mer) based on this motif were used to assess whether (EC'AC')₆ binds specifically (Fig. 2d). While the wild type peptide (RKpep: RKQRRERTTFTRAQL) retained the GAG mimic, the mutated peptide (AApep: AAQRRERTTFTRAQL) did not; neither did a scrambled peptide (SCpep: RTQTRFRTRARLEQK) containing the same residues as the RKpep but in random order (Fig. 2e). These assays confirm the interaction is not simply electrostatic but requires a specific residue sequence.

To measure the *in vivo* activity and specificity of biotinylated GAG mimics, we performed biochemical and immunohistochemical analyses. OTX2 and Semaphorin-3A (SEMA3A) are both key actors of visual cortex plasticity and share a similar motif for binding CS-E (Fig. 3a) (Beurdeley et al., 2012; Dick et al., 2013). We first focused on SEMA3A, as cortical OTX2 levels are too low to be reliably detected biochemically (Prochiantz et al., 2014). In pull-down experiments with lysates of adult mouse visual cortex, (EC'AC')₅ and (EC'AC')₆ but not (EC'C'A)₆ interact with SEMA3A (Fig. 3b-c). The RKpep specifically disrupts SEMA3A interaction with (EC'AC')₆ in these lysates (Fig. 3d-e), suggesting involvement of SEMA3A GAG-binding motif.

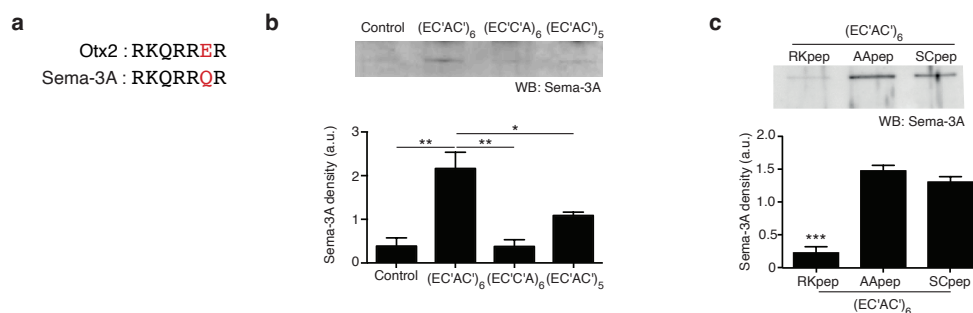


Figure 3. GAG mimics interact with proteins in adult mouse visual cortex.

(a) Comparison of GAG-binding motifs. (b) Representative western blot (WB) and quantification for SEMA3A from adult mouse visual cortex lysates after pull-down with GAG mimics retained on streptavidin beads (Control is beads alone). (c) Representative WB and quantification for SEMA3A after pull-down with (EC'AC')₆ incubated with GAG motif peptide (RKpep) or control peptides (AApep, SCpep). All values: N=3-6; mean ± SEM; one-way ANOVA with Bonferonni posthoc test in (c,e); t-test in (g,h); *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001.

To allow for histological detection, we added a fluorescein block with two lysines and a cysteine to (EC'AC')₆: fluo-KKC-(EC'AC')₆. The lysines allow for paraformaldehyde cross-linking that fixes the GAG mimic within histological sections, while the cysteine provides a spacer that prevents the lysines from interfering with GAG binding. To measure the stability and diffusion of fluo-KKC-(EC'AC')₆ *in vivo*, we performed stereotaxic injections into the medial prefrontal cortex (mPFC) of postnatal day (P) 90 wild type (WT) mice. The diffusion profile was assessed after 6h, 24h or 72h (Fig. 4a). For all 3 timepoints, the extent of diffusion remains the same, suggesting that fluo-KKC-(EC'AC')₆ diffuses rapidly and remains stable (Fig. 4b). However, the extent of diffusion differs between the anterior and posterior directions, with the mimic going much further in the anterior mPFC, perhaps due to the direction of flow of cerebral spinal fluid and/or the presence of the corpus callosum which may act as a diffusion barrier in the posterior direction.

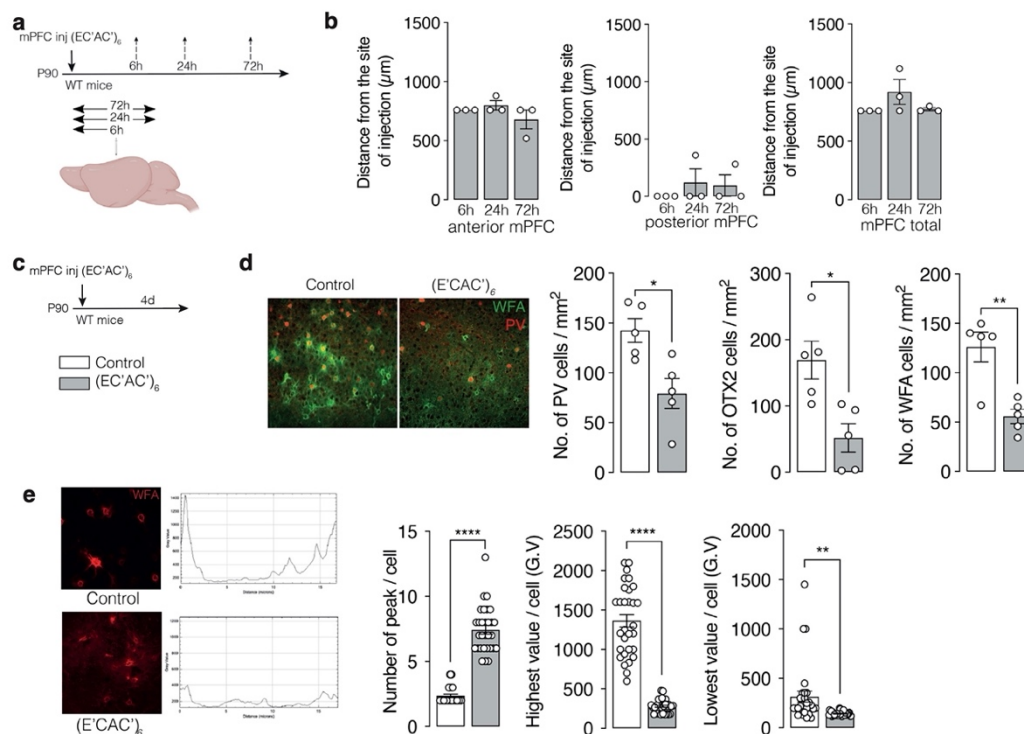


Figure 4. GAG mimics diffuse, are stable, and disrupt OTX2 transfer *in vivo*.

(a) GAG mimics injections paradigm. GAG mimics are injected into the mPFC of WT mice at P90. Diffusion and stability are checked after 6h, 24h and 72h. **(b)** Diffusion distance of GAG mimics from the injection site after 6h, 24h and 72h in mPFC. **(c)** Images and Quantification of the number of WFA, PV and OTX2 after 4 days post-injection in the mPFC. **(d)** Images and Quantification of the number of WFA, PV and OTX2 after 4 days post-injection in V1. **(e)** Quantification of WFA morphology after 4 days post-injection in mPFC. Scale bar = 100 μm. All values: N=5-7 mice.

To determine whether the GAG mimic affects OTX2 transfer and thus PV cell maturation levels, we analyzed PV, WFA and OTX2 staining in the mPFC and V1, 4 days after fluo-KKC-

(EC'AC')₆ injection (Fig. 4c-d). PV levels, PNN condensation, and OTX2 accumulation were all significantly decreased in both regions, suggesting that (EC'AC')₆ indeed interferes with OTX2 transfer. A feedback loop exists between OTX2 accumulation in PV cells and assembly of surrounding PNNs (Di Nardo et al., 2018). Not only do PNNs attract extracellular OTX2, OTX2 activity in PV cells increases PNN expression. Thus, this reduction suggests that these GAG mimics interfere with OTX2 signaling enough to break the feedback loop and diminish PNN assembly. To further determine the effect on PV cell ECM, we analyzed the impact on PNN morphology (Fig. 4e). PNNs normally show a stereotyped distribution with two high-intensity peaks of WFA staining separated by a large valley, reflecting high accumulation near the PV cell surface. Peptide injection resulted in an anarchic distribution of WFA staining, with an increased number of peaks and decreased intensity levels (Fig. 4e), suggesting that PNN are highly destabilized.

Interfering with OTX2 signaling in the adult visual cortex, even with modest 20-30% decrease in OTX2 levels, has been shown to reverse PV cell maturation state and induce plasticity in the adult visual cortex (Beurdeley et al., 2012; Spatazza et al., 2013; Bernard et al., 2016). Given that fitc-KKC-(EC'AC')₆ injection potentially alters PV cell maturation levels, we investigated their potential for promoting visual cortex plasticity in adult mice. We used a paradigm that assesses changes in the natural ocular dominance (OD) of the contralateral eye for V1 activity (Fig. 5a). After 4 days post-injection, mice underwent 3 days of monocular deprivation (MD) and were then analyzed by optical imaging to assess V1 activity (Fig. 5b). Compared to NaCl-injected control mice, the mice injected with fitc-KKC-(EC'AC')₆ displayed enhanced V1 plasticity, resulting in increased activity in response to ipsilateral stimulation and a decrease in the OD index (Fig. 5c). The plasticity observed here is thus the result of an increase in the nondeprived eye response, which is typical of reopened OD plasticity in the adult mouse (Hofer et al., 2006).

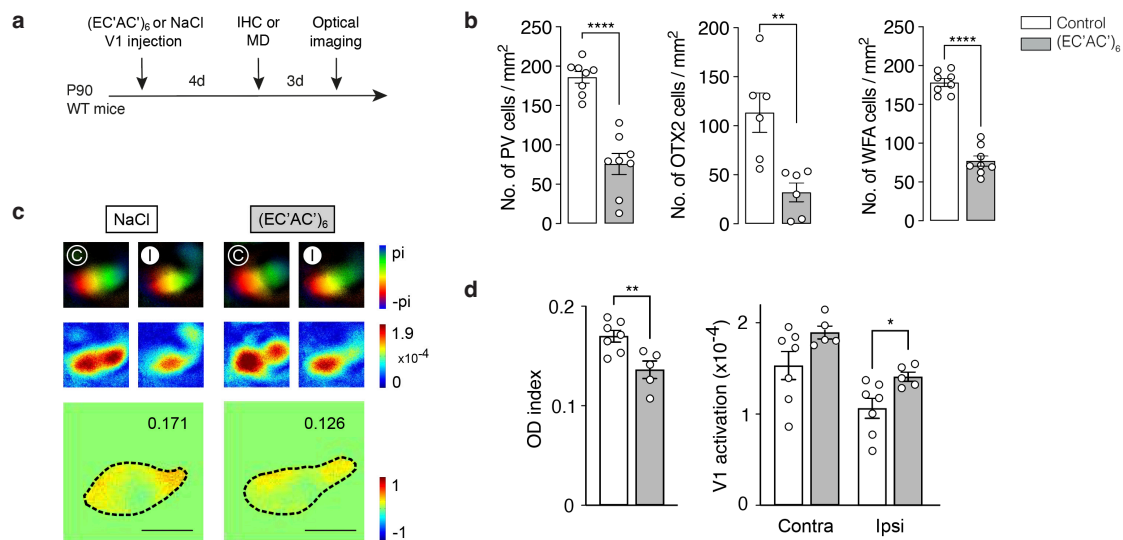


Figure 5. GAG mimics reopen plasticity in the visual cortex.

(a) Injection paradigm. GAG mimics or NaCl are injected into the V1 of WT mice at P90. 4 days post-injection monocular deprivation (MD) is performed, followed 3 days after by optical imaging. (b) Visual maps of control (NaCl) and (EC'AC')₆ mice. Contralateral (C) and ipsilateral (I) visual stimulations are indicated with a white (non-deprived eye) or black (deprived eye) circle. The bottom panels show the normalized OD map with the average value inset. (c) Mice injected with (EC'AC')₆ show an increase in OD plasticity compared with control mice injected with NaCl. (d) The activity of the ipsilateral eye is increased after (EC'AC')₆ injection in V1. N=3-8 mice.

Discussion

The *in vivo* pull-down and injection experiments suggest that (EC'AC')_n and (EC'C'A)_n mimics can provide some specificity and selectivity. While Otx2 shows no preference for either motif *in vitro*, SEMA3A interacts with the (EC'AC')_n motif but not the (EC'C'A)_n motif in brain lysates. *In vivo* injection experiments also demonstrated that (EC'AC')₆ peptides are stable and can sufficiently interfere with OTX2 signaling to break the PNN-OTX2 feedback loop and impact PV cell maturation. This blockade is sufficient to induce a window of plasticity in adult mice, thus demonstrating the therapeutic potential of GAG mimics. This also suggests that these GAG mimics contain valid electrostatic patterns to recapitulate specific sulfation patterns present in natural GAGs. This strategy could be used to construct more complete libraries and screen a set of proteins to generate an interaction matrix with biological relevance. For example, given that the 300-strong homeoprotein family contains a large variety of GAG-binding motifs, such an approach could unlock the hypothesized sugar code for homeoprotein *in vivo* internalization specificity (Prochiantz and Di Nardo, 2015).

The problem of selectivity between GAG and protein remains paramount. CS chains are known to interact with many ECM proteins mainly through electrostatic interactions such that

weak or non-productive bindings may interfere with selectivity. Our GAG mimics have spatially represented carboxylate and sulfonate charge patterns, allowing one to explore charge pattern recognition. These GAG mimics are too small to be expected to have defined structure, but they may adopt a consistent structure through induced fit when bound to protein. To improve GAG mimic selectivity, different charge-patterned motifs could be assembled along with neutral spacer motifs, while also modifying the repeating motif and length.

Homeoproteins have a high therapeutic potential and their intercellular transfer properties make them particularly interesting (Di Nardo et al., 2020). OTX2 has been shown to act in a non-cell autonomous manner in various brain areas (Spatazza et al., 2013; Lee et al., 2017; Vincent et al., 2021), making it theoretically possible to design various brain plasticity therapies through direct delivery of GAG mimics that alter PV cell maturation state. More generally, GAGs have important and specific physiological functions but are not developed for therapeutic use owing to the difficulty of chemical synthesis. Alternative efforts have focused on peptides and peptidomimetics (Beurdeley et al., 2012; Corredor et al., 2016), while others have developed small molecules that disrupt sulfation enzymes (Cheung et al., 2017). The development of easy-to-synthesize GAG mimics with high biological specificity may lead to a new and important class of tools for fundamental research with pharmacological potential.

Acknowledgements

Funding was provided by the Agence Nationale de la Recherche (ANR-15-CE16-0010 and ANR-18-CE16-0013-01) for supporting salaries and research costs.

Author contributions

R.M. synthesized, purified and characterized GAG mimics. R.G-R. and D.T. performed biochemical experiments, stereotaxic injections and immunohistochemistry, and performed quantifications and statistical analyses. R.M., S.L., and J-M.M. designed GAG mimic synthesis strategies. R.G-R., D.T., A.P., and A.A.D. designed in vitro and in vivo experiments. R.G-R. and J.R. performed MD and OI experiments. S.L., A.A.D., and J-M.M. wrote the manuscript. All authors approved the manuscript.

Competing interests

The authors have obtained a patent pertaining to these GAG mimics.

References

- Arslan, E., Guler, M. O., and Tekinay, A. B. (2016). Glycosaminoglycan-Mimetic Signals Direct the Osteo/Chondrogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells in a Three-Dimensional Peptide Nanofiber Extracellular Matrix Mimetic Environment. *Biomacromolecules* 17, 1280–1291. doi:10.1021/acs.biomac.5b01637.
- Bernard, C., Kim, H. T., Torero Ibad, R., Lee, E. J. un., Simonutti, M., Picaud, S., et al. (2014). Graded Otx2 activities demonstrate dose-sensitive eye and retina phenotypes. *Hum. Mol. Genet.* 23, 1742–1753. doi:10.1093/hmg/ddt562.
- Bernard, C., Vincent, C., Testa, D., Bertini, E., Ribot, J., Di Nardo, A. A., et al. (2016). A Mouse Model for Conditional Secretion of Specific Single-Chain Antibodies Provides Genetic Evidence for Regulation of Cortical Plasticity by a Non-cell Autonomous Homeoprotein Transcription Factor. *PLOS Genet.* 12, e1006035. doi:10.1371/journal.pgen.1006035.
- Beurdeley, M., Spatazza, J., Lee, H. H. C., Sugiyama, S., Bernard, C., Di Nardo, A. A., et al. (2012). Otx2 binding to perineuronal nets persistently regulates plasticity in the mature visual cortex. *J. Neurosci.* 32, 9429–9437. doi:10.1523/JNEUROSCI.0394-12.2012.
- Cheung, S. T., Miller, M. S., Pacoma, R., Roland, J., Liu, J., Schumacher, A. M., et al. (2017). Discovery of a Small-Molecule Modulator of Glycosaminoglycan Sulfation. *ACS Chem. Biol.* 12, 3126–3133. doi:10.1021/acscchembio.7b00885.
- Connell, B. J., Baleux, F., Coic, Y. M., Clayette, P., Bonnaffé, D., and Lortat-Jacob, H. (2012). A synthetic heparan sulfate-mimetic peptide conjugated to a mini CD4 displays very high anti- HIV-1 activity independently of coreceptor usage. *Chem. Biol.* 19, 131–139. doi:10.1016/j.chembiol.2011.12.009.
- Corredor, M., Bonet, R., Moure, A., Domingo, C., Bujons, J., Alfonso, I., et al. (2016). Cationic Peptides and Peptidomimetics Bind Glycosaminoglycans as Potential Sema3A Pathway Inhibitors. *Biophys. J.* 110, 1291–1303. doi:10.1016/j.bpj.2016.01.033.
- Despras, G., Bernard, C., Perrot, A., Cattiaux, L., Prochiantz, A., Lortat-Jacob, H., et al. (2013). Toward libraries of biotinylated chondroitin sulfate analogues: From synthesis to in vivo studies. *Chem. - A Eur. J.* 19, 531–540. doi:10.1002/chem.201202173.
- Di Nardo, A. A., Fuchs, J., Joshi, R. L., Moya, K. L., and Prochiantz, A. (2018). The physiology of homeoprotein transduction. *Physiol. Rev.* 98, 1943–1982. doi:10.1152/physrev.00018.2017.
- Di Nardo, A. A., Joliot, A., and Prochiantz, A. (2020). Homeoprotein transduction in neurodevelopment and physiopathology. *Sci. Adv.* 6, eabc6374.

doi:10.1126/sciadv.abc6374.

- Dick, G., Liktan, C., Alves, J. N., Ehlert, E. M. E., Miller, G. M., Hsieh-Wilson, L. C., et al. (2013). Semaphorin 3A binds to the perineuronal nets via chondroitin sulfate type E motifs in rodent brains. *J. Biol. Chem.* 288, 27384–27395. doi:10.1074/jbc.M111.310029.
- Henry, B. L., and Desai, U. R. (2014). Sulfated low molecular weight lignins, allosteric inhibitors of coagulation proteinases via the heparin binding site, significantly alter the active site of thrombin and factor xa compared to heparin. *Thromb. Res.* 134, 1123–1129. doi:10.1016/j.thromres.2014.08.024.
- Hirs, C. H. W. (1956). THE OXIDATION OF RIBONUCLEASE WITH PERFORMIC ACID. *J. Biol. Chem.* 219, 611–621. doi:10.1016/S0021-9258(18)65721-7.
- Hofer, S. B., Mrsic-Flogel, T. D., Bonhoeffer, T., and Hübener, M. (2006). Prior experience enhances plasticity in adult visual cortex. *Nat. Neurosci.* 9, 127–132. doi:10.1038/nn1610 PMID - 16327785.
- Johnson, D. J. D., Li, W., Adams, T. E., and Huntington, J. A. (2006). Antithrombin–S195A factor Xa-heparin structure reveals the allosteric mechanism of antithrombin activation. *EMBO J.* 25, 2029–2037. doi:10.1038/sj.emboj.7601089.
- Kim, S. H., and Kiick, K. L. (2007). Heparin-mimetic sulfated peptides with modulated affinities for heparin-binding peptides and growth factors. *Peptides* 28, 2125–2136. doi:10.1016/j.peptides.2007.08.010.
- Lee, H. H. C., Bernard, C., Ye, Z., Acampora, D., Simeone, A., Prochiantz, A., et al. (2017). Genetic Otx2 mis-localization delays critical period plasticity across brain regions. *Mol. Psychiatry* 22, 680–688. doi:10.1038/mp.2017.1.
- Malineni, J., Singh, S., Tillmann, S., Keul, H., and Möller, M. (2017). Aliphatic Polyethers with Sulfate, Carboxylate, and Hydroxyl Side Groups—Do They Show Anticoagulant Properties? *Macromol. Biosci.* 17, 1117. doi:10.1002/mabi.201600274.
- Maynard, H. D., and Hubbell, J. A. (2005). Discovery of a sulfated tetrapeptide that binds to vascular endothelial growth factor. *Acta Biomater.* 1, 451–459. doi:10.1016/j.actbio.2005.04.004.
- Miyata, S., Komatsu, Y., Yoshimura, Y., Taya, C., and Kitagawa, H. (2012). Persistent cortical plasticity by upregulation of chondroitin 6-sulfation. *Nat. Neurosci.* 15, 414–422. doi:10.1038/nn.3023.
- Moore, S. (1963). On the Determination of Cystine as Cysteic Acid. *J. Biol. Chem.* 238, 235–237. doi:10.1016/S0021-9258(19)83985-6.
- Ohara, K., Jacquinet, J.-C., Jouanneau, D., Helbert, W., Smietana, M., and Vasseur, J.-J. (2009).

- Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometric analysis of polysulfated-derived oligosaccharides using pyrenemethylguanidine. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 20, 131–137. doi:10.1016/j.jasms.2008.09.004.
- Prochiantz, A., and Di Nardo, A. A. (2015). Homeoprotein Signaling in the Developing and Adult Nervous System. *Neuron* 85, 911–925. doi:10.1016/j.neuron.2015.01.019.
- Prochiantz, A., Kim, N., Acampora, D., Dingli, F., Loew, D., Simeone, A., et al. (2014). Immunoprecipitation and mass spectrometry identify non-cell autonomous Otx2 homeoprotein in the granular and supragranular layers of mouse visual cortex. *F1000Research* 3, 178. doi:10.12688/f1000research.4869.1.
- Reh, R. K., Dias, B. G., Nelson, C. A., Kaufer, D., Werker, J. F., Kolb, B., et al. (2020). Critical period regulation across multiple timescales. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 117, 23242–23251. doi:10.1073/pnas.1820836117.
- Sangaj, N., Kyriakakis, P., Yang, D., Chang, C. W., Arya, G., and Varghese, S. (2010). Heparin mimicking polymer promotes myogenic differentiation of muscle progenitor cells. *Biomacromolecules* 11, 3294–3300. doi:10.1021/bm101041f.
- Spatazza, J., Lee, H. H. C., DiNardo, A. A., Tibaldi, L., Joliot, A., Hensch, T. K., et al. (2013). Choroid-Plexus-Derived Otx2 Homeoprotein Constrains Adult Cortical Plasticity. *Cell Rep.* 3, 1815–1823. doi:10.1016/j.celrep.2013.05.014.
- Vázquez-Campos, S., St. Hilaire, P. M., Damgaard, D., and Meldal, M. (2005). GAG mimetic libraries: Sulphated peptide as heparin-like glycosaminoglycan mimics in their interaction with FGF-1. *QSAR Comb. Sci.* 24, 923–942. doi:10.1002/qsar.200420100.
- Vincent, C., Gilabert-Juan, J., Gibel-Russo, R., Alvarez-Fischer, D., Krebs, M.-O., Le Pen, G., et al. (2021). Non-cell-autonomous OTX2 transcription factor regulates anxiety-related behavior in the mouse. *Mol. Psychiatry* 26, 6469–6480. doi:10.1038/s41380-021-01132-y.
- Yamaguchi, M., Ohmori, T., Sakata, Y., and Ueki, M. (2008). Oligo(tyrosine sulfate)s as heparin pentasaccharide mimic: Evaluation by surface noncovalent affinity mass spectrometry. *Bioorganic Med. Chem.* 16, 3342–3351. doi:10.1016/j.bmc.2007.12.004.
- Yokoo, T., Knight, B. W., and Sirovich, L. (2001). An Optimization Approach to Signal Extraction from Noisy Multivariate Data. *Neuroimage* 14, 1309–1326. doi:10.1006/nimg.2001.0950.

DISCUSSION - CONCLUSION

I. OTX2 et la maturation du cortex piriforme

Dans notre première étude, nous nous sommes intéressés à la maturation du PC, une région cérébrale jouissant d'une grande singularité. En effet, contrairement aux autres modalités sensorielles, la voie thalamique n'est pas le passage obligé vers les structures corticales. Ainsi, le aPC reçoit une entrée directe du OB via le LOT tandis que le pPC reçoit les branches collatérales des cellules pyramidales du aPC.

Nous avons montré que dans le PC adulte à P90, la maturation des cellules PV, définie par l'expression des PNN qui les entourent, est similaire à celles du gyrus denté de l'hippocampe et du mPFC, mais n'égale pas le niveau élevé du cortex visuel. Chez la souris, il a été établi que la CP pour la vision binoculaire débute à P20 et décline avant P40 (Fagiolini et al., 1994; Gordon and Stryker, 1996). Ainsi, à P90, le V1 est-il une région mature exempt de plasticité. Le mPFC est lui aussi impliqué dans des CP juvéniles cependant sa plasticité semble hétérogène probablement du fait de ses réseaux associatifs. La densité de cellules PV est également très similaire entre le mPFC et le PC, il serait alors envisageable que cette maturation tardive soit une des caractéristiques des aires associatives.

Malgré leurs maturations semblables, le nombre de cellules PV et de PNN du gyrus denté est très faible comparé au PC et aux autres régions hippocampiques. Ainsi, il se pourrait que la neurogenèse adulte du gyrus denté confère un état de maturation particulier, proche de celui du PC mais associé à une plus grande plasticité.

Une de nos principales interrogations était de comprendre si et pourquoi le PC demeurerait plastique à l'âge adulte. Certaines études suggèrent que c'est la neurogenèse olfactive assurée par les interneurons du OB qui est la clé de la régulation de la plasticité du système olfactif. Le modèle de la maladie d'Alzheimer ; APP/PS1 illustre bien cela. Chez les souris APP/PS1 âgées (P300), on observe ~ 40 % de diminution de la prolifération cellulaire dans la SVZ (en comparaison avec les souris WT du même âge). Nos données montrent que dans le PC, cette altération de la prolifération est à l'origine d'une accélération de la maturation des cellules PV, suggérant l'existence d'un lien entre la neurogenèse adulte et plasticité de ce cortex (Figure 35). Nous avons également montré que le PC est à bien des égards une structure surprenante. Les niveaux d'expression de PV et de PNN sont faibles mais augmentent lentement au cours du temps ce qui suggère l'existence de possibles CP. De plus, grâce à l'utilisation de la lignée *PV::Cre;Rosa-dtTomato*, nous avons constaté qu'il existait un biais de l'intensité des cellules PV vers la population TOM+, suggérant que les cellules les plus matures sont TOM+. Même

s'il est admis que toutes les cellules PV n'expriment pas TOM chez les souris PV-tdTom (Madisen et al., 2010) et que les souris *PV::Cre* peuvent fournir un marquage de faible efficacité dans certaines régions du cerveau (Nigro et al., 2021), nos résultats suggèrent que la population de cellules TOM+ est une sous-population cellulaire distincte au sein des cellules PV.

Comme rappelé précédemment, le PC possède un vaste réseau d'interconnexions au sein de ses diverses sous-régions et entre elles (Figure 30). Ainsi, sa connectivité intrinsèque pourrait-elle dépendre de la nature et de la source des entrées à longue distance comme le noyau olfactif antérieur, le striatum, l'amygdale, et les cortex préfrontal, entorhinal et périrhinal (Haberly, 2001).

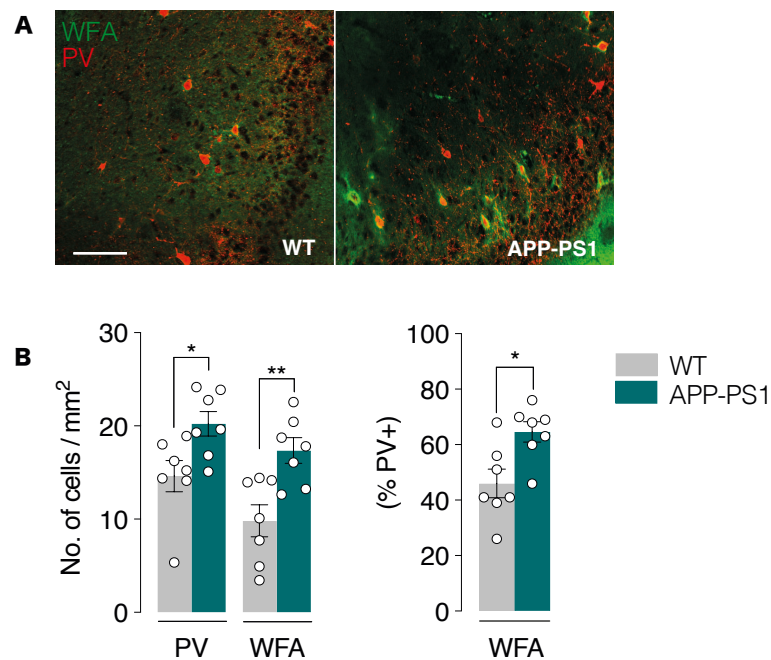


Figure 35. Altération de la maturation du cortex piriforme chez les souris APP-PS1

La lignée de souris APP-PS1 est classiquement utilisée comme modèle de la maladie d'Alzheimer. Les souris reproduisent certaines lésions neuropathologiques de la maladie d'Alzheimer dont le dépôt extracellulaire d'A β (plaques amyloïdes) et l'angiopathie amyloïde. Dans la SVZ de souris APP-PS1 âgées (P300), le déclin de la prolifération des interneurons est augmenté. (A) Image représentative de la distribution de la WFA et des cellules PV chez des souris WT et APP-PS1 à P300, barre d'échelle 100 μ m. (B) Comparaison de la maturation des cellules PV entre des souris sauvages (WT) et APP-PS1.

De façon étonnante, malgré les nombreuses dissimilitudes entre le aPC et pPC (Litaudon et al., 2003; Luna and Morozov, 2012; Maier et al., 2012; Illig and Wilson, 2014; Wang et al., 2020), nous n'avons observé aucune différence dans le nombre de PV et de PNN entre ces deux régions. La connectivité du PC est complexe et des études de traçage viral permettraient de disséquer son architecture intrinsèque et extrinsèque. Il serait alors possible de vérifier si l'état

de maturation des cellules PV est lié à des différences dans les entrées locales ou à longues distances.

Puisqu'OTX2, sécrétée depuis le plexus choroïde dans le liquide cébrospinal, reconnaît et régule la maturation des cellules PV décorées de PNN (Spatazza et al., 2013b; Lee et al., 2017; Vincent et al., 2021), nous avons pensé qu'elle pourrait être potentiellement impliquée dans la maturation du PC. Dans les souris *PV-scFvOtx2*, la maturation des cellules PV est retardée démontrant alors le rôle clé de l'activité non-autonome d'OTX2 dans le PC. Cependant, l'activité d'OTX2 est très complexe et, en ce sens, peut se produire à plusieurs niveaux en modulant non seulement l'expression des gènes liés au PNN mais aussi des gènes liés à l'état épigénétique de la chromatine tels que *Gadd45b* (Hou et al., 2017; Lee et al., 2017; Sakai et al., 2017; Apulei et al., 2019). La réduction à long terme d'OTX2 dans le PC entraîne une augmentation de l'expression d'*Adamts9* et de *Mmp9* et de la protéolyse des protéoglycanes (Huntley, 2012; Lemarchant et al., 2013). La baisse des niveaux de PNN serait alors inhérente à une réorganisation massive de la matrice extracellulaire chez les souris P400.

Outre les modifications d'expression des enzymes régulant le catabolisme et la stabilité de la matrice, nous avons observé celle des enzymes de sulfatation des chondroïtines. Il est bien établi que le schéma de sulfatation des chaînes de glycanes est un élément important de la plasticité corticale (Miyata et al., 2012). Dans ce contexte il est intéressant de constater que la perte d'OTX2 affecte l'expression de *Chst7* et *Chst11/13*, enzymes responsables de la synthèse de formes monosulfatées en position 6 et 4 respectivement (Mikami and Kitagawa, 2013), formes juvéniles majoritaires.

La surexpression de l'enzyme *Chst3*, catalysant le transfert de sulfate en position 6 dans le cerveau jeune, déstabilise le maillage des PNN en faveur d'un réseau éparse en forme de points, réduisant l'accumulation d'OTX2 dans les cellules PV (Miyata et al., 2012). Il serait donc intéressant d'étudier le réseau tri-dimensionnel des PNN dans le PC et de déterminer si la perte d'OTX2 impacte la structure des PNN.

La matrice extracellulaire exerce une signalisation complexe et dynamique via l'activité de nombreuses enzymes. Il est alors fort probable qu'OTX2 puisse moduler le niveau d'expression d'autres enzymes de sulfatation, d'épimérisation, ou de synthèse et de polymérisation de la chondroïtine, comme *Chsy* et *Chpf* respectivement. De façon étonnante, nous n'avons observé aucune différence dans l'expression des gènes de plasticité entre les animaux sauvages et *PV-scFvOtx2*. Une explication possible serait que les microdissections du PC que nous avons réalisées ne sont pas assez précises et ne permettent pas une analyse spécifique des cellules arborant un état de plasticité élevé. Il faudrait alors réaliser des techniques plus précises telle

qu'une analyse transcriptomique sur cellule unique ciblant spécifiquement la population PV. De même, trier les cellules en fonctions de leur niveau d'expression de PV puis réaliser ce genre d'analyse permettrait une avancée majeure dans la compréhension des états des cellules PV.

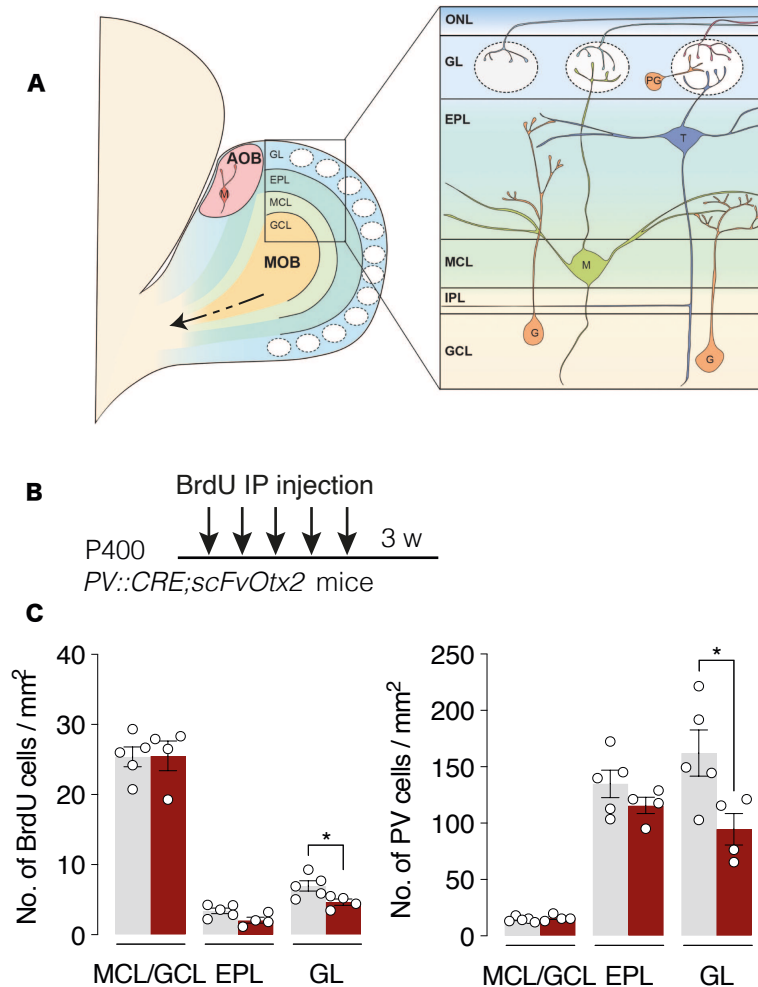


Figure 36. La neurogénèse adulte du bulbe olfactif chez les souris *PV::CRE;scFvOtx2^{tg/o}*

(A) Schéma anatomique du OB. Le bulbe olfactif accessoire (AOB) reçoit les informations phéromonales de l'organe voméronasal dans la partie postéro-dorsale du bulbe olfactif. Les axones des OSN innervent tangentiellement les couches concentriques du bulbe olfactif principal (MOB). De la périphérie vers le centre se trouvent la couche du nerf olfactif (ONL), la couche glomérulaire (GL), la couche plexiforme externe (EPL), la couche des cellules mitrales (MCL), la couche plexiforme interne (IPL) et celle des cellules granuleuses (GCL). Extrait de (Imamura et al., 2020). (B) Paradigme d'injection du BrdU dans les souris *PV::CRE;scFvOtx2^{tg/o}* P400. (C) Quantification du nombre de cellules BrdU et PV dans les couches du bulbe olfactif de souris WT et *PV::CRE;scFvOtx2^{tg/o}* P400.

Enfin, nous avons remarqué que l'expression de PV diminue de moitié à P400 à la fois chez les souris sauvages et *PV-scFvOtx2*. Ainsi, il semblerait que les niveaux protéiques et l'ARNm de

PV soient régulés différenciellement et que la régulation de la transcription du gène soit indépendante d'OTX2.

Le modèle de souris *PV-scFvOtx2* perturbe le transfert d'OTX2 dans l'ensemble des cellules PV du cerveau. Nous avons constaté une altération de la neurogénèse adulte, comme le démontre la baisse de cellules BrdU et PV positives dans la couche glomérulaire du OB (Figure 36). Une de nos précédentes études a démontré le rôle d'OTX2 dans la régulation de la neurogénèse adulte. La diminution de sa production dans les plexus choroïdes affecte la migration des neuroblastes dans le courant migratoire rostral et réduit le nombre de neurones nouvellement formés dans le OB. Dans ce même modèle d'activité non-autonome cellulaire, OTX2 module l'expression de composants de la ECM et de molécules de signalisation produites par les astrocytes de soutien (Planques et al., 2019). Afin de s'affranchir de l'action d'OTX2 dans le bulbe et d'autres structures connexes au PC, nous avons développé une approche virale nous permettant de cibler finement les cellules PV du PC. En exprimant ou en déplaçant OTX2 dans les cellules PV du PC, nous confirmons qu'OTX2 module leur maturation. L'expression du scFv autour des cellules PV séquestre OTX2 dans le milieu extracellulaire, retarde la maturation des cellules PV et induit le désassemblage de leur PNN. À l'inverse, l'introduction d'OTX2 dans les cellules PV accélère leur maturation induisant alors l'accumulation des PNN. Il est alors envisageable que ces cellules soient sous un état de quiescence mais néanmoins disponibles si stimulées. En outre, il est à noter que la maturation des cellules PV régulée par OTX2 est région-dépendante. En effet, bien que l'expression virale soit uniforme dans tout le PC, l'effet des perte et gain de fonction est plus fort dans le PC postérieur. Sachant qu'il existe différentes classes de cellules PV (Hu et al., 2014a), il est possible qu'OTX2 régule la maturation d'une sous population plus représentée dans le pPC.

Grâce à notre modèle de perte de fonction locale pour OTX2, nous apportons la preuve que l'état de maturation des cellules PV et l'activation du réseau régulent la mémoire olfactive. Comme pour la mémoire de peur, (Gogolla et al., 2009), la mémoire olfactive serait intimement liée à la condensation des PNN et donc liée au niveau d'OTX2. Le paradigme comportemental utilisé consiste en plusieurs sessions d'acquisition suivies d'un test de mémoire 4 jours plus tard. Il est donc possible que les moins bonnes performances des souris présentant des niveaux réduits d'OTX2 soient liées soit à un déficit d'apprentissage lors des sessions d'acquisition, soit à un défaut de mémorisation. Pour distinguer entre ces deux hypothèses, nous pourrions soit augmenter le nombre de sessions d'acquisition pour renforcer l'apprentissage, soit raccourcir le

temps entre l'acquisition et le test de mémoire. En outre, comme dans l'hippocampe (Gogolla et al., 2009), il serait intéressant de dégrader les PNN par la ChABC afin de mieux comprendre comment les PNN régulent-ils la mémoire olfactive.

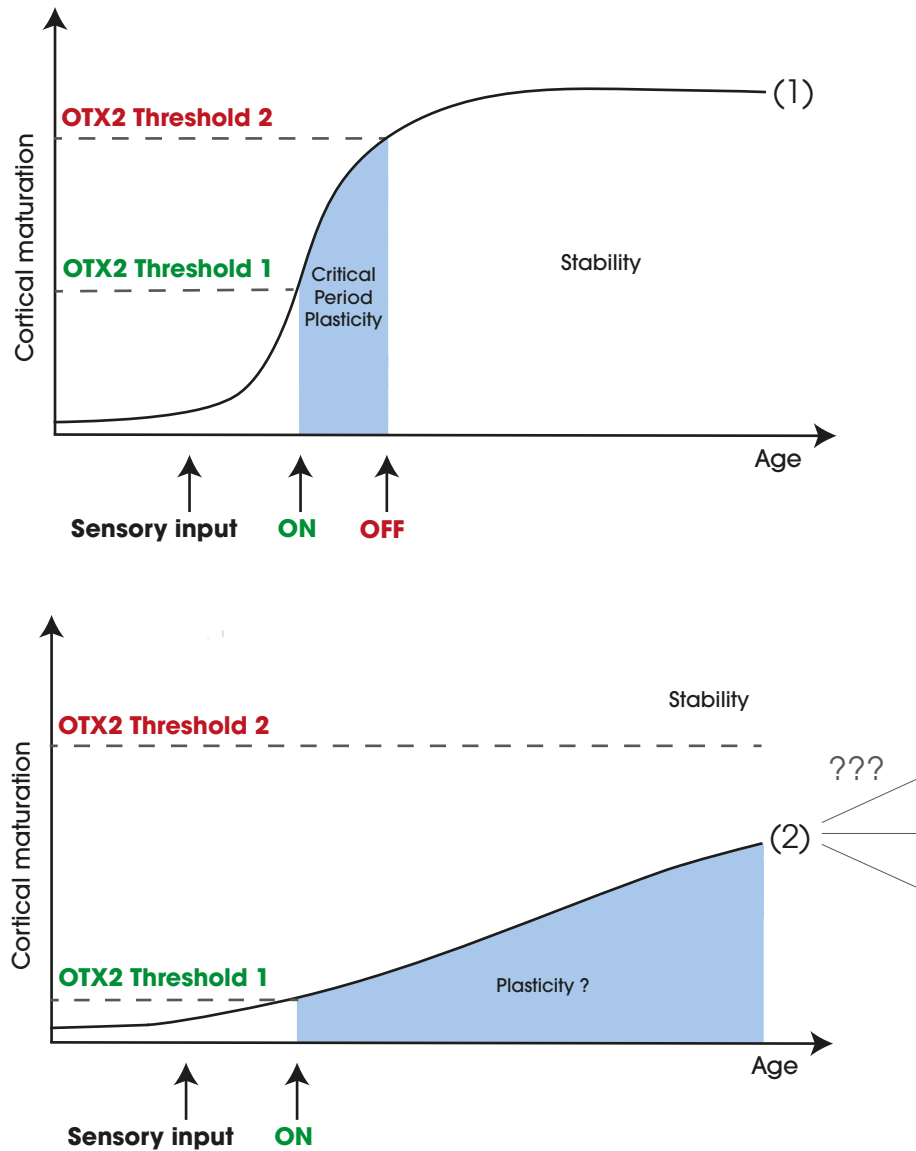


Figure 37. Modèle du contrôle de la plasticité par OTX2 dans le V1 (1) et le PC (2)

L'accumulation d'OTX2 dans les cellules PV entraîne une maturation corticale. Dans le V1 (1), l'accumulation d'OTX2 déclenche l'ouverture et la fermeture de la CP. Dans le PC (2), l'accumulation d'OTX2 serait lente et à l'origine d'une plasticité étalée dans le temps. Dans le PC, il est envisageable que l'accumulation d'OTX2 continue progressivement mais n'atteigne jamais ou seulement très tardivement le second seuil de fermeture. Puis, un déclin progressif de la plasticité serait observé au cours du vieillissement.

À ce jour, l'existence d'une CP dans le PC est inconnue. Le laboratoire a proposé un modèle de plasticité à deux seuils fondé sur le niveau d'accumulation d'OTX2 dans les cellules PV

(Spatazza et al., 2013b; Prochiantz and Di Nardo, 2015) et, étant donné la sensibilité des cellules PV aux niveaux d'OTX2, il est probable que la plasticité du PC repose sur un modèle similaire où la cinétique d'accumulation d'OTX2 serait plus lente (Figure 37).

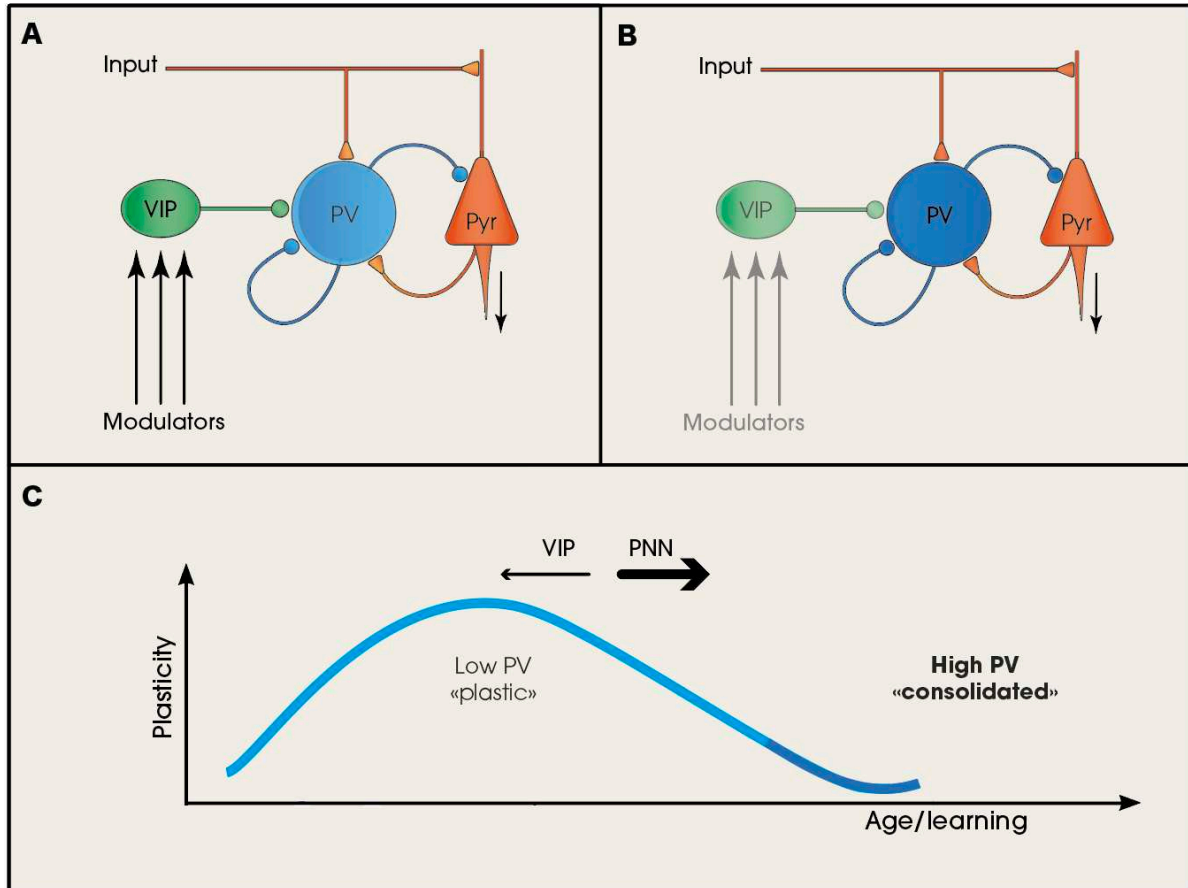


Figure 38. La plasticité cérébrale dépend du niveau d'expression de PV

(A) L'état de 'PV faible' est un marqueur de la plasticité. Dans un environnement enrichi, les neuromodulateurs activent le microcircuit VIP qui assure une entrée inhibitrice sur le réseau PV. (B) L'état de 'PV élevé', réfractaire à la plasticité, est atteint par une stimulation excitatrice accrue des cellules pyramidales locales (Pyr) ou par une entrée externe lorsque les souvenirs sont consolidés. (C) L'expérience peut moduler l'apprentissage en ciblant l'état de différenciation des neurones PV. Il est à noter que l'état et la plasticité des cellules PV sont réversibles tout au long de la vie notamment via la signalisation des cellules VIP ou PNN. (Adapté de (Hensch, 2014)).

D'autres travaux sont nécessaires pour déterminer le rôle de l'activité des cellules PV dans le comportement induit par les odeurs. Dans l'ensemble des structures cérébrales, les cellules PV constituent une population hétérogène avec des degrés variables d'expression de PV, associés à différents stades de maturité. Dans leurs travaux, (Donato et al., 2013) montrent que les

cellules PV au sein du CA3 de l'hippocampe présentent un changement d'état en fonction de l'expérience de l'animal. Ainsi, l'enrichissement du milieu serait-il corrélé à une faible expression de PV et, à l'inverse, un contexte coercitif, par exemple de conditionnement à la peur, à une forte expression PV. De plus, ce changement d'expression est un marqueur fonctionnel, le niveau d'expression de PV corrélant avec celui de GAD67, la principale enzyme de synthèse des neurotransmetteurs GABA. Les états PV faible ou PV élevé sont associés respectivement à une augmentation des entrées synaptiques GABAergiques ou excitatrices sur les cellules PV elles-mêmes. Les neurones VIP participent eux aussi à la régulation des changements de configuration du réseau en inhibant transitoirement les cellules PV (Figure 38). Ceci suggère une hétérogénéité de la population PV à l'origine de l'inhomogénéité régionale de la plasticité cérébrale.

Comme dans l'hippocampe, l'inhibition de l'activité des cellules PV dans le mPFC peut activer des circuits qui modifient le comportement de peur (Courtin et al., 2014) et déclencher des crises épileptiformes dans le PC (Ryu et al., 2021). Les cellules PV participent assurément au fonctionnement normal du PC mais leur rôle soulève encore de nombreuses interrogations. Comme énoncé précédemment, les interneurons seraient réfractaires à la LTP associative entre les voies afférentes et intrinsèques du PC (Kanter and Haberly, 1993; Kapur et al., 1997). Outre les systèmes de neuromodulation qui, en inhibant les interneurons, permettent l'établissement de la LTP (Haberly and Bower, 1989; Patil and Hasselmo, 1999; Linster and Hasselmo, 2001), les microcircuits inhibiteurs VIP jouent un rôle essentiel dans la plasticité synaptique pendant la formation des représentations olfactives (Canto-Bustos et al., 2022). Ainsi, similairement au fonctionnement du réseau hippocampique (Figure 38), l'inhibition assurée par les cellules VIP permettrait de conserver un état 'PV faible' et contribuerait au maintien de la plasticité du système olfactif. L'hippocampe et le CP sont à bien des égards des systèmes proches ; ils sont tous deux des allocortex, arborant des réseaux associatifs, interconnectés entre eux et responsables des processus mnésiques. Cependant, même si l'hippocampe et le PC sont des systèmes très semblables, nous ne disposons d'aucune preuve sur le contrôle de la plasticité médiée par les circuits VIP. La plasticité du PC pourrait être totalement indépendante de cette désinhibition médiée par le VIP comme le démontre les études réalisées dans le cortex auditif (Takesian et al., 2018). Des études précédentes dans le aPC de rat ont montré que la force de l'inhibition sur les cellules pyramidales se présente sous la forme d'un gradient dont l'amplitude augmente le long de l'axe rostro-caudal (Luna and Pettit, 2010). Cette différence d'inhibition ne semble pas être liée à la densité des interneurons mais serait plus probablement le résultat

de l'excitabilité intrinsèque différentielle des interneurons. Les interneurons caudaux déclencheraient alors plus de potentiels d'action que les rostraux, probablement grâce à une libération GABAergique plus élevée (Luna and Pettit, 2010). De plus, les cellules SOM participeraient activement à l'inhibition des cellules pyramidales et PV influençant les entrées afférentes et récurrentes du PC (Large et al., 2016). Les interneurons SOM jouiraient alors d'un rôle important dans la régulation de l'excitation au cours du traitement olfactif. Dans notre étude, il est clair que la perte d'OTX2 retarde la maturation d'un sous-ensemble de cellules PV, ces cellules sont alors plus actives, au sens de porteuses de plasticité, comme le démontre les niveaux élevés de cFos. Néanmoins, la corrélation entre les niveaux PV et la plasticité demeure inconnue, si elle existe et que le niveau de PV est autre chose qu'un marqueur.

Plusieurs expériences pourraient être envisagées afin de mieux comprendre le lien entre OTX2, la plasticité et les cellules PV dans le PC. Par exemple, il serait intéressant d'exprimer spécifiquement la channelrhodopsine-2 dans les cellules PV sensibles au niveau d'OTX2 afin de comprendre comment leur stimulation contrôle la neurotransmission GABAergique du PC. Nos tests sur la mémoire olfactive ont été réalisés sur des animaux perte de fonction d'OTX2, et nous ignorons quel serait l'impact éventuel du gain de fonction sur la mémoire olfactive des animaux. En outre, les expressions virales ont été analysées 3 semaines post-infection et nous ignorons la cinétique des niveaux d'expression des gènes encodés par le génome viral. Des analyses 1, 3 ou 6 mois post-infection pourraient alors être nécessaires, fournissant de nouveaux indices permettant peut-être de disséquer les mécanismes inhérents à la plasticité du PC.

À ce stade nous ignorons toujours pourquoi la maturation du PC est tardive comparée à celle d'autres structures corticales. Un élément de réponse peut être la dépendance du transfert d'OTX2 au schéma de sulfatation des chaînes de glycanes. L'addition de sulfates en des endroits précis de ces chaînes détermine leurs propriétés de liaison aux protéines. Des preuves récentes suggèrent que l'augmentation développementale du ratio 4-sulfatation/6-sulfatation (4S/6S) des CSPG pourrait être requise pour l'accumulation d'OTX2 (Miyata et al., 2012). Ainsi, la reconnaissance d'OTX2 par les cellules PV pourrait, au moins en partie, découler de l'affinement progressif du profil de sulfatation des PNN. Il pourrait alors exister un schéma de sulfatation des CS propre au PC qui modulerait spécifiquement l'accumulation d'OTX2. Il serait alors intéressant d'utiliser des anticorps tels que le CS-56, 2H6 et MO-225 qui reconnaissent les formes monosulfatées et disulfatées respectivement (Maeda et al., 2003).

De façon intrigante, il a été rapporté que la sensibilité des neurones aux lésions cérébrales diffère selon les régions du cerveau (Lipachev et al., 2019). Bien que le mécanisme de ce phénomène n'ait pas été élucidé, il est possible qu'il implique des différences dans la distribution des molécules de la ECM renforçant notre hypothèse sur la dissimilarité d'expression des PNN selon la région cérébrale considérée.

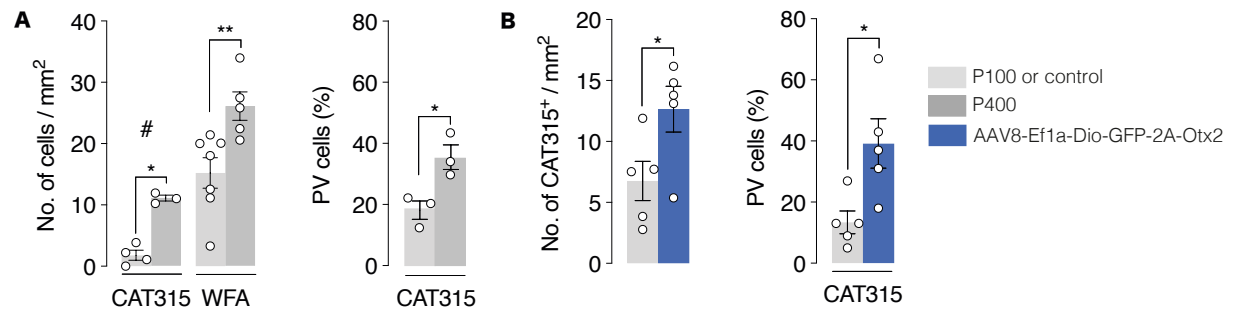


Figure 39. Dans le PC, l'accumulation de CAT315 est lente et dépendante d'OTX2

(A) Dans le PC de souris adulte, CAT315 s'accumule encore plus faiblement que la WFA (#). Comme la WFA, son accumulation est tardive et augmente chez les animaux âgés. (B) Les souris GOF injectées, montrent qu'OTX2 régule l'accumulation de CAT315 dans le PC.

Des études antérieures ont indiqué que la variation des structures glycaniques sur l'agrécane contribue à l'hétérogénéité des PNN (Lander et al., 1997; Matthews et al., 2002). La WFA et CAT315 reconnaissent des populations de CS distinctes se chevauchant partiellement. La WFA reconnaît les résidus GalNac des chaînes CS (Härtig et al., 1992; Haji-Ghassemi et al., 2016) tandis que l'anticorps CAT315 reconnaît l'épitope glycanique HNK-1 sur l'agrécane (Matthews et al., 2002; Yabuno et al., 2015; Yamada and Jinno, 2017). Dans le cortex mature de la souris, les régions dépourvues de WFA et riches en CAT315 sont différenciellement distribuées dans les régions cérébrales (Ueno et al., 2017 ; Matthews et al., 2002). Dans le PC, nos résultats montrent que l'accumulation de CAT315 est lente et augmente au cours du temps. Cette accumulation très faible (Figure 39) est dépendante d'OTX2. Il a été rapporté que les cortex ayant de faibles niveaux de CAT315 maintiennent des niveaux élevés de plasticité même après leur maturation (Ueno et al., 2017). La matrice du PC serait alors composée de peu d'agrécanes, assurant un maintien constant de la plasticité.

II. Mimes de GAG et homéoprotéines

Dans notre seconde étude, nous nous sommes intéressés au développement d'imitations stables de GAG bloquant le transfert d'OTX2. Ces analogues peptidiques imitent les GAG en

fournissant une distribution spatiale des charges et sont plus facilement synthétisables que d'autres mimétiques non-peptidiques comme l'hexaCSE, analogue synthétique du CS-E (Despras et al., 2013).

Nous avons montré que SEMA-3A interagit préférentiellement avec les motifs (EC'AC'), tandis qu'OTX2 ne présente pas de préférence entre les motifs (E'CAC') et (EC'C'A). De plus, les peptides (EC'AC')₆ sont stables au cours du temps et déstabilisent fortement les PNN. Ainsi, ils interfèrent avec la signalisation OTX2 et SEMA-3A, rompent la boucle de rétrocontrôle positive établie entre OTX2 et les PNN, déstabilisant ainsi la maturation des cellules PV.



Figure 40. Schéma des séquences linéaires et branchés

Le mime linéaire est similaire en longueur à un octasaccharide CS. Le mime branché contient 4 motifs liés à un noyau d'oligo-lysine.

Nos précédentes études ont montré qu'une réduction de 20 à 30% des niveaux d'OTX2 dans le V1 induisait une fenêtre de plasticité à l'âge adulte (Beurdeley et al., 2012b; Spatazza et al., 2013b; Bernard and Prochiantz, 2016). Ici, après 4 jours d'injection, le blocage par les peptides (EC'AC')₆ est suffisant pour la réouverture d'une fenêtre de plasticité chez les souris adultes, démontrant alors le potentiel thérapeutique des mimes de GAG. Nos résultats suggèrent que les motifs électrostatiques des mimes récapitulent les motifs de sulfatation spécifiques présents dans les GAG naturels et jouissent alors d'un certain potentiel thérapeutique. Néanmoins, nos mimes actuels interfèrent avec la signalisation SEMA-3A qui participe à la fermeture de la CP (de Winter et al., 2016), il n'est donc pas exclu que la réouverture observée chez les souris adultes découle de la signalisation SEMA-3A et pas seulement du blocage d'OTX2. Par conséquent, des améliorations sont nécessaires afin d'améliorer la sélectivité des mimes de GAG. Les chaînes de CS sont connues pour interagir avec de nombreuses protéines de la ECM, principalement par des interactions électrostatiques, de sorte que des liaisons faibles ou non spécifiques peuvent interférer avec la sélectivité. Le développement de mimes branchés,

favorisant de multiples interactions pourrait alors être pertinent et permettre d'augmenter l'affinité et la spécificité *in vivo* (Figure 40). Au sein des mimes branchés, l'amplification du noyau oligo-lysine, permettrait d'augmenter le nombre de motifs et créer une bibliothèque de mimes de GAG plus complète permettant de cribler un ensemble de protéines interagissant avec la ECM. Étant donné que la famille des homéoprotéines, qui compte 300 membres, détient une grande variété de motifs de liaison aux GAG, une telle approche de développement de mimes spécifiques pourrait permettre de déchiffrer le 'code sucre' dirigeant la spécificité d'interaction *in vivo* entre homéoprotéines et cellules cibles (Prochiantz and Di Nardo, 2015).

Quels sont alors les indices soutenant l'existence d'un tel code ?

Il a été observé que la spécificité d'internalisation des homéoprotéines découlait des conditions expérimentales. *In vitro*, leur internalisation est aspécifique à l'inverse de celle *in vivo*. En outre, l'injection d'EN dans le cortex n'aboutit à aucune internalisation préférentielle au sein de la couche IV (Sugiyama et al., 2008) à l'inverse d'OTX2 qui reconnaît les motifs CS-D/E des PNN décorant les cellules PV de cette couche.

Après injection dans le V1, la diffusion d'OTX2 et EN est limitée du fait d'une rapide capture par les cellules proches du site d'injection. En revanche, leur association avec de la PSA améliore leur diffusion et la spécificité et intensité de leur capture par des cellules cibles (Joliot et al., 1991a). Il a été proposé que la structure hélicale et les charges du PSA mimeraient la structure de la double hélice d'ADN et établirait une liaison de faible affinité avec l'homéodomaine (Joliot et al., 1991a; Prochiantz and Di Nardo, 2015). L'internalisation serait alors limitée aux cellules présentant à leur surface des glycanes de forte affinité pour les HP considérées, plus forte que celle du PSA. Par analogie, on peut proposer que lors de sa sécrétion à partir des plexus choroïdes, l'association d'OTX2 avec des sucres de faibles affinités assurerait sa stabilité et sa diffusion au sein du parenchyme et faciliterait sa capture spécifique avec les cellules cibles arborant des sites de fortes affinités (motifs CS-D/E). À proximité de sa cible, un changement de partenaire s'opèrerait conduisant à l'internalisation préférentielle d'OTX2. Ce modèle est confirmé par le motif de liaison au GAG (doublet RK) qui interagit avec CS-D/E et confère une grande spécificité de reconnaissance des cellules PV, sa mutation compromettant l'accumulation spécifique d'OTX2 dans ces cellules (Beurdeley et al., 2012b). Toutes ces études suggèrent que la diffusion des homéoprotéines repose sur une association à des sucres de faible affinité, et que le GAG serait le site d'échange de forte affinité assurant l'internalisation par des populations cellulaires spécifiques. Par ailleurs, ce mode de diffusion a été rapporté pour de nombreux morphogènes tels que FGF, Wnt, TGF β et Hedgehog dont la

diffusion limitée est améliorée lorsqu'ils sont associés à des transporteurs glucidiques ou lipidiques (Lin, 2004; Eaton, 2006; Steinhauer and Treisman, 2009).

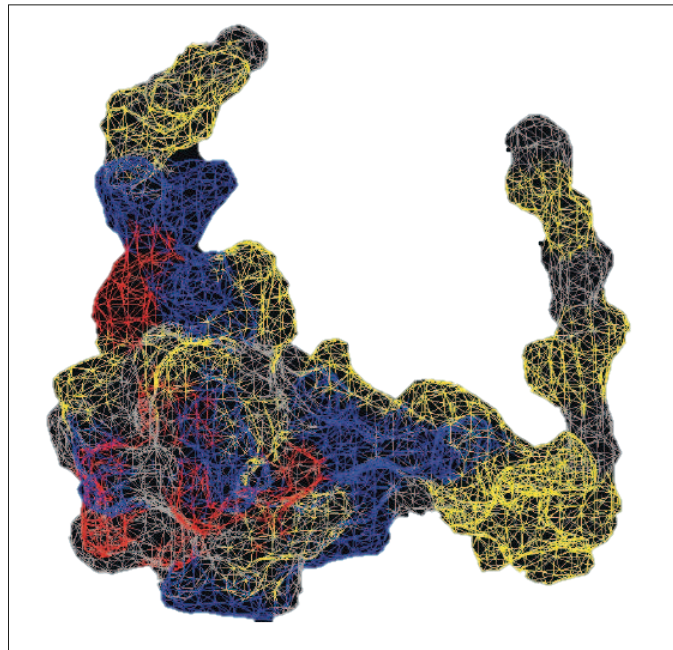


Figure 41 : Structure de l'homéoprotéine OTX2

Représentation d'OTX2 (pdb 2DMS) avec le domaine de liaison aux GAG (peptide RK) dans la partie supérieure gauche. Code couleur : bleu, résidus chargés positivement ; rouge, résidus anioniques ; jaune, résidus neutres et polaires ; gris, résidus hydrophobes.

Ainsi, le développement d'une librairie de mimes présentant des variations de longueur et de charge permettrait d'identifier les propriétés de chaque domaine de reconnaissance aux sucres pour de nombreuses homéoprotéines. L'identification de ce 'code sucre' permettra alors d'identifier la nature des interactions des homéoprotéines et de distinguer l'activité cellulaire autonome de celle non-autonome. Le développement de mimes branchés concourrait à l'augmentation de la spécificité en augmentant les zones de contact avec les homéoprotéines (Figure 41). La représentation spatiale d'OTX2 montre l'importance des domaines chargés positivement, ils sont au nombre de deux, le domaine de reconnaissance aux sucres (peptide RK) et un autre qui reste à ce jour inconnu. La structure d'OTX2 révèle également des zones secondaires de contact à proximité du domaine de liaison qui pourraient participer à la sélectivité de l'interaction entre les protéines et les sucres.

III. Quels mécanismes pour OTX2 ?

Comme nous avons pu le constater au fil du manuscrit, OTX2 est à bien des égards une homéoprotéine aux rôles complexes régulant l'embryogénèse mais aussi le développement postnatal et exerçant des fonctions physiologiques chez l'adulte, dont au niveau du cortex cérébral, du cervelet, du plexus choroïde, de la rétine et de l'aire ventrale tegmentaire. Il semblerait qu'elle interagisse avec un grand nombre de partenaires et qu'elle pourrait réguler la signalisation cellulaire à plusieurs niveaux (Figure 42). Pour ce qui est du cortex cérébral, OTX2 est sécrétée à partir de sources extracorticales tel que le plexus choroïde (Spatazza et al., 2013b), diffuse dans le parenchyme cérébral et est internalisée préférentiellement dans les cellules PV dont elle régule la maturation, variable importante de la plasticité corticale, en particulier celle qui accompagne les CP (Lee et al., 2017).

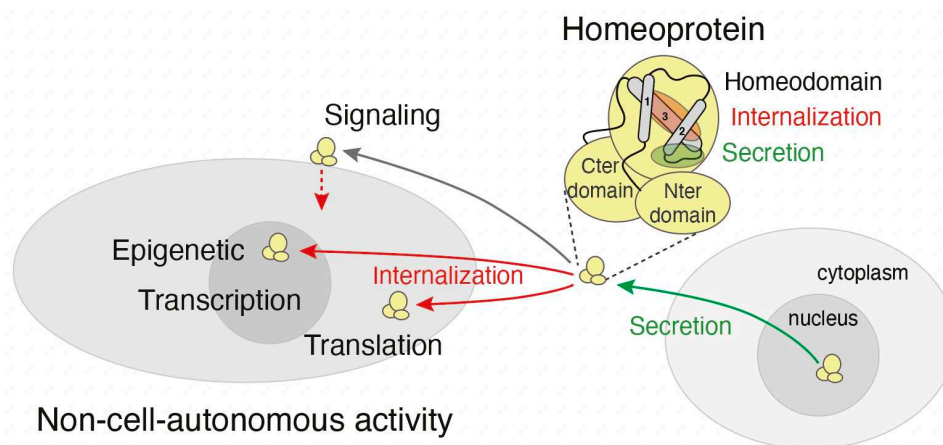


Figure 42. Transfert intercellulaire des homéoprotéines

Dans une homéoprotéine, l'homéodomaine, composé de 3 hélices-alpha conservées, est flanqué de domaines N- et C-terminaux plus variables. Ces domaines participent à nombre d'interactions avec l'ADN, l'ARN, les GAG et les protéines. Les homéoprotéines régulent l'état épigénétique de la chromatine, la transcription et la traduction. (Adapté de (Prochiantz and Di Nardo, 2015)).

Bien entendu, OTX2 n'est pas le seul gardien de la plasticité et de nombreux facteurs cellulaires non-autonomes ont montré leur rôle prépondérant dans sa régulation (Gibel-Russo et al., 2022). La microglie, les oligodendrocytes mais également les astrocytes participent largement à la plasticité cérébrale (Gibel-Russo et al., 2022). Par exemple, une étude récente a rapporté le rôle de la signalisation non conventionnelle de la connexine-30 astrocytaire (Cx30) qui en entravant l'expression de MMP9, par l'activation de la RhoA-guanosine triphosphatase, influence

l'activité des synapses et le câblage des circuits cérébraux en réponse à l'expérience visuelle (Ribot et al., 2021).

Ces derniers travaux établissent qu'en V1, la CX30 augmente progressivement jusqu'à la fin de la CP où elle atteint son niveau maximal. Elle contribue à la fermeture de la CP et sa régulation négative entraîne la réouverture d'une fenêtre de plasticité à l'âge adulte. Chez les souris knockdown pour la *Cx30*, où son expression est diminuée de ~80% dans les astrocytes, la CP est retardée et la plasticité persiste jusqu'à P50. La CX30 semble alors, au même titre qu'OTX2 participer à la maturation corticale et ainsi à la régulation de la CP visuelle. Dans le V1 de souris P50 knockdown pour la *Cx30*, nos données préliminaires confirment les résultats précédemment obtenus (Ribot et al., 2021). Les niveaux d'intensité de la CX30 sont altérés et nous observons aussi une diminution des niveaux d'intensité de la CX30 dans les animaux hétérozygotes pour *Otx2* (*Otx2*^{GFP/+}). À l'inverse, l'expression virale d'OTX2 rétablit l'intensité de la CX30 dans les souris knockdown pour la *Cx30* (Figure 43). Ces résultats montrent une nouvelle coopération entre une homéoprotéine et une protéine astrocytaire régulant ensemble la CP du V1.

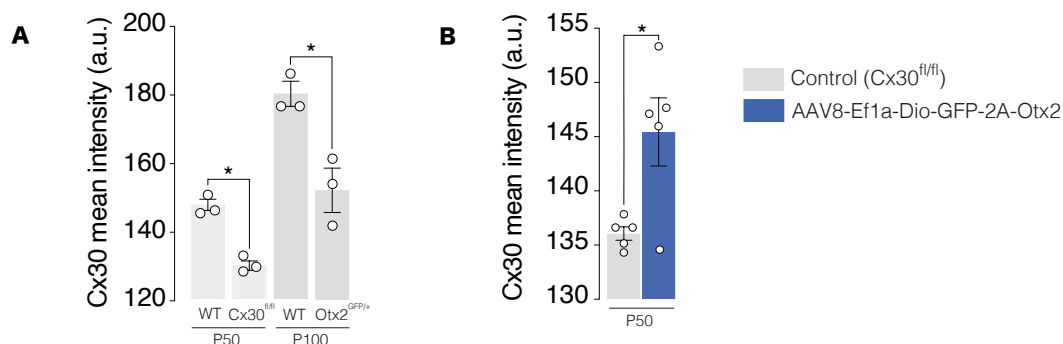


Figure 43. La Cx30 partenaire ou cible d'OTX2 ?

Dans le V1, il a été montré que la Cx30 contribuait à la fermeture de la CP. (A) À P100, la baisse d'intensité de la Cx30 dans la souris *Otx2*^{GFP/+} rappelle celle observée après knockdown de la Cx30 à P50. (B) Dans les animaux knockdown pour la Cx30, l'expression virale d'OTX2 rétablit l'intensité physiologique de la Cx30.

L'activité d'Otx2 est complexe et rappelons-le peut se produire à plusieurs niveaux (Figure 42). OTX2 est un facteur de transcription et module par conséquent le niveau d'expression de ses gènes cibles. Notre étude dans le PC démontre que les niveaux d'OTX2 influencent différemment l'expression des enzymes de la matrice. Nous ignorons si OTX2 régule directement ou non l'expression de ces gènes, néanmoins la perte d'OTX2 augmente

l'expression de *Mmp9* et de *Chst14*, tandis que sa surexpression augmente également *Chst14* mais également les isoformes 3 et 13 ainsi qu'*Adamts9*. Dans les paradigmes de gain et de perte de fonction, il est d'usage d'observer une régulation de l'expression opposée des gènes cibles. Ils sont alors soit activés ou réprimés selon les niveaux d'expression du gène qui les régule. Cependant, dans notre étude nous observons un effet concentration dépendant d'OTX2 qui contrôle différenciellement les gènes régulés. Dans une précédente étude, nous avons constaté qu'OTX2 régule *Gadd45b* de manière opposée dans le cortex juvénile et adulte (Apulei et al., 2019). OTX2 modulerait alors l'état épigénétique des cellules PV en régulant la structure de la chromatine. Nous avons émis l'hypothèse selon laquelle les sites cibles d'OTX2 sur *Gadd45b* seraient accessibles en fonction de la concentration d'OTX2, certains niveaux activant et d'autres réprimant la transcription.

De façon intéressante, un tel mécanisme a été rapporté pour l'homéoprotéine Bicoid (Hannon et al., 2017). On distingue alors des sites sensibles et insensibles à sa concentration. À concentration élevée Bicoid influence la structure de la chromatine pour accéder aux sites sensibles, tandis que les sites insensibles sont liés à des concentrations plus faibles de Bicoid. Ainsi, bien que l'impact d'OTX2 sur la structure de la chromatine n'ait pas encore été élucidé, il est possible que la protéine induise des modifications de la structure chromatinienne de façon proportionnelle à sa quantité. Outre leur contrôle transcriptionnel, certaines homéoprotéines telles que Bicoid, Emx2, Hoxa9, PRH, En et Otx2 contrôlent également la traduction via un motif fonctionnel de liaison à eIF4E (Dubnau and Struhl, 1996; Nédélec et al., 2004; Topisirovic and Borden, 2005). Une fois dans le cytoplasme des cellules PV, OTX2 pourrait alors lier eIF4E et réguler la traduction de ses gènes cibles. Pour lors, nous ignorons encore quels sont les mécanismes inhérents à la relation OTX2/CX30. Néanmoins, il est attendu que les voies activées par OTX2 et la CX30 soient proches et qu'elles puissent s'influencer mutuellement. Ainsi, OTX2 pourrait être internalisée dans les astrocytes et réguler directement leur signalisation. Une étude récente dans le V1 a montré que la photostimulation sélective des astrocytes par la channelrhodopsin-2 activerait les cellules PV. Les astrocytes influenceraient alors les caractéristiques d'intégration neuronales essentielles au traitement des informations sensorielles (Perea et al., 2014). Ainsi, il est assez probable que les astrocytes modulent l'activité des cellules PV via une signalisation OTX2/CX30 dépendante. Il est à noter que malgré leurs divergences phylogénétiques, l'organisation gliale entre le néocortex et le paléocortex conservent de nombreuses similitudes (Pinto-Duarte et al., 2019). Le rôle des

astrocytes dans le PC reste inconnu, néanmoins il serait probable qu'ils puissent également être impliqués dans la plasticité singulière du PC.

A travers ces derniers éclairages, il apparaît que de nombreuses questions demeurent et que, même si ce manuscrit contribue à une meilleure connaissance de la régulation de la plasticité impliquant OTX2, beaucoup reste à faire. J'espère que de nouvelles études mettront la lumière sur les parts d'ombres qui subsistent à ce jour et qu'une meilleure compréhension des mécanismes de plasticité contribuera à l'amélioration des neuropathologies associées à ses dysfonctionnements.

Des premières étapes de la vie jusqu'à son inexorable fin, les nombreuses fonctions des homéoprotéines n'ont certainement pas fini de nous étonner.

RÉFÉRENCES

- Aboitiz, F., Montiel, J., Morales, D., and Concha, M. (2002). Evolutionary divergence of the reptilian and the mammalian brains: considerations on connectivity and development. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 39, 141–53. doi:10.1016/s0165-0173(02)00180-7.
- Acampora, D., Gulisano, M., Broccoli, V., and Simeone, A. (2001). Otx genes in brain morphogenesis. *Prog. Neurobiol.* 64, 69–95. doi:10.1016/s0301-0082(00)00042-3.
- Acampora, D., Mazan, S., Lallemand, Y., Avantaggiato, V., Maury, M., Simeone, A., et al. (1995). Forebrain and midbrain regions are deleted in Otx2^{-/-} mutants due to a defective anterior neuroectoderm specification during gastrulation. *Development* 121, 3279–3290. doi:10.1242/dev.121.10.3279.
- Akol, I., Kalogeraki, E., Pielecka-Fortuna, J., Fricke, M., and Löwel, S. (2022). MMP2 and MMP9 Activity Is Crucial for Adult Visual Cortex Plasticity in Healthy and Stroke-Affected Mice. *J. Neurosci.* 42, 16–32. doi:10.1523/JNEUROSCI.0902-21.2021.
- Altman, J. (1963). Autoradiographic investigation of cell proliferation in the brains of rats and cats. *Anat. Rec.* 145, 573–91. doi:10.1002/ar.1091450409.
- Altman, J. (1969). Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb. *J. Comp. Neurol.* 137, 433–57. doi:10.1002/cne.901370404.
- Altman, J., and Das, G. D. (1965). Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J. Comp. Neurol.* 124, 319–335. doi:10.1002/cne.901240303.
- Alvarez-Buylla, A., García-Verdugo, J. M., and Tramontin, A. D. (2001). A unified hypothesis on the lineage of neural stem cells. *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 287–93. doi:10.1038/35067582.
- Amblard, I., Thauvin, M., Rampon, C., Queguiner, I., Pak, V. V., Belousov, V., et al. (2020). H2O2 and Engrailed 2 paracrine activity synergize to shape the zebrafish optic tectum. *Commun. Biol.* 3, 536. doi:10.1038/s42003-020-01268-7.
- Amrein, I. (2015). Adult Hippocampal Neurogenesis in Natural Populations of Mammals. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 7, a021295. doi:10.1101/cshperspect.a021295.
- Antonoudiou, P., Tan, Y. L., Kontou, G., Upton, A. L., and Mann, E. O. (2020). Parvalbumin and Somatostatin Interneurons Contribute to the Generation of Hippocampal Gamma Oscillations. *J. Neurosci.* 40, 7668–7687. doi:10.1523/JNEUROSCI.0261-20.2020.
- Apulei, J., Kim, N., Testa, D., Ribot, J., Morizet, D., Bernard, C., et al. (2019). Non-cell Autonomous OTX2 Homeoprotein Regulates Visual Cortex Plasticity Through

- Gadd45b/g. *Cereb. Cortex* 29, 2384–2395. doi:10.1093/cercor/bhy108.
- Arslan, E., Guler, M. O., and Tekinay, A. B. (2016). Glycosaminoglycan-Mimetic Signals Direct the Osteo/Chondrogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells in a Three-Dimensional Peptide Nanofiber Extracellular Matrix Mimetic Environment. *Biomacromolecules* 17, 1280–1291. doi:10.1021/acs.biomac.5b01637.
- Asher, R. A., Morgenstern, D. A., Fidler, P. S., Adcock, K. H., Oohira, A., Braistead, J. E., et al. (2000). Neurocan is upregulated in injured brain and in cytokine-treated astrocytes. *J. Neurosci.* 20, 2427–38. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10729323>.
- Asher, R. A., Morgenstern, D. A., Shearer, M. C., Adcock, K. H., Pesheva, P., and Fawcett, J. W. (2002). Versican Is Upregulated in CNS Injury and Is a Product of Oligodendrocyte Lineage Cells. *J. Neurosci.* 22, 2225–2236. doi:10.1523/JNEUROSCI.22-06-02225.2002.
- Aton, S. J., Broussard, C., Dumoulin, M., Seibt, J., Watson, A., Coleman, T., et al. (2013). Visual experience and subsequent sleep induce sequential plastic changes in putative inhibitory and excitatory cortical neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 3101–6. doi:10.1073/pnas.1208093110.
- Bandtlow, C. E., and Zimmermann, D. R. (2000). Proteoglycans in the Developing Brain: New Conceptual Insights for Old Proteins. *Physiol. Rev.* 80, 1267–1290. doi:10.1152/physrev.2000.80.4.1267.
- Baranova, N. S., Nilebäck, E., Haller, F. M., Briggs, D. C., Svedhem, S., Day, A. J., et al. (2011). The inflammation-associated protein TSG-6 cross-links hyaluronan via hyaluronan-induced TSG-6 oligomers. *J. Biol. Chem.* 286, 25675–86. doi:10.1074/jbc.M111.247395.
- Barkai, E., Bergman, R. E., Horwitz, G., and Hasselmo, M. E. (1994). Modulation of associative memory function in a biophysical simulation of rat piriform cortex. *J. Neurophysiol.* 72, 659–677. doi:10.1152/jn.1994.72.2.659.
- Barnea, G., O'Donnell, S., Mancina, F., Sun, X., Nemes, A., Mendelsohn, M., et al. (2004). Odorant receptors on axon termini in the brain. *Science* 304, 1468. doi:10.1126/science.1096146.
- Bartos, M., Vida, I., and Jonas, P. (2007). Synaptic mechanisms of synchronized gamma oscillations in inhibitory interneuron networks. *Nat. Rev. Neurosci.* 8, 45–56. doi:10.1038/nrn2044.
- Bayer, S. A., Yackel, J. W., and Puri, P. S. (1982). Neurons in the rat dentate gyrus granular layer substantially increase during juvenile and adult life. *Science* 216, 890–2.

doi:10.1126/science.7079742.

- Bekkers, J. M., and Suzuki, N. (2013). Neurons and circuits for odor processing in the piriform cortex. *Trends Neurosci.* 36, 429–38. doi:10.1016/j.tins.2013.04.005.
- Belitz, H.-D., Grosch, W., and Schieberle, P. (1999). *Food Chemistry*.
- Berlose, J. P., Convert, O., Derossi, D., Brunissen, A., and Chassaing, G. (1996). Conformational and associative behaviours of the third helix of antennapedia homeodomain in membrane-mimetic environments. *Eur. J. Biochem.* 242, 372–86. doi:10.1111/j.1432-1033.1996.0372r.x.
- Bernard, C., Kim, H.-T., Torero Ibad, R., Lee, E. J., Simonutti, M., Picaud, S., et al. (2014). Graded Otx2 activities demonstrate dose-sensitive eye and retina phenotypes. *Hum. Mol. Genet.* 23, 1742–53. doi:10.1093/hmg/ddt562.
- Bernard, C., and Prochiantz, A. (2016). Otx2-PNN Interaction to Regulate Cortical Plasticity. *Neural Plast.* 2016, 1–7. doi:10.1155/2016/7931693.
- Bernard, C., Vincent, C., Testa, D., Bertini, E., Ribot, J., Di Nardo, A. A., et al. (2016a). A Mouse Model for Conditional Secretion of Specific Single-Chain Antibodies Provides Genetic Evidence for Regulation of Cortical Plasticity by a Non-cell Autonomous Homeoprotein Transcription Factor. *PLOS Genet.* 12. doi:10.1371/journal.pgen.1006035.
- Bernard, C., Vincent, C., Testa, D., Bertini, E., Ribot, J., Di Nardo, A. A., et al. (2016b). A Mouse Model for Conditional Secretion of Specific Single-Chain Antibodies Provides Genetic Evidence for Regulation of Cortical Plasticity by a Non-cell Autonomous Homeoprotein Transcription Factor. *PLOS Genet.* 12, e1006035. doi:10.1371/journal.pgen.1006035.
- Berry, M., Hubbard, P., and Butt, A. M. Cytology and lineage of NG2-positive glia. *J. Neurocytol.* 31, 457–67. doi:10.1023/a:1025735513560.
- Beurdeley, M., Spatazza, J., Lee, H. H. C., Sugiyama, S., Bernard, C., Di Nardo, A. A., et al. (2012a). Otx2 binding to perineuronal nets persistently regulates plasticity in the mature visual cortex. *J. Neurosci.* 32, 9429–9437. doi:10.1523/JNEUROSCI.0394-12.2012.
- Beurdeley, M., Spatazza, J., Lee, H. H. C., Sugiyama, S., Bernard, C., Di Nardo, A. A., et al. (2012b). Otx2 Binding to Perineuronal Nets Persistently Regulates Plasticity in the Mature Visual Cortex. *J. Neurosci.* 32. doi:10.1523/JNEUROSCI.0394-12.2012.
- Bjerke, I. E., Yates, S. C., Laja, A., Witter, M. P., Puchades, M. A., Bjaalie, J. G., et al. (2021). Densities and numbers of calbindin and parvalbumin positive neurons across the rat and mouse brain. *iScience* 24, 101906. doi:10.1016/j.isci.2020.101906.

- Boldrini, M., Fulmore, C. A., Tartt, A. N., Simeon, L. R., Pavlova, I., Poposka, V., et al. (2018). Human Hippocampal Neurogenesis Persists throughout Aging. *Cell Stem Cell* 22, 589-599.e5. doi:10.1016/j.stem.2018.03.015.
- Brann, D. H., Tsukahara, T., Weinreb, C., Lipovsek, M., Van den Berge, K., Gong, B., et al. (2020). Non-neuronal expression of SARS-CoV-2 entry genes in the olfactory system suggests mechanisms underlying COVID-19-associated anosmia. *Sci. Adv.* 6. doi:10.1126/sciadv.abc5801.
- Bridges, C. B., and Morgan, T. H. (1923). *The third-chromosome group of mutant characters of Drosophila melanogaster*. Washington: Carnegie Institution of Washington doi:10.5962/bhl.title.24013.
- Bronshtein, A. A., and Minor, A. V (1977). [Regeneration of olfactory flagella and restoration of the electroolfactogram following application of triton X-100 to the olfactory mucosa of frogs]. *Tsitologiya* 19, 33–9.
- Brückner, G., Brauer, K., Härtig, W., Wolff, J. R., Rickmann, M. J., Derouiche, A., et al. (1993). Perineuronal nets provide a polyanionic, glia-associated form of microenvironment around certain neurons in many parts of the rat brain. *Glia* 8, 183–200. doi:10.1002/glia.440080306.
- Brückner, G., Bringmann, A., Härtig, W., Köppe, G., Delpech, B., and Brauer, K. (1998). Acute and long-lasting changes in extracellular-matrix chondroitin-sulphate proteoglycans induced by injection of chondroitinase ABC in the adult rat brain. *Exp. brain Res.* 121, 300–10. doi:10.1007/s002210050463.
- Brückner, G., and Grosche, J. (2001). Perineuronal nets show intrinsic patterns of extracellular matrix differentiation in organotypic slice cultures. *Exp. brain Res.* 137, 83–93. doi:10.1007/s002210000617.
- Brückner, G., Grosche, J., Schmidt, S., Härtig, W., Margolis, R. U., Delpech, B., et al. (2000). Postnatal development of perineuronal nets in wild-type mice and in a mutant deficient in tenascin-R. *J. Comp. Neurol.* 428, 616–29. doi:10.1002/1096-9861(20001225)428:4<616::aid-cne3>3.0.co;2-k.
- Brückner, G., Hausen, D., Härtig, W., Drlicek, M., Arendt, T., and Brauer, K. (1999). Cortical areas abundant in extracellular matrix chondroitin sulphate proteoglycans are less affected by cytoskeletal changes in Alzheimer's disease. *Neuroscience* 92, 791–805. doi:10.1016/S0306-4522(99)00071-8.
- Brunet, I., Weinl, C., Piper, M., Trembleau, A., Volovitch, M., Harris, W., et al. (2005). The transcription factor Engrailed-2 guides retinal axons. *Nature* 438, 94–8.

doi:10.1038/nature04110.

- Brunjes, P. C., Illig, K. R., and Meyer, E. A. (2005). A field guide to the anterior olfactory nucleus (cortex). *Brain Res. Rev.* 50, 305–335. doi:10.1016/j.brainresrev.2005.08.005.
- Buck, L., and Axel, R. (1991). A novel multigene family may encode odorant receptors: A molecular basis for odor recognition. *Cell* 65, 175–187. doi:10.1016/0092-8674(91)90418-X.
- Bukalo, O., Schachner, M., and Dityatev, A. (2007). Hippocampal Metaplasticity Induced by Deficiency in the Extracellular Matrix Glycoprotein Tenascin-R. *J. Neurosci.* 27, 6019–6028. doi:10.1523/JNEUROSCI.1022-07.2007.
- Buss, R. R., Sun, W., and Oppenheim, R. W. (2006). ADAPTIVE ROLES OF PROGRAMMED CELL DEATH DURING NERVOUS SYSTEM DEVELOPMENT. *Annu. Rev. Neurosci.* 29, 1–35. doi:10.1146/annurev.neuro.29.051605.112800.
- Buzsáki, G., and Draguhn, A. (2004). Neuronal oscillations in cortical networks. *Science* 304, 1926–9. doi:10.1126/science.1099745.
- Cabungcal, J.-H., Steullet, P., Morishita, H., Kraftsik, R., Cuenod, M., Hensch, T. K., et al. (2013). Perineuronal nets protect fast-spiking interneurons against oxidative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 9130–9135. doi:10.1073/pnas.1300454110.
- Canto-Bustos, M., Friason, F. K., Bassi, C., and Oswald, A.-M. M. (2022). Disinhibitory Circuitry Gates Associative Synaptic Plasticity in Olfactory Cortex. *J. Neurosci.* 42, 2942–2950. doi:10.1523/JNEUROSCI.1369-21.2021.
- Carceller, H., Guirado, R., Ripolles-Campos, E., Teruel-Martí, V., and Nacher, J. (2020). Perineuronal Nets Regulate the Inhibitory Perisomatic Input onto Parvalbumin Interneurons and γ Activity in the Prefrontal Cortex. *J. Neurosci.* 40, 5008–5018. doi:10.1523/JNEUROSCI.0291-20.2020.
- Cardin, A. D., and Weintraub, H. J. Molecular modeling of protein-glycosaminoglycan interactions. *Arteriosclerosis* 9, 21–32. doi:10.1161/01.atv.9.1.21.
- Cardon, S., Bolbach, G., P. Hervis, Y., Lopin-Bon, C., Jacquinet, J.-C., Illien, F., et al. (2021). A cationic motif in Engrailed-2 homeoprotein controls its internalization via selective cell-surface glycosaminoglycans interactions. *bioRxiv*. doi:10.1101/2021.07.29.454375.
- 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. doi:10.1038/nn1048.
- Carstens, K. E., Phillips, M. L., Pozzo-Miller, L., Weinberg, R. J., and Dudek, S. M. (2016). Perineuronal Nets Suppress Plasticity of Excitatory Synapses on CA2 Pyramidal

- Neurons. *J. Neurosci.* 36, 6312–6320. doi:10.1523/JNEUROSCI.0245-16.2016.
- Carulli, D., Rhodes, K. E., Brown, D. J., Bonnert, T. P., Pollack, S. J., Oliver, K., et al. (2006). Composition of perineuronal nets in the adult rat cerebellum and the cellular origin of their components. *J. Comp. Neurol.* 494, 559–77. doi:10.1002/cne.20822.
- Carulli, D., Rhodes, K. E., and Fawcett, J. W. (2007). Upregulation of aggrecan, link protein 1, and hyaluronan synthases during formation of perineuronal nets in the rat cerebellum. *J. Comp. Neurol.* 501, 83–94. doi:10.1002/cne.21231.
- Castrén, E., Zafra, F., Thoenen, H., and Lindholm, D. (1992). Light regulates expression of brain-derived neurotrophic factor mRNA in rat visual cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 9444–8. doi:10.1073/pnas.89.20.9444.
- Celio, M. R. (1990). Calbindin D-28k and parvalbumin in the rat nervous system. *Neuroscience* 35. doi:10.1016/0306-4522(90)90091-H.
- Chapuis, J., and Wilson, D. A. (2012). Bidirectional plasticity of cortical pattern recognition and behavioral sensory acuity. *Nat. Neurosci.* 15, 155–161. doi:10.1038/nn.2966.
- Chatelin, L., Volovitch, M., Joliot, A. H., Perez, F., and Prochiantz, A. (1996). Transcription factor *hoxa-5* is taken up by cells in culture and conveyed to their nuclei. *Mech. Dev.* 55, 111–7. doi:10.1016/0925-4773(95)00478-5.
- Chattopadhyaya, B., Di Cristo, G., Higashiyama, H., Knott, G. W., Kuhlman, S. J., Welker, E., et al. (2004). Experience and activity-dependent maturation of perisomatic GABAergic innervation in primary visual cortex during a postnatal critical period. *J. Neurosci.* 24, 9598–611. doi:10.1523/JNEUROSCI.1851-04.2004.
- Cheah, M., Andrews, M. R., Chew, D. J., Moloney, E. B., Verhaagen, J., Fässler, R., et al. (2016). Expression of an Activated Integrin Promotes Long-Distance Sensory Axon Regeneration in the Spinal Cord. *J. Neurosci.* 36, 7283–97. doi:10.1523/JNEUROSCI.0901-16.2016.
- Chen, L., Yang, C., and Mower, G. D. (2001). Developmental changes in the expression of GABA(A) receptor subunits ($\alpha(1)$, $\alpha(2)$, $\alpha(3)$) in the cat visual cortex and the effects of dark rearing. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 88, 135–43. doi:10.1016/s0169-328x(01)00042-0.
- Cheng, H., Wang, Y., Chen, J., and Chen, Z. (2020). The piriform cortex in epilepsy: What we learn from the kindling model. *Exp. Neurol.* 324, 113137. doi:10.1016/j.expneurol.2019.113137.
- Cheung, S. T., Miller, M. S., Pacoma, R., Roland, J., Liu, J., Schumacher, A. M., et al. (2017). Discovery of a Small-Molecule Modulator of Glycosaminoglycan Sulfation. *ACS Chem.*

- Biol.* 12, 3126–3133. doi:10.1021/acscchembio.7b00885.
- Christiaens, B., Symoens, S., Verheyden, S., Engelborghs, Y., Joliot, A., Prochiantz, A., et al. (2002). Tryptophan fluorescence study of the interaction of penetratin peptides with model membranes. *Eur. J. Biochem.* 269, 2918–26. doi:10.1046/j.1432-1033.2002.02963.x.
- Cohen, S., and Jürgens, G. (1991). Drosophila headlines. *Trends Genet.* 7, 267–272. doi:10.1016/0168-9525(91)90327-M.
- Connell, B. J., Baleux, F., Coic, Y. M., Clayette, P., Bonnaffé, D., and Lortat-Jacob, H. (2012). A synthetic heparan sulfate-mimetic peptide conjugated to a mini CD4 displays very high anti- HIV-1 activity independently of coreceptor usage. *Chem. Biol.* 19, 131–139. doi:10.1016/j.chembiol.2011.12.009.
- Corotto, F. S., Henegar, J. R., and Maruniak, J. A. (1994). Odor deprivation leads to reduced neurogenesis and reduced neuronal survival in the olfactory bulb of the adult mouse. *Neuroscience* 61, 739–744. doi:10.1016/0306-4522(94)90397-2.
- Corredor, M., Bonet, R., Moure, A., Domingo, C., Bujons, J., Alfonso, I., et al. (2016). Cationic Peptides and Peptidomimetics Bind Glycosaminoglycans as Potential Sema3A Pathway Inhibitors. *Biophys. J.* 110, 1291–303. doi:10.1016/j.bpj.2016.01.033.
- Corvetti, L., and Rossi, F. (2005). Degradation of chondroitin sulfate proteoglycans induces sprouting of intact purkinje axons in the cerebellum of the adult rat. *J. Neurosci.* 25, 7150–8. doi:10.1523/JNEUROSCI.0683-05.2005.
- Coulson-Thomas, V. J., Lauer, M. E., Soleman, S., Zhao, C., Hascall, V. C., Day, A. J., et al. (2016). Tumor Necrosis Factor-stimulated Gene-6 (TSG-6) Is Constitutively Expressed in Adult Central Nervous System (CNS) and Associated with Astrocyte-mediated Glial Scar Formation following Spinal Cord Injury. *J. Biol. Chem.* 291, 19939–52. doi:10.1074/jbc.M115.710673.
- Courtin, J., Chaudun, F., Rozeske, R. R., Karalis, N., Gonzalez-Campo, C., Wurtz, H., et al. (2014). Prefrontal parvalbumin interneurons shape neuronal activity to drive fear expression. *Nature* 505, 92–96. doi:10.1038/nature12755.
- Courtois, V., Chatelain, G., Han, Z.-Y., Le Novère, N., Brun, G., and Lamonerie, T. (2003). New Otx2 mRNA isoforms expressed in the mouse brain. *J. Neurochem.* 84, 840–853. doi:10.1046/j.1471-4159.2003.01583.x.
- Cragg, B. (1979). Brain extracellular space fixed for electron microscopy. *Neurosci. Lett.* 15, 301–6. doi:10.1016/0304-3940(79)96130-5.
- Davies, J. A., Yates, E. A., and Turnbull, J. E. (2003). Structural determinants of heparan

- sulphate modulation of GDNF signalling. *Growth Factors* 21, 109–19.
doi:10.1080/08977190310001621005.
- Davies, J. E., Tang, X., Denning, J. W., Archibald, S. J., and Davies, S. J. A. (2004). Decorin suppresses neurocan, brevican, phosphacan and NG2 expression and promotes axon growth across adult rat spinal cord injuries. *Eur. J. Neurosci.* 19, 1226–42.
doi:10.1111/j.1460-9568.2004.03184.x.
- Day, J. M., Olin, A. I., Murdoch, A. D., Canfield, A., Sasaki, T., Timpl, R., et al. (2004). Alternative Splicing in the Aggrecan G3 Domain Influences Binding Interactions with Tenascin-C and Other Extracellular Matrix Proteins. *J. Biol. Chem.* 279.
doi:10.1074/jbc.M400242200.
- De Curtis, M., Biella, G., Forti, M., and Panzica, F. (1994). Multifocal spontaneous epileptic activity induced by restricted bicuculline ejection in the piriform cortex of the isolated guinea pig brain. *J. Neurophysiol.* 71, 2463–76. doi:10.1152/jn.1994.71.6.2463.
- de Winter, F., Kwok, J. C. F., Fawcett, J. W., Vo, T. T., Carulli, D., and Verhaagen, J. (2016). The Chemorepulsive Protein Semaphorin 3A and Perineuronal Net-Mediated Plasticity. *Neural Plast.* 2016, 1–14. doi:10.1155/2016/3679545.
- Debaisieux, S., Rayne, F., Yezid, H., and Beaumelle, B. (2012). The Ins and Outs of HIV-1 Tat. *Traffic* 13, 355–363. doi:10.1111/j.1600-0854.2011.01286.x.
- Deepa, S. S., Carulli, D., Galtrey, C., Rhodes, K., Fukuda, J., Mikami, T., et al. (2006). Composition of perineuronal net extracellular matrix in rat brain: a different disaccharide composition for the net-associated proteoglycans. *J. Biol. Chem.* 281, 17789–800.
doi:10.1074/jbc.M600544200.
- Deepa, S. S., Umehara, Y., Higashiyama, S., Itoh, N., and Sugahara, K. (2002). Specific molecular interactions of oversulfated chondroitin sulfate E with various heparin-binding growth factors. Implications as a physiological binding partner in the brain and other tissues. *J. Biol. Chem.* 277, 43707–16. doi:10.1074/jbc.M207105200.
- Degen, M., Scherberich, A., and Tucker, R. P. (2021). Tenascin-W: Discovery, Evolution, and Future Prospects. *Front. Immunol.* 11. doi:10.3389/fimmu.2020.623305.
- del Río, J. A., de Lecea, L., Ferrer, I., and Soriano, E. (1994). The development of parvalbumin-immunoreactivity in the neocortex of the mouse. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 81, 247–59. doi:10.1016/0165-3806(94)90311-5.
- Derelle, R., Lopez, P., Guyader, H. Le, and Manuel, M. (2007). Homeodomain proteins belong to the ancestral molecular toolkit of eukaryotes. *Evol. Dev.* 9, 212–219.
doi:10.1111/j.1525-142X.2007.00153.x.

- Derossi, D., Calvet, S., Trembleau, A., Brunissen, A., Chassaing, G., and Prochiantz, A. (1996). Cell internalization of the third helix of the Antennapedia homeodomain is receptor-independent. *J. Biol. Chem.* 271, 18188–93. doi:10.1074/jbc.271.30.18188.
- Derossi, D., Chassaing, G., and Prochiantz, A. (1998). Trojan peptides: the penetratin system for intracellular delivery. *Trends Cell Biol.* 8, 84–87. doi:10.1016/S0962-8924(98)80017-2.
- Derossi, D., Joliot, A. H., Chassaing, G., and Prochiantz, A. (1994). The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes. *J. Biol. Chem.* 269, 10444–50. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8144628>.
- Despras, G., Bernard, C., Perrot, A., Cattiaux, L., Prochiantz, A., Lortat-Jacob, H., et al. (2013). Toward Libraries of Biotinylated Chondroitin Sulfate Analogues: From Synthesis to In Vivo Studies. *Chem. - A Eur. J.* 19, 531–540. doi:10.1002/chem.201202173.
- Dhallan, R. S., Yau, K.-W., Schrader, K. A., and Reed, R. R. (1990). Primary structure and functional expression of a cyclic nucleotide-activated channel from olfactory neurons. *Nature* 347, 184–187. doi:10.1038/347184a0.
- Di Cristo, G., Chattopadhyaya, B., Kuhlman, S. J., Fu, Y., Bélanger, M.-C., Wu, C. Z., et al. (2007). Activity-dependent PSA expression regulates inhibitory maturation and onset of critical period plasticity. *Nat. Neurosci.* 10, 1569–77. doi:10.1038/nn2008.
- Di Lullo, E., Haton, C., Le Poupon, C., Volovitch, M., Joliot, A., Thomas, J.-L., et al. (2011). Paracrine Pax6 activity regulates oligodendrocyte precursor cell migration in the chick embryonic neural tube. *Development* 138, 4991–5001. doi:10.1242/dev.066282.
- Di Nardo, A. A., Fuchs, J., Joshi, R. L., Moya, K. L., and Prochiantz, A. (2018). The Physiology of Homeoprotein Transduction. *Physiol. Rev.* 98, 1943–1982. doi:10.1152/physrev.00018.2017.
- Di Nardo, A. A., Joliot, A., and Prochiantz, A. (2020). Homeoprotein transduction in neurodevelopment and physiopathology. *Sci. Adv.* 6. doi:10.1126/sciadv.abc6374.
- Dick, G., Tan, C. L., Alves, J. N., Ehlert, E. M. E., Miller, G. M., Hsieh-Wilson, L. C., et al. (2013). Semaphorin 3A binds to the perineuronal nets via chondroitin sulfate type E motifs in rodent brains. *J. Biol. Chem.* 288, 27384–27395. doi:10.1074/jbc.M111.310029.
- Dityatev, A., Brückner, G., Dityateva, G., Grosche, J., Kleene, R., and Schachner, M. (2007). Activity-dependent formation and functions of chondroitin sulfate-rich extracellular matrix of perineuronal nets. *Dev. Neurobiol.* 67, 570–88. doi:10.1002/dneu.20361.

- Doelling, K. B., and Assaneo, M. F. (2021). Neural oscillations are a start toward understanding brain activity rather than the end. *PLoS Biol.* 19, e3001234. doi:10.1371/journal.pbio.3001234.
- Donato, F., Rompani, S. B., and Caroni, P. (2013). Parvalbumin-expressing basket-cell network plasticity induced by experience regulates adult learning. *Nature* 504, 272–276. doi:10.1038/nature12866.
- Dou, C. L., and Levine, J. M. (1994). Inhibition of neurite growth by the NG2 chondroitin sulfate proteoglycan. *J. Neurosci.* 14, 7616–28. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7996200>.
- Dubnau, J., and Struhl, G. (1996). RNA recognition and translational regulation by a homeodomain protein. *Nature* 379, 694–699. doi:10.1038/379694a0.
- Duchamp-Viret, P., Duchamp, A., and Chaput, M. A. (2000). Peripheral Odor Coding in the Rat and Frog: Quality and Intensity Specification. *J. Neurosci.* 20, 2383–2390. doi:10.1523/JNEUROSCI.20-06-02383.2000.
- Dupont, E., Prochiantz, A., and Joliot, A. (2007). Identification of a signal peptide for unconventional secretion. *J. Biol. Chem.* 282, 8994–9000. doi:10.1074/jbc.M609246200.
- Eaton, S. (2006). Release and trafficking of lipid-linked morphogens. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 16, 17–22. doi:10.1016/j.gde.2005.12.006.
- Ekstrand, J. J., Domroese, M. E., Feig, S. L., Illig, K. R., and Haberly, L. B. (2001). Immunocytochemical analysis of basket cells in rat piriform cortex. *J. Comp. Neurol.* 434. doi:10.1002/cne.1179.
- Fagiolini, M., Fritschy, J.-M., Löw, K., Möhler, H., Rudolph, U., and Hensch, T. K. (2004). Specific GABAA circuits for visual cortical plasticity. *Science* 303, 1681–3. doi:10.1126/science.1091032.
- Fagiolini, M., and Hensch, T. K. (2000). Inhibitory threshold for critical-period activation in primary visual cortex. *Nature* 404, 183–6. doi:10.1038/35004582.
- Fagiolini, M., Pizzorusso, T., Berardi, N., Domenici, L., and Maffei, L. (1994). Functional postnatal development of the rat primary visual cortex and the role of visual experience: dark rearing and monocular deprivation. *Vision Res.* 34, 709–20. doi:10.1016/0042-6989(94)90210-0.
- Favuzzi, E., Marques-Smith, A., Deogracias, R., Winterflood, C. M., Sánchez-Aguilera, A., Mantoan, L., et al. (2017). Activity-Dependent Gating of Parvalbumin Interneuron Function by the Perineuronal Net Protein Brevican. *Neuron* 95, 639-655.e10. doi:10.1016/j.neuron.2017.06.028.

- Fawcett, J. W., Oohashi, T., and Pizzorusso, T. (2019). The roles of perineuronal nets and the perinodal extracellular matrix in neuronal function. *Nat. Rev. Neurosci.* 20, 451–465. doi:10.1038/s41583-019-0196-3.
- Finkelstein, R., Smouse, D., Capaci, T. M., Spradling, A. C., and Perrimon, N. (1990). The orthodenticle gene encodes a novel homeo domain protein involved in the development of the Drosophila nervous system and ocellar visual structures. *Genes Dev.* 4, 1516–27. doi:10.1101/gad.4.9.1516.
- Firestein, S., Darrow, B., and Shepherd, G. M. (1991). Activation of the sensory current in salamander olfactory receptor neurons depends on a G protein-mediated cAMP second messenger system. *Neuron* 6, 825–35. doi:10.1016/0896-6273(91)90178-3.
- Foscarin, S., Ponchione, D., Pajaj, E., Leto, K., Gawlak, M., Wilczynski, G. M., et al. (2011). Experience-dependent plasticity and modulation of growth regulatory molecules at central synapses. *PLoS One* 6, e16666. doi:10.1371/journal.pone.0016666.
- Fournier, J., Müller, C. M., and Laurent, G. (2015). Looking for the roots of cortical sensory computation in three-layered cortices. *Curr. Opin. Neurobiol.* 31, 119–126. doi:10.1016/j.conb.2014.09.006.
- Frank, T., Mönig, N. R., Satou, C., Higashijima, S., and Friedrich, R. W. (2019). Associative conditioning remaps odor representations and modifies inhibition in a higher olfactory brain area. *Nat. Neurosci.* 22, 1844–1856. doi:10.1038/s41593-019-0495-z.
- Franks, K. M., Russo, M. J., Sosulski, D. L., Mulligan, A. A., Siegelbaum, S. A., and Axel, R. (2011). Recurrent Circuitry Dynamically Shapes the Activation of Piriform Cortex. *Neuron* 72, 49–56. doi:10.1016/j.neuron.2011.08.020.
- Frantz, G. D., Weimann, J. M., Levin, M. E., and McConnell, S. K. (1994). Otx1 and Otx2 define layers and regions in developing cerebral cortex and cerebellum. *J. Neurosci.* 14, 5725–40. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7931541>.
- Fu, Y., Tucciarone, J. M., Espinosa, J. S., Sheng, N., Darcy, D. P., Nicoll, R. A., et al. (2014). A Cortical Circuit for Gain Control by Behavioral State. *Cell* 156, 1139–1152. doi:10.1016/j.cell.2014.01.050.
- Gallagher, J. T., and Turnbull, J. E. (1992). Heparan sulphate in the binding and activation of basic fibroblast growth factor. *Glycobiology* 2, 523–528. doi:10.1093/glycob/2.6.523.
- Galtrey, C. M., Asher, R. A., Nothias, F., and Fawcett, J. W. (2007). Promoting plasticity in the spinal cord with chondroitinase improves functional recovery after peripheral nerve repair. *Brain* 130, 926–39. doi:10.1093/brain/awl372.
- Galtrey, C. M., Kwok, J. C. F., Carulli, D., Rhodes, K. E., and Fawcett, J. W. (2008).

- Distribution and synthesis of extracellular matrix proteoglycans, hyaluronan, link proteins and tenascin-R in the rat spinal cord. *Eur. J. Neurosci.* 27, 1373–90. doi:10.1111/j.1460-9568.2008.06108.x.
- Gavrilovici, C., D’Alfonso, S., Dann, M., and Poulter, M. O. (2006). Kindling-induced alterations in GABAA receptor-mediated inhibition and neurosteroid activity in the rat piriform cortex. *Eur. J. Neurosci.* 24, 1373–84. doi:10.1111/j.1460-9568.2006.05012.x.
- Gehring, W. J. (1987). Homeo Boxes in the Study of Development. *Science (80-)*. 236, 1245–1252. doi:10.1126/science.2884726.
- Gheusi, G., and Lledo, P.-M. (2014). “Adult Neurogenesis in the Olfactory System Shapes Odor Memory and Perception,” in *Progress in brain research*, 157–175. doi:10.1016/B978-0-444-63350-7.00006-1.
- Giamanco, K. A., Morawski, M., and Matthews, R. T. (2010). Perineuronal net formation and structure in aggrecan knockout mice. *Neuroscience* 170, 1314–27. doi:10.1016/j.neuroscience.2010.08.032.
- Gibel-Russo, R., Benacom, D., and Di Nardo, A. (2022). Non-Cell-Autonomous Factors Implicated in Parvalbumin Interneuron Maturation and Critical Periods. *Front. Neural Circuits*. doi:10.3389/fncir.2022.875873.
- Giessel, A. J., and Datta, S. R. (2014). Olfactory maps, circuits and computations. *Curr. Opin. Neurobiol.* 24, 120–132. doi:10.1016/j.conb.2013.09.010.
- Gogolla, N., Caroni, P., Lüthi, A., and Herry, C. (2009). Perineuronal nets protect fear memories from erasure. *Science* 325, 1258–61. doi:10.1126/science.1174146.
- Gogos, J. A., Osborne, J., Nemes, A., Mendelsohn, M., and Axel, R. (2000). Genetic Ablation and Restoration of the Olfactory Topographic Map. *Cell* 103, 609–620. doi:10.1016/S0092-8674(00)00164-1.
- Goldman, S. A., and Nottebohm, F. (1983). Neuronal production, migration, and differentiation in a vocal control nucleus of the adult female canary brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 80, 2390–4. doi:10.1073/pnas.80.8.2390.
- Golgi, C. (1893). Intorno all’ origine del quarto nervo cerebrale (patetico o trocleare) e di una questione di isto-fisiologia generale che a questo argomento si collega. *Atti R Accad Lincei, Ser V, vol II*.
- Golgi, C. (1898). Intorno alla struttura delle cellule nervose. *Boll Soc Med-chirurg Pavia* 1-14.
- Gordon, J. A., and Stryker, M. P. (1996). Experience-dependent plasticity of binocular responses in the primary visual cortex of the mouse. *J. Neurosci.* 16, 3274–86. Available

- at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8627365>.
- Gottfried, J. A. (2006). Smell: central nervous processing. *Adv. Otorhinolaryngol.* 63, 44–69. doi:10.1159/000093750.
- Gottfried, J. A. (2010). Central mechanisms of odour object perception. *Nat. Rev. Neurosci.* 11, 628–41. doi:10.1038/nrn2883.
- Graziadei, P. P. C., Levine, R. R., and Monti Graziadei, G. A. (1979). Plasticity of connections of the olfactory sensory neuron: Regeneration into the forebrain following bullectomy in the neonatal mouse. *Neuroscience* 4, 713–727. doi:10.1016/0306-4522(79)90002-2.
- Haberly, L. B. (2001). Parallel-distributed processing in olfactory cortex: new insights from morphological and physiological analysis of neuronal circuitry. *Chem. Senses* 26, 551–76. doi:10.1093/chemse/26.5.551.
- Haberly, L. B., and Bower, J. M. (1989). Olfactory cortex: model circuit for study of associative memory? *Trends Neurosci.* 12, 258–264. doi:10.1016/0166-2236(89)90025-8.
- Haberly, L. B., and Price, J. L. (1977). The axonal projection patterns of the mitral and tufted cells of the olfactory bulb in the rat. *Brain Res.* 129, 152–7. doi:10.1016/0006-8993(77)90978-7.
- Haberly, L. B., and Sutula, T. P. (1992). Neuronal processes that underlie expression of kindled epileptiform events in the piriform cortex in vivo. *J. Neurosci.* 12, 2211–24. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1607937>.
- Habuchi, H., Habuchi, O., and Kimata, K. (2004). Sulfation pattern in glycosaminoglycan: does it have a code? *Glycoconj. J.* 21, 47–52. doi:10.1023/B:GLYC.0000043747.87325.5e.
- Haji-Ghassemi, O., Gilbert, M., Spence, J., Schur, M. J., Parker, M. J., Jenkins, M. L., et al. (2016). Molecular Basis for Recognition of the Cancer Glycobiomarker, LacdiNAc (GalNAc[β 1→4]GlcNAc), by Wisteria floribunda Agglutinin. *J. Biol. Chem.* 291, 24085–24095. doi:10.1074/jbc.M116.750463.
- Hannon, C. E., Blythe, S. A., and Wieschaus, E. F. (2017). Concentration dependent chromatin states induced by the bicoid morphogen gradient. *Elife* 6. doi:10.7554/eLife.28275.
- Happel, M. F. K., Niekisch, H., Castiblanco Rivera, L. L., Ohl, F. W., Deliano, M., and Frischknecht, R. (2014). Enhanced cognitive flexibility in reversal learning induced by removal of the extracellular matrix in auditory cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*

- 111, 2800–5. doi:10.1073/pnas.1310272111.
- Harauzov, A., Spolidoro, M., DiCristo, G., De Pasquale, R., Cancedda, L., Pizzorusso, T., et al. (2010). Reducing intracortical inhibition in the adult visual cortex promotes ocular dominance plasticity. *J. Neurosci.* 30, 361–71. doi:10.1523/JNEUROSCI.2233-09.2010.
- Härtig, W., Brauer, K., and Brückner, G. (1992). Wisteria floribunda agglutinin-labelled nets surround parvalbumin-containing neurons. *Neuroreport* 3, 869–72. doi:10.1097/00001756-199210000-00012.
- Härtig, W., Derouiche, A., Welt, K., Brauer, K., Grosche, J., Mäder, M., et al. (1999). Cortical neurons immunoreactive for the potassium channel Kv3.1b subunit are predominantly surrounded by perineuronal nets presumed as a buffering system for cations. *Brain Res.* 842, 15–29. doi:10.1016/s0006-8993(99)01784-9.
- Hayashi, S., and Scott, M. P. (1990). What determines the specificity of action of Drosophila homeodomain proteins? *Cell* 63, 883–94. doi:10.1016/0092-8674(90)90492-w.
- Held, H. (1902). Über den Bau der grauen und weissen Substanz. *Arch. Anat. Physiol. (Anal. Abtl.)*, 189-224.
- Henry, B. L., and Desai, U. R. (2014). Sulfated low molecular weight lignins, allosteric inhibitors of coagulation proteinases via the heparin binding site, significantly alter the active site of thrombin and factor xa compared to heparin. *Thromb. Res.* 134, 1123–1129. doi:10.1016/j.thromres.2014.08.024.
- Hensch, T. K. (2004). Critical period regulation. *Annu. Rev. Neurosci.* 27, 549–79. doi:10.1146/annurev.neuro.27.070203.144327.
- Hensch, T. K. (2005). Critical period plasticity in local cortical circuits. *Nat. Rev. Neurosci.* 6, 877–88. doi:10.1038/nrn1787.
- Hensch, T. K. (2014). Bistable Parvalbumin Circuits Pivotal for Brain Plasticity. *Cell* 156, 17–19. doi:10.1016/j.cell.2013.12.034.
- Hensch, T. K., and Bilimoria, P. M. (2012). Re-opening Windows: Manipulating Critical Periods for Brain Development. *Cerebrum* 2012, 11. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23447797>.
- Hensch, T. K., Fagiolini, M., Mataga, N., Stryker, M. P., Baekkeskov, S., and Kash, S. F. (1998). Local GABA circuit control of experience-dependent plasticity in developing visual cortex. *Science* 282, 1504–8. doi:10.1126/science.282.5393.1504.
- Hirs, C. H. W. (1956). THE OXIDATION OF RIBONUCLEASE WITH PERFORMIC ACID. *J. Biol. Chem.* 219, 611–621. doi:10.1016/S0021-9258(18)65721-7.
- Hirth, F., Therianos, S., Loop, T., Gehring, W. J., Reichert, H., and Furukubo-Tokunaga, K.

- (1995). Developmental defects in brain segmentation caused by mutations of the homeobox genes *orthodenticle* and *empty spiracles* in *Drosophila*. *Neuron* 15, 769–78. doi:10.1016/0896-6273(95)90169-8.
- Hocking, A. M., Shinomura, T., and McQuillan, D. J. (1998). Leucine-rich repeat glycoproteins of the extracellular matrix. *Matrix Biol.* 17, 1–19. doi:10.1016/s0945-053x(98)90121-4.
- Hofer, S. B., Mrsic-Flogel, T. D., Bonhoeffer, T., and Hübener, M. (2006). Prior experience enhances plasticity in adult visual cortex. *Nat. Neurosci.* 9, 127–132. doi:10.1038/nrn1610 PMID - 16327785.
- Hoshino, H., Foyez, T., Ohtake-Niimi, S., Takeda-Uchimura, Y., Michikawa, M., Kadomatsu, K., et al. (2014). KSGal6ST Is Essential for the 6-Sulfation of Galactose within Keratan Sulfate in Early Postnatal Brain. *J. Histochem. Cytochem.* 62, 145–156. doi:10.1369/0022155413511619.
- Hou, X., Yoshioka, N., Tsukano, H., Sakai, A., Miyata, S., Watanabe, Y., et al. (2017). Chondroitin Sulfate Is Required for Onset and Offset of Critical Period Plasticity in Visual Cortex. *Sci. Rep.* 7, 12646. doi:10.1038/s41598-017-04007-x.
- Hu, H., Gan, J., and Jonas, P. (2014a). Fast-spiking, parvalbumin + GABAergic interneurons: From cellular design to microcircuit function. *Science (80-.)*. 345. doi:10.1126/science.1255263.
- Hu, H., Gan, J., and Jonas, P. (2014b). Interneurons. Fast-spiking, parvalbumin⁺ GABAergic interneurons: from cellular design to microcircuit function. *Science* 345, 1255263. doi:10.1126/science.1255263.
- Huang, Z. J., Kirkwood, A., Pizzorusso, T., Porciatti, V., Morales, B., Bear, M. F., et al. (1999). BDNF regulates the maturation of inhibition and the critical period of plasticity in mouse visual cortex. *Cell* 98, 739–55. doi:10.1016/s0092-8674(00)81509-3.
- Huntley, G. W. (2012). Synaptic circuit remodelling by matrix metalloproteinases in health and disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 13, 743–57. doi:10.1038/nrn3320.
- Hylin, M. J., Orsi, S. A., Moore, A. N., and Dash, P. K. (2013). Disruption of the perineuronal net in the hippocampus or medial prefrontal cortex impairs fear conditioning. *Learn. Mem.* 20, 267–273. doi:10.1101/lm.030197.112.
- Ibad, R. T., Rhee, J., Mrejen, S., Forster, V., Picaud, S., Prochiantz, A., et al. (2011). Otx2 Promotes the Survival of Damaged Adult Retinal Ganglion Cells and Protects against Excitotoxic Loss of Visual Acuity In Vivo. *J. Neurosci.* 31, 5495–5503. doi:10.1523/JNEUROSCI.0187-11.2011.

- Illig, K. R., and Wilson, D. A. (2014). “Olfactory Cortex: Comparative Anatomy☆,” in *Reference Module in Biomedical Sciences* (Elsevier). doi:10.1016/B978-0-12-801238-3.04706-1.
- Imamura, F., Ito, A., and LaFever, B. J. (2020). Subpopulations of Projection Neurons in the Olfactory Bulb. *Front. Neural Circuits* 14. doi:10.3389/fncir.2020.561822.
- Itano, N., Sawai, T., Yoshida, M., Lenas, P., Yamada, Y., Imagawa, M., et al. (1999). Three isoforms of mammalian hyaluronan synthases have distinct enzymatic properties. *J. Biol. Chem.* 274, 25085–92. doi:10.1074/jbc.274.35.25085.
- Iwai, Y., Fagiolini, M., Obata, K., and Hensch, T. K. (2003). Rapid Critical Period Induction by Tonic Inhibition in Visual Cortex. *J. Neurosci.* 23, 6695–6702. doi:10.1523/JNEUROSCI.23-17-06695.2003.
- Jansen, S., Gottschling, C., Faissner, A., and Manahan-Vaughan, D. (2017). Intrinsic cellular and molecular properties of in vivo hippocampal synaptic plasticity are altered in the absence of key synaptic matrix molecules. *Hippocampus* 27, 920–933. doi:10.1002/hipo.22742.
- Jiang, H.-H., Guo, A., Chiu, A., Li, H., Lai, C. S. W., and Lau, C. G. (2021a). Target-specific control of piriform cortical output via distinct inhibitory circuits. *FASEB J.* 35, e21944. doi:10.1096/fj.202100757R.
- Jiang, H., Guo, A., Chiu, A., Li, H., Lai, C. S. W., and Lau, C. G. (2021b). Target-specific control of piriform cortical output via distinct inhibitory circuits. *FASEB J.* 35, e21944. doi:10.1096/fj.202100757R.
- Jiang, J., Kosman, D., Ip, Y. T., and Levine, M. (1991). The dorsal morphogen gradient regulates the mesoderm determinant twist in early *Drosophila* embryos. *Genes Dev.* 5, 1881–91. doi:10.1101/gad.5.10.1881.
- Jiao, C.-Y., Delaroche, D., Burlina, F., Alves, I. D., Chassaing, G., and Sagan, S. (2009). Translocation and endocytosis for cell-penetrating peptide internalization. *J. Biol. Chem.* 284, 33957–65. doi:10.1074/jbc.M109.056309.
- Johanning, F. W., Beed, P. S., Trimbuch, T., Bendels, M. H. K., Winterer, J., and Schmitz, D. (2009). Dendritic Compartment and Neuronal Output Mode Determine Pathway-Specific Long-Term Potentiation in the Piriform Cortex. *J. Neurosci.* 29, 13649–13661. doi:10.1523/JNEUROSCI.2672-09.2009.
- Johnson, D. J. D., Li, W., Adams, T. E., and Huntington, J. A. (2006). Antithrombin–S195A factor Xa-heparin structure reveals the allosteric mechanism of antithrombin activation.

- EMBO J.* 25, 2029–2037. doi:10.1038/sj.emboj.7601089.
- Johnson, D. M. G., Illig, K. R., Behan, M., and Haberly, L. B. (2000a). 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. doi:10.1523/JNEUROSCI.20-18-06974.2000.
- Johnson, D. M., Illig, K. R., Behan, M., and Haberly, L. B. (2000b). 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, 6974–82. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10995842>.
- Joliot, A. H., Triller, A., Volovitch, M., Pernelle, C., and Prochiantz, A. (1991a). alpha-2,8-Polysialic acid is the neuronal surface receptor of antennapedia homeobox peptide. *New Biol.* 3, 1121–34. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1777485>.
- Joliot, A., Maizel, A., Rosenberg, D., Trembleau, A., Dupas, S., Volovitch, M., et al. (1998). Identification of a signal sequence necessary for the unconventional secretion of Engrailed homeoprotein. *Curr. Biol.* 8, 856–863. doi:10.1016/S0960-9822(07)00346-6.
- Joliot, A., Pernelle, C., Deagostini-Bazin, H., and Prochiantz, A. (1991b). Antennapedia homeobox peptide regulates neural morphogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88, 1864–1868. doi:10.1073/pnas.88.5.1864.
- Jones, L. L., Yamaguchi, Y., Stallcup, W. B., and Tuszynski, M. H. (2002). NG2 Is a Major Chondroitin Sulfate Proteoglycan Produced after Spinal Cord Injury and Is Expressed by Macrophages and Oligodendrocyte Progenitors. *J. Neurosci.* 22, 2792–2803. doi:10.1523/JNEUROSCI.22-07-02792.2002.
- Joyner, A. L. (1996). Engrailed, Wnt and Pax genes regulate midbrain--hindbrain development. *Trends Genet.* 12, 15–20. doi:10.1016/0168-9525(96)81383-7.
- Kaddour, H., Coppola, E., Di Nardo, A. A., Le Poupon, C., Maily, P., Wizenmann, A., et al. (2020). Extracellular Pax6 Regulates Tangential Cajal-Retzius Cell Migration in the Developing Mouse Neocortex. *Cereb. Cortex* 30, 465–475. doi:10.1093/cercor/bhz098.
- Kanter, E. D., and Haberly, L. B. (1993). Associative long-term potentiation in piriform cortex slices requires GABAA blockade. *J. Neurosci.* 13, 2477–82. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8099125>.
- Kaplan, M. S., McNelly, N. A., and Hinds, J. W. (1985). Population dynamics of adult-formed granule neurons of the rat olfactory bulb. *J. Comp. Neurol.* 239, 117–125.

doi:10.1002/cne.902390110.

- Kapur, A., Lytton, W. W., Ketchum, K. L., and Haberly, L. B. (1997). Regulation of the NMDA component of EPSPs by different components of postsynaptic GABAergic inhibition: computer simulation analysis in piriform cortex. *J. Neurophysiol.* 78, 2546–59. doi:10.1152/jn.1997.78.5.2546.
- Katagiri, H., Fagiolini, M., and Hensch, T. K. (2007). Optimization of somatic inhibition at critical period onset in mouse visual cortex. *Neuron* 53, 805–12. doi:10.1016/j.neuron.2007.02.026.
- Katagiri, H., Pallotto, M., Nissant, A., Murray, K., Sassoè-Pognetto, M., and Lledo, P.-M. (2011). Dynamic development of the first synapse impinging on adult-born neurons in the olfactory bulb circuit. *Neural Syst. Circuits* 1, 6. doi:10.1186/2042-1001-1-6.
- Keleher, C. A., Passmore, S., and Johnson, A. D. (1989). Yeast repressor alpha 2 binds to its operator cooperatively with yeast protein Mcm1. *Mol. Cell. Biol.* 9, 5228–5230. doi:10.1128/MCB.9.11.5228.
- Kelly, E. A., Russo, A. S., Jackson, C. D., Lamantia, C. E., and Majewska, A. K. (2015). Proteolytic regulation of synaptic plasticity in the mouse primary visual cortex: analysis of matrix metalloproteinase 9 deficient mice. *Front. Cell. Neurosci.* 9. doi:10.3389/fncel.2015.00369.
- Kelsch, W., Lin, C.-W., and Lois, C. (2008). Sequential development of synapses in dendritic domains during adult neurogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 16803–8. doi:10.1073/pnas.0807970105.
- Kelsch, W., Sim, S., and Lois, C. (2010). Watching synaptogenesis in the adult brain. *Annu. Rev. Neurosci.* 33, 131–49. doi:10.1146/annurev-neuro-060909-153252.
- Kelwick, R., Desanlis, I., Wheeler, G. N., and Edwards, D. R. (2015). The ADAMTS (A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin motifs) family. *Genome Biol.* 16. doi:10.1186/s13059-015-0676-3.
- 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. doi:10.1002/hipo.20315.
- Khodosevich, K., Alfonso, J., and Monyer, H. (2013). Dynamic changes in the transcriptional profile of subventricular zone-derived postnatally born neuroblasts. *Mech. Dev.* 130, 424–32. doi:10.1016/j.mod.2012.11.003.
- Kim, N., Acampora, D., Dingli, F., Loew, D., Simeone, A., Prochiantz, A., et al. (2014). Immunoprecipitation and mass spectrometry identify non-cell autonomous Otx2

- homeoprotein in the granular and supragranular layers of mouse visual cortex. *F1000Research* 3, 178. doi:10.12688/f1000research.4869.1.
- Kim, S. H., and Kiick, K. L. (2007). Heparin-mimetic sulfated peptides with modulated affinities for heparin-binding peptides and growth factors. *Peptides* 28, 2125–2136. doi:10.1016/j.peptides.2007.08.010.
- Kim, Y., Yang, G. R., Pradhan, K., Venkataraju, K. U., Bota, M., García del Molino, L. C., et al. (2017). Brain-wide Maps Reveal Stereotyped Cell-Type-Based Cortical Architecture and Subcortical Sexual Dimorphism. *Cell* 171, 456-469.e22. doi:10.1016/j.cell.2017.09.020.
- Kimura, C., Shen, M. M., Takeda, N., Aizawa, S., and Matsuo, I. (2001). Complementary functions of Otx2 and Cripto in initial patterning of mouse epiblast. *Dev. Biol.* 235, 12–32. doi:10.1006/dbio.2001.0289.
- Kissinger, C. R., Liu, B., Martin-Blanco, E., Kornberg, T. B., and Pabo, C. O. (1990). Crystal structure of an engrailed homeodomain-DNA complex at 2.8 Å resolution: A framework for understanding homeodomain-DNA interactions. *Cell* 63, 579–590. doi:10.1016/0092-8674(90)90453-L.
- Kitagawa, H., Tsutsumi, K., Tone, Y., and Sugahara, K. (1997). Developmental Regulation of the Sulfation Profile of Chondroitin Sulfate Chains in the Chicken Embryo Brain. *J. Biol. Chem.* 272. doi:10.1074/jbc.272.50.31377.
- Klingler, E. (2017). Development and Organization of the Evolutionarily Conserved Three-Layered Olfactory Cortex. *eneuro* 4, ENEURO.0193-16.2016. doi:10.1523/ENEURO.0193-16.2016.
- Kochlamazashvili, G., Senkov, O., Grebenyuk, S., Robinson, C., Xiao, M.-F., Stummeyer, K., et al. (2010). Neural Cell Adhesion Molecule-Associated Polysialic Acid Regulates Synaptic Plasticity and Learning by Restraining the Signaling through GluN2B-Containing NMDA Receptors. *J. Neurosci.* 30, 4171–4183. doi:10.1523/JNEUROSCI.5806-09.2010.
- Koike, C., Nishida, A., Ueno, S., Saito, H., Sanuki, R., Sato, S., et al. (2007). Functional roles of Otx2 transcription factor in postnatal mouse retinal development. *Mol. Cell. Biol.* 27, 8318–29. doi:10.1128/MCB.01209-07.
- Köppe, G., Brückner, G., Brauer, K., Härtig, W., and Bigl, V. (1997). Developmental patterns of proteoglycan-containing extracellular matrix in perineuronal nets and neuropil of the postnatal rat brain. *Cell Tissue Res.* 288, 33–41. doi:10.1007/s004410050790.
- Kuhlman, S. J., Olivás, N. D., Tring, E., Ikrar, T., Xu, X., and Trachtenberg, J. T. (2013). A

- disinhibitory microcircuit initiates critical-period plasticity in the visual cortex. *Nature* 501, 543–6. doi:10.1038/nature12485.
- Kwok, J. C. F., Carulli, D., and Fawcett, J. W. (2010). In vitro modeling of perineuronal nets: hyaluronan synthase and link protein are necessary for their formation and integrity. *J. Neurochem.*, no-no. doi:10.1111/j.1471-4159.2010.06878.x.
- La Venuta, G., Zeitler, M., Steringer, J. P., Müller, H.-M., and Nickel, W. (2015). The Startling Properties of Fibroblast Growth Factor 2: How to Exit Mammalian Cells without a Signal Peptide at Hand. *J. Biol. Chem.* 290, 27015–27020. doi:10.1074/jbc.R115.689257.
- Lander, C., Kind, P., Maleski, M., and Hockfield, S. (1997). A family of activity-dependent neuronal cell-surface chondroitin sulfate proteoglycans in cat visual cortex. *J. Neurosci.* 17, 1928–39. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9045722>.
- Large, A. M., Kunz, N. A., Mielo, S. L., and Oswald, A. M. M. (2016). Inhibition by somatostatin interneurons in olfactory cortex. *Front. Neural Circuits* 10, 62. doi:10.3389/fncir.2016.00062.
- Large, A. M., Vogler, N. W., Canto-Bustos, M., Friason, F. K., Schick, P., and Oswald, A.-M. M. (2018). Differential inhibition of pyramidal cells and inhibitory interneurons along the rostrocaudal axis of anterior piriform cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 115, E8067–E8076. doi:10.1073/pnas.1802428115.
- Laska, M. (1999). Olfactory Discrimination Ability for Homologous Series of Aliphatic Alcohols and Aldehydes. *Chem. Senses* 24, 263–270. doi:10.1093/chemse/24.3.263.
- Lau, C. G., Zhang, H., and Murthy, V. N. (2022). Deletion of TrkB in parvalbumin interneurons alters cortical neural dynamics. *J. Cell. Physiol.* 237, 949–964. doi:10.1002/jcp.30571.
- Lau, L. W., Cua, R., Keough, M. B., Haylock-Jacobs, S., and Yong, V. W. (2013). Pathophysiology of the brain extracellular matrix: a new target for remyelination. *Nat. Rev. Neurosci.* 14, 722–9. doi:10.1038/nrn3550.
- Laurent, G. (2002). Olfactory network dynamics and the coding of multidimensional signals. *Nat. Rev. Neurosci.* 3, 884–95. doi:10.1038/nrn964.
- Layalle, S., Volovitch, M., Mugat, B., Bonneaud, N., Parmentier, M.-L., Prochiantz, A., et al. (2011). Engrailed homeoprotein acts as a signaling molecule in the developing fly. *Development* 138, 2315–2323. doi:10.1242/dev.057059.
- Le Roux, I., Duhaucourt, S., Volovitch, M., Prochiantz, A., and Ronchi, E. (1995). Promoter-specific regulation of gene expression by an exogenously added homedomain that

- promotes neurite growth. *FEBS Lett.* 368, 311–4. doi:10.1016/0014-5793(95)00681-x.
- Le Roux, I., Joliot, A. H., Bloch-Gallego, E., Prochiantz, A., and Volovitch, M. (1993). Neurotrophic activity of the Antennapedia homeodomain depends on its specific DNA-binding properties. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90, 9120–9124. doi:10.1073/pnas.90.19.9120.
- Lee, E. J., Kim, N., Park, J. W., Kang, K. H., Kim, W., Sim, N. S., et al. (2019). Global Analysis of Intercellular Homeodomain Protein Transfer. *Cell Rep.* 28, 712-722.e3. doi:10.1016/j.celrep.2019.06.056.
- Lee, H. H. C., Bernard, C., Ye, Z., Acampora, D., Simeone, A., Prochiantz, A., et al. (2017). Genetic Otx2 mis-localization delays critical period plasticity across brain regions. *Mol. Psychiatry* 22. doi:10.1038/mp.2017.1.
- Lemarchant, S., Pruvost, M., Montaner, J., Emery, E., Vivien, D., Kanninen, K., et al. (2013). ADAMTS proteoglycanases in the physiological and pathological central nervous system. *J. Neuroinflammation* 10. doi:10.1186/1742-2094-10-133.
- Lensink, M. F., Christiaens, B., Vandekerckhove, J., Prochiantz, A., and Rosseneu, M. (2005). Penetratin-membrane association: W48/R52/W56 shield the peptide from the aqueous phase. *Biophys. J.* 88, 939–52. doi:10.1529/biophysj.104.052787.
- Lensjø, K. K., Christensen, A. C., Tennøe, S., Fyhn, M., and Hafting, T. (2017). Differential Expression and Cell-Type Specificity of Perineuronal Nets in Hippocampus, Medial Entorhinal Cortex, and Visual Cortex Examined in the Rat and Mouse. *eNeuro* 4. doi:10.1523/ENEURO.0379-16.2017.
- Lesaffre, B., Joliot, A., Prochiantz, A., and Volovitch, M. (2007). Direct non-cell autonomous Pax6 activity regulates eye development in the zebrafish. *Neural Dev.* 2, 2. doi:10.1186/1749-8104-2-2.
- LeVay, S., Stryker, M. P., and Shatz, C. J. (1978). Ocular dominance columns and their development in layer IV of the cat's visual cortex: a quantitative study. *J. Comp. Neurol.* 179, 223–44. doi:10.1002/cne.901790113.
- Lewis, E. B. (1978). A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. *Nature* 276, 565–70. doi:10.1038/276565a0.
- Lewis, T. L., and Maurer, D. (2009). Effects of early pattern deprivation on visual development. *Optom. Vis. Sci.* 86, 640–6. doi:10.1097/OPX.0b013e3181a7296b.
- Lim, L., Mi, D., Llorca, A., and Marín, O. (2018). Development and Functional Diversification of Cortical Interneurons. *Neuron* 100, 294–313. doi:10.1016/j.neuron.2018.10.009.
- Lin, X. (2004). Functions of heparan sulfate proteoglycans in cell signaling during

- development. *Development* 131, 6009–21. doi:10.1242/dev.01522.
- Linster, C., and Hasselmo, M. E. (2001). Neuromodulation and the functional dynamics of piriform cortex. *Chem. Senses* 26, 585–94. doi:10.1093/chemse/26.5.585.
- Lipachev, N., Arnst, N., Melnikova, A., Jääliñoja, H., Kochneva, A., Zhigalov, A., et al. (2019). Quantitative changes in perineuronal nets in development and posttraumatic condition. *J. Mol. Histol.* 50, 203–216. doi:10.1007/s10735-019-09818-y.
- Litaudon, P., Amat, C., Bertrand, B., Vigouroux, M., and Buonviso, N. (2003). Piriform cortex functional heterogeneity revealed by cellular responses to odours. *Eur. J. Neurosci.* 17, 2457–2461. doi:10.1046/j.1460-9568.2003.02654.x.
- Lledo, P.-M., Alonso, M., and Grubb, M. S. (2006). Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits. *Nat. Rev. Neurosci.* 7, 179–93. doi:10.1038/nrn1867.
- Lodato, S., Rouaux, C., Quast, K. B., Jantrachotechatchawan, C., Studer, M., Hensch, T. K., et al. (2011). Excitatory projection neuron subtypes control the distribution of local inhibitory interneurons in the cerebral cortex. *Neuron* 69, 763–79. doi:10.1016/j.neuron.2011.01.015.
- Louessard, M., Lacroix, A., Martineau, M., Mondielli, G., Montagne, A., Lesept, F., et al. (2016). Tissue Plasminogen Activator Expression Is Restricted to Subsets of Excitatory Pyramidal Glutamatergic Neurons. *Mol. Neurobiol.* 53. doi:10.1007/s12035-015-9432-7.
- Lugaro, E. (1895). Sulla struttura del nucleo dentato del cervelletto nell'uomo. *Monit Zool Ital* 65–12.
- Luna, V. M., and Morozov, A. (2012). Input-specific excitation of olfactory cortex microcircuits. *Front. Neural Circuits* 6. doi:10.3389/fncir.2012.00069.
- Luna, V. M., and Pettit, D. L. (2010). Asymmetric rostro-caudal inhibition in the primary olfactory cortex. *Nat. Neurosci.* 13, 533–535. doi:10.1038/nn.2524.
- Ma, L., Wu, Y., Qiu, Q., Scheerer, H., Moran, A., and Yu, C. R. (2014). A developmental switch of axon targeting in the continuously regenerating mouse olfactory system. *Science* 344, 194–7. doi:10.1126/science.1248805.
- Mabuchi, M., Murakami, S., Taguchi, T., Ohtsuka, A., and Murakami, T. (2001). Purkinje cells in the adult cat cerebellar cortex possess a perineuronal net of proteoglycans. *Arch. Histol. Cytol.* 64, 203–9. doi:10.1679/aohc.64.203.
- Madisen, L., Zwingman, T. A., Sunkin, S. M., Oh, S. W., Zariwala, H. A., Gu, H., et al. (2010). A robust and high-throughput Cre reporting and characterization system for the whole mouse brain. *Nat. Neurosci.* 13, 133–140. doi:10.1038/nn.2467.
- Maeda, N. (2015). Proteoglycans and neuronal migration in the cerebral cortex during

- development and disease. *Front. Neurosci.* 9. doi:10.3389/fnins.2015.00098.
- Maeda, N., He, J., Yajima, Y., Mikami, T., Sugahara, K., and Yabe, T. (2003). Heterogeneity of the Chondroitin Sulfate Portion of Phosphacan/6B4 Proteoglycan Regulates Its Binding Affinity for Pleiotrophin/Heparin Binding Growth-associated Molecule. *J. Biol. Chem.* 278, 35805–35811. doi:10.1074/jbc.M305530200.
- Maier, J. X., Wachowiak, M., and Katz, D. B. (2012). Chemosensory Convergence on Primary Olfactory Cortex. *J. Neurosci.* 32, 17037–17047. doi:10.1523/JNEUROSCI.3540-12.2012.
- Maizel, A., Tassetto, M., Filhol, O., Cochet, C., Prochiantz, A., and Joliot, A. (2002). Engrailed homeoprotein secretion is a regulated process. *Development* 129, 3545–3553. doi:10.1242/dev.129.15.3545.
- Makiyama, Y., Shoji, S., and Mizusawa, H. (1997). Hydrocephalus in the *Otx2*^{+/-} mutant mouse. *Exp. Neurol.* 148, 215–21. doi:10.1006/exnr.1997.6638.
- Malinen, J., Singh, S., Tillmann, S., Keul, H., and Möller, M. (2017). Aliphatic Polyethers with Sulfate, Carboxylate, and Hydroxyl Side Groups—Do They Show Anticoagulant Properties? *Macromol. Biosci.* 17, 1117. doi:10.1002/mabi.201600274.
- Mandairon, N., Sacquet, J., Jourdan, F., and Didier, A. (2006). Long-term fate and distribution of newborn cells in the adult mouse olfactory bulb: Influences of olfactory deprivation. *Neuroscience* 141, 443–451. doi:10.1016/j.neuroscience.2006.03.066.
- Maniti, O., Blanchard, E., Trugnan, G., Lamazière, A., and Ayala-Sanmartin, J. (2012). Metabolic energy-independent mechanism of internalization for the cell penetrating peptide penetratin. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 44, 869–75. doi:10.1016/j.biocel.2012.02.010.
- Margolis, R. K., Rauch, U., Maurel, P., and Margolis, R. U. (1996). Neurocan and phosphacan: two major nervous tissue-specific chondroitin sulfate proteoglycans. *Perspect. Dev. Neurobiol.* 3, 273–90. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9117260>.
- Margolis, R. U., and Margolis, R. K. (1989). Properties of nervous tissue proteoglycans relevant to studies on Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 10, 500–2; discussion 510–2. doi:10.1016/0197-4580(89)90110-3.
- Marín, O. (2012). Interneuron dysfunction in psychiatric disorders. *Nat. Rev. Neurosci.* 13, 107–20. doi:10.1038/nrn3155.
- Marr, D. (1971). Simple memory: a theory for archicortex. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 262, 23–81. doi:10.1098/rstb.1971.0078.

- Martinez-Morales, J. R., Signore, M., Acampora, D., Simeone, A., and Bovolenta, P. (2001). Otx genes are required for tissue specification in the developing eye. *Development* 128, 2019–30. doi:10.1242/dev.128.11.2019.
- Matthews, R. T., Kelly, G. M., Zerillo, C. A., Gray, G., Tiemeyer, M., and Hockfield, S. (2002). Aggrecan glycoforms contribute to the molecular heterogeneity of perineuronal nets. *J. Neurosci.* 22, 7536–47. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12196577>.
- Maynard, H. D., and Hubbell, J. A. (2005). Discovery of a sulfated tetrapeptide that binds to vascular endothelial growth factor. *Acta Biomater.* 1, 451–459. doi:10.1016/j.actbio.2005.04.004.
- McGinnis, W., Garber, R. L., Wirz, J., Kuroiwa, A., and Gehring, W. J. (1984). A homologous protein-coding sequence in Drosophila homeotic genes and its conservation in other metazoans. *Cell* 37, 403–8. doi:10.1016/0092-8674(84)90370-2.
- McRae, P. A., and Porter, B. E. (2012). The perineuronal net component of the extracellular matrix in plasticity and epilepsy. *Neurochem. Int.* 61, 963–972. doi:10.1016/j.neuint.2012.08.007.
- Meierhenrich, U. J., Golebiowski, J., Fernandez, X., and Cabrol-Bass, D. (2005). De la molécule à l'odeur : Les bases moléculaires des premières étapes de l'olfaction. *Actual. Chim.*
- Merkle, F. T., Mirzadeh, Z., and Alvarez-Buylla, A. (2007). Mosaic organization of neural stem cells in the adult brain. *Science* 317, 381–4. doi:10.1126/science.1144914.
- Meyer, E. A., Illig, K. R., and Brunjes, P. C. (2006). Differences in chemo- and cytoarchitectural features within pars principalis of the rat anterior olfactory nucleus suggest functional specialization. *J. Comp. Neurol.* 498, 786–795. doi:10.1002/cne.21077.
- Mikami, T., and Kitagawa, H. (2013). Biosynthesis and function of chondroitin sulfate. *Biochim. Biophys. Acta* 1830, 4719–33. doi:10.1016/j.bbagen.2013.06.006.
- Minor, K., Tang, X., Kahrilas, G., Archibald, S. J., Davies, J. E., and Davies, S. J. (2008). Decorin promotes robust axon growth on inhibitory CSPGs and myelin via a direct effect on neurons. *Neurobiol. Dis.* 32, 88–95. doi:10.1016/j.nbd.2008.06.009.
- Mitsui, S., Igarashi, K. M., Mori, K., and Yoshihara, Y. (2011). Genetic visualization of the secondary olfactory pathway in Tbx21 transgenic mice. *Neural Syst. Circuits* 1, 5. doi:10.1186/2042-1001-1-5.
- Miura, K., Mainen, Z. F., and Uchida, N. (2012). Odor representations in olfactory cortex:

- distributed rate coding and decorrelated population activity. *Neuron* 74, 1087–98. doi:10.1016/j.neuron.2012.04.021.
- Miyata, S., Komatsu, Y., Yoshimura, Y., Taya, C., and Kitagawa, H. (2012). Persistent cortical plasticity by upregulation of chondroitin 6-sulfation. *Nat. Neurosci.* 15, 414–422. doi:10.1038/nn.3023.
- Miyata, S., Nishimura, Y., and Nakashima, T. (2007). Perineuronal nets protect against amyloid beta-protein neurotoxicity in cultured cortical neurons. *Brain Res.* 1150, 200–6. doi:10.1016/j.brainres.2007.02.066.
- Moore, S. (1963). On the Determination of Cystine as Cysteic Acid. *J. Biol. Chem.* 238, 235–237. doi:10.1016/S0021-9258(19)83985-6.
- Morales, B., Choi, S.-Y., and Kirkwood, A. (2002). Dark Rearing Alters the Development of GABAergic Transmission in Visual Cortex. *J. Neurosci.* 22, 8084–8090. doi:10.1523/JNEUROSCI.22-18-08084.2002.
- Morawski, M., Brückner, G., Jäger, C., Seeger, G., Matthews, R. T., and Arendt, T. (2012). Involvement of perineuronal and perisynaptic extracellular matrix in Alzheimer’s disease neuropathology. *Brain Pathol.* 22, 547–61. doi:10.1111/j.1750-3639.2011.00557.x.
- Moreno-Jiménez, E. P., Flor-García, M., Terreros-Roncal, J., Rábano, A., Cafini, F., Pallas-Bazarra, N., et al. (2019). Adult hippocampal neurogenesis is abundant in neurologically healthy subjects and drops sharply in patients with Alzheimer’s disease. *Nat. Med.* 25, 554–560. doi:10.1038/s41591-019-0375-9.
- Mori, K. (1987). Membrane and synaptic properties of identified neurons in the olfactory bulb. *Prog. Neurobiol.* 29, 275–320. doi:10.1016/0301-0082(87)90024-4.
- Mori, K., and Sakano, H. (2011). How is the olfactory map formed and interpreted in the mammalian brain? *Annu. Rev. Neurosci.* 34, 467–99. doi:10.1146/annurev-neuro-112210-112917.
- Morishita, H., Cabungcal, J.-H., Chen, Y., Do, K. Q., and Hensch, T. K. (2015). Prolonged Period of Cortical Plasticity upon Redox Dysregulation in Fast-Spiking Interneurons. *Biol. Psychiatry* 78, 396–402. doi:10.1016/j.biopsych.2014.12.026.
- Moulton, D. G., and Beidler, L. M. (1967). Structure and function in the peripheral olfactory system. *Physiol. Rev.* 47, 1–52. doi:10.1152/physrev.1967.47.1.1.
- Mouret, A., Murray, K., and Lledo, P.-M. (2009). Centrifugal Drive onto Local Inhibitory Interneurons of the Olfactory Bulb. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1170, 239–254. doi:10.1111/j.1749-6632.2009.03913.x.
- Moya, K., and Ibad, R. (2021). OTX2 signaling in retinal dysfunction, degeneration and

- regeneration. *Neural Regen. Res.* 16, 2002. doi:10.4103/1673-5374.308094.
- Mueller-Buehl, C., Reinhard, J., Roll, L., Bader, V., Winklhofer, K., and Faissner, A. (2022). Brevican, Neurocan, Tenascin-C and Tenascin-R Act as Important Regulators of the Interplay between Perineuronal Nets, Synaptic Integrity, Inhibitory Interneurons and Otx2. *Eur. PMC*. doi:https://doi.org/10.1101/2022.02.24.481837.
- Nabel, E. M., and Morishita, H. (2013). Regulating critical period plasticity: insight from the visual system to fear circuitry for therapeutic interventions. *Front. psychiatry* 4, 146. doi:10.3389/fpsyt.2013.00146.
- Nagayama, S., Igarashi, K. M., Manabe, H., and Mori, K. (2014). “Parallel Tufted Cell and Mitral Cell Pathways from the Olfactory Bulb to the Olfactory Cortex,” in *The Olfactory System* (Tokyo: Springer Japan), 133–160. doi:10.1007/978-4-431-54376-3_7.
- Nakamura, T., and Gold, G. H. (1987). A cyclic nucleotide-gated conductance in olfactory receptor cilia. *Nature* 325, 442–444. doi:10.1038/325442a0.
- Nakielnny, S., and Dreyfuss, G. (1997). Nuclear export of proteins and RNAs. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9, 420–9. doi:10.1016/s0955-0674(97)80016-6.
- Nédélec, S., Foucher, I., Brunet, I., Bouillot, C., Prochiantz, A., and Trembleau, A. (2004). Emx2 homeodomain transcription factor interacts with eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E) in the axons of olfactory sensory neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101, 10815–10820. doi:10.1073/pnas.0403824101.
- Neville, K. R., and Haberly, L. B. (2003). Beta and Gamma Oscillations in the Olfactory System of the Urethane-Anesthetized Rat. *J. Neurophysiol.* 90, 3921–3930. doi:10.1152/jn.00475.2003.
- Neville, K. R., and Haberly, L. B. (2004). “Olfactory Cortex,” in *The Synaptic Organization of the Brain* (Oxford University Press), 415–454. doi:10.1093/acprof:oso/9780195159561.003.0010.
- Nguyen, M. Q., Zhou, Z., Marks, C. A., Ryba, N. J. P., and Belluscio, L. (2007). Prominent roles for odorant receptor coding sequences in allelic exclusion. *Cell* 131, 1009–17. doi:10.1016/j.cell.2007.10.050.
- Nigro, M. J., Kirikae, H., Kjelsberg, K., Nair, R. R., and Witter, M. P. (2021). Not All That Is Gold Glitters: PV-IRES-Cre Mouse Line Shows Low Efficiency of Labeling of Parvalbumin Interneurons in the Perirhinal Cortex. *Front. Neural Circuits* 15. doi:10.3389/fncir.2021.781928.
- Nothias, F., Fishell, G., and Altaba, A. R. (1998). Cooperation of intrinsic and extrinsic signals in the elaboration of regional identity in the posterior cerebral cortex. *Curr. Biol.*

- 8, 459–463. doi:10.1016/S0960-9822(98)70189-7.
- Ohara, K., Jacquinet, J.-C., Jouanneau, D., Helbert, W., Smietana, M., and Vasseur, J.-J. (2009). Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometric analysis of polysulfated-derived oligosaccharides using pyrenemethylguanidine. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 20, 131–137. doi:10.1016/j.jasms.2008.09.004.
- Ohloff, G. (1994). Scent and fragrances - The fascination of odors and their chemical perspectives, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- Oohashi, T., Edamatsu, M., Bekku, Y., and Carulli, D. (2015). The hyaluronan and proteoglycan link proteins: Organizers of the brain extracellular matrix and key molecules for neuronal function and plasticity. *Exp. Neurol.* 274. doi:10.1016/j.expneurol.2015.09.010.
- Pace, U., Hanski, E., Salomon, Y., and Lancet, D. (1985). Odorant-sensitive adenylate cyclase may mediate olfactory reception. *Nature* 316, 255–258. doi:10.1038/316255a0.
- Packer, A. M., and Yuste, R. (2011). Dense, Unspecific Connectivity of Neocortical Parvalbumin-Positive Interneurons: A Canonical Microcircuit for Inhibition? *J. Neurosci.* 31, 13260–13271. doi:10.1523/JNEUROSCI.3131-11.2011.
- Paredes, M. F., James, D., Gil-Perotin, S., Kim, H., Cotter, J. A., Ng, C., et al. (2016). Extensive migration of young neurons into the infant human frontal lobe. *Science* 354. doi:10.1126/science.aaf7073.
- 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. *J. Comp. Neurol.* 501, 825–36. doi:10.1002/cne.21205.
- Patil, M. M., and Hasselmo, M. E. (1999). Modulation of inhibitory synaptic potentials in the piriform cortex. *J. Neurophysiol.* 81, 2103–18. doi:10.1152/jn.1999.81.5.2103.
- Pelkey, K. A., Barksdale, E., Craig, M. T., Yuan, X., Sukumaran, M., Vargish, G. A., et al. (2015). Pentraxins coordinate excitatory synapse maturation and circuit integration of parvalbumin interneurons. *Neuron* 85, 1257–72. doi:10.1016/j.neuron.2015.02.020.
- Perea, G., Yang, A., Boyden, E. S., and Sur, M. (2014). Optogenetic astrocyte activation modulates response selectivity of visual cortex neurons in vivo. *Nat. Commun.* 5, 3262. doi:10.1038/ncomms4262.
- Petreau, L., and Alvarez-Buylla, A. (2002). Maturation and death of adult-born olfactory bulb granule neurons: role of olfaction. *J. Neurosci.* 22, 6106–13. doi:20026588.
- Pinto-Duarte, A., Bogue, K., Sejnowski, T. J., and Srinivasan, S. (2019). A conserved principle of glial organization in the paleocortex and neocortex.

doi:<https://doi.org/10.1101/449421>.

- Pizzorusso, T., Medini, P., Berardi, N., Chierzi, S., Fawcett, J. W., and Maffei, L. (2002). Reactivation of ocular dominance plasticity in the adult visual cortex. *Science* 298, 1248–51. doi:10.1126/science.1072699.
- Pizzorusso, T., Medini, P., Landi, S., Baldini, S., Berardi, N., and Maffei, L. (2006). Structural and functional recovery from early monocular deprivation in adult rats. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 8517–8522. doi:10.1073/pnas.0602657103.
- Planques, A., Oliveira Moreira, V., Dubreuil, C., Prochiantz, A., and Di Nardo, A. A. (2019). OTX2 Signals from the Choroid Plexus to Regulate Adult Neurogenesis. *eneuro* 6, ENEURO.0262-18.2019. doi:10.1523/ENEURO.0262-18.2019.
- Poo, C., and Isaacson, J. S. (2009). Odor Representations in Olfactory Cortex: “Sparse” Coding, Global Inhibition, and Oscillations. *Neuron* 62, 850–861. doi:10.1016/j.neuron.2009.05.022.
- Prochiantz, A., and Di Nardo, A. A. (2015). Homeoprotein signaling in the developing and adult nervous system. *Neuron* 85, 911–25. doi:10.1016/j.neuron.2015.01.019.
- Prochiantz, A., and Joliot, A. (2003). Can transcription factors function as cell-cell signalling molecules? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 814–9. doi:10.1038/nrm1227.
- Prydz, K., and Dalen, K. T. (2000). Synthesis and sorting of proteoglycans. *J. Cell Sci.* 113 Pt 2, 193–205. doi:10.1242/jcs.113.2.193.
- Rabouille, C. (2017). Pathways of Unconventional Protein Secretion. *Trends Cell Biol.* 27, 230–240. doi:10.1016/j.tcb.2016.11.007.
- Ramón y Cajal, S. (1897). Las células de cilindro-eje corto de la capa molecular del cerebro. *Rev Trim Microgr.* 105-127.
- Rapraeger, A. C., Guimond, S., Krufka, A., and Olwin, B. B. (1994). “[11] Regulation by heparan sulfate in fibroblast growth factor signaling,” in, 219–240. doi:10.1016/0076-6879(94)45013-7.
- Rauch, U., Clement, A., Retzler, C., Fröhlich, L., Fässler, R., Göhring, W., et al. (1997). Mapping of a Defined Neurocan Binding Site to Distinct Domains of Tenascin-C. *J. Biol. Chem.* 272. doi:10.1074/jbc.272.43.26905.
- Reh, R. K., Dias, B. G., Nelson, C. A., Kaufer, D., Werker, J. F., Kolb, B., et al. (2020a). Critical period regulation across multiple timescales. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 117, 23242–23251. doi:10.1073/pnas.1820836117.
- Reh, R. K., Dias, B. G., Nelson, C. A., Kaufer, D., Werker, J. F., Kolb, B., et al. (2020b). Critical period regulation across multiple timescales. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 117, 23242–

23251. doi:10.1073/pnas.1820836117.
- Reinhard, S. M., Razak, K., and Ethell, I. M. (2015). A delicate balance: role of MMP-9 in brain development and pathophysiology of neurodevelopmental disorders. *Front. Cell. Neurosci.* 9. doi:10.3389/fncel.2015.00280.
- Ribot, J., Breton, R., Calvo, C.-F., Moulard, J., Ezan, P., Zapata, J., et al. (2021). Astrocytes close the mouse critical period for visual plasticity. *Science* 373, 77–81. doi:10.1126/science.abf5273.
- Rocheffort, 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, 2679–89. doi:20026260.
- Romberg, C., Yang, S., Melani, R., Andrews, M. R., Horner, A. E., Spillantini, M. G., et al. (2013). Depletion of perineuronal nets enhances recognition memory and long-term depression in the perirhinal cortex. *J. Neurosci.* 33, 7057–65. doi:10.1523/JNEUROSCI.6267-11.2013.
- Rossier, J., Bernard, A., Cabungcal, J.-H., Perrenoud, Q., Savoye, A., Gallopin, T., et al. (2015). Cortical fast-spiking parvalbumin interneurons enwrapped in the perineuronal net express the metallopeptidases Adamts8, Adamts15 and Neprilysin. *Mol. Psychiatry* 20, 154–61. doi:10.1038/mp.2014.162.
- Ryu, B., Nagappan, S., Santos-Valencia, F., Lee, P., Rodriguez, E., Lackie, M., et al. (2021). Chronic loss of inhibition in piriform cortex following brief, daily optogenetic stimulation. *Cell Rep.* 35, 109001. doi:10.1016/j.celrep.2021.109001.
- Saghatelyan, A., Roux, P., Migliore, M., Rocheffort, C., Desmaisons, D., Charneau, P., et al. (2005). Activity-Dependent Adjustments of the Inhibitory Network in the Olfactory Bulb following Early Postnatal Deprivation. *Neuron* 46, 103–116. doi:10.1016/j.neuron.2005.02.016.
- Sakai, A., Nakato, R., Ling, Y., Hou, X., Hara, N., Iijima, T., et al. (2017). Genome-Wide Target Analyses of Otx2 Homeoprotein in Postnatal Cortex. *Front. Neurosci.* 11. doi:10.3389/fnins.2017.00307.
- Sanchez-Andrade, G., and Kendrick, K. M. (2009). The main olfactory system and social learning in mammals. *Behav. Brain Res.* 200, 323–335. doi:10.1016/j.bbr.2008.12.021.
- Sangaj, N., Kyriakakis, P., Yang, D., Chang, C. W., Arya, G., and Varghese, S. (2010). Heparin mimicking polymer promotes myogenic differentiation of muscle progenitor cells. *Biomacromolecules* 11, 3294–3300. doi:10.1021/bm101041f.
- Schaefer, A. T., Angelo, K., Spors, H., and Margrie, T. W. (2006). Neuronal oscillations

- enhance stimulus discrimination by ensuring action potential precision. *PLoS Biol.* 4, e163. doi:10.1371/journal.pbio.0040163.
- Schoonover, C. E., Ohashi, S. N., Axel, R., and Fink, A. J. P. (2021). Representational drift in primary olfactory cortex. *Nature* 594, 541–546. doi:10.1038/s41586-021-03628-7.
- Shepherd, G. M. ed. (2004). *The Synaptic Organization of the Brain*. Oxford University Press doi:10.1093/acprof:oso/9780195159561.001.1.
- Shepherd, G. M. (2011). The Microcircuit Concept Applied to Cortical Evolution: from Three-Layer to Six-Layer Cortex. *Front. Neuroanat.* 5. doi:10.3389/fnana.2011.00030.
- Shinozaki, M., Iwanami, A., Fujiyoshi, K., Tashiro, S., Kitamura, K., Shibata, S., et al. (2016). Combined treatment with chondroitinase ABC and treadmill rehabilitation for chronic severe spinal cord injury in adult rats. *Neurosci. Res.* 113, 37–47. doi:10.1016/j.neures.2016.07.005.
- Silbert, J. E., and Sugumaran, G. (2002). Biosynthesis of chondroitin/dermatan sulfate. *IUBMB Life* 54, 177–86. doi:10.1080/15216540214923.
- Simeone, A., Acampora, D., Gulisano, M., Stornaiuolo, A., and Boncinelli, E. (1992). Nested expression domains of four homeobox genes in developing rostral brain. *Nature* 358, 687–90. doi:10.1038/358687a0.
- Simeone, A., Acampora, D., Mallamaci, A., Stornaiuolo, A., D'Apice, M. R., Nigro, V., et al. (1993). A vertebrate gene related to orthodenticle contains a homeodomain of the bicoid class and demarcates anterior neuroectoderm in the gastrulating mouse embryo. *EMBO J.* 12, 2735–47. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8101484>.
- Simpson, K. L., and Sweazey, R. D. (2015). Olfaction and Taste.
- Sklar, P. B., Anholt, R. R., and Snyder, S. H. (1986). The odorant-sensitive adenylate cyclase of olfactory receptor cells. Differential stimulation by distinct classes of odorants. *J. Biol. Chem.* 261, 15538–43.
- Smith, C. C., Mauricio, R., Nobre, L., Marsh, B., Wüst, R. C. I., Rossiter, H. B., et al. (2015). Differential regulation of perineuronal nets in the brain and spinal cord with exercise training. *Brain Res. Bull.* 111, 20–6. doi:10.1016/j.brainresbull.2014.12.005.
- Soghomonian, J. J., and Martin, D. L. (1998). Two isoforms of glutamate decarboxylase: why? *Trends Pharmacol. Sci.* 19, 500–5. doi:10.1016/s0165-6147(98)01270-x.
- Sohal, V. S., Zhang, F., Yizhar, O., and Deisseroth, K. (2009). Parvalbumin neurons and gamma rhythms enhance cortical circuit performance. *Nature* 459, 698–702. doi:10.1038/nature07991.
- Sonntag, M., Blosa, M., Schmidt, S., Rübsamen, R., and Morawski, M. (2015). Perineuronal

- nets in the auditory system. *Hear. Res.* 329, 21–32. doi:10.1016/j.heares.2014.12.012.
- Sorrells, S. F., Paredes, M. F., Cebrian-Silla, A., Sandoval, K., Qi, D., Kelley, K. W., et al. (2018). Human hippocampal neurogenesis drops sharply in children to undetectable levels in adults. *Nature* 555, 377–381. doi:10.1038/nature25975.
- Southwell, D. G., Froemke, R. C., Alvarez-Buylla, A., Stryker, M. P., and Gandhi, S. P. (2010). Cortical plasticity induced by inhibitory neuron transplantation. *Science* 327, 1145–8. doi:10.1126/science.1183962.
- Spalding, K. L., Bergmann, O., Alkass, K., Bernard, S., Salehpour, M., Huttner, H. B., et al. (2013). Dynamics of Hippocampal Neurogenesis in Adult Humans. *Cell* 153, 1219–1227. doi:10.1016/j.cell.2013.05.002.
- Spatazza, J., Di Lullo, E., Joliot, A., Dupont, E., Moya, K. L., and Prochiantz, A. (2013a). Homeoprotein Signaling in Development, Health, and Disease: A Shaking of Dogmas Offers Challenges and Promises from Bench to Bed. *Pharmacol. Rev.* 65, 90–104. doi:10.1124/pr.112.006577.
- Spatazza, J., Lee, H. H. C., Di Nardo, A. A., Tibaldi, L., Joliot, A., Hensch, T. K., et al. (2013b). Choroid-plexus-derived Otx2 homeoprotein constrains adult cortical plasticity. *Cell Rep.* 3, 1815–23. doi:10.1016/j.celrep.2013.05.014.
- Spicer, A. P., Joo, A., and Bowling, R. A. (2003). A hyaluronan binding link protein gene family whose members are physically linked adjacent to chondroitin sulfate proteoglycan core protein genes: the missing links. *J. Biol. Chem.* 278, 21083–91. doi:10.1074/jbc.M213100200.
- Spicer, A. P., Seldin, M. F., Olsen, A. S., Brown, N., Wells, D. E., Doggett, N. A., et al. (1997). Chromosomal localization of the human and mouse hyaluronan synthase genes. *Genomics* 41, 493–7. doi:10.1006/geno.1997.4696.
- Staubli, U., Schottler, F., and Nejat-Bina, D. (1987). Role of dorsomedial thalamic nucleus and piriform cortex in processing olfactory information. *Behav. Brain Res.* 25, 117–29. doi:10.1016/0166-4328(87)90005-2.
- Steinhauer, J., and Treisman, J. E. (2009). Lipid-modified morphogens: functions of fats. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 19, 308–314. doi:10.1016/j.gde.2009.04.006.
- Stern, S., Tanaka, M., and Herr, W. (1989). The Oct-1 homoeodomain directs formation of a multiprotein-DNA complex with the HSV transactivator VP16. *Nature* 341, 624–30. doi:10.1038/341624a0.
- Stettler, D. D., and Axel, R. (2009). Representations of odor in the piriform cortex. *Neuron* 63, 854–64. doi:10.1016/j.neuron.2009.09.005.

- Su, C.-Y., Menuz, K., and Carlson, J. R. (2009). Olfactory Perception: Receptors, Cells, and Circuits. *Cell* 139, 45–59. doi:10.1016/j.cell.2009.09.015.
- Sugahara, K., and Mikami, T. (2007). Chondroitin/dermatan sulfate in the central nervous system. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 17. doi:10.1016/j.sbi.2007.08.015.
- Sugahara, K., Mikami, T., Uyama, T., Mizuguchi, S., Nomura, K., and Kitagawa, H. (2003). Recent advances in the structural biology of chondroitin sulfate and dermatan sulfate. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 13, 612–20. doi:10.1016/j.sbi.2003.09.011.
- Sugiyama, S., Di Nardo, A. A., Aizawa, S., Matsuo, I., Volovitch, M., Prochiantz, A., et al. (2008). Experience-dependent transfer of Otx2 homeoprotein into the visual cortex activates postnatal plasticity. *Cell* 134, 508–20. doi:10.1016/j.cell.2008.05.054.
- Sugiyama, S., Prochiantz, A., and Hensch, T. K. (2009). From brain formation to plasticity: insights on Otx2 homeoprotein. *Dev. Growth Differ.* 51, 369–77. doi:10.1111/j.1440-169X.2009.01093.x.
- Suttkus, A., Rohn, S., Weigel, S., Glöckner, P., Arendt, T., and Morawski, M. (2014). Aggrecan, link protein and tenascin-R are essential components of the perineuronal net to protect neurons against iron-induced oxidative stress. *Cell Death Dis.* 5, e1119. doi:10.1038/cddis.2014.25.
- Suzuki, N., and Bekkers, J. M. (2010a). Distinctive classes of GABAergic interneurons provide layer-specific phasic inhibition in the anterior piriform cortex. *Cereb. Cortex* 20, 2971–84. doi:10.1093/cercor/bhq046.
- Suzuki, N., and Bekkers, J. M. (2010b). Inhibitory neurons in the anterior piriform cortex of the mouse: Classification using molecular markers. *J. Comp. Neurol.* 518, 1670–1687. doi:10.1002/cne.22295.
- Suzuki, N., Tantirigama, M. L., Aung, K. P., Huang, H. H., and Bekkers, J. M. (2022). Fast and slow feedforward inhibitory circuits for cortical odor processing. *Elife* 11. doi:10.7554/eLife.73406.
- Takesian, A. E., Bogart, L. J., Lichtman, J. W., and Hensch, T. K. (2018). Inhibitory circuit gating of auditory critical-period plasticity. *Nat. Neurosci.* 21, 218–227. doi:10.1038/s41593-017-0064-2.
- Takesian, A. E., and Hensch, T. K. (2013). Balancing plasticity/stability across brain development. *Prog. Brain Res.* 207, 3–34. doi:10.1016/B978-0-444-63327-9.00001-1.
- Tang, Y., Stryker, M. P., Alvarez-Buylla, A., and Espinosa, J. S. (2014). Cortical plasticity induced by transplantation of embryonic somatostatin or parvalbumin interneurons. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, 18339–18344. doi:10.1073/pnas.1421844112.

- Testa, D., Prochiantz, A., and Di Nardo, A. A. (2019). Perineuronal nets in brain physiology and disease. *Semin. Cell Dev. Biol.* 89. doi:10.1016/j.semcdb.2018.09.011.
- Toole, B. P. (2000). Hyaluronan is not just a goo! *J. Clin. Invest.* 106, 335–6. doi:10.1172/JCI10706.
- Topisirovic, I., and Borden, K. L. B. (2005). Homeodomain proteins and eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E): an unexpected relationship. *Histol. Histopathol.* 20, 1275–84. doi:10.14670/HH-20.1275.
- Tremblay, R., Lee, S., and Rudy, B. (2016). GABAergic Interneurons in the Neocortex: From Cellular Properties to Circuits. *Neuron* 91, 260–92. doi:10.1016/j.neuron.2016.06.033.
- Trofimenko, E., Grasso, G., Heulot, M., Chevalier, N., Deriu, M. A., Dubuis, G., et al. (2021). Genetic, cellular, and structural characterization of the membrane potential-dependent cell-penetrating peptide translocation pore. *Elife* 10. doi:10.7554/eLife.69832.
- Tropea, D., Kreiman, G., Lyckman, A., Mukherjee, S., Yu, H., Horng, S., et al. (2006). Gene expression changes and molecular pathways mediating activity-dependent plasticity in visual cortex. *Nat. Neurosci.* 9, 660–8. doi:10.1038/nn1689.
- Tsai, L., and Barnea, G. (2014). A critical period defined by axon-targeting mechanisms in the murine olfactory bulb. *Science* 344, 197–200. doi:10.1126/science.1248806.
- Tsuji, K., Aoki, T., Tejima, E., Arai, K., Lee, S.-R., Atochin, D. N., et al. (2005). Tissue Plasminogen Activator Promotes Matrix Metalloproteinase-9 Upregulation After Focal Cerebral Ischemia. *Stroke* 36, 1954–1959. doi:10.1161/01.STR.0000177517.01203.eb.
- Turrigiano, G. G., and Nelson, S. B. (2004). Homeostatic plasticity in the developing nervous system. *Nat. Rev. Neurosci.* 5, 97–107. doi:10.1038/nrn1327.
- Ueno, H., Suemitsu, S., Murakami, S., Kitamura, N., Wani, K., Matsumoto, Y., et al. (2019). Layer-specific expression of extracellular matrix molecules in the mouse somatosensory and piriform cortices. *IBRO Reports* 6, 1–17. doi:10.1016/j.ibror.2018.11.006.
- Ueno, H., Suemitsu, S., Okamoto, M., Matsumoto, Y., and Ishihara, T. (2017). Sensory experience-dependent formation of perineuronal nets and expression of Cat-315 immunoreactive components in the mouse somatosensory cortex. *Neuroscience* 355, 161–174. doi:10.1016/j.neuroscience.2017.04.041.
- van 't Spijker, H. M., and Kwok, J. C. F. (2017). A Sweet Talk: The Molecular Systems of Perineuronal Nets in Controlling Neuronal Communication. *Front. Integr. Neurosci.* 11. doi:10.3389/fnint.2017.00033.
- Vassalli, A., Rothman, A., Feinstein, P., Zapotocky, M., and Mombaerts, P. (2002). Minigenes impart odorant receptor-specific axon guidance in the olfactory bulb. *Neuron*

- 35, 681–96. doi:10.1016/s0896-6273(02)00793-6.
- Vázquez-Campos, S., St. Hilaire, P. M., Damgaard, D., and Meldal, M. (2005). GAG mimetic libraries: Sulphated peptide as heparin-like glycosaminoglycan mimics in their interaction with FGF-1. *QSAR Comb. Sci.* 24, 923–942. doi:10.1002/qsar.200420100.
- Venturino, A., Schulz, R., De Jesús-Cortés, H., Maes, M. E., Nagy, B., Reilly-Andújar, F., et al. (2021). Microglia enable mature perineuronal nets disassembly upon anesthetic ketamine exposure or 60-Hz light entrainment in the healthy brain. *Cell Rep.* 36, 109313. doi:10.1016/j.celrep.2021.109313.
- Vincent, C., Gilabert-Juan, J., Gibel-Russo, R., Alvarez-Fischer, D., Krebs, M.-O., Le Pen, G., et al. (2021). Non-cell-autonomous OTX2 transcription factor regulates anxiety-related behavior in the mouse. *Mol. Psychiatry* 26, 6469–6480. doi:10.1038/s41380-021-01132-y.
- Vo, T., Carulli, D., Ehlert, E. M. E., Kwok, J. C. F., Dick, G., Mecollari, V., et al. (2013). The chemorepulsive axon guidance protein semaphorin3A is a constituent of perineuronal nets in the adult rodent brain. *Mol. Cell. Neurosci.* 56, 186–200. doi:10.1016/j.mcn.2013.04.009.
- Volovitch, M., Le Roux, I., Joliot, A. H., Bloch-Gallego, E., and Prochiantz, A. (1993). Control of neuronal morphogenesis by homeoproteins: consequences for the making of neuronal networks. *Perspect Dev Neurobiol* 1, 133–138.
- Walimbe, T., and Panitch, A. (2020). Proteoglycans in Biomedicine: Resurgence of an Underexploited Class of ECM Molecules. *Front. Pharmacol.* 10. doi:10.3389/fphar.2019.01661.
- Wang, D., Ichiyama, R. M., Zhao, R., Andrews, M. R., and Fawcett, J. W. (2011). Chondroitinase Combined with Rehabilitation Promotes Recovery of Forelimb Function in Rats with Chronic Spinal Cord Injury. *J. Neurosci.* 31, 9332–9344. doi:10.1523/JNEUROSCI.0983-11.2011.
- Wang, L., Zhang, Z., Chen, J., Manyande, A., Haddad, R., Liu, Q., et al. (2020). Cell-Type-Specific Whole-Brain Direct Inputs to the Anterior and Posterior Piriform Cortex. *Front. Neural Circuits* 14. doi:10.3389/fncir.2020.00004.
- Whitman, M. C., and Greer, C. A. (2007). Adult-generated neurons exhibit diverse developmental fates. *Dev. Neurobiol.* 67, 1079–93. doi:10.1002/dneu.20389.
- Whittington, M. A., and Traub, R. D. (2003). Interneuron diversity series: inhibitory interneurons and network oscillations in vitro. *Trends Neurosci.* 26, 676–82. doi:10.1016/j.tins.2003.09.016.

- Wiesel, T. N., and Hubel, D. H. (1963). SINGLE-CELL RESPONSES IN STRIATE CORTEX OF KITTENS DEPRIVED OF VISION IN ONE EYE. *J. Neurophysiol.* 26, 1003–1017. doi:10.1152/jn.1963.26.6.1003.
- Wilson, D. A. (2001). Receptive Fields in the Rat Piriform Cortex. *Chem. Senses* 26, 577–584. doi:10.1093/chemse/26.5.577.
- Wilson, D. A. (2009). “Olfactory Cortex Physiology,” in *Encyclopedia of Neuroscience* (Elsevier), 95–100. doi:10.1016/B978-008045046-9.01690-9.
- Wilson, D. A., and Stevenson, R. J. (2003). The fundamental role of memory in olfactory perception. *Trends Neurosci.* 26, 243–7. doi:10.1016/S0166-2236(03)00076-6.
- Wilson, D. A., and Sullivan, R. M. (2011). Cortical processing of odor objects. *Neuron* 72, 506–19. doi:10.1016/j.neuron.2011.10.027.
- Winner, B., Cooper-Kuhn, C. M., Aigner, R., Winkler, J., and Kuhn, H. G. (2002). Long-term survival and cell death of newly generated neurons in the adult rat olfactory bulb. *Eur. J. Neurosci.* 16, 1681–1689. doi:10.1046/j.1460-9568.2002.02238.x.
- Wizenmann, A., Brunet, I., Lam, J., Sonnier, L., Beurdeley, M., Zarbalis, K., et al. (2009). Extracellular Engrailed participates in the topographic guidance of retinal axons in vivo. *Neuron* 64, 355–366. doi:10.1016/j.neuron.2009.09.018.
- Wolpert, L. (1969). Positional information and the spatial pattern of cellular differentiation. *J. Theor. Biol.* 25, 1–47. doi:10.1016/S0022-5193(69)80016-0.
- Yabuno, K., Morise, J., Kizuka, Y., Hashii, N., Kawasaki, N., Takahashi, S., et al. (2015). A Sulfated Glycosaminoglycan Linkage Region Is a Novel Type of Human Natural Killer-1 (HNK-1) Epitope Expressed on Aggrecan in Perineuronal Nets. *PLoS One* 10, e0144560. doi:10.1371/journal.pone.0144560.
- Yamada, J., and Jinno, S. (2017). Molecular heterogeneity of aggrecan-based perineuronal nets around five subclasses of parvalbumin-expressing neurons in the mouse hippocampus. *J. Comp. Neurol.* 525, 1234–1249. doi:10.1002/cne.24132.
- Yamada, J., Ohgomori, T., and Jinno, S. (2015). Perineuronal nets affect parvalbumin expression in GABAergic neurons of the mouse hippocampus. *Eur. J. Neurosci.* 41, 368–78. doi:10.1111/ejn.12792.
- Yamaguchi, M. (2014). “Interneurons in the Olfactory Bulb: Roles in the Plasticity of Olfactory Information Processing,” in *The Olfactory System* (Tokyo: Springer Japan), 97–132. doi:10.1007/978-4-431-54376-3_6.
- Yamaguchi, M., and Mori, K. (2005). Critical period for sensory experience-dependent survival of newly generated granule cells in the adult mouse olfactory bulb. *Proc. Natl.*

- Acad. Sci.* 102, 9697–9702. doi:10.1073/pnas.0406082102.
- Yamaguchi, M., Ohmori, T., Sakata, Y., and Ueki, M. (2008). Oligo(tyrosine sulfate)s as heparin pentasaccharide mimic: Evaluation by surface noncovalent affinity mass spectrometry. *Bioorganic Med. Chem.* 16, 3342–3351. doi:10.1016/j.bmc.2007.12.004.
- Yamaguchi, Y. (2000). Lecticans: organizers of the brain extracellular matrix. *Cell. Mol. Life Sci.* 57, 276–89. doi:10.1007/PL00000690.
- Yazaki-Sugiyama, Y., Kang, S., Câteau, H., Fukai, T., and Hensch, T. K. (2009). Bidirectional plasticity in fast-spiking GABA circuits by visual experience. *Nature* 462, 218–21. doi:10.1038/nature08485.
- Ye, Q., and Miao, Q.-L. (2013). Experience-dependent development of perineuronal nets and chondroitin sulfate proteoglycan receptors in mouse visual cortex. *Matrix Biol.* 32, 352–63. doi:10.1016/j.matbio.2013.04.001.
- Yokoo, T., Knight, B. W., and Sirovich, L. (2001). An Optimization Approach to Signal Extraction from Noisy Multivariate Data. *Neuroimage* 14, 1309–1326. doi:10.1006/nimg.2001.0950.
- Zelano, C., Mohanty, A., and Gottfried, J. A. (2011). Olfactory predictive codes and stimulus templates in piriform cortex. *Neuron* 72, 178–87. doi:10.1016/j.neuron.2011.08.010.
- Zhang, C., Szabó, G., Erdélyi, F., Rose, J. D., and Sun, Q.-Q. (2006). Novel interneuronal network in the mouse posterior piriform cortex. *J. Comp. Neurol.* 499, 1000–15. doi:10.1002/cne.21166.

ANNEXES

