

Université de Montréal

Manipuler les interneurons corticaux exprimant la parvalbumine pour augmenter la  
plasticité cérébrale chez l'adulte

*Par*

Marisol Lavertu Jolin

Département de neurosciences, Faculté de médecine

Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de Ph. D.  
en neurosciences

Avril 2021

© Marisol Lavertu Jolin, 2021



Université de Montréal

Unité académique : Département de neurosciences, Faculté de médecine

---

*Cette thèse intitulée*

**Manipuler les interneurons corticaux exprimant la parvalbumine pour augmenter la plasticité cérébrale chez l'adulte**

*Présentée par*

**Marisol Lavertu Jolin**

*A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes*

**Richard Robitaille**  
Président-rapporteur

**Graziella Di Cristo**  
Directrice de recherche

**Christine Vande Velde**  
Membre du jury

**Edward Ruthazer**  
Examineur externe



## Résumé

La plasticité cérébrale est régulée de façon dynamique au cours d'une vie : atteignant des sommets au cours de l'enfance, elle est réduite chez l'adulte. Toutefois, des circonstances particulières appellent à vouloir stimuler la malléabilité du cerveau adulte : pour favoriser la réhabilitation suite à un accident vasculaire cérébral ou un traumatisme crânien, pour aider l'adaptation spécifique nécessaire pour vivre avec une nouvelle prothèse ou encore pour améliorer l'efficacité de la thérapie cognitivo-comportementale suite à un traumatisme émotionnel qui a laissé un souvenir de peur qui s'est développé en syndrome de choc post-traumatique. Toutes ces situations demandent des capacités d'adaptation et une flexibilité exceptionnelles au système nerveux central. Or, pour retrouver une plasticité cérébrale telle qu'au niveau juvénile, la littérature nous apprend qu'il faut diminuer la puissance inhibitrice générée par un type d'interneurones particuliers, ceux exprimant la parvalbumine (PV<sup>+</sup>).

Les fonctions des interneurones PV<sup>+</sup> dépendent autant de leur patron de connectivité que de l'environnement extracellulaire dans lequel ils évoluent. En effet, en innervant des centaines de neurones cibles, délivrant une forte inhibition périsomatique en formant de multiples synapses autour de leur corps cellulaire et de leurs dendrites proximales, ils ont été impliqués dans l'intégration synaptique des neurones pyramidaux et dans la synchronisation des circuits corticaux. Toute manipulation ciblant cette arborescence axonale complexe pourrait s'avérer efficace à l'augmentation de la plasticité cérébrale en diminuant l'inhibition qu'elle génère. Ainsi, comprendre la signalisation moléculaire restreignant la croissance de l'arborescence axonale et la

formation de boutons fonctionnels au cours de la longue phase développementale qui caractérise les interneurons PV<sup>+</sup> aiderait à identifier des méthodes efficaces afin d'activer cette signalisation moléculaire chez l'adulte. De plus, comprendre les régulations épigénétiques liées au développement et à la maturation structurelle et fonctionnelle des interneurons PV<sup>+</sup> offrirait une cible de choix afin de dématurer ces circuits inhibiteurs et lever un frein sur la plasticité cérébrale adulte.

Nous démontrons ici que l'expression du récepteur des neurotrophines p75<sup>NTR</sup> chez les interneurons PV<sup>+</sup> au cours de leur développement restreint la maturation de leur arborescence axonale, autant *in vitro* que *in vivo*, ainsi que l'agglomération des filets périneuronaux, autour de leur corps cellulaire. Aussi, en utilisant une version modifiée du test de ligation de proximité, nous avons résolu une controverse et démontré que le récepteur est toujours exprimé chez les interneurons PV<sup>+</sup> du cortex adulte. Enfin, l'activation de la signalisation via p75<sup>NTR</sup> des interneurons PV<sup>+</sup> par son ligand proBDNF est suffisante pour déstabiliser leur connectivité et restaurer la plasticité du cortex visuel suite à une privation monoculaire.

Également, l'inactivation d'un régulateur épigénétique, l'histone déacétylase *Hdac2*, spécifiquement chez les interneurons PV<sup>+</sup> suffit à diminuer leur connectivité efférente ainsi que l'agglomération des filets périneuronaux autour de leurs corps cellulaire tout en augmentant la rétention de l'extinction des souvenirs de peur, témoignant d'une augmentation de la plasticité cérébrale adulte. Par le séquençage d'ARNm en cellule unique, suivi de l'hybridation *in situ* RNAscope, nous avons identifié le gène *Acan*, codant pour aggrécane, une composante protéique des filets périneuronaux, comme étant exprimé de façon autonome à la cellule par les interneurons PV<sup>+</sup> du cortex

préfrontal adulte. Enfin, nous avons démontré qu'une seule injection d'un nouvel inhibiteur spécifique pour Hdac2 avant le paradigme d'extinction suffit à augmenter la rétention des souvenirs d'extinction chez l'adulte, tout en réduisant l'expression de *Acan* et l'agglomération des filets périneuronaux dans le cortex préfrontal.

En somme, nos travaux ont montré que le remodelage des circuits des interneurons PV+ en ciblant soit le récepteur p75<sup>NTR</sup>, soit l'histone déacétylase Hdac2, peut efficacement augmenter la plasticité cérébrale chez l'adulte.

**Mots-clés :** Interneurones, Parvalbumine, Plasticité cérébrale, p75<sup>NTR</sup>, Hdac2, Dominance oculaire, Extinction de la peur, Filets périneuronaux, *Acan*.





# Abstract

Brain plasticity is dynamically regulated during a lifespan: it reaches a peak during juvenile age and decreases in adulthood. However, exceptional circumstances can drive the need to foster adult brain plasticity: to help rehabilitation after a stroke or a head trauma, to increase the adaptability of an individual facing a new life with a prosthetic, to improve the efficiency of cognitive behavioral therapy to cope with the indelible fear memory trace created by an emotional trauma. All these situations require exceptional adaptation capabilities and cognitive flexibility. Several studies have suggested that reducing inhibitory drive, in particular of a specific GABAergic interneuron population, the parvalbumin-expressing interneurons (PV<sup>+</sup>), could be an effective approach to recover juvenile brain plasticity, thereby increasing adult brain plasticity.

PV<sup>+</sup> interneuron functions depend on their axonal connectivity pattern as well as their specific extracellular environment. Indeed, by contacting hundreds of postsynaptic neurons and delivering a strong perisomatic inhibitory drive by forming multiple synapses on their somata and proximal dendrites, PV<sup>+</sup> interneurons strongly regulate pyramidal cell synaptic integration and cortical circuit synchronisation. PV<sup>+</sup> interneuron maturation is a prolonged process, which reaches plateau only after the end of adolescence, and correlates with the decline of developmentally regulated- brain plasticity. We hypothesize that manipulations specifically targeting PV<sup>+</sup> interneuron highly complex axonal arborisation, and thus reducing their inhibitory drive, could be efficient tools to foster adult brain plasticity. Understanding the molecular signalling that

restricts PV<sup>+</sup> cell axonal arborisation growth and the formation of functional presynaptic boutons during their long developmental phase may help identifying efficient methods to activate this molecular pathway, thus reducing PV<sup>+</sup> interneuron connectivity, in adults. In addition, understanding the epigenetic regulation of structural and functional maturation of PV<sup>+</sup> interneurons may offer a choice target to demature these inhibitory circuits and lift a brake on adult brain plasticity.

Here, we demonstrate that the expression levels of neurotrophin receptor p75<sup>NTR</sup> during PV<sup>+</sup> interneurons development constrain the maturation of their connectivity as well as the perineuronal net agglomeration around their cell bodies in a cell-autonomous fashion, both *in vitro* and *in vivo*. Also, by using a modified version of the proximity ligand assay, we solve a long-standing debate by demonstrating p75<sup>NTR</sup> expression in PV<sup>+</sup> interneurons in adult cortex. Finally, we show that promoting p75<sup>NTR</sup> signalisation in PV<sup>+</sup> cortical interneurons by its ligand proBDNF is sufficient to destabilize their connectivity and restore cortical plasticity following monocular deprivation in the adult visual cortex.

We further show that the deletion of the epigenetic regulator histone deacetylase 2 (*Hdac2*), specifically in PV<sup>+</sup> interneurons, is sufficient to decrease their efferent connectivity and perineuronal net agglomeration around their cell bodies, while increasing fear extinction retention, a measure of brain plasticity. By single-cell RNA sequencing, followed by RNAscope *in situ* hybridization, we found that the *Acan* gene, which encodes for aggrecan, a critical perineuronal net protein component, is expressed cell-autonomously by PV<sup>+</sup> interneurons in adult prefrontal cortex. Finally, we showed that a single injection of a novel Hdac2 specific inhibitor before extinction training is

sufficient to increase fear extinction retention in adults, while reducing *Acan* expression and perineuronal net agglomeration in prefrontal cortex.

In summary, our work shows that increasing remodeling of PV<sup>+</sup> interneuron circuits by targeting either p75<sup>NTR</sup> receptor or histone deacetylase Hdac2 efficiently foster adult brain plasticity.

**Keywords:** Interneurons, Parvalbumine, Brain plasticity, p75<sup>NTR</sup>, Hdac2, Ocular dominance, Fear extinction, Perineuronal nets, *Acan*.



# Table des matières

|  |    |
|--|----|
| Résumé .....   | 5  |
| Abstract .....   | 9  |
| Table des matières .....   | 13 |
| Liste des figures .....  | 19 |
| Liste des sigles et abréviations.....  | 23 |
| Remerciements .....  | 26 |
| Chapitre 1 – Introduction générale .....   | 27 |
| 1.1 La plasticité cérébrale .....  | 27 |
| 1.1.1 Les périodes critiques de la plasticité cérébrale .....  | 28 |
| 1.1.1.1 Le modèle de la dominance oculaire .....   | 31 |
| 1.1.1.2 Le modèle de l’extinction de la peur.....  | 34 |
| 1.1.2 La régulation des périodes critiques de plasticité .....   | 40 |
| 1.1.2.1 L’ouverture des périodes critiques.....  | 41 |
| 1.1.2.2 La fermeture des périodes critiques .....  | 43 |
| 1.2 Cibler les interneurones exprimant la parvalbumine pour augmenter la plasticité<br>cérébrale chez l’adulte ..... | 45 |
| 1.2.1 Le développement des interneurones PV <sup>+</sup> .....   | 46 |
| 1.2.1.1 Les divers types d’interneurones corticaux.....  | 47 |
| 1.2.1.2 La spécification précoce des interneurones corticaux.....  | 48 |
| 1.2.2.3 La migration vers le cortex.....   | 50 |
| 1.2.1.4 La formation des synapses .....  | 51 |
| 1.2.2 Les filets périneuronaux .....   | 56 |
| 1.2.2.1 Structure et composition des filets périneuronaux .....  | 58 |

|  |    |
|--|----|
| 1.2.2.1.1 L'acide hyaluronique .....   | 59 |
| 1.2.2.1.2 Les protéoglycanes .....   | 60 |
| 1.2.2.1.3 Les protéoglycanes de type chondroïtine-sulfate .....  | 60 |
| 1.2.2.1.4 Tenascines et Haplns.....  | 61 |
| 1.2.2.2 Désassemblage .....  | 62 |
| 1.2.2.3 Fonctions .....  | 63 |
| 1.2.2.3.1 Barrière physique .....  | 63 |
| 1.2.2.3.2 Voies signalétiques particulières .....  | 64 |
| 1.2.2.3.3 L'activité neuronale .....   | 66 |
| 1.2.2.3.4 La mémoire .....   | 67 |
| 1.3 Le récepteur p75 <sup>NTR</sup> .....  | 68 |
| 1.3.1 Structure et fonctions.....  | 69 |
| 1.3.2 Le récepteur p75 <sup>NTR</sup> et la plasticité synaptique.....   | 73 |
| 1.3.3 Le récepteur p75 <sup>NTR</sup> et la plasticité cérébrale .....   | 76 |
| 1.4 L'histone déacétylase 2.....   | 77 |
| 1.4.1 L'acétylation de la chromatine et la régulation des périodes critiques de plasticité .....   | 77 |
| 1.4.1 Structure et fonctions.....  | 80 |
| 1.4.2 Hdac1 et la plasticité corticale .....   | 83 |
| 1.4.3 Hdac2 et la mémoire de peur .....  | 83 |
| 1.5 Hypothèse et objectifs.....  | 86 |
| Chapitre 2.....  | 90 |
| p75 Neurotrophin Receptor Activation Regulates the Timing of the Maturation of Cortical Parvalbumin Interneuron Connectivity and Promotes Juvenile-like Plasticity in Adult Visual Cortex..... | 90 |

|   |     |
|---|-----|
| Published: Baho E, Chattopadhyaya B, Lavertu-Jolin M, et al., J Neurosci. 2019 Jun 5;39(23):4489-4510.....  | 91  |
| 2.1 Author contribution:.....   | 92  |
| 2.2 Acknowledgments.....  | 95  |
| 2.3 Abstract.....   | 96  |
| 2.4 Significance statement.....   | 97  |
| 2.5 Introduction.....   | 98  |
| 2.6 Methods and materials.....  | 101 |
| 2.6.1 Mice.....   | 101 |
| 2.6.2 Cortical organotypic culture and biolistic transfection.....  | 101 |
| 2.6.3 Western Blots.....  | 103 |
| 2.6.4 Proximity Ligation Assays (PLA).....  | 105 |
| 2.6.5 Fluorescent multiplex RNAscope.....   | 106 |
| 2.6.6 Immunohistochemistry.....   | 108 |
| 2.6.7 Perineuronal nets labeling.....   | 109 |
| 2.6.8 Analysis of PV cell innervation in cortical organotypic cultures.....   | 109 |
| 2.6.9 Imaging and analysis of immunolabeling <i>in vivo</i> .....   | 111 |
| 2.6.10 Minipump implant and Monocular Deprivation (MD).....   | 112 |
| 2.6.11 <i>In Vivo</i> Electrophysiology.....  | 112 |
| 2.6.12 <i>In Vivo</i> Optical Imaging.....  | 114 |
| 2.6.13 Experimental Design and Statistical Analysis.....  | 117 |
| 2.7 Results.....  | 118 |
| 2.7.1 Cortical PV cells express p75NTR during development and in the adult brain.....   | 118 |
| 2.7.2 p75NTR downregulation during the first postnatal weeks induces the formation of exuberant PV cell innervation in cortical organotypic cultures..... | 119 |

|  |     |
|--|-----|
| 2.7.3 Increased p75NTR activation inhibits the formation of PV cell innervation in cortical organotypic cultures ..... | 122 |
| 2.7.4 p75NTR regulates the timing of the maturation of PV cell connectivity <i>in vivo</i> .<br>.....                  | 125 |
| 2.7.5 p75NTR activation destabilizes PV cell connectivity in adult brain .....   | 126 |
| 2.7.6 proBDNF-mediated p75NTR activation in PV cells promotes cortical plasticity in adult mice .....                  | 128 |
| 2.8 Discussion.....  | 131 |
| 2.9 References.....  | 137 |
| 2.10 Figures.....  | 144 |
| Chapitre 3.....  | 167 |
| Enhancing adult neuroplasticity by epigenetic regulation of parvalbumin-expressing GABAergic cells.....                | 167 |
| 3.1 Author contribution:.....  | 168 |
| 3.2 Acknowledgements.....  | 171 |
| 3.3 Abstract.....  | 172 |
| 3.4 Introduction .....   | 174 |
| 3.5 Materiel and Methods.....  | 177 |
| 3.5.1 Animals.....   | 177 |
| 3.5.2 Mice genotyping .....  | 177 |
| 3.5.3 Immunohistochemistry.....  | 178 |
| 3.5.4 Confocal imaging.....  | 180 |
| 3.5.5 Image analysis.....  | 180 |
| 3.5.6 Behavioral testing.....  | 181 |
| 3.5.7 Viral vector and stereotaxic injections .....  | 183 |
| 3.5.8 Neuronal cell dissection and dissociation.....   | 184 |



|   |     |
|---|-----|
| 3.5.9 Single cell capture and sequencing.....   | 185 |
| 3.5.10 Computational analysis of single-cell transcriptomic data .....  | 186 |
| 3.5.11 Cell type Identification .....   | 187 |
| 3.5.12 Fluorescent multiplex RNAscope.....  | 188 |
| 3.5.13 Drug treatment.....  | 190 |
| 3.5.14 Statistical analysis. ....   | 190 |
| 3.5.14 Data availability .....  | 191 |
| 3.6 Results.....  | 192 |
| 3.6.1 Adult <i>PV-Cre;Hdac2<sup>lox/lox</sup></i> mice show enhanced retention of fear extinction .   | 192 |
| 3.6.2 Postnatal deletion of Hdac2 in PV+ cells reduces their enwrapping by PNN194   |     |
| 3.6.3 Hdac2 regulates Aggrecan expression in PV+ cells.....   | 195 |
| 3.6.4 Acute pharmacological Hdac2 inhibition in PV+ cells after fear training increases the retention of fear extinction and reduces <i>Acan</i> /Aggrecan expression. .... | 198 |
| 3.6.5 <i>Hdac2</i> deletion in PFC PV+ cells promotes dynamic changes in <i>Acan</i> expression.....  | 199 |
| 3.6.6 Postnatal deletion of Hdac2 in PV+ cells enhances their remodelling potential .....   | 200 |
| 3.7 Discussion.....   | 202 |
| 3.8 References.....   | 209 |
| 3.9 Figures.....  | 218 |
| 3.10 Supplementary Figures .....  | 235 |
| Chapitre 4 – Discussion et perspectives.....  | 239 |
| 4.1 Résumé des résultats .....  | 239 |
| 4.2 Discussion et perspectives.....   | 245 |
| 4.2.1 L'expression de p75NTR chez les interneurons PV+ .....  | 245 |

|   |     |
|---|-----|
| 4.2.2 Le polymorphisme Val66Met de <i>BDNF</i> .....  | 246 |
| 4.2.3 La signalisation intracellulaire en aval de p75 <sup>NTR</sup> dans les interneurons PV <sup>+</sup><br>..... | 248 |
| 4.2.4 La régulation de l'expression génique en aval de la signalisation via p75 <sup>NTR</sup><br>.....             | 249 |
| 4.2.5 Les synapses périsonmatiques PV <sup>+</sup> .....  | 250 |
| 4.2.6 La S-nitrosylation de Hdac2 .....   | 251 |
| 4.2.7 p75 <sup>NTR</sup> et Hdac2 : deux voies distinctes ou imbriquées ? .....                                     | 252 |
| 4.2.8 L'extinction de la mémoire de peur versus la diminution de l'expression de la<br>peur .....                   | 254 |
| 4.2.9 L'extinction de la mémoire de peur et le sexe .....   | 256 |
| 4.2.10 Les modèles du syndrome de stress post-traumatique .....   | 257 |
| Chapitre 5 – Conclusion .....   | 259 |
| Références bibliographiques .....   | 261 |

# Liste des figures

## Chapitre 1

|  |    |
|--|----|
| Figure 1. – La séquence des périodes critiques de plasticité observée dans le cerveau murin.....   | 30 |
| Figure 2. – La privation monoculaire durant la période critique de plasticité du cortex visuel chez le rongeur.....  | 32 |
| Figure 3. – Schéma simplifié du conditionnement de la peur au son.....   | 35 |
| Figure 4. – Diversité des interneurons GABAergiques du néocortex.....  | 48 |
| Figure 5. – Les filets périneuronaux s'agglomèrent autour du corps cellulaire et des dendrites proximales des neurones, principalement les interneurons PV <sup>+</sup> . .... | 58 |
| Figure 6. – Représentation schématique de la structure des filets périneuronaux. ..  | 59 |
| Figure 7. – Les mécanismes signalétiques de p75 <sup>NTR</sup> . ....  | 72 |
| Figure 8. – Représentation schématique de la régulation de l'acétylation des histones de la chromatine. ....   | 81 |
| Figure 9. – Représentation schématique de l'hypothèse de travail. ....   | 87 |

## Chapitre 2

|   |     |
|---|-----|
| Figure 1. – A subset of PV cells express p75NTR mRNA and protein.....   | 144 |
| Figure 2. – Controls for RNAscope probe specificity. ....   | 146 |
| Figure 3. – p75NTR expression in cortical PV cells decreases during the first postnatal month. ....   | 148 |
| Figure 4. – Cre-mediated inactivation of p75NTR in single PV cells induces the formation of more complex innervations. ....                                       | 150 |
| Figure 5. – p75NTR $\Delta$ DD mimics, while p75NTR <sup>w</sup> t rescues the innervation phenotype of p75NTR <sup>-/-</sup> PV cells. ....                      | 152 |
| Figure 6. – mut-proBDNF mediated activation of p75NTR in PV cells during their maturation phase impairs the development of their innervations.....                | 154 |
| Figure 7. – Blocking or increasing tPA activity during early postnatal development reduces and increases mBDNF levels in organotypic cultures, respectively. .... | 156 |

Figure 8. – Modulation of tPA activity affects the formation of PV cell innervations during early postnatal development..... 157

Figure 9. – Cortical PV cells form more perisomatic boutons and are precociously enwrapped by PNN in *Nkx2.1\_Cre; P75NTR<sup>flx/flx</sup>* mice. .... 159

Figure 10. – *mut-proBDNF* destabilizes PV cell innervation even after it has reached maturity. 161

Figure 11. – *proBDNF*-mediated *p75NTR* activation in cortical PV cells reduces their perisomatic boutons. .... 163

Figure 12. – *proBDNF*-mediated *p75NTR* activation in cortical PV cells restores ocular dominance plasticity in adult visual cortex *in vivo*. .... 165

### Chapitre 3

Figure 1. – Postnatal *Hdac2* deletion restricted to PV<sup>+</sup> cells decreases the spontaneous recovery of fear memory after extinction in adult mice. .... 218

Figure 2. – *PV\_Cre;Hdac2<sup>lox/lox</sup>* mice show reduced PNN agglomeration around cortical PV<sup>+</sup> cell bodies and decreased PV<sup>+</sup> cell efferent synaptic connectivity. .... 220

Figure 3. – PNN components and metalloproteases are expressed by different cell types in mouse PFC. .... 222

Figure 4. – PV<sup>+</sup> cell-specific *Hdac2* deletion leads to reduced *Acan* mRNA expression and Aggrecan condensation around PV<sup>+</sup> cell bodies in adult mouse PFC. .... 224

Figure 5. – PV<sup>+</sup> cell-specific *Hdac2* re-expression in *PV\_Cre;Hdac2<sup>lox/lox</sup>* mice rescues Aggrecan condensation around PV<sup>+</sup> cell bodies in PFC..... 226

Figure 6. – *Hdac2* inhibition before extinction training decreases the spontaneous recovery of fear memory, while decreasing *Acan* mRNA expression and Aggrecan agglomeration around PFC PV<sup>+</sup> cell somata in wild-type but not in *PV-Cre;Hdac2<sup>lox/lox</sup>* mice. 228

Figure 7. – *Hdac2* deletion or pharmacological inhibition promotes *Acan* dynamic expression in PFC PV<sup>+</sup> cells following fear extinction training. .... 231

Figure 8. – PV<sup>+</sup> cell perisomatic connectivity show increased remodeling following extinction training in PFC and BLA of *PV-Cre;Hdac2<sup>lox/lox</sup>* mice. .... 233

Figure 1. – Supplementary. Hdac2 expression is decreased in PV<sup>+</sup> cells of *PV\_Cre;Hdac2<sup>lox/lox</sup>* mice. .... 235

Figure 2. – Supplementary. Adult *PV\_Cre;Hdac2<sup>lox/lox</sup>* mice show increased fear extinction retention compared to their control *PV\_Cre;Hdac2<sup>+/+</sup>* littermates. .... 236

Figure 3. – Supplementary. Expression levels of VGLUT1 (*Slc17a7*), GAD1 (*Gad1*) and GAD2 (*Gad2*) in clusters 1-18. .... 237

Figure 4. – Supplementary. mRNA expression of different PNN components and metalloproteases in distinct cell types in prefrontal cortex of P40 mice identified by single cell RNAseq (DropSeq). .... 238

#### **Chapitre 4**

Figure 1. – Modèle des rôles opposés de la signalisation proBDNF-p75<sup>NTR</sup> et de Hdac2 sur le phénotype cellulaire des interneurons PV<sup>+</sup> et la plasticité du cerveau adulte. 240

Figure 2. – Relation entre le récepteur p75<sup>NTR</sup> et Hdac2. .... 253



## Liste des sigles et abréviations

**ADAMTS** : Désintégrine et métalloprotéase avec motifs, *a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs*.

**BDNF** : Facteur neurotrophique dérivé du cerveau, *Brain-derived neurotrophic factor*.

**chABC** : Chondroïtinase ABC, *Chondroitinase ABC*.

**CS** : Chondroïtine-sulfate, *Chondroitin sulfate*.

**CSPG** : Protéoglycane de type chondroïtine-sulfate, *Chondroitin-sulfate proteoglycan*.

**DD** : Domaine de la mort, *Death domain*.

**ECM** : Matrice extracellulaire, *Extracellular matrix*.

**EGC** : Éminence ganglionnaire caudale, *Caudal ganglionic eminence*.

**EGL** : Éminence ganglionnaire latérale, *Lateral ganglionic eminence*.

**EGM** : Éminence ganglionnaire médiane, *Medial ganglionic eminence*.

**Erk** : Kinase régulée par signaux extracellulaires, *Extracellular signal-regulated kinase*.

**GABA** : Acide  $\gamma$ -aminobutyrique,  *$\gamma$ -aminobutyric acid*.

**GAD** : Glutamate décarboxylase, *Glutamate decarboxylase*.

**HA** : Acide hyaluronique, *Hyaluronic acid*.

**HAS** : Hyaluronane synthase, *Hyaluronane synthase*.

**Hdac** : Histone déacétylase, *Histone deacetylase*.

**LTD** : Dépression à long terme, *Long-term depression*.

**LTP** : Potentialisation à long terme, *Long-term potentialisation*.

**MAG** : Glycoprotéine associée à la myéline, *Myelin-associated glycoprotein*.

**MeCP2** : Protéine de liaison au méthyl CpG, *Methyl CpG binding protein*.

**MMP** : Métalloprotéase, *Métalloprotease*.

**NCAM** : Molécule d'adhésion neurale, *Neuronal cell adhesion molecule*.

**NGF** : Facteur de croissance neural, *Nerve growth factor*.

**NT** : Neurotrophine, *Neurotrophin*.

**PG** : Protéoglycane, *Proteoglycan*.

**PirB** : Récepteur pairé B semblable à l'immunoglobuline, *Paired immunoglobulin-like receptor B expression*.

**PM** : Privation monoculaire, *Monocular deprivation*.

**PNN** : Filet périneuronal, *Perineuronal net*.

**PSA** : Acide polysialique, *Polysialic acid*.

**PV** : Parvalbumine, *Parvalbumin*.

**SST** : Somatostatine, *Somatostatin*.

**RVG** : Glycoprotéine du virus de la rage, *Rabies virus glycoprotein*.

**SC** : Stimulus conditionnel, *Conditionnal stimulus*.

**SI** : Stimulus inconditionnel, *Inconditionnal stimulus*.

**SST** : Somatostatine, *Somatostatin*.

**TNF** : Facteur de nécrose tumorale, *Tumor Necrosis Factor*.

**Trk** : Récepteur tropomyosine kinase, *Tropomyosin receptor kinase*.

**VIP** : Polypeptide intestinal vasoactif, *Vasoactive intestinal polypeptide*.

**WFA** : Lectine de *Wisteria floribunda*, *Wisteria floribonda lectin*.



*À Yann, Alan, Élise.*

## Remerciements

Je tiens à remercier chaleureusement tous ceux qui m'ont si bien aidée dans cette belle et grande aventure.

Tout particulièrement, je remercie ma directrice de recherche, Graziella, pour sa patience, sa sensibilité et son engagement. Elle a su m'accueillir dans son équipe et me guider en cultivant ma confiance en moi.

Je dédie une pensée toute spéciale aux collègues qui m'ont accompagnée. Mayukh Choudhury, pour les longues discussions, les bières et les danses effrénées. Patricia Awad, pour le support émotionnel, l'écoute et la complicité. Alexis Lupien-Meilleur, pour les discussions, les soirées et les escapades en congrès. Et Marie-Claude Guyot pour son esprit aiguisé, ses lumineux conseils et grâce à qui je suis enfin « zen et rayonnante ».

Un clin d'œil à tous les membres du laboratoire et de l'axe de recherche sur le Cerveau. Merci de m'avoir supportée, écoutée et endurée.

Enfin, un merci gigantesque à Yann, la moitié de moi-même, pour être là depuis et pour toujours. Mon roc, ma flamme.

# Chapitre 1 – Introduction générale

## 1.1 La plasticité cérébrale

La plasticité, ou la malléabilité, du cerveau peut être divisée sous deux termes : la plasticité structurale et la plasticité fonctionnelle. La plasticité structurale réfère à des changements anatomiques de la connectivité neuronale, où des connexions synaptiques peuvent être perdues ou nouvellement formées, où le nombre de cibles cellulaires peut varier, où le nombre de jonctions synaptiques peut être augmenté ou diminué. Au contraire, la plasticité fonctionnelle réfère au changement dans la force de la synapse, qu'elle soit renforcée par la potentialisation à long terme (*long-term potentiation* - LTP) (1, 2) ou affaiblie par les mécanismes de dépression à long terme (*long-term depression* - LTD) (3), affectant ainsi la fonction des synapses déjà existantes (4). Alors que la plasticité fonctionnelle est observable tout au long d'une vie, le cerveau en développement, le cerveau en jeune âge, est caractérisé par une plasticité structurale impressionnante qui forgera les circuits neuronaux afin de leur conférer leurs fonctions. Ainsi, les circuits neuronaux sont modelés par les expériences vécues durant des périodes critiques de développement, où chacun peut alors adapter son comportement à l'environnement qui l'entoure. Pour un développement normal du cerveau, il est nécessaire de retrouver un équilibre entre les programmes de maturation intrinsèques et les stimuli environnementaux (5) lors de cette période de forte plasticité structurale.

L'idée derrière l'étude des mécanismes régulant l'ouverture et la fermeture des périodes critiques de plasticité est d'identifier des moyens qui permettraient de *réactiver les caractères de la plasticité structurale juvénile chez l'adulte*, une fois que les circuits neuronaux sont moins plastiques. On pourrait alors imaginer l'utilité du remodelage des circuits neuronaux chez des patients victimes d'un accident cardio-vasculaire ou d'un traumatisme crânien afin de leur redonner leurs fonctionnalités. Ou encore chez les patients souffrant de maladies neurodéveloppementales, des interventions pharmacologiques qui augmenteraient la plasticité synaptique pourraient aider à corriger certaines altérations des circuits. En somme, une compréhension approfondie des mécanismes qui définissent les limites temporelles de la plasticité pourrait aider à l'établissement de voies thérapeutiques nouvelles permettant la réhabilitation suite à une blessure ou encore à l'amélioration des capacités mnémoniques et d'apprentissage chez l'adulte.

### **1.1.1 Les périodes critiques de la plasticité cérébrale**

Les périodes critiques de plasticité sont des fenêtres de temps au cours du développement postnatal où le développement et la maturation des fonctions neuronales, et des circuits qui les sous-tendent, sont hautement réceptifs aux stimuli environnementaux et aux expériences vécues (6). La définition même de ces périodes critiques se retrouve au cœur du débat nature contre culture qui transcende les sciences, qu'elles soient humaines ou biologiques. Ainsi, on se demande depuis longtemps de quelles façons sont développées nos capacités cognitives : par des facteurs intrinsèques inscrits dans le génome ou par des facteurs extrinsèques telles les

expériences vécues durant l'enfance ? En fait, la réponse se trouve probablement dans l'interaction de ces deux mondes, où les expériences vécues, parfois même intergénérationnelles, viennent s'inscrire dans l'expression de nos gènes.

Il existe une variété de périodes critiques : les différentes régions du cerveau, pour différentes fonctions cérébrales, s'ouvrent devant les expériences de la vie et ses facteurs environnementaux pour acquérir de façon permanente des fonctions essentielles [Figure 1, p. 30] (7-11). De plus, les périodes critiques ne se déroulent pas au même rythme selon les régions du cerveau et les fonctions qu'elles remplissent (12). La maturation du cerveau se fait selon un gradient rostro-caudal, selon les différentes modalités et les différents niveaux hiérarchiques de traitement de l'information. Ainsi, les périodes critiques s'étalent en cascades, demandant la fermeture des périodes critiques pour les modalités sensorielles primaires avant celle des aires associatives, puis cognitives, de sorte que les mécanismes de régulation des périodes critiques pour les régions du cerveau remplissant des fonctions de haut niveau tel que le cortex préfrontal se poursuivent jusqu'au début de l'âge adulte (5, 13). Ce concept a amené à revoir nos connaissances sur les maladies neuropsychiatriques telles que l'autisme (14), la schizophrénie et le trouble bipolaire (15, 16), appréciant les caractéristiques de ces maladies comme pouvant être attribuées à des défauts dans la régulation des périodes critiques entre les différentes régions du cerveau.

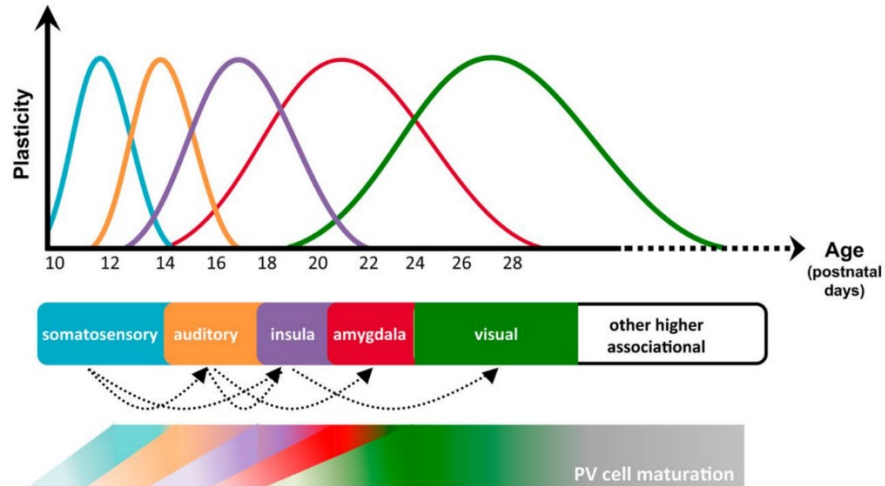


Figure 1. – **La séquence des périodes critiques de plasticité observée dans le cerveau murin.**

Les fenêtres de temps correspondant au maximum de plasticité du cortex somatosensoriel (17, 18), du cortex auditif (7), du cortex insulaire (19), de l'amygdale (20), du cortex visuel (21-23) et des aires cognitives (24, 25) s'échelonnent selon un répertoire respectant l'émergence des circuits inhibiteurs exprimant la parvalbumine.

Adaptée de Reh, R. K. and al., *PNAS*, 2020 (5).  
Reproduction avec permission

Enfin, il faut savoir que la régulation de l'ouverture et la fermeture des périodes critiques ne dépendent pas tant de l'âge en soi mais bien de l'expérience vécue durant cette période (13). En effet, si les stimuli ne sont pas présentés, les régions du cerveau demeurent alors en suspens, attendant une activation pour engranger leur maturation (26, 27). De l'autre côté, grandir dans un environnement enrichi, assurant une variété d'expériences aux systèmes neuronaux en développement, prolonge les périodes critiques dans le temps (28, 29). *Comprendre de façon approfondie les mécanismes qui sous-tendent la diminution de la plasticité structurale du cortex cérébral adulte permettrait d'identifier de nouveaux moyens thérapeutiques d'augmenter la malléabilité*

*du cerveau adulte dans certaines situations particulières, après un accident vasculaire cérébral par exemple.*

Les périodes critiques ont été grandement étudiées dans les systèmes sensoriels : dans le cortex visuel pour l'acquisition de la vision binoculaire (8), dans le cortex auditif pour l'affinement des cartes tonotopiques (30), dans le cortex somatosensoriel pour l'acquisition des représentations en tonneaux des vibrisses (31), mais aussi dans le système moteur ou dans les aires cognitives, par exemple dans l'aire de Broca pour l'acquisition du langage. Les périodes critiques ont aussi été étudiées dans les aires sous-corticales telles que dans l'amygdale en ce qui a trait à la gestion de la mémoire émotionnelle (20, 32, 33). Nous poursuivrons en s'intéressant à deux modèles de plasticité cérébrale qui seront utilisés dans cette étude : le modèle de la dominance oculaire [Section 1.1.1.1, p. 31] et le modèle de l'extinction des souvenirs de peur [Section 1.1.1.2, p. 34].

### **1.1.1.1 Le modèle de la dominance oculaire**

L'étude des effets des expériences sensorielles vécues sur le développement du cerveau a grandement avancé grâce au modèle de la dominance oculaire. En effet, il est aisé de manipuler les stimuli visuels des deux yeux indépendamment et de mesurer les changements de plasticité au niveau du cortex visuel via la dominance oculaire [Figure 2, p. 32]. La dominance oculaire réfère au fait que les neurones du cortex visuel sont activés à différents degrés par la présentation d'un stimulus visuel par un œil plus que l'autre (34). Autrement dit, bien que le cortex visuel primaire (V1) reçoive des

signaux provenant des deux yeux, les neurones qui le composent répondent préférentiellement aux signaux provenant d'un des deux yeux.

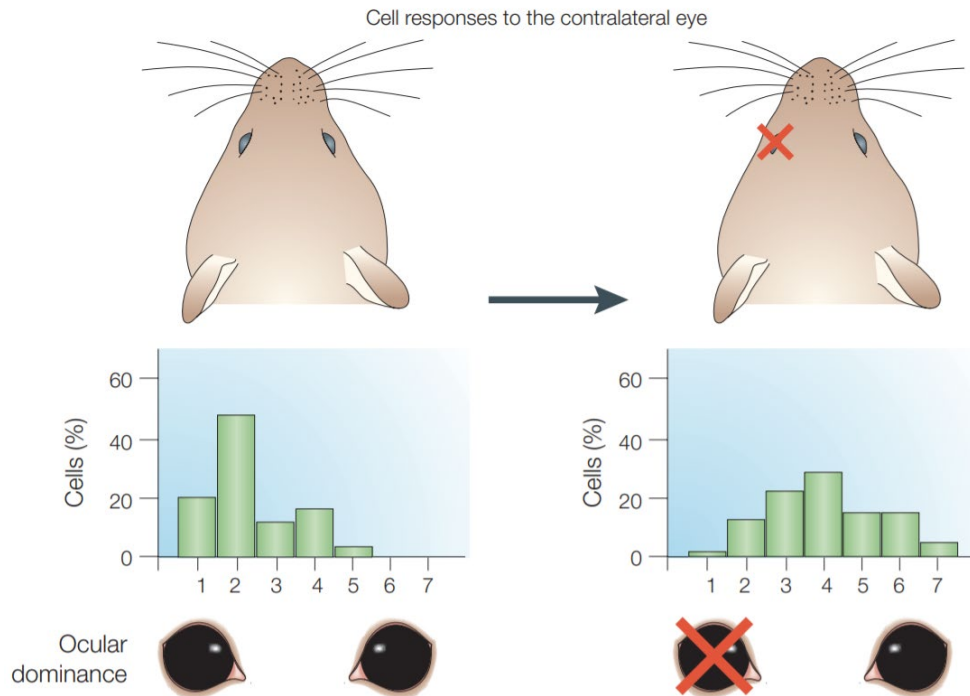


Figure 2. – **La privation monoculaire durant la période critique de plasticité du cortex visuel chez le rongeur.**

La privation monoculaire entraîne une perte de réponse envers l'œil privé et un gain envers l'œil ouvert, tel que mesuré par les décharges neuronales unitaires enregistrées dans le cortex visuel de souris (35). Les cellules à dominance oculaire, évaluées sur une échelle de 7 points selon leur réceptivité, indiquent un biais typique vers l'œil contralatéral (1-3) chez le rongeur (à gauche). Après 3 jours ou plus de privation monoculaire durant la période critique de plasticité, la distribution se déplace vers l'œil ouvert, l'œil ipsilatéral (4-7, à droite).

Adaptée de Hensch, T. et al., *Nature Reviews Neuroscience*, 2005(36).

Reproduction avec permission.

Tirant avantage de cette propriété, appelée la dominance oculaire (DO), il est possible d'évaluer les mécanismes moléculaires et cellulaires qui sous-tendent les capacités plastiques des circuits du cortex visuel. Les travaux pionniers de Hubel et Weisel (8,



37-40) chez le chat ont montré les niveaux d'organisation déjà présents du cortex visuel à la naissance de même que la dégénérescence de ces connexions lors de la privation visuelle, qu'elle soit monoculaire, binoculaire ou générée par l'absence de stimuli environnementaux (ex., l'élevage dans le noir). Ainsi, la privation monoculaire (PM), si elle est maintenue au-delà de la période critique, précisément durant la 4<sup>e</sup> et 5<sup>e</sup> semaine postnatale chez le rongeur (35), engendre une réorganisation synaptique difficilement réversible des circuits visuels : elle réduit le pourcentage de cellules qui seront excitées par l'œil qui a été suturé pendant la période critique au bénéfice de l'œil qui a profité des stimuli environnementaux (8). Si toutefois les stimuli sont rétablis durant cette période critique de développement du cortex visuel, l'acuité visuelle et la vision binoculaire reviendront à la normale. Cependant, la capacité à modifier la dominance oculaire diminue avec l'âge de sorte que si les stimuli sont rétablis seulement à l'âge adulte, aucune compensation ne pourra ramener l'acuité visuelle de l'œil qui avait été privé et la vision binoculaire se trouvera dès lors affectée (41). Or, une certaine plasticité résiduelle du cortex visuel persiste à l'âge adulte : si l'œil resté ouvert lors de la PM est suturé une fois la PM terminée au-delà de la période critique, forçant ainsi l'usage unique de l'œil affaibli, la dominance oculaire demeure malléable : les colonnes corticales dévouées à l'œil affaibli s'élargiront (42, 43). Enfin, la privation monoculaire, si imposée directement à l'âge adulte, n'engendre pas la même réorganisation structurale et fonctionnelle que durant la période critique de développement (13). En effet, la suture d'un œil chez l'adulte n'a pas de conséquence sur l'acuité visuelle puisque la plasticité structurale y est grandement diminuée. *De ce fait, évaluer l'acuité visuelle suite à la privation sensorielle chez l'adulte permet d'identifier, de valider et de manipuler des voies*

*moléculaires spécifiques capables de favoriser la plasticité cérébrale au-delà de la fermeture de la période critique de plasticité.*

### **1.1.1.2 Le modèle de l'extinction de la peur**

Autant des études chez des modèles animaux que chez l'humain ont montré que les systèmes qui sous-tendent la gestion de la mémoire émotionnelle passent par des périodes critiques de plasticité dépendante de l'expérience au cours de leur développement. Le conditionnement de la peur est un modèle d'étude de la mémoire associative où le sujet est entraîné à associer un stimulus conditionnel (SC) tels qu'un contexte environnemental, une odeur particulière ou un son distinctif à la prédiction d'un stimulus inconditionnel (SI) aversif tel qu'un choc électrique (44, 45). En raison de l'association qui suit la présentation répétée SC-SI, seule la présentation du SC est suffisante pour appeler le comportement de peur chez l'humain et chez les modèles animaux (augmentation du rythme cardiaque, sécrétion de cortisol, comportement d'immobilisation typique chez le rongeur), témoignant du conditionnement de la peur (44, 46). Afin de diminuer la réponse de peur engendrée par la présentation du SC, la thérapie d'exposition est utilisée chez l'humain, selon le courant behavioriste de la psychologie cognitive. Cette thérapie d'exposition est étudiée chez la souris avec le protocole d'extinction de la peur (47-49) . Ainsi, la souris conditionnée sera placée dans un nouveau contexte où le SC seul sera présenté de façon répétée afin de faire diminuer la réponse comportementale de peur. Toutefois, autant chez les rongeurs que chez l'humain, l'extinction, c'est-à-dire la capacité de réencoder une réponse de peur préalablement apprise, a ses limites : seul le passage du temps est suffisant pour voir la

résurgence de l'association SC-comportement de peur (appelée la ***récupération*** de la peur), la présentation du SC en contexte de conditionnement conduira au ***renouvellement*** de la peur et l'avènement d'une seule association SC-SI rétablira la peur à son niveau conditionné (***rétablissement*** de la peur [Figure 3, p. 35]).

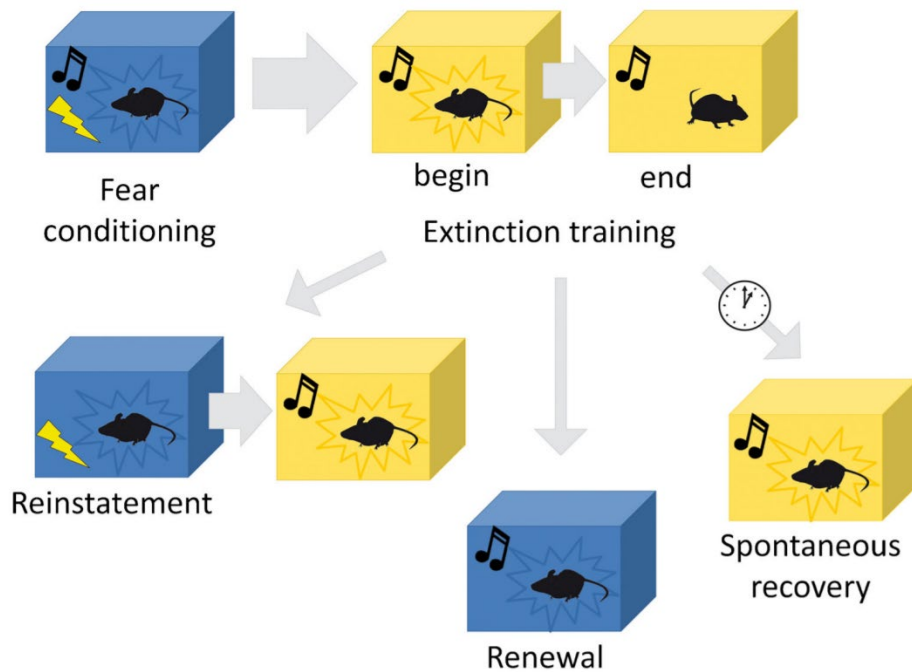


Figure 3. – **Schéma simplifié du conditionnement de la peur au son.**

Le comportement de peur (l'immobilité) peut réapparaître malgré l'extinction suite à la présentation du stimulus inconditionnel (rétablissement de la peur – *reinstatement*), à la présentation du stimulus conditionnel dans un contexte différent de celui de l'extinction (renouvellement de la peur – *renewal*), ou simplement suite au passage du temps (récupération de la peur – *spontaneous recovery* ou *retrieval*). L'immobilité est représentée par la forme étoilée qui entoure la souris. Les couleurs réfèrent à des contextes différents.

Adaptée de Meis, S., *Cell and Tissue Research*, 2020 (50).  
Reproduction avec permission.

L'étude de l'extinction de la mémoire de peur a suscité beaucoup d'intérêt dans la communauté scientifique puisqu'un défaut dans l'acquisition et la persistance de la mémoire d'extinction est à la base des désordres anxieux tels que le syndrome de stress post-traumatique et les phobies (51-54). Dès lors, bien comprendre les bases cellulaires et moléculaires qui sous-tendent les circuits responsables de traiter la mémoire d'extinction a une haute importance clinique. La régulation de la mémoire de peur, ainsi que celle de l'extinction, impliquent une panoplie de régions cérébrales, l'hippocampe, l'amygdale et le cortex préfrontal médial étant au cœur de l'acquisition et de la consolidation des souvenirs de peur et des souvenirs d'extinction (55-59). L'amygdale peut être divisée en deux régions principales : l'amygdale basolatérale ainsi que l'amygdale centrale. Alors que l'amygdale basolatérale est une région semblable au cortex et contient 80% de neurones glutamatergiques pour 20% de neurones GABAergiques, l'amygdale centrale est une région semblable au striatum et est composée de neurones GABAergiques en étoile qui projettent vers les régions responsables des comportements défensifs. L'acquisition de la mémoire de peur dépend de la plasticité dépendante de l'activité au niveau de l'amygdale latérale (60, 61). En effet, une activation optogénétique des neurones de projections de l'amygdale latérale peut substituer, du moins en partie, la présentation du SI pendant la période d'acquisition de la mémoire de peur, entraînant la réponse comportementale (62). Des études récentes *in vivo* ont utilisé l'optogénétique pour manipuler les interneurones exprimant la parvalbumine (PV<sup>+</sup>) [**Section 1.2, p. 45**], ciblant le corps cellulaire de leurs neurones cibles, ainsi que les interneurones exprimant la somatostatine (SST<sup>+</sup>), eux ciblant l'arbre dendritique de leurs neurones cibles, afin d'identifier leurs fonctions pendant l'acquisition de la mémoire de peur (63-66). Il a été démontré que la

présentation du SC excite les interneurons PV<sup>+</sup> de l'amygdale, inhibant alors les interneurons SST<sup>+</sup>, ce qui résulte en la désinhibition des neurones glutamatergiques de l'amygdale basolatérale. Le SI quant à lui, inhibe autant les interneurons PV<sup>+</sup> que les SST<sup>+</sup>, ce qui mène donc à la désinhibition complète des neurones glutamatergiques. De ce fait, l'association du SC et du SI implique une désinhibition le long de l'axe somato-dendritique plus forte que celle déployée par le SI seul (revu dans (59)). D'un autre côté, l'apprentissage de la mémoire d'extinction quant à lui requiert les mêmes régions cérébrales que l'apprentissage de la mémoire de peur. Toutefois, certains conçoivent la mémoire d'extinction comme indépendante de la mémoire de peur (67), alors que d'autres modélisent l'extinction comme l'acquisition d'un nouvel apprentissage qui vient inhiber les souvenirs de peur (48). Dans le premier ordre d'idées, il a été montré que si l'on divise les neurones de l'amygdale basolatérale selon la région du cortex préfrontal ciblée (soit le prélimbique ou l'infralimbique), on s'aperçoit que les neurones de peur ciblent préférentiellement le prélimbique alors que les neurones d'extinction ciblent l'infralimbique. De plus, la balance d'activité entre ces deux sous-populations déterminent l'expression de la peur au moment du test de récupération (68). Ces expériences démontrent que les communications entre l'amygdale et le cortex préfrontal sont au cœur de la compétitivité entre la mémoire de peur et celle de l'extinction lors de la présentation du stimulus conditionnel. Dans le deuxième ordre d'idées, des expériences-clefs ont montré que l'extinction de la mémoire de peur réduit l'activité des neurones de peur dans l'amygdale basolatérale, ce qui suggère que l'extinction est essentiellement la réduction de la mémoire de peur. Ce mécanisme emploie les interneurons de l'amygdale (69, 70), mais pourrait aussi impliquer l'activité coordonnée d'une autre région de l'amygdale, soit les cellules intercalées (71, 72). Une

étude élégante a démontré le remodelage spécifique des synapses périssomatiques provenant des interneurons PV<sup>+</sup> autour des neurones de peur dont la réponse est diminuée après la procédure d'extinction, alors que les synapses périssomatiques des interneurons exprimant la cholecystokinine demeurent inchangée, autour des mêmes neurones (73).

Le cortex préfrontal médian est en étroite relation avec l'amygdale dans la régulation de la mémoire de peur et d'extinction. En utilisant des méthodes de traçage monosynaptique, utilisant le virus de la rage modifié, des connections étroites entre l'amygdale basolatérale et les neurones du cortex préfrontal ont été mises en lumière et forment une boucle réciproque avec au centre les interneurons PV<sup>+</sup> de l'amygdale (74). Ainsi, en plus d'exercer un contrôle sur l'activité de l'amygdale, l'activité des interneurons PV<sup>+</sup> de l'amygdale affecte l'activité du cortex préfrontal en modulant de façon dynamique cet ensemble réciproque. En utilisant des souris génétiquement modifiées pour identifier les neurones activées pendant l'acquisition de la mémoire de peur versus les neurones activés pendant la période d'extinction, le tout couplé avec de l'optogénétique pour inhiber les interneurons PV<sup>+</sup> de l'amygdale, ces travaux ont montré une répercussion certaine de l'amygdale sur les oscillations thêta du cortex préfrontal et ainsi l'expression de la peur suite à l'extinction (74). D'autres ont plutôt enregistré les patrons d'activité et utilisé l'optogénétique pour questionner le rôle du cortex préfrontal dans l'expression de la mémoire de peur suite à l'extinction. Ils ont montré que l'expression de la peur coïncide avec l'inhibition des interneurons PV<sup>+</sup> du cortex préfrontal (75). Ainsi, l'inhibition de ces interneurons PV<sup>+</sup> désinhibe les neurones de projection du cortex préfrontal et synchronise leurs patrons d'activité en

remettant à zéro les oscillations locales en phase thêta, ce qui entraîne l'expression de la peur (75). Ce qui est intéressant dans cette étude, c'est d'abord l'utilisation de souris de type sauvage pour l'enregistrement des patrons d'activité du cortex préfrontal, puis l'utilisation de l'optogénétique pour démontrer que l'inactivation des interneurons PV<sup>+</sup> du cortex préfrontal conjointement avec la présentation du SC cause la réapparition du comportement de peur après l'extinction, alors que leur activation inhibe la présentation du comportement d'immobilité. Cette expérience simple et directe démontre l'importance des circuits d'interneurones PV<sup>+</sup> et leur forte implication dans réapparition, ou non, du comportement de peur lors du test de récupération de la peur, ainsi que le pouvoir détenu par le cortex préfrontal sur l'amygdale.

En somme, l'étude de l'extinction des souvenirs de peur a fait émerger deux modèles : un premier où les souvenirs de peur sont effacés suite au protocole d'extinction (20, 76) ; un second où les souvenirs de peur sont en compétition avec les souvenirs d'extinction qui deviennent alors une mémoire de sécurité (73, 74, 77-79). Or, il a été démontré que le cerveau juvénile encore malléable est capable d'effacer de façon permanente les souvenirs de peur conditionnée au bénéfice du souvenir de sécurité acquis lors de l'extinction. Le résultat de l'extinction est donc fonction de l'âge : durant la période critique de P13-P17 (32, 33), elle mène à l'effacement alors qu'avant ou après, elle est inefficace et la réponse de peur revient spontanément (80). Il semblerait aussi que l'extinction soit plus efficace lorsqu'elle survient le plus rapidement possible suite à l'expérience traumatique (1 à 3 jours), alors que les rongeurs qui reçoivent la procédure d'extinction plus tard témoignent d'un état d'hyper vigilance persistant au lieu d'un effacement complet (81). *Comprendre les mécanismes qui sous-tendent la*

*diminution en fonction de l'âge du niveau de plasticité du système cérébral régulant les souvenirs de peur pourrait aider à déployer de nouvelles méthodes pour augmenter la plasticité du cerveau adulte et ainsi améliorer l'efficacité de la thérapie d'exposition pour les gens souffrant du syndrome de choc post-traumatique.*

Des parallèles utiles peuvent être définis concernant les périodes critiques de plasticité des systèmes visuel et de la peur. Ainsi, nous considérerons l'effacement de la mémoire de peur analogue à l'amblyopie puisque les deux ne peuvent être induits qu'en période critique (82). De la même façon, la procédure d'extinction est semblable à la privation monoculaire puisque ceux-ci sont les procédures d'induction de la plasticité cérébrale (82). Enfin, l'acuité visuelle de même que la persistance de l'extinction des souvenirs de peur dans le temps sont deux mesures du niveau de plasticité des systèmes (82).

### **1.1.2 La régulation des périodes critiques de plasticité**

Les moments d'ouverture et de fermeture des périodes critiques varient donc, en fonction de la région cérébrale, mais aussi en fonction des processus, sensoriels, mnémoniques ou cognitifs. Est-ce que ces différentes périodes critiques partagent les mêmes facteurs communs ? Quels sont les facteurs, intrinsèques ou extrinsèques, responsables de l'augmentation de la plasticité cérébrale au commencement de la période critique ? La fermeture de la période critique, ou la diminution de la plasticité cérébrale avec l'âge, provient-elle de l'épuisement des facteurs favorisant la plasticité ou requiert-elle des mécanismes actifs venant limiter les capacités ré-organisationnelles



du cerveau ? Si la fermeture de la période critique est un processus actif, venant freiner la plasticité du cerveau, diminuant alors les capacités d'adaptation du cerveau adulte, serait-il possible de lever ses « freins moléculaires » afin d'augmenter les capacités adaptatives du cerveau adulte ?

### **1.1.2.1 L'ouverture des périodes critiques**

Il s'avère qu'un facteur déterminant de l'ouverture des périodes critiques de plasticité est le niveau d'inhibition corticale engendré par le développement du système inhibiteur. Ce dernier forme jusqu'à 20-30% des neurones corticaux, sécrète l'acide  $\gamma$ -aminobutyrique (GABA) comme neurotransmetteur et remplit des fonctions variées, allant de la régulation de l'excitabilité et l'intégration neuronale à la génération des synchronies temporelles et des oscillations parmi les circuits de neurones excitateurs en passant par la régulation, au cours du développement, de la migration et la différenciation neuronale ainsi que le raffinement des circuits de façon expérience-dépendante. Deux glutamate décarboxylases, Gad67 et Gad65, sont responsables de la synthèse de GABA et l'inactivation des gènes codants pour chacune de ces enzymes entraîne une diminution des taux de GABA (83, 84). L'enzyme Gad67 est présente dans le corps cellulaire et les terminaisons axonales et synthétise jusqu'à 90 % du GABA (85) alors que les autres 10 % sont synthétisés par la Gad65, exprimée plus tard au cours du développement de façon activité-dépendante dans les boutons présynaptiques et liée aux vésicules synaptiques (86, 87). L'ablation de *Gad1* (codant pour Gad67) est létale (83). Toutefois, les souris *Gad2<sup>-/-</sup>* (codant pour Gad65) sont viables et montrent un relâche de GABA, bien que faible, suite à une forte stimulation

(84, 88). Or, cette diminution de l'inhibition corticale est suffisante pour prévenir l'ouverture de la période critique de plasticité. De plus, les niveaux de plasticité se trouvent rétablit lorsque les souris mutantes sont traitées avec le diazépam, un composé de la famille des benzodiazépines qui augmente l'efficacité du GABA sur les récepteurs GABA<sub>A</sub>, rétablissant ainsi la stimulation inhibitrice et démontrant son importance dans l'ouverture des périodes critiques (84). Et encore, lorsqu'infusée quotidiennement, la benzodiazépine est capable d'induire une période critique précoce (P15-20) pendant une courte PM (89). Ainsi, l'augmentation de la transmission inhibitrice via les récepteurs GABA semble induire l'augmentation de la plasticité lors de l'ouverture des périodes critiques. Enfin, des travaux ont montré l'importance, pour l'augmentation de la plasticité, du nombre de récepteurs GABA<sub>A</sub> présents sur la membrane des dendrites proximales et du corps cellulaire des neurones excitateurs (90). Comme ces sous-régions membranaires sont préférentiellement ciblées par les interneurons exprimant la PV [Section 1.2, p. 45], ces derniers ont alors été désignés comme joueurs-clefs dans la régulation des périodes critiques de plasticité. Dès lors, toute manipulation permettant d'accélérer la maturation ou la transmission inhibitrice via les interneurons PV<sup>+</sup> aura le même effet sur l'ouverture de la période critique. En effet, que ce soit en augmentant les niveaux de facteurs de croissance (*brain-derived neurotrophic factor* - BDNF) (91, 92) [Section 1.2.1.4, p. 51] ou du facteur de transcription Otx2 (21, 93) ou en enlevant une molécule d'adhésion cellulaire, soit l'acide polysialique, (*polysialic acid* - PSA) (94) [Section 1.2.1.4, p. 51] ou une molécule liant l'ADN (*methyl CpG binding protein 2* - MeCP2) (95, 96), on accélère à la fois la maturation des circuits PV<sup>+</sup> ainsi qu'on devance l'ouverture des périodes critiques. En somme, il semblerait que

l'accélération du développement de l'inhibition via les interneurons GABAergiques exprimant la PV permet d'ouvrir les périodes critiques de plasticité plus rapidement.

### **1.1.2.2 La fermeture des périodes critiques**

La fermeture des périodes critiques de plasticité demande aussi une élévation du niveau d'inhibition corticale. En effet, lors de l'élevage des souris dans le noir, on observe une diminution du niveau d'activité cérébrale, de sécrétion de BDNF (97) ainsi que de relâche des circuits inhibiteurs du cortex visuel (27, 98), ce qui entraîne une prolongation de la période critique de plasticité vers l'adulte (26, 99, 100). Or, ce phénomène peut être compensé soit par l'infusion directe de diazépam dans le cortex visuel (99), ou par la surexpression de BDNF (101) ou encore par la stimulation générée par l'élevage dans un environnement enrichi (102), ce qui soutient l'importance du GABA pour la fermeture de la période critique. En effet, la surexpression de BDNF dans une souris transgénique, mène autant à l'accélération de l'ouverture que de la fermeture de la période critique de plasticité du cortex visuel, phénomène accompagné par un développement précoce de la circuiterie inhibitrice et une diminution devancée de la plasticité synaptique qu'est la LTP (91). Ainsi, BDNF régule le développement des interneurons GABAergiques (103), en plus d'accentuer la relâche de GABA (104) et de réguler l'inhibition synaptique de façon activité-dépendante (105). De la même façon, les animaux élevés dans le noir montrent une diminution du nombre de filets périneuronaux au niveau du cortex visuel, de même qu'une diminution d'expression de Gad65 dans les boutons présynaptiques entourant les corps cellulaires des neurones ciblés. Toutefois, l'élevage dans un environnement enrichi, bien que les rats soient toujours élevés dans

le noir, mène à un rétablissement, autant du nombre de filets périneuronaux que d'expression de Gad65 en corrélation avec un rétablissement de la dominance oculaire suite à la privation monoculaire (102). En somme, ces expériences démontrent l'importance du développement des circuits GABAergiques dans la régulation de la fermeture des périodes critiques de plasticité.

En étudiant de façon approfondie les niveaux de plasticité du cortex visuel chez les rongeurs, les chercheurs ont identifié plusieurs freins moléculaires, qu'ils soient fonctionnels ou structuraux, qui limitent de façon active la plasticité et ainsi ferme les périodes critiques de plasticité du cerveau en développement (106, 107). Les freins agissant sur la structure des circuits sont les filets périneuronaux (*perineuronal nets* - PNNs) (108), la signalisation inhibitrice reliée à la myéline et transigeant via le récepteur Nogo (109) ainsi que l'expression du récepteur pairé B semblable à l'immunoglobuline (*paired immunoglobulin-like receptor B expression* (PirB) (110). Les freins fonctionnels agissant sur la balance excitation/inhibition à l'intérieur des circuits sont par exemple la protéine liant le récepteur nicotinique (Lynx1) (111). Enfin, le niveau d'acétylation de la chromatine est aussi un frein moléculaire venant restreindre le niveau de plasticité cérébrale au cours du développement (112-114). De façon notable, ces freins moléculaires représentent autant de leviers potentiels pour augmenter la plasticité cérébrale adulte, que ce soit dans le cortex visuel ou dans les régions cérébrales associées à la régulation de la mémoire de peur. Alors que nous détaillerons les mécanismes abordés dans cet ouvrage, soit les filets périneuronaux [Section 1.2.2, p. 56], le récepteur Nogo en raison de son affinité pour le récepteur p75<sup>NTR</sup> [Section 1.3,

p. 68] et l'acétylation des histones [Section 1.4, p. 77], le lecteur est invité à se référer aux revues suivantes (5, 82, 107, 115) pour explorer les autres mécanismes possibles.

## **1.2 Cibler les interneurons exprimant la parvalbumine pour augmenter la plasticité cérébrale chez l'adulte**

Au niveau du cerveau antérieur, les interneurons GABAergiques forment une classe hétérogène d'interneurons inhibiteurs : ils diffèrent quant à leur morphologie, leur patron de connectivité ou leurs propriétés électrophysiologiques. De façon intéressante, ce ne sont pas tous les circuits GABAergiques qui sont impliqués dans la régulation de la plasticité corticale. Plusieurs travaux ont montré que le développement d'une classe spécifique d'interneurons, celle formant plus de la moitié des circuits inhibiteurs du cortex et exprimant la PV, une protéine liant le calcium, est intimement lié à l'ouverture et la fermeture des périodes critiques de plasticité. Les interneurons PV<sup>+</sup> forment leurs synapses inhibitrices spécifiquement au niveau du corps cellulaire et des dendrites proximales de leurs cibles et sont capables de générer des potentiels d'action à haute fréquence (116, 117). De ce fait, ils sont capables de générer un contrôle puissant sur leurs cibles cellulaires, restreignant les fenêtres temporelles pour l'intégration des flux synaptiques excitateurs et ainsi faciliter l'encodage précis des informations dans le cerveau (118-120). Comme le niveau de plasticité corticale adulte est restreint par la force inhibitrice GABAergique générée par les circuits PV<sup>+</sup>, au cours des travaux de cette thèse, nous nous sommes demandé s'il *serait possible d'activer certaines voies moléculaires pour affaiblir les connexions efférentes des interneurons PV<sup>+</sup> chez*

*l'adulte, d'une façon contrôlée et transitoire, afin de diminuer la puissance inhibitrice et ainsi favoriser la plasticité cérébrale.*

Dans cette section [Section 1.2.1, p. 46], nous détaillerons les grandes lignes du développement des interneurons PV<sup>+</sup>. De plus, nous nous intéresserons à une structure particulière de la matrice extracellulaire qui se condense autour des corps cellulaires des interneurons PV<sup>+</sup> lors de leur maturation et qui est étroitement liée à leurs fonctions : les PNNs [Section 1.2.2, p. 56].

### **1.2.1 Le développement des interneurons PV<sup>+</sup>**

Les interneurons GABAergiques synthétisent tous le GABA comme neurotransmetteur mais diffèrent quant à leur patron de connectivité, leurs propriétés électrophysiologiques et les protéines marqueurs qu'ils expriment. Ils ont tous la capacité d'influencer l'activité des circuits neuronaux, avec leurs caractères de spécificité spatiale et temporelle. Le développement des interneurons suit de grandes étapes et se poursuit jusqu'à l'âge adulte : la multiplication des progéniteurs, leur spécification, la migration vers la région et couche laminaire corticale appropriée, l'acquisition de leurs caractéristiques morphologiques et de leur patron de connectivité spécifiques, et enfin l'adoption de leurs propriétés électrophysiologiques matures grâce à l'expression d'une combinaison unique de canaux. (Voir (121-123) pour des revues exhaustives sur le développement et les fonctions de la variété d'interneurons corticaux.)

### **1.2.1.1 Les divers types d'interneurones corticaux**

Les interneurones exprimant la PV constituent la plus grande classe d'interneurones corticaux [Figure 4, p. 48]. Partageant tous la capacité de générer des décharges à haute fréquence (124, 125) (jusqu'à 200Hz), ils se déclinent en trois sous-classes : les cellules chandeliers, les cellules à panier et les interneurones translaminaires. Les cellules chandeliers forment leurs synapses sur les segments initiaux des axones des cellules pyramidales (126). Chez les rongeurs, elles sont plus abondantes au niveau des couches 1 et 2, ainsi que la couche 6 du cortex et leur distribution varie quant aux régions corticales (127). Effectivement, alors qu'on les retrouve de façon plus clairsemé au niveau du néocortex, les interneurones chandeliers sont plus denses dans les cortex piriforme et entorhinal, témoignant de leurs diverses origines embryonnaires (pallium dorsal versus pallium latéral et médial respectivement) (127). Et il est important de noter qu'une certaine proportion des cellules de type chandelier ne contient pas de niveau détectable de protéine PV (128). Les interneurones translaminaires PV<sup>+</sup>, bien que relativement rare, sont plus abondants dans les couches 5 et 6 du cortex et se caractérisent par le fait qu'ils contactent les cellules pyramidales de plusieurs couches corticales à la fois puisque leur axone couvre toute l'épaisseur du cortex (129, 130). Enfin, les cellules à panier PV<sup>+</sup> sont le type le plus abondant d'interneurones du cortex : on les retrouve dans les couches 2 à 6 de toutes les régions corticales. Ils sont caractérisés par leur axone très complexe, contactant des centaines de cellules pyramidales et autres interneurones au niveau de leur corps cellulaire et de leurs dendrites proximales (117).

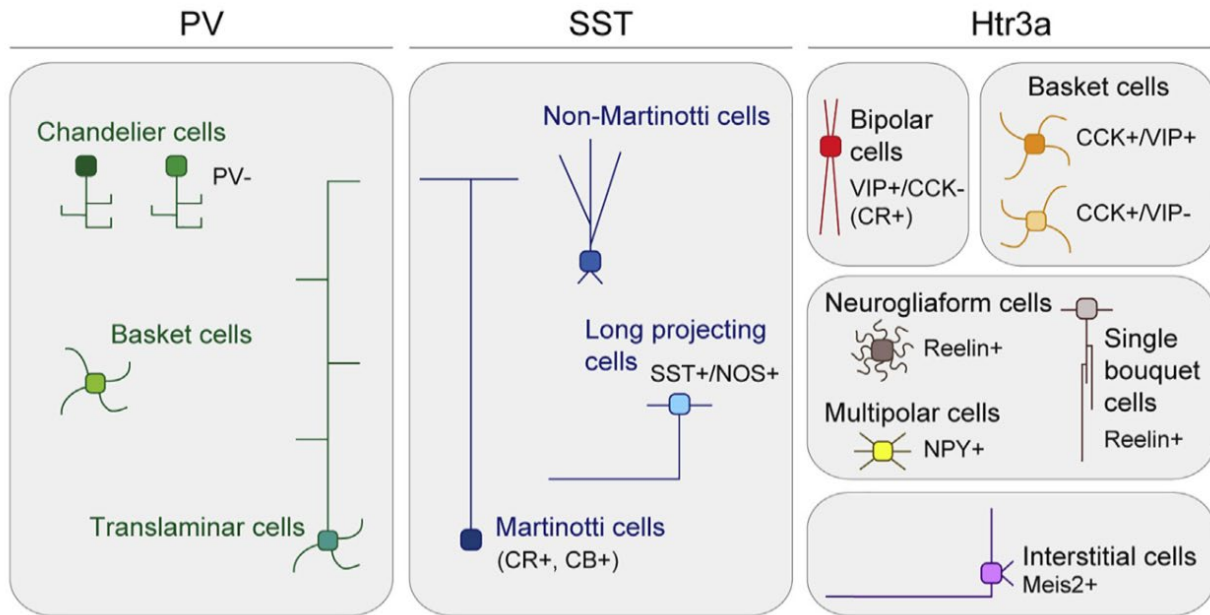


Figure 4. – **Diversité des interneurones GABAergiques du néocortex.**

Représentation schématique des grandes classes d'interneurones corticaux du néocortex de la souris. Les interneurones peuvent être définis en trois grandes classes selon leur expression de la parvalbumine (PV), de la somatostatine (SST) ou du récepteur à la sérotonine 3A (Htr3a). Noter qu'une petite fraction des cellules à panier PV<sup>+</sup> exprime aussi la SST.

Adapté de Lim, L., *Neuron*, 2018 (122).

Reproduction avec permission.

### 1.2.1.2 La spécification précoce des interneurones corticaux

La vaste majorité des interneurones GABAergiques inhibiteurs sont générés dans la partie ventrale du télencéphale, une région germinale qui comprend trois zones morphologiques distinctes : les éminences ganglionnaires caudale (EGC), médiane (EGM) et latérale (EGL) (121). De plus, il a été récemment montré que des interneurones proviennent aussi de la région pré-optique et migrent jusqu'à l'hippocampe et le cortex (131). Les interneurones générés dans les éminences ganglionnaires atteignent le cortex via une migration tangentielle sur de longues distances avant de procéder à une migration radiale intra-corticale vers leur position



laminaire finale (132). Les interneurones exprimant la PV, ainsi que ceux exprimant la SST, formant à eux deux près de 70% des interneurones du cortex, sont générés dans le EGM. Le EGC quant à lui fournit les interneurones exprimant le récepteur ionotropique sérotoninergique 5-HT-3A qu'on retrouve dans les couches superficielles du cortex (133). Enfin, le EGL produit quant à lui principalement les interneurones GABAergiques du striatum et du prosencéphale basal (134).

L'étude du développement embryonnaire des interneurones GABAergiques chez les rongeurs a montré qu'il est étroitement régulé par un code combinatoire de divers facteurs de transcription qui détermine le destin cellulaire ainsi que la route migratoire adéquate de chaque type d'interneurones (122). Ainsi, la lignée GABAergique est déterminée par l'expression des facteurs de transcription à homéoboite Dlx1/2 et Dlx5/6, elle-même engendrée par le facteur de transcription proneural Mash1 (135). Ceux-ci sont essentiels à la genèse, la spécification et la migration de tous les interneurones corticaux (136). Pour cette raison, les souris mutantes pour Dlx1/2 ou Mash1 ont des interneurones GABAergiques incapables de migrer hors des éminences (135, 137). L'identité régionale du EGM et de l'aire pré-optique est spécifiée par le facteur de transcription à homéoboite Nkx2.1, dont l'expression débute juste avant le début de la neurogénèse. Les interneurones PV<sup>+</sup> sont générés suite à une cascade transcriptionnelle spécifique au EGM et qui comprend les facteurs Nkx2.1 et Lhx6 (123). Les souris avec ablation de *Nkx2.1* montrent des défauts de migration tangentielle des interneurones et comptent une population corticale déficitaire de 50% des cellules exprimant la PV ou la SST (138). La prolifération et la spécialisation des sous-régions

ventrale et dorsale du EGM se fait via l'intégration de plusieurs voies de signalisation classiques telles que celle de *Sonic Hedgehog* et des *Wnts/β-caténine* (139, 140). Alors que la sous-région dorsale du EGM génère les interneurons SST<sup>+</sup>, la sous-région ventrale fournit les interneurons PV<sup>+</sup>, les cellules à panier dans une première vague, puis les cellules chandeliers en deuxième.

### **1.2.2.3 La migration vers le cortex**

Les interneurons dérivés du EGM, EGC et de la région pré-optique partagent essentiellement les mêmes mécanismes cellulaires pour se rendre jusqu'au cortex (141-143). Ils se déplacent en évitant le striatum en raison d'une signalisation répulsive Sema3A et Sema3F fortement sécrétées par le striatum (132). De plus, une signalisation attractive impliquant neuregulin1 (Nrg1), un membre de la superfamille des facteurs de croissance de l'épiderme, et le récepteur ErbB4, exprimé par la plupart des interneurons à ce stade (144), s'assure d'attirer les interneurons en migration vers le cortex. Ainsi, en absence de ErbB4, la plupart des interneurons ne peuvent s'y rendre (145).

Le changement entre la migration tangentielle vers une migration radiale vers les différentes couches laminaires du cortex semble impliquer des molécules telles que Csc12 (146) et Nrg3 (147). La position laminaire adoptée par les interneurons semble être influencée par des signaux envoyés par les cellules pyramidales. D'abord, les interneurons acquièrent leur position seulement après que les cellules pyramidales se

soient différenciées en une couche corticale particulière. Ensuite, une perturbation de la formation des couches corticales entraîne une mauvaise localisation des interneurones (148, 149).

L'activité neuronale est aussi un facteur important pour entraîner une distribution laminaire normale des interneurones au travers du cortex. La terminaison de la migration des interneurones est liée à l'activation de l'expression du co-transporteur potassium/chlore KCC2. Ce dernier diminue la mobilité des interneurones en réduisant la fréquence des vagues calciques spontanées en réponse au GABA (150). En conséquence, la réduction de l'excitabilité des interneurones au cours de la première semaine postnatale est suffisante pour perturber la distribution laminaire des interneurones (151). En somme, la localisation précise des interneurones dans les diverses couches corticales est le résultat de l'intégration d'un programme intrinsèque de maturation et de divers signaux spécifiques produits par des classes distinctes de cellules pyramidales.

#### ***1.2.1.4 La formation des synapses***

De nombreux travaux ont montré que lors de leur maturation, les interneurones PV<sup>+</sup> forment leurs synapses périsonatiques de façon dépendante au niveau d'activité. En fait, la densité et la force de l'innervation GABAergique sont régulées par les niveaux d'activité neuronale et l'expérience (54, 152-154). La privation sensorielle pendant la période critique de plasticité a montré qu'elle réduisait la maturation de l'innervation des

cellules à panier PV<sup>+</sup> du cortex visuel (152) et somatosensoriel (153). Toutefois, il est possible d'étudier les voies moléculaires affectant le développement de l'arborescence axonale des cellules PV<sup>+</sup> en culture organotypique, même en absence des afférences thalamiques (152).

Le neurotransmetteur GABA a des rôles plus complexes que seulement la transmission inhibitrice. En fait, le GABA régule la morphogénèse des axones GABAergiques et leurs synapses et ainsi la maturation et la plasticité de l'innervation inhibitrice (155). Le *knock-out* du gène *Gad1*, codant pour Gad67, l'enzyme responsable de la synthèse basale de GABA, dans une cellule à panier PV<sup>+</sup>, entraîne une réduction de la complexité des embranchements axonaux de façon autonome à la cellule, en plus d'une diminution du nombre de synapses périsonmatiques autour des neurones pyramidaux du cortex visuel (155). *In vivo*, la souris *Gad1<sup>+/-</sup>* possède une diminution de 30 % en GABA qui s'accompagne d'une réduction de la maturation de l'innervation périsonmatique chez l'adolescent (155). En plus d'activer les récepteurs GABA<sub>A</sub> et GABA<sub>B</sub> sur la membrane postsynaptique, le GABA active des autorécepteurs GABA<sub>B</sub> qui modulent les canaux calciques et donc la relâche de GABA (156, 157). Il est par ailleurs suggéré que la modulation des dynamiques calciques présynaptiques dans les interneurons en développement influence la mobilité des cônes de croissance de même que la stabilité des boutons présynaptiques (158). Ou encore, l'activation des récepteurs GABA peut engendrer la relâche de facteurs rétrogrades qui agirait ensuite pour promouvoir le branchement des axones et la formation des synapses (159).

Toutefois, un blocage complet de la relâche de GABA, soit en inactivant *Gad1* et *Gad2*, codant pour les deux enzymes Gad67 et Gad65, soit en inactivant *vGAT* (le gène codant pour le transporteur vésiculaire de GABA responsable de remplir les vésicules synaptiques) dans une cellule isolée en culture organotypique, entraîne un phénotype inverse : une prolifération marquée de petites synapses périsonomatiques avec surcroissance axonale (160), ce qui suggère que le GABA participe plutôt à l'élimination de synapses émergentes au lieu de leur formation.

Une autre approche a été utilisée pour varier la relâche synaptique d'une cellule à panier PV<sup>+</sup> isolée en culture organotypique : soit de réduire l'excitabilité neuronale et la décharge de potentiels d'action via la signalisation par le récepteur à l'allostatine (161), soit de surexprimer TeNT-Lc afin de supprimer la relâche de vésicules synaptiques, qu'elle soit spontanée ou évoquée (162). Comme précédemment, alors que la réduction de la transmission synaptique diminue le nombre de synapses inhibitrices formées au cours du développement, le blocage complet de la relâche entraîne une surproduction de boutons synaptiques durant la phase de maturation axonale. Cependant, lorsque la relâche de neurotransmetteur est bloquée après le pic de formation des boutons, on observe une diminution drastique du nombre de boutons périsonomatiques, de la complexité de l'arborisation axonale ainsi que du nombre de cellules postsynaptiques contactées (163).

D'autres candidats potentiels idéaux pour lier l'activité neuronale à la formation et la maturation des synapses sont les neurotrophines, car elles sont en effet synthétisées et relâchées en fonction de l'activité et ont des propriétés trophiques (164, 165). Et comme BDNF n'est produit que par les neurones pyramidaux, on le retrouve donc au bon endroit et au bon moment pour poser l'hypothèse selon laquelle il peut ajuster le nombre et la force des synapses inhibitrices en fonction de l'activité des cellules pyramidales. Et effectivement, des données ont montré que l'application de BDNF favorise la formation des synapses GABAergiques en culture hippocampiques ou corticales (166-168), de même qu'il favorise la maturation de l'innervation GABAergique dans le cortex visuel (91). Enfin, le stress induit par la séparation de la mère en jeune âge entraîne une diminution transitoire de BDNF durant le développement précoce, ce qui entraîne un retard de développement du système GABAergique et résulte en une diminution du nombre de synapses GABAergiques au niveau du cortex préfrontal (169). De quelle façon BDNF agirait sur le système inhibiteur ? BDNF pourrait agir comme un signal rétrograde : sa sécrétion à partir des cellules pyramidales influencerait alors les sites présynaptiques GABAergiques localement (170). Ou encore, il pourrait agir comme signal antérograde : BDNF signalerait à plusieurs neurones GABAergiques et influencerait alors l'innervation GABAergique globalement (171, 172). Or, en culture organotypique du cortex visuel, il a été montré que le *knock-out* de *BDNF* dans une cellule pyramidale unique entraîne une diminution du nombre et de la force des synapses GABAergiques l'entourant alors que les cellules pyramidales sauvages avoisinantes sont in affectées (173), argumentant en faveur d'un rôle local de BDNF.

Enfin, l'activité neuronale module les propriétés intrinsèques et le patron de connectivité des interneurones corticaux entre autres via la régulation de programmes transcriptionnels propres aux types cellulaires. Par exemple, chez les interneurones SST<sup>+</sup>, l'activité neuronale induit l'expression du facteur de transcription à réponse rapide Npas4 afin de réguler la formation de synapses excitatrices sur ceux-ci, en induisant l'expression de protéines synaptiques et du canal potassique Kv1.1 (174). Chez les interneurones exprimant le polypeptide intestinal vasoactif (*vasoactive intestinal polypeptide* – VIP), l'activité neuronale induit plutôt un programme transcriptionnel différent, qui favorise la formation de synapses inhibitrices (175). Chez les cellules à panier PV<sup>+</sup>, l'activité neuronale module l'expression ainsi que la translocation cytoplasme-noyau du facteur de transcription Etv1 (176) qui induit alors l'expression de Kv1.1, canal potassique rectifiant qui se trouve au segment initial de l'axone et qui est responsable du début tardif des potentiels d'action chez ceux-ci (177). Ainsi, les cellules à panier PV<sup>+</sup> peuvent ajuster leur excitabilité et s'adapter de façon réversible aux variations d'activité les entourant.

D'autres signaux semblent être présents afin de restreindre la formation de synapses GABAergiques pendant l'élaboration très complexe de son arbre axonal dont la maturation s'étend jusqu'au début de l'âge adulte. En effet, une formation synaptique précoce et excessive pourrait faire obstacle à une croissance axonale adéquate. La PSA, dont l'expression au niveau du cortex visuel est déterminée par l'activité neuronale, module les interactions cellule-cellule médiées par les molécules d'adhésion (178, 179) dont la molécule d'adhésion neurale (*neuronal cell adhesion molecule* –

NCAM) (180). Or, la suppression prématurée du PSA entraîne une maturation précoce des synapses périsonmatiques inhibitrices formées par les cellules à panier du cortex visuel. Étant donnée le rôle des cellules à panier PV<sup>+</sup> dans le déclenchement de la période critique de plasticité, cette digestion enzymatique de le PSA devance le début de la plasticité pour la dominance oculaire (94).

*Nous voulons donc étudier les cascades moléculaires pouvant restreindre la formation de synapses inhibitrices au cours du développement dans l'optique de pouvoir réactiver ces voies de signalisations chez l'adulte afin de diminuer la puissance inhibitrice et ainsi favoriser une plasticité cérébrale de type « juvénile ».*

### **1.2.2 Les filets périneuronaux**

Bien qu'elle fût l'objet de moins d'attention que ses composantes cellulaires, la matrice extracellulaire (*extracellular matrix* – ECM), classée en trois compartiments (la membrane basale, la matrice diffuse et la matrice condensée), compose de 10 à 20 % du volume du système nerveux central (181). La membrane basale forme un feuillet protecteur, une frontière entre les cellules endothéliales et les cellules parenchymateuses. Elle est essentiellement formée de collagène et de laminine. Alors que la matrice diffuse se retrouve au travers du parenchyme neuronal, la matrice condensée, appelée filets périneuronaux (PNNs), se forme autour du corps cellulaire et des dendrites proximales d'un sous-ensemble de neurones. La matrice, qu'elle soit diffuse ou condensée, est essentiellement enrichie de protéoglycanes. Bien que les



PNNs furent d'abord identifiés et décrits par Camillo Golgi il y a plus d'un siècle, la diversité de leurs composantes ainsi que les règles qui gouvernent la dynamique de leur assemblage/désassemblage sont un mystère qui commence à se révéler.

L'utilisation de l'agglutinine ou lectine de *Wisteria floribonda* (WFA), qui lie le résidu N-acétylgalactosamine des glycoprotéines présentes dans la majorité (>80 %) des PNNs, a révélé leur présence dans plusieurs régions du système nerveux central [Figure 5, p. 58]. La condensation des PNNs autour du corps cellulaire des interneurons PV<sup>+</sup> coïncide avec leur maturation (182). D'un autre côté, l'injection dans le système nerveux central de la chondroïtinase ABC (chABC), une enzyme bactérienne qui coupe les chaînes latérales des protéoglycanes de type chondroïtine-sulfate (CSPG) présentes dans les PNNs, a démontré l'importance des PNNs dans la régularisation de l'activité des interneurons PV<sup>+</sup> et la fermeture des périodes critiques de plasticité de même que dans les processus mnémoniques et d'apprentissage. Ainsi, les PNNs sont impliqués dans les dysfonctions telles que la dépendance et les maladies neurodéveloppementales comme l'autisme, le syndrome de l'X fragile et la schizophrénie, soulignant l'importance d'approfondir les connaissances autant sur l'expression, les modifications post-traductionnelles et les règles d'assemblage des différentes composantes des PNNs en condition physiologique au cours du développement que dans l'optique de favoriser la plasticité cérébrale chez l'adulte.

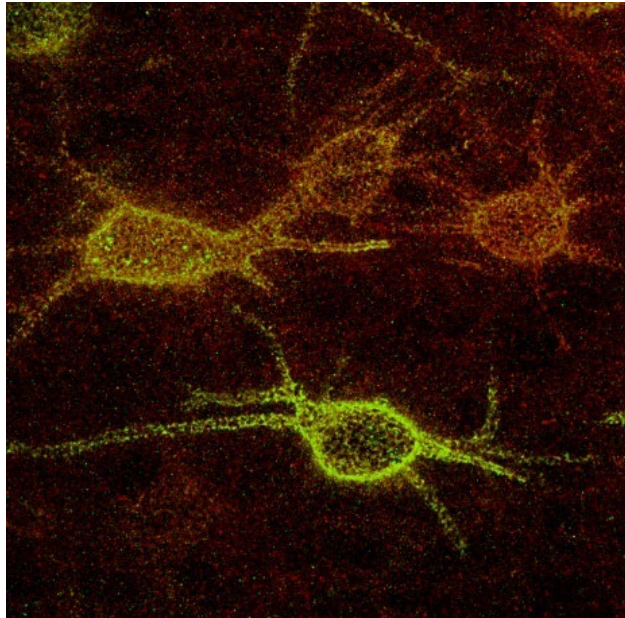


Figure 5. – **Les filets périneuronaux s’agglomèrent autour du corps cellulaire et des dendrites proximales des neurones, principalement les interneurons PV<sup>+</sup>.**

Immunofluorescence montrant les PNNs marqués avec WFA (rouge) et la protéine agrécan (vert) au niveau de cortex somatosensoriel de souris à P60. Projection maximale d’une image obtenue en microscopie confocale avec un objectif 63X.

### ***1.2.2.1 Structure et composition des filets périneuronaux***

Dans cette section, nous détaillerons les diverses molécules qui composent les PNNs et qui sont représentés schématiquement à la **Figure 6, p.59**.

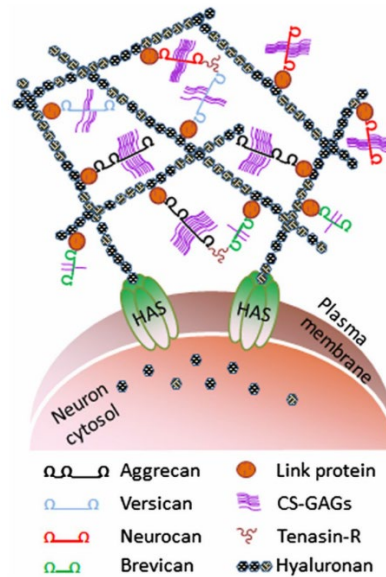


Figure 6. – **Représentation schématique de la structure des filets périneuronaux.**

L'hyaluronane, sécrétée par l'hyaluronane synthase, lie les membres de la famille des lecticanes (aggrecane, brévicane, versicane et neurocane) via les protéines link et tenascin-R pour former des agrégats supra-moléculaires à la surface des neurones.

Adaptée de Tsien, PNAS, 2013(183).

Reproduction avec permission.

### 1.2.2.1.1 L'acide hyaluronique

La base de l'exosquelette que forment les PNNs est montée à partir des hyaluronanes synthases (HAS: HAS1, HAS2, HAS3), enzymes transmembranaires qui synthétisent l'acide hyaluronique (HA) directement à partir du neurone par extrusion (184). Alors que HAS2 et HAS3 sont exprimées au niveau du corps cellulaire, HAS1 est retrouvée dans les axones (185). L'HA est un polymère formé de centaines de répétitions de disaccharides formés d'acide glucuronique – N-acétylglucosamine (GlcA-GlcNac), formant une chaîne peu flexible et chargée négativement. Ainsi, elle confère des sites d'hydratation multiples, déterminant la densité et la viscosité des PNNs.

### *1.2.2.1.2 Les protéoglycanes*

Une grande proportion de l'ECM est formée de protéoglycanes (PGs) (186). Ceux-ci sont composés de chaînes de glycosaminoglycanes (GAGs) attachées de façon covalente à une portion protéique centrale (187). La variabilité des chaînes de disaccharides provient de la grande diversité des enzymes les synthétisant de même que par leurs différents patrons de sulfatation qui définissent alors 5 types de CSPGs (CS-A/B/C/D/E) (188). On note que l'héparane sulfate (HS), composée de GlcA ou IdoA et de GalNac, et que la chondroïtine-sulfate (CS), formée de GlcA et GalNac, sont les plus importantes chaînes de GAGs du système nerveux central et sont enrichies dans les PNNs en comparaison à la matrice diffuse (187, 189, 190).

### *1.2.2.1.3 Les protéoglycanes de type chondroïtine-sulfate*

Les CSPGs sont des protéoglycanes qui diffèrent quant à leur portion protéique centrale ainsi que par le nombre varié de chaînes de GAGs qui leur sont associées (191). Elles regroupent les protéines sécrétées de la famille des lecticanes ainsi que deux protéines qui demeurent ancrées à la membrane : phosphacan et NG2 (CSPG4). La famille des lecticanes est composée d'aggrécane (CSPG1), brévicane (CSPG7), neurocane (CSPG3) et versicane (CSPG2), cette dernière étant exprimée sous forme de quatre variants alternatifs (192). Alors que toutes sont décorées d'un nombre variant de quelques à des centaines de chaînes de GAGs de type chondroïtine-sulfate, seule aggrécane est associée à des chaînes de GAGs de type kératine-sulfate. De plus, aggrécane est la seule CSPGs retrouvée dans pratiquement tous les PNNs. Son rôle dans l'assemblage des PNNs a été démontré comme primordial puisqu'on retrouve,

chez la souris déficiente en agrécane, une diminution de marquage des PNNs à l'aide de WFA bien que les autres composantes ne soient pas affectées (193). Neurocane est exprimée par les neurones et par les astrocytes. Brévicane est présente sous deux formes (194), soit exprimée par les neurones et sécrétée, soit produite par les cellules gliales et ancrée à la membrane (195, 196) .

La portion protéique des CSPGs qui est glycosylée est encadrée de 2 ou 3 sous-domaines globulaires (G1 et/ou G2 en N-terminal, G3 en C-terminal). Le domaine G1 est caractérisé par un domaine immunoglobuline et de deux répétitions PG en tandem tandis que le domaine G2, contenu uniquement dans agrécane, ne contient que deux répétitions PG. C'est via les répétitions PG que le domaine G1 assure la liaison des CSPGs à l'HA via les protéines de la famille Hapln. Le domaine G3 est composé de trois sous-domaines : un sous-domaine EGF, un sous-domaine lectine ainsi qu'un sous-domaine similaire à la protéine de régulation du complément. C'est via ce sous-domaine lectine commun que les CSPGs interagissent de façon calcium-dépendante avec tenascine-R et tenascine-C via leur domaine fibronectine de type III 3-5 (197-199), lesquelles sont les seules tenascines exprimées dans le système nerveux central (200, 201).

#### *1.2.2.1.4 Tenascines et Haplns*

Les tenascines forment un pont entre les CSPGs via leur domaine G3 et sont exprimées autant par les neurones eux-mêmes que par les cellules gliales (202). Leur hétérogénéité est due à l'épissage alternatif de même que par l'activité des

métalloprotéases. Leur importance a été démontrée par la génération de la souris knock-out pour *Tn-R* puisqu'on y observe une diminution marquée de la présence de l'agglomération de HA et des CSPGs dans les PNNs (203).

Les protéines Haplns, quant à elles, stabilisent le lien entre le domaine G1 des CSPGs et HA, complétant la structure en filet caractéristique des PNNs (204). Trois des quatre membres de cette famille sont exprimés dans le système nerveux central, Hapln1, 2 et 4. Alors que Hapln1 et 4 sont exprimés par les neurones entourés de PNNs, Hapln2 est sécrétée par les oligodendrocytes avoisinants et se retrouve autour des nœuds de Ranvier (205). Il est à noter que Hapln1 forme le pont entre la plupart des lecticanes et HA, tandis que Hapln4 interagit spécifiquement avec brévicane (189, 206). De ce fait, Hapln1 est primordiale à l'assemblage des PNNs. La surexpression de Hapln1, accompagnée de HAS3, dans un système hétérologue tel que les cellules HEK suffit à générer une matrice extracellulaire condensée qui ressemble celle des PNNs (207). Enfin, bien que l'expression des CSPGs demeure inchangée, on observe une diminution de l'agglomération des PNNs chez la souris *Hapln1* KO (208).

### **1.2.2.2 Désassemblage**

La variabilité des PNNs est complexifiée par l'action de différentes protéases sécrétées dans la matrice extracellulaire. Nous distinguerons deux grandes familles : les ADAMTS (*a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs*) qui regroupe 19 membres exprimés dans le SNC dont 7 sont reconnus pour dégrader les PGs, puis les MMPs qui est composée de 25 membres, dont seulement trois sont retrouvés dans le

cerveau. Les sept protéoglycanases ADAMTS du cerveau sont exprimées par les astrocytes (209, 210) et récemment, ADAMTS-8 et ADAMTS-15 ont été reconnues comme étant aussi exprimées par les interneurons PV<sup>+</sup> (211). Les protéoglycanases MMPs clivent aggrecane et brevican près de leur domaine G1. Seule MMP9, exprimée à la fois par les neurones, les astrocytes et les oligodendrocytes, a été identifiée comme un joueur-clé dans la régulation des PNNs. En effet, la diminution des PNNs observée autour des interneurons PV<sup>+</sup> du cortex auditif de la souris Fmr1KO peut être ramenée à la normale en diminuant l'expression trop élevée de MMP9 (212).

### **1.2.2.3 Fonctions**

Bien qu'ils diffèrent quant à leur structure au travers des différentes régions du cerveau, les PNNs remplissent des fonctions essentielles pour les neurones qu'ils entourent.

#### *1.2.2.3.1 Barrière physique*

La structure des PNNs, avec ses nombreuses chaînes de GAGs, crée un environnement fortement chargé négativement, ce qui permet de conserver à forte concentration les ions positifs, créant une forme de réservoir (184). C'est cette propriété qui contribue à conserver un fort potentiel de membrane au repos (213). En générant un tri ionique aux abords de la membrane, les PNNs facilitent les décharges à haute fréquence, typiques des interneurons PV<sup>+</sup> (214). Enfin, les PNNs qui contiennent aggrecane, mais non brevican, en retenant les ions Fe<sup>3+</sup>, protègent contre le stress oxydatif généré par le fer (215). Les PNNs jouent un rôle important dans la plasticité synaptique. En effet, structurellement, les PNNs forment un filet qui entoure le corps

cellulaire et les dendrites proximales, générant des trous libérant l'accès la membrane pour la formation des contacts synaptiques. Ainsi, les PNNs sont capables de contrôler l'activité nerveuse en régulant l'accessibilité au neurone-cible en agissant comme une barrière physique. De plus, par le démontage des PNNs à l'aide de l'hyaluronidase dans des cultures neuronales hippocampiques, il a été démontré que la diffusion latérale des récepteurs AMPA à la membrane postsynaptique est restreinte par la présence des PNNs(216). L'ajout de ChABC aux neurones corticaux en culture augmente la motilité des épines dendritiques, augmentant leur *turnover*. Ensuite, au niveau du CA3, des changements de plasticité structurelle et fonctionnelle engendrés par l'application *in vivo* de ChABC ont favorisé l'augmentation spécifique de géphyrine sur les interneurons PV<sup>+</sup> (217). Il s'avère donc que des modifications de la structure des PNNs, même subtiles, puissent augmenter localement la plasticité synaptique, réduisant le potentiel inhibiteur des interneurons PV<sup>+</sup>.

#### 1.2.2.3.2 Voies signalétiques particulières

Les PNNs sont impliqués directement dans plusieurs voies signalétiques, dont deux exemples seront décrits ici. Deux séquences peptidiques ont été identifiées comme étant capables de s'associer avec les GAGs : XBBXBX et XBBBXXBX où B est un résidu basique et X un résidu hydrophile (218).

Le premier exemple réfère à Otx2, un facteur de transcription à homéodomaine. Chez la souris, Otx2 est retrouvé dans le noyau des interneurons PV<sup>+</sup> du cortex, où il joue un rôle important dans leur maturation et l'agglomération des PNNs. Il a été récemment



suggéré qu'Otx2 est capable de réguler l'expression d'aggrécane (219). Toutefois, le locus *Otx2* est silencieux dans le cortex post-natal. On retrouve plutôt l'ARN messager codant pour Otx2 dans les régions sous-corticales de la voie optique : dans le noyau géniculé latéral, les colliculi supérieurs et la rétine (21). C'est dans sa portion N-terminale qu'Otx2 contient une région peptique (RKQRRER) capable d'interagir avec les GAGs. C'est donc via les PNNs qu'Otx2 peut intégrer les cellules PV<sup>+</sup>. Une accumulation constante de Otx2 dans les cellules PV<sup>+</sup> est nécessaire pour maintenir le cerveau adulte dans un état peu plastique : en effet, une diminution de Otx2 entraînera une dématuration des cellules PV<sup>+</sup>, qui diminueront alors leur PNNs, entraînant une augmentation de la plasticité cérébrale après la fermeture de la période critique.

Un deuxième exemple vient des sémaphorines, des molécules impliquées dans le guidage axonal et qui signalent via les récepteurs de la famille des plexines. Les sémaphorines sont soit sécrétées, soit ancrées à la membrane plasmique. La portion C-terminale de Sema3A contient un domaine (RKQRRQR) hautement semblable à la région peptidique de Otx2 capable d'interagir avec les GAGs. Bien que son interaction directe avec les GAGs ne soit pas encore démontrée, Sema3A se retrouve aux alentours des cellules PV<sup>+</sup>, en colocalisation avec les composantes des PNNs que sont aggrécane, versicane et Tn-R, tout en étant absente après un traitement à la ChABC ou chez la souris KO pour *Halpn1*, laquelle ne condense pas de PNNs(220). Il semble donc que la signalisation via la voie Sema3A-plexines soit dépendante de l'intégrité structurale des PNNs.

### 1.2.2.3.3 L'activité neuronale

La relation entre la formation et le maintien des PNNs au niveau cortical et le niveau d'activité neuronale en est une d'interdépendance. En effet, au cours du développement, l'augmentation de l'activité neuronale est nécessaire à l'agglomération des PNNs autour des cellules PV<sup>+</sup>, tel que démontré par l'absence de PNNs dans le cortex visuel des souris élevées dans le noir(108). On pense que ceci est dû à la régulation activité-dépendante de l'expression de *Halpn1*. De la même façon, la diminution de l'activité du cortex somato-sensoriel, par l'ablation des vibrisses chez la souris, entraîne une diminution de la condensation des PNNs (221). Dans des cellules hippocampiques *in vitro*, la diminution de la fréquence des potentiels d'action ou le blocage des récepteurs AMPA, des récepteurs glutamatergiques non-NMDA ou des canaux calciques de type L entraînent tous une diminution de la condensation des PNNs autour des cellules PV<sup>+</sup> (222). Par ailleurs, l'intégrité structurale des PNNs autour des cellules PV<sup>+</sup> est essentielle au maintien de leurs propriétés électrophysiologiques matures et de leurs contacts synaptiques. Comme mentionné précédemment, les PNNs participent au tamponnage des ions nécessaires aux décharges à haut débit. De plus, il a été démontré *in vitro* que la formation des PNNs diminue l'excitabilité des interneurons PV<sup>+</sup> (222). Les contacts synaptiques sur les cellules PV<sup>+</sup> sont eux-aussi influencé par la structure des PNNs, car les cellules PV<sup>+</sup> entourés de PNNs contenant du brévicané reçoivent plus de contacts glutamatergiques (223). De plus, les études utilisant ChABC *in vivo* pour désintégrer les PNNs ont montré une diminution de l'inhibition via les cellules PV<sup>+</sup> au niveau du cortex préfrontal (224). Comme les interneurons PV<sup>+</sup> demeurent une source majeure d'inhibition corticale, régulant les

oscillations nécessaires aux fonctions cérébrales de haut niveau, bien sûr que ces dernières seront influencées par la structure et l'intégrité des PNNs.

#### *1.2.2.3.4 La mémoire*

Les études utilisant l'injection de ChABC ou d'hyaluronidase pour digérer les chaînes de GAGS décorant les CSPGs ou pour couper la structure primaire formée de HA, dans diverses régions du cerveau ont permis de mettre en lumière le rôle inouï de la structure des PNNs dans la formation et la maintenance de la mémoire. En effet, au niveau de l'hippocampe, la destruction des PNNs entraîne une difficulté à transformer les souvenirs à court terme en mémoire à long terme (225, 226). L'utilisation de la ChABC en combinaison avec l'hyaluronidase au niveau de l'hippocampe empêche la formation de la mémoire à long terme de la peur contextuelle alors qu'au niveau du cortex préfrontal, elle empêche la formation de la mémoire à long terme de la peur conditionnée au son (226). De la même façon, la digestion des PNNs de l'amygdale avant la formation de la mémoire de la peur conditionnée rend cette dernière plus labile, donc plus prête à être remplacée par la mémoire de l'extinction (20). De par son action sur la mémoire et sur la fermeture des périodes critiques de plasticité, la formation des PNNs au cours du développement entraîne une diminution de la capacité à apprendre. L'ablation des PNNs du cortex périrhinal augmente la reconnaissance des objets nouveaux (227). De plus, elle augmente la plasticité synaptique du cortex auditif adulte de la gerboise, augmentant ainsi les capacités d'un apprentissage nouveau sans toutefois entraîner la disparition des souvenirs déjà présents à la mémoire (228).

En somme, ces données pointent toutes vers un rôle des PNNs dans la consolidation de la mémoire à long terme et la stabilité des apprentissages en renforçant les circuits PV<sup>+</sup>. Par conséquent, il est important de *comprendre de façon approfondie le patron d'expression cellulaire des différentes composantes formant les PNNs ainsi que les mécanismes transcriptionnels régulant leur expression en fonction de l'activité pour identifier de nouveaux moyens thérapeutiques afin de favoriser la plasticité cérébrale adulte.*

### **1.3 Le récepteur p75<sup>NTR</sup>**

Dans le but de réduire la connectivité des circuits inhibiteurs PV<sup>+</sup> afin de favoriser la plasticité cérébrale chez l'adulte [Section 1.2, p. 45], il est important de s'intéresser aux mécanismes moléculaires capables de restreindre la formation des synapses au cours de la longue phase de maturation des interneurons corticaux PV<sup>+</sup>, qui se prolonge jusqu'à la fin de l'adolescence. Or, au cours du développement, la croissance des interneurons GABAergiques est influencée, entre autres, par les facteurs neurotrophiques présents dans leur environnement, tels que BDNF (229). Il faut savoir que BDNF est d'abord synthétisé en tant que propeptide (proBDNF, 32 kDa). Il peut soit être sécrété tel quel (165, 230), soit être clivé (mature BDNF (mBDNF, 14 kDa)) de façon intra-cellulaire par des enzymes telles que la furine ou les pro-convertases (par exemple, PC1) avant d'être sécrété dans l'environnement. Lorsque proBDNF est sécrété, il peut alors être clivé de façon extra-cellulaire via l'activation de l'enzyme plasmine. Cette activation est régulée par l'activateur tissulaire du plasminogène (tPA) ou par des métalloprotéases telles que MMP7 par exemple (231). Les taux ambiants de

proBDNF/mBDNF sont donc finement régulés. D'abord l'expression du gène lui-même est régulée de façon dépendante de l'activité neuronale, via le promoteur IV (91, 173, 229, 232). Ensuite, les patrons d'activité neuronales viennent déterminer les taux de sécrétion et de clivage de proBDNF en mBDNF : en effet, sur des cultures hippocampiques il a été montré que des stimulations à basse fréquence stimule la sécrétion de proBDNF alors que des stimulations à haute fréquence induit une augmentation des taux extracellulaires de mBDNF en favorisant la sécrétion de tPA.

De nombreuses études ont mesuré les effets de la signalisation de mBDNF via le récepteur TrkB sur la croissance axonale des interneurons GABAergiques, toutefois le rôle de la signalisation via proBDNF/p75<sup>NTR</sup> demeure inconnu. Étant donné l'impact de la signalisation proBDNF/p75<sup>NTR</sup> sur la rétraction axonale, nous nous sommes demandé si l'activation du récepteur p75<sup>NTR</sup> serait suffisante pour réduire la connectivité efférente des interneurons PV<sup>+</sup> et réactiver la plasticité cérébrale du cortex visuel chez l'adulte. Dans cette section, nous détaillerons la structure et les fonctions intracellulaires du récepteur p75<sup>NTR</sup> [Section 1.3.1, p. 69], ainsi que son rôle dans la plasticité synaptique [Section 1.3.2, p. 73] et la plasticité cérébrale [Section 1.3.3, p. 76].

### 1.3.1 Structure et fonctions

Le récepteur des neurotrophines p75 (p75<sup>NTR</sup> ou *Nerve Growth Factor Receptor*, NGFR ou TNFRSF16), est un membre de la superfamille des facteurs de nécrose tumorale (*Tumor Necrosis Factor*, TNF) (233). Une fois activé par son ligand, il peut influencer

plusieurs voies intracellulaires : allant de la survie/mort cellulaire et la croissance axonale jusqu'à la plasticité synaptique (233-235).

Le récepteur, comme son nom l'indique, a d'abord été identifié comme étant un récepteur pour le facteur de croissance des nerfs (*Nerve Growth Factor*, NGF) (236). Puis, il a été démontré qu'il peut lier, bien qu'avec une faible affinité, toutes les neurotrophines : le BDNF, la neurotrophine 3 (NT-3) et la neurotrophine 4 (NT-4) (234, 235). Ces neurotrophines peuvent aussi activer des récepteurs à tyrosine kinase : les récepteurs kinases à tropomyosine-A, -B, -C (*tropomyosin receptor kinases* (Trk)) (aussi connus comme étant NTRK1, 2 et 3) (237). Ceux-ci activent alors différentes voies signalétiques dont celle des MEK/MAPK, celle de la kinase régulée par signaux extracellulaires (*extracellular signal-regulated kinase* (Erk)), la voie de PI3K-Akt ainsi que celle de la phospholipase C gamma (238). De plus, il a été démontré que le récepteur p75<sup>NTR</sup> peut être activé par la liaison aux neurotrophines avant qu'elles ne soient clivées, donc sous forme de propeptide (239, 240). Lorsque le récepteur est lié aux pro-neurotrophines, il favoriserait alors l'inhibition de la croissance et la mort cellulaire (241). Ainsi, les deux types de récepteurs peuvent agir de façon soit antagoniste, indépendante ou synergétique (231).

Quelques autres molécules ont été identifiées comme ligands du récepteur p75<sup>NTR</sup> : les polypeptides dérivés de la myéline tels que la glycoprotéine associée à la myéline (*myelin-associated glycoprotein*, MAG) et Nogo (reticulon-4) (242, 243), les

glycoprotéines du virus de la rage (*rabies virus glycoprotein*, RVG) (244) et le peptide  $\beta$ -amyloïde (245, 246). Certains de ces ligands peuvent lier directement le récepteur p75<sup>NTR</sup>, alors que d'autres nécessiteront une liaison avec des co-récepteurs. C'est le cas des pro-neurotrophines qui lieront le récepteur p75<sup>NTR</sup> avec ces co-récepteurs de la famille des Vps10, soit sortilin, SorL1 et SorCS2 (247, 248). Les ligands dérivés de la myéline nécessitent quant à eux la présence du récepteur Nogo (NgR, ou RTN4R) et Lingo-1 pour signaler via le récepteur p75<sup>NTR</sup> (242, 243, 249).

Le domaine intracellulaire du récepteur p75<sup>NTR</sup> contient un *death domain* (DD) en C-terminal qui est adjoint au seul passage transmembranaire via une portion de liaison longue de 60 acides aminés (250). Le DD est un domaine protéique globulaire de 80-90 acides aminés caractérisé par un paquet de six hélices alpha (251, 252) qui interagissent ensemble via des liaisons disulfures pour former des dimères de récepteurs en absence de ligand (253, 254). Ainsi, le récepteur p75<sup>NTR</sup> est caractérisé par l'absence d'un domaine catalytique. Tout comme les autres membres de la famille de récepteurs TNFRSF, la signalisation via le récepteur p75<sup>NTR</sup> passe par la séquestration ou le relâchement de partenaires protéiques dans l'environnement intracellulaire. Ainsi, la liaison des ligands au récepteur p75<sup>NTR</sup> entraîne la séparation des deux DDs du dimère, ce qui change alors l'affinité pour certains effecteurs en aval. Bien que plusieurs partenaires protéiques semblent avoir été identifiés, les mécanismes moléculaires selon lesquels différentes voies signalétiques peuvent être engagées en aval de p75<sup>NTR</sup> demandent encore des éclaircissements [Figure 7, p. 72]. La voie intracellulaire la plus connue est la régulation de la croissance, de l'effondrement et de

la dégénérescence axonale via RhoA (255-257). Il est aussi connu que p75<sup>NTR</sup> peut activer la voie de NF-κB et ainsi favoriser la survie cellulaire (258-260). Enfin, p75<sup>NTR</sup> peut activer la voie de la kinase c-Jun ou de la caspase, menant alors à la mort cellulaire par apoptose (261, 262). Les acides aminés essentiels à l'activation différentielle de ces voies ont été détaillés, et toutes ont montré l'exigence du DD pour la signalisation intracellulaire (263).

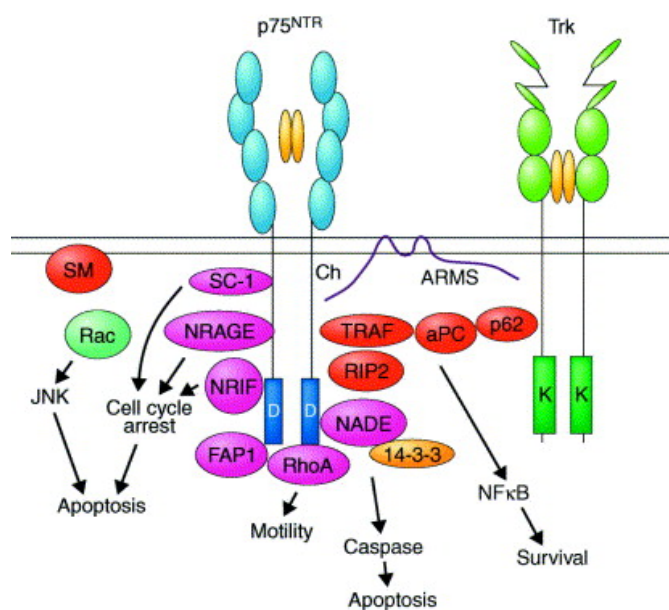


Figure 7. – **Les mécanismes signalétiques de p75<sup>NTR</sup>.**

Représentation schématique des différentes composantes proximales des voies de signalisation en aval de l'activation du récepteur p75<sup>NTR</sup>, incluant RhoA, Rac, Caspase et NFκB ainsi que les réponses biologiques en résultant : l'apoptose, la mobilité, la survie cellulaire.

Adaptée de Hempstead, B. L., *Current Opinion in Neurobiology*, 2002 (264).  
Reproduction avec permission.

La complexité des combinaisons et rôles physiologiques remplis par le récepteur p75<sup>NTR</sup> peut être approchée par la résolution de son patron d'expression, ainsi que celui de ses co-récepteurs partenaires signalétiques au cours du développement ou en situation



pathologique. Ainsi, il est connu que p75<sup>NTR</sup> est largement exprimé durant la période de synaptogénèse et de la mort cellulaire développementale programmée (265). Son expression est par la suite réduite et peut être réactivée suite à une atteinte neurologique. Ainsi, l'inhibition, ou la réduction de l'expression, de p75<sup>NTR</sup> et du co-récepteur NogoR, peut avoir un effet protecteur dans le modèle d'accident vasculaire cérébral par occlusion de l'artère cérébrale du milieu (266, 267).

L'expression du récepteur p75<sup>NTR</sup> chez les interneurons corticaux demeure nébuleuse à ce jour. En fait, il a été démontré que les interneurons PV<sup>+</sup> de l'hippocampe n'expriment pas le récepteur p75<sup>NTR</sup>, et ce à l'aide d'une expérience d'immunofluorescence, et que, en conséquence, l'application de proBDNF n'a révélé aucun effet sur l'activité GABAergique (268). Toutefois, l'étude du patron d'expression développemental de p75<sup>NTR</sup> chez les interneurons GABAergiques du cortex au moyen de techniques plus sensibles reste une question ouverte.

### **1.3.2 Le récepteur p75<sup>NTR</sup> et la plasticité synaptique**

Il est généralement conçu que les niveaux relatifs de proBDNF et de mBDNF jouent un rôle primordial dans la modulation de la structure et des fonctions du cerveau. En effet, il s'avère que l'activation de p75<sup>NTR</sup> via la liaison de proBDNF a des effets opposés sur la structure neuronale et la plasticité synaptique que celle de TrkB via la liaison de la forme mature de BDNF (269-271).

Bien que de déterminer les rôles physiologiques de mBDNF versus proBDNF et ceux de l'activation de leurs récepteurs respectifs sur la transmission synaptique ait représenté un défi de taille, la construction d'un modèle *knock-in* murin, où la séquence de proBDNF est mutée afin de le rendre résistant au clivage, a permis de questionner les effets des ratios endogènes de proBDNF/mBDNF. Cette étude a montré que proBDNF diminue la complexité de l'arbre dendritique des neurones hippocampiques et ce d'une façon dépendante de p75<sup>NTR</sup> (272).

Avant de pouvoir poser des hypothèses quant au rôle possible de la signalisation proBDNF/p75<sup>NTR</sup> dans la plasticité synaptique, il a d'abord fallu démontrer la sécrétion de proBDNF en tant que propeptide non-clivé. En 2001, un groupe a réussi à montrer la sécrétion de proNGF et proBDNF à partir de cellules HEK239 ou encore de cellules endothéliales de souris (241). Dès lors, ils ont poursuivi en étudiant le rôle de proBDNF sur la LTD sur des tranches d'hippocampe. Ces données ont été supportées par une première étude qui montrait que la LTD induite par des stimulations à basse fréquence est déficiente chez deux lignées différentes de souris chez qui le gène p75<sup>NTR</sup> a été supprimé (273), puis une deuxième qui confirmaient les défauts de la LTD chez les souris p75<sup>NTR</sup><sup>-/-</sup>, mais aussi chez les souris sauvages dont le récepteur a été bloqué par l'infusion d'un anticorps REX (269). Enfin, il faut savoir que l'effet de p75<sup>NTR</sup> sur la LTD est dépendant de son co-récepteur SorCS2, abondamment exprimé dans l'hippocampe (274).

La signalisation proBDNF/p75<sup>NTR</sup> est très importante pour un autre aspect de la mémoire : elle inhibe les décharges persistantes au niveau du cortex entorhinal, décharges importantes pour la mémoire de travail (275, 276). D'un côté, les animaux p75<sup>NTR</sup><sup>-/-</sup> réussissent mieux que les animaux sauvages dans la tâche de reconnaissance d'un nouvel objet (276) ainsi que dans la tâche du labyrinthe de Barnes (277), deux tâches servant à évaluer la mémoire de travail. De l'autre côté, l'infusion de proBDNF dans l'hippocampe réduit les performances dans la tâche du labyrinthe de Morris (278).

En plus de son rôle sur la LTD, la signalisation via proBDNF/p75<sup>NTR</sup> a été impliquée dans d'autres formes de plasticité synaptique. Au niveau de la jonction neuromusculaire, l'application de proBDNF induit une diminution de la fréquence et de l'amplitude des courants spontanés et que l'expression présynaptique de p75<sup>NTR</sup> est requise pour observer les effets de proBDNF sur la dépression synaptique (230). De plus, l'activation de la signalisation de p75<sup>NTR</sup> par proBDNF conduit à l'élimination des synapses inactives de la jonction neuromusculaire, alors que de l'autre côté lorsque proBDNF est clivé en mBDNF, les terminaisons sont alors stabilisées (279, 280).

Enfin, l'expression de proBDNF peut réduire la complexité de l'arbre dendritique et le nombre d'épines dendritiques des cellules granulaires du CA1 et du gyrus dentelé de l'hippocampe, réduisant donc la transmission synaptique basale, et ce d'une façon dépendante de p75<sup>NTR</sup> (272). L'élimination des épines en raison d'une asynchronie semble passer par une signalisation proBDNF/ p75<sup>NTR</sup> (281).

*La relâche de proBDNF dans l'environnement synaptique, et la possible expression de p75<sup>NTR</sup> au niveau des interneurones PV<sup>+</sup>, soulève la question à savoir s'il y a, dans des conditions physiologiques, modulation de la plasticité synaptique et/ou de la connectivité des cellules PV<sup>+</sup> via la signalisation par le récepteur p75<sup>NTR</sup>.*

### **1.3.3 Le récepteur p75<sup>NTR</sup> et la plasticité cérébrale**

Comme détaillé au chapitre 1, toute manipulation qui pourrait éventuellement diminuer l'inhibition via les interneurones PV<sup>+</sup> chez l'adulte pourrait être envisagée comme un levier potentiel dans l'augmentation de la plasticité cérébrale chez l'adulte. Ainsi, en posant l'hypothèse que la signalisation via proBDNF/p75<sup>NTR</sup> sur les boutons terminaux des interneurones PV<sup>+</sup> pourraient entraîner une diminution de synapses inhibitrices, nous nous retrouvons devant un possible mécanisme pour manipuler la plasticité cérébrale chez l'adulte. En support à cette hypothèse, des données probantes utilisant l'inactivation génique du récepteur Nogo, co-récepteur de p75<sup>NTR</sup>, spécifiquement au niveau des cellules PV<sup>+</sup>, entraîne la suppression des souvenirs de peur chez l'adulte, signe d'une grande plasticité cérébrale (76). L'expression du récepteur Nogo, et, par extension, probablement celle du récepteur p75<sup>NTR</sup>, représente donc un frein moléculaire, limitant la plasticité dépendante de l'expérience chez l'adulte. *Dès lors, on peut se demander si la signalisation via proBDNF/p75<sup>NTR</sup> représente un moyen efficace d'augmenter la plasticité cérébrale dans le cortex visuel adulte.*

## 1.4 L'histone déacétylase 2

Le développement et la maturation des fonctions et de la connectivité des interneurons PV<sup>+</sup>, de même que l'agglomération des PNNs autour de leur corps cellulaire, sont régulés de façon dépendante de l'activité neuronale et de l'expérience sensorielle [Section 1.2, p. 56]. Par exemple, la privation visuelle engendrée par l'élevage dans le noir retarde la maturation des interneurons GABAergiques du cortex visuel (91). Or, les mécanismes épigénétiques responsables de réguler l'accessibilité de la machinerie transcriptionnelle à la chromatine sont des candidats idéaux pour coupler les stimuli externes à l'expression génique (282).

Dans cette section, nous détaillerons les données pointant vers l'acétylation de la chromatine comme mécanisme de régulation des périodes critiques de plasticité. Puis, nous nous intéresserons à une cible potentiellement intéressante pour manipuler les circuits PV<sup>+</sup> chez l'adulte : l'histone déacétylase 2 (Hdac2).

### 1.4.1 L'acétylation de la chromatine et la régulation des périodes critiques de plasticité

Les modifications post-traductionnelles réversibles des histones formant la chromatine sont au cœur de la modulation de l'expression génique, régulant l'accessibilité aux séquences géniques en modifiant la structure de la chromatine (283) [Figure 8, p. 81]. Une des modifications des histones les plus étudiées demeure l'acétylation : en neutralisant les charges positives des résidus lysines sur les queues libres des histones,

elle diminue l'affinité entre l'ADN et les nucléosomes, ce qui relaxe la structure de la chromatine, et est généralement associée à un état transcriptionnellement actif (284). En fait, les histones acétylées peuvent servir de site de liaison pour des protéines à bromodomaine, qui s'avère être souvent des activateurs transcriptionnels (285). Enfin, il semble que des facteurs de transcription puissent être directement acétylés/déacétylés, ce qui influence alors directement les taux de transcription (286).

L'exposition à la lumière d'animaux élevés dans le noir déclenche une cascade de régulation via la phosphorylation de ERK résultant en l'acétylation et la phosphorylation de l'histone H3 et l'activation de la transcription via le facteur de transcription CREB. Ce changement d'expression génique en lien avec l'expérience sensorielle est spécifique à la phase critique de plasticité, argumentant en faveur d'un rôle de l'acétylation de la chromatine pour réguler le taux de plasticité corticale. Cette hypothèse a été validée par l'utilisation d'inhibiteurs des histones déacétylase, capables d'augmenter les niveaux d'acétylation en inhibant de façon non-sélective l'action des déacétylases. En effet, l'utilisation de la trichostatine A, un inhibiteur non-spécifique ciblant les classes I et II, favorise la plasticité du cortex visuel chez l'adulte (113) alors que le traitement chronique avec deux autres inhibiteurs, l'acide valproïque (cible les classes I et II) et le butyrate de sodium (cible la classe I), en combinaison avec une privation monoculaire, peut rétablir l'acuité visuelle chez un adulte amblyope (114).

Cette réouverture de la période critique de plasticité dans le cortex visuel adulte s'accompagne d'une diminution de la transmission GABAergique ainsi que d'une augmentation du niveau d'acétylation de l'histone 3 dans la région promotrice de *Bdnf*. Argumentant dans le même sens, l'administration systémique de butyrate de sodium, ou l'injection de trichostatine A dans l'hippocampe, augmente l'efficacité de l'extinction de la peur contextuelle (287). Parallèlement, l'utilisation de l'acide valproïque résulte en une augmentation de la maintenance de la mémoire d'extinction dans le temps (288), et est corrélée avec une augmentation de l'acétylation des histones au promoteur ainsi que de l'expression de *Bdnf*. En somme, l'utilisation d'inhibiteurs non-spécifiques des histones déacétylases montre que l'activité des déacétylases, ainsi que la diminution du taux d'acétylation des histones, représente un frein moléculaire diminuant la plasticité corticale au cours du développement.

Toutefois, le fait que les inhibiteurs des Hdacs soient non-spécifiques et agissent de façon systémique empêche d'élucider les rôles spécifiques des Hdacs dans la mémoire de peur et la plasticité. Nous devons donc nous tourner vers l'étude des modèles de souris conditionnelles mutantes pour investiguer l'implication directe des différentes Hdacs dans la régulation des périodes critiques de plasticité. Dans la prochaine section, nous présenterons les différentes Hdacs et ce que nous ont appris les différents modèles conditionnels.

### 1.4.1 Structure et fonctions

L'acétylation des histones, un mécanisme dynamique efficace pour coupler des signaux extracellulaires avec la transcription du génome (289), est le résultat de la balance entre les actions antagonistes de deux grandes familles de protéines. Les groupements acétyles sont ajoutés sur les lysines des queues libres des histones par des histones acétyltransférases tandis qu'ils sont enlevés par les Hdacs. Dans les cellules de mammifères, on retrouve 18 Hdacs différentes qui sont classées en quatre classes principales selon la similarité de leur séquence codante et de leurs fonctions : la classe I dont l'expression est ubiquitaire et nucléaire (Hdac1, 2, 3, 8), la classe II connue pour naviguer entre le noyau et le cytoplasme (Hdac4, 5, 6, 7, 9, 10), la classe III (Sirtuin 1-7) et la classe IV (Hdac11) (290, 291). Alors que l'activité enzymatique des Hdacs 1-11, dont le domaine catalytique est hautement conservé, est dépendante d'un ion zinc, les sirtuines diffèrent et utilisent le NAD<sup>+</sup> (revues (290, 292)).

Les Hdacs sont amenées à des séquences d'ADN soit par liaison directe à des facteurs de transcription spécifiques, soit en étant incorporés à des complexes régulateurs multimériques : les Hdacs ne possèdent pas de domaine de liaison à l'ADN intrinsèque (285, 293). Par conséquent, il faut noter que l'éventail des séquences géniques régulées par une Hdac particulière sera déterminé par le type cellulaire en question ainsi que le spectre de partenaires protéiques disponibles. Alors que les fonctions bien établies des Hdacs sont d'agir en tant que répresseurs transcriptionnels, certaines données spécifiques ont montré qu'elles pouvaient activer la transcription (chez la levure (294-296) et chez les eucaryotes plus complexes (297)). En fait, il peut s'avérer difficile de distinguer les effets primaires des



effets secondaires à l'inhibition des Hdacs et on retrouve un pourcentage équivalent de gènes qui seront réprimés à ceux qui seront activés (297-299).

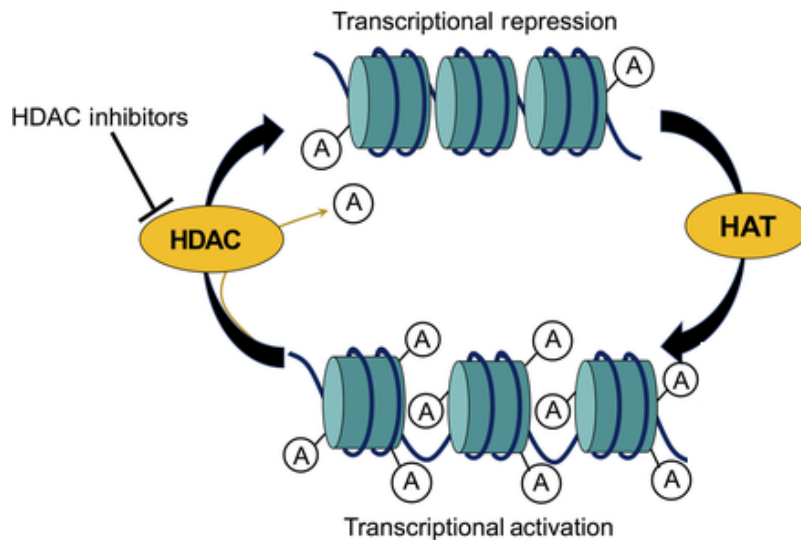


Figure 8. – **Représentation schématique de la régulation de l'acétylation des histones de la chromatine.**

Le niveau d'acétylation des histones est le résultat de l'équilibre entre l'activité des histones acétyltransférases (Hat) et celle des histones déacétylases (Hdac). En présence d'inhibiteurs enzymatiques des Hdacs, l'équilibre est déplacé vers l'acétylation des histones qui est généralement associée avec un état transcriptionnel actif.

Adapté de Begum, M. R., *Journal of Neurochemistry*, 2017(300).  
Reproduction avec permission.

Alors que les autres Hdacs ont des patrons d'expression et des cibles protéiques variées (voir revue (290)), les Hdacs de la classe I sont exprimées de façon ubiquitaire, se retrouvent principalement dans le noyau cellulaire et ciblent principalement les histones, ce qui laisse à penser à une certaine redondance fonctionnelle entre ses membres. Or, les diverses souris mutantes *null* pour chacune des Hdacs de la classe I prouvent que chacune possède des rôles distincts dans la régulation de programmes transcriptionnels spécifiques. La souris *Hdac1null* décède avant le jour embryonnaire

10,5, témoignant de gros retards de prolifération et de croissance (299, 301). La souris *Hdac2null* quant à elle décède le jour de sa naissance en raison de malformations cardiaques sévères attribuées à une prolifération excessive (299). Toutefois, la souris *knockin/knockout* en raison d'une insertion de *lacZ* dans *Hdac2* a été rapportée comme viable (302). Pour expliquer cette controverse, on peut penser à des différences en raison du fond génétique employé, ou encore à une fuite d'expression de *Hdac2* suffisante pour assurer la viabilité.

Les souris conditionnelles ont permis d'investiguer les rôles des *Hdac1* et *Hdac2* plus tard au cours du développement et ont montré une redondance fonctionnelle entre les deux isoformes au cours du développement cardiaque et nerveux. En effet, alors que l'inactivation d'un seul des deux isoformes à partir du stade des cellules souches neurales (*GFAP\_Cre*) ne cause pas de défaut histo-architectural frappant, l'inactivation complète de *Hdac1* et de *Hdac2* entraîne des défauts importants du développement du cortex, de l'hippocampe et du cervelet attribués à des défauts de différenciation des progéniteurs, entraînant l'apoptose (303). Alors que les deux isoformes sont fortement exprimées au niveau des cellules souches neurales et des progéniteurs neuronaux, leurs patrons d'expression divergent au fur et à mesure de la différenciation, *Hdac1* étant plus exprimé dans les cellules gliales alors que *Hdac2* se confine aux neurones (304, 305). Toutefois, on retrouve une expression nette de *Hdac1* au niveau des neurones de l'hippocampe (306), alors que son expression nucléaire dans les neurones corticaux fait l'objet d'un débat.

### 1.4.2 Hdac1 et la plasticité corticale

Le rôle de Hdac1 dans la plasticité corticale régulée par l'expérience a été investiguée au niveau du cortex somatosensoriel. Chez des souris dont les vibrisses ont été coupées dès leur jeune âge, on retrouve une augmentation de l'expression et de l'activité de Hdac1 avec une diminution corrélée de l'expression de *Bdnf* et de *PV*. Des essais d'immunoprécipitation ont montré une liaison directe entre Hdac1 et le promoteur de *Bdnf* et *Pvalb* de même qu'une augmentation de la déacétylation des histones suite à la coupe des vibrisses. Le *knockdown* de *Hdac1* est suffisant pour rétablir l'expression de ces deux gènes. Ces données proposent donc un modèle selon lequel Hdac1 joue un rôle dans la maturation des circuits PV<sup>+</sup> à la fois via la régulation de l'expression de neurotrophines comme *Bdnf*, et à la fois via la régulation épigénétique de gènes importants pour ses fonctions, comme *Pvalb* (307).

### 1.4.3 Hdac2 et la mémoire de peur

Il est évident que Hdac2 régule fortement de la mémoire et de l'apprentissage. Hdac2 est surexprimée dans le cas de la maladie de Alzheimer, que ce soit chez l'humain ou chez la souris, et son inhibition diminue les symptômes chez le modèle murin (308). Alors que le *knock-out* embryonnaire neuronal de *Hdac2* (*Nestin\_Cre;Hdac2<sup>lox/lox</sup>*) augmente les capacités d'apprentissage dans le labyrinthe de Morris et lors du conditionnement de la peur, qu'elle soit contextuelle ou auditive, sa surexpression réduit les performances mnémoniques (309). L'étude plus approfondie de ces modèles murins a montré l'importance de Hdac2 pour la synaptogénèse et la plasticité synaptique. L'inactivation de *Hdac2* augmente le nombre d'épines dendritiques ainsi que

l'immunoréactivité pour la synaptophysine, un marqueur fonctionnel présynaptique, sur les neurones pyramidaux de l'hippocampe et de l'amygdale, alors que sa surexpression entraîne des déficits (309). De plus, un simple train de stimulation à haute fréquence est capable d'induire une potentialisation à long terme chez les souris déficientes en *Hdac2* alors qu'il est inefficace chez les souris sauvages. À l'opposée, lorsque deux séries de stimulation à haute fréquences entraînent une LTP chez les souris sauvages, cette stimulation est sans conséquence chez celles surexprimant *Hdac2*. Les études transcriptomiques ont permis d'identifier des cibles de *Hdac2*, principalement des gènes associées à la plasticité synaptiques ainsi que des gènes régulés par l'activité neuronale (309). Ces données ont permis de conclure que *le knockout spécifique de Hdac2 dans le cerveau restreint la formation de synapses excitatrices, régulant l'expression des gènes importants pour la plasticité synaptique. De plus, l'inactivation génétique de Hdac2 facilite l'apprentissage et la mémoire à long terme.*

Afin d'investiguer les types cellulaires impliqués dans ce phénotype, un mutant conditionnel spécifique aux neurones pyramidaux postnataux du cerveau antérieur a été généré (*CaMKII\_Cre;Hdac2<sup>lox/lox</sup>*) (310). Alors que l'inactivation de *Hdac1* ne semble pas avoir d'effet particulier, l'ablation de *Hdac2* résulte en une augmentation de la LTP dans l'hippocampe ainsi que l'augmentation de la mémoire de peur, qu'elle soit contextuelle ou auditive, et du rythme d'extinction des souvenirs de peur. Toutefois, cette diminution dans le comportement de peur suite à la présentation du stimulus conditionné n'est pas maintenue dans le temps et chez ces animaux conditionnels, on observe la résurgence spontanée du comportement de peur au même niveau que les animaux sauvages.

*Ainsi, étant donné le rôle primordial de l'inhibition générée par les circuits PV<sup>+</sup> dans la plasticité cérébrale et la capacité d'adapter le comportement en fonction des changements environnementaux, nous nous sommes demandé si l'ablation de Hdac2 seulement dans les cellules PV<sup>+</sup> postnatales, en utilisant la souris PV\_Cre (311), serait suffisante pour augmenter la plasticité de la mémoire émotionnelle et à maintenir les souvenirs d'extinction dans le temps.*

## 1.5 Hypothèse et objectifs

L'équilibre du cerveau adulte lui confère des caractères essentiels aux fonctions de haut niveau telles que la cognition et les apprentissages. Toutefois, des situations exceptionnelles peuvent nous amener à vouloir pousser les capacités d'adaptation du cerveau adulte afin de promouvoir la réhabilitation.

Réduire les capacités d'inhibition des interneurones GABAergiques, les interneurones PV<sup>+</sup> en particulier, constitue une stratégie de choix afin de donner des caractères juvéniles à la plasticité cérébrale adulte. Toutefois, il reste à déterminer par quels moyens cette entreprise peut demeurer dans l'ordre des possibles. En effet, des expériences élégantes ont permis d'identifier des mécanismes moléculaires chez les modèles animaux qui représentent autant de leviers avec lesquels on peut manipuler la plasticité cérébrale de l'adulte : toutes semblent pointer vers les fonctions des circuits des interneurones PV<sup>+</sup> comme cible de choix.

Les fonctions des interneurones PV<sup>+</sup> dépendent autant de leur patron de connectivité que de l'environnement extracellulaire dans lequel ils évoluent. En effet, en innervant des centaines de neurones cibles et délivrant une forte inhibition périsomatique en formant de multiples synapses autour de leur corps cellulaire et de leurs dendrites proximales, ils ont été impliqués dans la synchronisation des circuits corticaux et la direction des oscillations gamma. Toute manipulation ciblant cette arborescence axonale complexe pourrait s'avérer efficace à l'augmentation de la plasticité cérébrale en diminuant l'inhibition qu'elle génère. Ainsi, comprendre la signalisation moléculaire

restreignant la croissance de l'arborescence axonale et la formation de boutons fonctionnels au cours de la longue phase développementale qui caractérise les interneurons PV<sup>+</sup> aiderait à identifier des méthodes efficaces afin d'activer cette signalisation moléculaire chez l'adulte. D'un autre côté, comprendre les régulations épigénétiques liées au développement et à la maturation structurelle et fonctionnelle des interneurons PV offrirait une cible de choix afin de dématurer ces circuits inhibiteurs et lever un frein sur la plasticité cérébrale adulte.

Nous avons donc émis l'hypothèse selon laquelle le récepteur p75<sup>NTR</sup> et l'histone déacétylase Hdac2 représentent deux leviers antagonistes sur le niveau de plasticité du cerveau adulte, et ce via leur action sur les interneurons PV<sup>+</sup>.

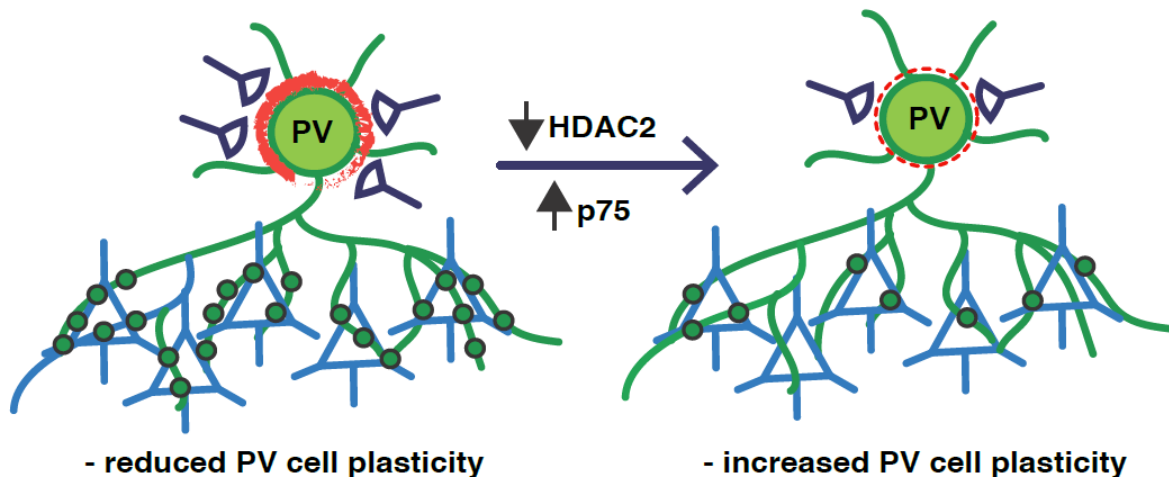


Figure 9. – **Représentation schématique de l'hypothèse de travail.**

L'activation de la signalisation via le récepteur p75<sup>NTR</sup>, ou l'inhibition de Hdac2, chez les interneurons PV<sup>+</sup> entraîne une réduction de leur connectivité efférente (vert) de même qu'une diminution de l'agglomération des filets périneuronaux (rouge) autour de leur corps cellulaire, ce qui favorise la plasticité des circuits PV<sup>+</sup> et par conséquent la plasticité cérébrale.

Figure de Bidisha Chattopadhyaya.

Nous pensons que l'expression du récepteur p75<sup>NTR</sup> dans les interneurons PV<sup>+</sup> au cours de leur développement restreint leur maturation. Ainsi, la signalisation via ce récepteur chez l'adulte serait suffisante pour augmenter la plasticité cérébrale. De l'autre côté, la déacétylation de la chromatine des interneurons PV<sup>+</sup> constitue un frein moléculaire venant restreindre la plasticité au cours du développement. Dès lors, nous pensons que l'inactivation génétique de *Hdac2*, seulement au niveau des interneurons PV<sup>+</sup>, serait suffisante pour augmenter la plasticité cérébrale adulte.

En somme, notre hypothèse de travail est qu'autant l'activation du récepteur p75<sup>NTR</sup> que l'inactivation d'une histone déacétylase, *Hdac2*, chez les interneurons PV<sup>+</sup> du cortex adulte sont indépendamment suffisantes pour remodeler les circuits des interneurons PV<sup>+</sup> et ainsi augmenter la plasticité cérébrale chez l'adulte.



Les objectifs spécifiques de cette étude sont :

- 1) Déterminer si le récepteur p75<sup>NTR</sup> est capable de restreindre, d'une façon autonome à la cellule, la maturation des interneurons PV au cours du développement.
- 2) Évaluer si l'activation du récepteur p75<sup>NTR</sup> sur les interneurons PV<sup>+</sup> du cortex visuel par son ligand proBDNF suffit à augmenter la plasticité, selon le modèle de la dominance oculaire chez l'adulte.
- 3) Évaluer si l'ablation de *Hdac2*, spécifiquement au niveau des interneurons PV<sup>+</sup>, est suffisante pour induire le remodelage des circuits des interneurons PV<sup>+</sup>.
- 4) Évaluer si l'ablation de *Hdac2*, spécifiquement au niveau des interneurons PV<sup>+</sup>, est suffisante pour augmenter la plasticité cérébrale chez l'adulte, en testant la rétention de l'extinction de la mémoire de peur.
- 5) Vérifier si l'inhibition aigüe de l'activité enzymatique de Hdac2 est suffisante pour augmenter la plasticité cérébrale chez l'adulte, à l'aide du modèle de rétention de l'extinction de la mémoire de peur.

## Chapitre 2

# **p75 Neurotrophin Receptor Activation Regulates the Timing of the Maturation of Cortical Parvalbumin Interneuron Connectivity and Promotes Juvenile-like Plasticity in Adult Visual Cortex**

Elie Baho<sup>1,2,#</sup>, Bidisha Chattopadhyaya<sup>1,2,#</sup>, Marisol Lavertu-Jolin<sup>1,2,#</sup>, Raffaele Mazziotti<sup>3</sup>, Patricia N Awad<sup>1,2</sup>, Pegah Chehrazi<sup>1,2</sup>, Marianne Groleau<sup>4</sup>, Celine Jahannault-Talignani<sup>5</sup>, Elvire Vaucher<sup>4</sup>, Fabrice Ango<sup>5</sup>, Tommaso Pizzorusso<sup>3,6</sup>, Laura Baroncelli<sup>3</sup>, Graziella Di Cristo<sup>1,2,\*</sup>.

### *Affiliations:*

1. Department of Neurosciences, Université de Montréal, Montréal, Québec H3T 1J4, Canada.
2. Centre de Recherche, CHU Sainte-Justine, Montréal, Québec, H3T 1C5, Canada.
3. Institute of Neuroscience CNR, 56124 Pisa, Italy.
4. École d'Optométrie, Université de Montréal, Montréal, Québec H3T 1P1, Canada
5. Institute de Génétique Fonctionnelle – CNRS – 34090 Montpellier, France
6. Department of Neuroscience, Psychology, Drug Research and Child Health NEUROFARBA, University of Florence, Firenze, Italy

# These authors contributed equally to the study

\*Corresponding author

Graziella Di Cristo,

Department of Neurosciences, Université de Montréal,  
Centre de Recherche, CHU Sainte-Justine,  
3175, Côte-Sainte-Catherine, Montréal, QC H3T 1C5, Canada.  
E-mail: graziella.dicristo@recherche-ste-justine.qc.ca.

**Published: Baho E, Chattopadhyaya B, Lavertu-Jolin M, et al., J  
Neurosci. 2019 Jun 5;39(23):4489-4510.**

## 2.1 Author contribution:

Pour la publication de cet article, les premiers co-auteurs ont travaillé en étroite collaboration sous la supervision de Dre Graziella Di Cristo. Au niveau expérimental, voici la contribution de chacun des auteurs :

Comme le niveau d'expression du récepteur p75<sup>NTR</sup> chez les interneurones exprimant la PV est très faible, les méthodes classiques d'étude d'expression par immunofluorescence ou par Western blot sur extraits totaux n'ont pas permis d'adresser la question concernant l'expression du récepteur chez les interneurones PV<sup>+</sup>. Pour ce faire, Marisol Lavertu Jolin a étudié le patron d'expression de p75<sup>NTR</sup> par hybridation *in situ*. Elle a donc développé dans le laboratoire et validé la technique de RNAscope, permettant une détection spécifique et quantitative des molécules d'ARN messenger de façon spécifique à la cellule, a mis au point les méthodes de préparation des échantillons et approfondi les techniques d'imagerie requises. Ainsi, le travail de Marisol a permis de renforcer les données arguant pour l'expression du récepteur p75<sup>NTR</sup> par les interneurones PV<sup>+</sup>, données nécessaires à la publication du manuscrit. Les résultats sont présentés aux figures 1 et 2.

L'étude du patron d'expression protéique du récepteur p75<sup>NTR</sup> à l'aide de la technique de ligation par proximité a été rendu possible grâce au travail de Céline Jahannault-Talignani et Fabrice Ango. Les résultats sont présentés à la figure 1 et 3.

Toutes les expériences en culture organotypique ont principalement été faites par Élie Baho et Bidisha Chattopadhyaya. Élie et Marisol ont collaboré pour les analyses de reconstruction morphologiques des arborescences axonales des diverses expériences. Élie et Bidisha ont analysés et présentés les résultats des figures 4, 5, 6, 8 et 10.

Les expériences présentées à la figure 5 ont été possibles à la suite du clonage par Marisol de la région codante de p75<sup>NTR</sup> à partir d'une banque de cDNA construite à partir d'une extraction d'ARNm de cerveau de souris contrôle. Marisol a aussi été responsable du sous-clonage de p75<sup>NTR</sup> ainsi que de p75<sup>NTR</sup> $\Delta$ DD dans le vecteur d'expression P<sub>G67</sub> utilisé pour transférer les interneurones PV<sup>+</sup> en culture organotypique. Elle a fait les cultures organotypiques, transfecté les constructions d'ADN nouvellement construites, acquis les données en imagerie confocale, procédé aux reconstructions morphologiques, analysés et présenté les résultats. La surexpression de ces deux constructions en cellules p75<sup>-/-</sup> a permis d'identifier d'abord que la région codante de p75<sup>NTR</sup> est suffisante pour le rétablissement du développement des interneurones PV<sup>+</sup> p75<sup>-/-</sup>, puis que le domaine intracellulaire de p75<sup>NTR</sup> est nécessaire à la restriction de la maturation de l'arborescence axonale des interneurones PV<sup>+</sup> en culture organotypique. Les résultats sont présentés à la figure 5.

Marisol a produit la figure 7 en validant d'abord par Western Blot la spécificité des anticorps anti-mBDNF disponibles à l'aide d'extraits de cerveau provenant d'animaux *CAMKII\_Cre;BDNF<sup>lox/lox</sup>*, puis en préparant les échantillons de cultures organotypiques traitées et en évaluant l'impact de l'ajout de PPACK et de tPA en milieu de culture sur les niveaux de mBDNF, validant ainsi les expériences présentées en Figure 8.

Pegah Chehrazhi a adressé la question de l'expression des filets périneuronaux chez les animaux conditionnels mutants pour le récepteur p75<sup>NTR</sup>, dont les résultats sont présentés à la figure 9. Elle a perfusé les animaux contrôles et mutants, collecté les tranches, fait les immunofluorescence, acquis et analysé les données en imagerie confocal. Pegah et Bidisha ont présenté les résultats à la figure 9.

Pour répondre à la question à savoir si l'activation du récepteur par proBDNF résulte en une augmentation de l'agglomération des filets périneuronaux autour des interneurons PV<sup>+</sup> et affecte leurs synapses efférentes, Élie a fait les chirurgies nécessaires à l'implantation de mini-pompes pour infuser mut-proBDNF au niveau du cortex visuel d'animaux contrôles et *PV\_Cre;p75<sup>NTR</sup> lox/lox*. Il a perfusé les animaux, Marisol a préparé les tranches de cerveau, Élie a fait les immunofluorescences contre PV et PNN, acquis les images en microscopie confocale ainsi que l'analyse des données. Les résultats sont présentés à la figure 11.

Finalemment, pour valider l'hypothèse selon laquelle l'activation de la voie de signalisation proBDNF- p75<sup>NTR</sup> chez les interneurons PV<sup>+</sup> est suffisante pour augmenter la plasticité du cerveau adulte, des enregistrements du cortex visuel in vivo ont été faits sur des animaux contrôles et conditionnels mutants pour p75<sup>NTR</sup> suite à l'infusion de mut-proBDNF. Le groupe composé de Raffaele Mazziotti, Marianne Groleau, Elvire Vaucher, Tommaso Pizzorusso et Laura Baroncelli ont montré que l'infusion de proBDNF chez des animaux contrôles adultes était suffisante pour augmenter la plasticité du cortex visuel suite à la privation monoculaire. Les résultats recueillis sont présentés à la figure 12.

Élie, Marisol, Bidisha et Graziella ont collaboré au design expérimental de l'étude. Élie, Marisol, Bidisha et Graziella ont analysé et présenté les résultats obtenus. Élie, Bidisha et Marisol ont contribué à l'écriture du manuscrit et à son édition.

## 2.2 Acknowledgments

We thank Drs. Graçielia Pineyro (CHU Ste. Justine, Montreal), Elsa Rossignol (CHU Ste. Justine, Montreal), Nathalie Sanon (CHU Ste. Justine, Montreal), (Dr. Keith Murai (CRN, McGill University, Montreal) and Dr. Agustin Anastasia (INIMEC-CONICET –Universidad Nacional de Cordoba, Argentina) for their insightful suggestions, Dr. Louis Reichardt (USF) for providing reagents, Dr. Vesa Kartineen (UMichigan) for the p75NTR<sup>lox</sup> mouse, Dr. Phil Barker (UBC, Vancouver) for the anti-p75NTR antibody and JF Cloutier (MNI, Montreal) for the p75NTR KO mice. We would like to thank Josianne Nuñez Carriço and Menna Murrah for their technical assistance as well as the Comité Institutionnel de Bonne Pratiques Animales en Recherche (CIBPAR), the personnel of the animal facility and of the Plateforme Imagerie Microscopique (PIM) of the Research Center of CHU Sainte-Justine for their instrumental technical support. This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research (G.DC), Canada Foundation for Innovation (G.DC), Canada Research Chair Program (G.DC). E.B. and M.J-L were supported by FRQS fellowship. B.C. was supported by CHU Sainte-Justine Foundation.

## 2.3 Abstract

By virtue of their extensive axonal arborisation and perisomatic synaptic targeting, cortical inhibitory Parvalbumin (PV) cells strongly regulate principal cell output and plasticity and modulate experience-dependent refinement of cortical circuits during development. An interesting aspect of PV cell connectivity is its prolonged maturation time course, which is completed only by end of adolescence. The p75 neurotrophin receptor (p75NTR) regulates numerous cellular functions, however its role on cortical circuit development and plasticity remains elusive, mainly because localizing p75NTR expression with cellular and temporal resolution has been challenging.

By using RNAscope and a modified version of the Proximity Ligation Assay, we found that p75NTR expression in PV cells decreases between the second and fourth postnatal week, at a time when PV cell synapse numbers increase dramatically. Conditional knockout of p75NTR in single PV neurons *in vitro* and in PV cell networks *in vivo* causes precocious formation of PV cell perisomatic innervation and perineural nets around PV cell somata, therefore suggesting that p75NTR expression modulates the timing of maturation of PV cell connectivity in the adolescent cortex.

Remarkably, we found that PV cells still express p75NTR in adult mouse cortex of both sexes and that its activation is sufficient to destabilize PV cell connectivity and to restore cortical plasticity following monocular deprivation *in vivo*. Altogether, our results show that p75NTR activation dynamically regulates PV cell connectivity, and represents a novel tool to foster brain plasticity in adults.



## 2.4 Significance statement

In the cortex, inhibitory, GABA-releasing neurons control the output and plasticity of excitatory neurons. Within this diverse group, parvalbumin-expressing (PV) cells form the larger inhibitory system. PV cell connectivity develops slowly, reaching maturity only at the end of adolescence, however the mechanisms controlling the timing of its maturation are not well understood. We discovered that the expression of the neurotrophin receptor p75NTR in PV cells inhibits the maturation of their connectivity in a cell autonomous fashion, both *in vitro* and *in vivo* and that p75NTR activation in adult PV cells promotes their remodelling and restores cortical plasticity. These results reveal a new p75NTR function in the regulation of the time course of PV cell maturation and in limiting cortical plasticity.

## 2.5 Introduction

Within the forebrain, GABAergic interneurons possess the largest diversity in morphology, connectivity, and physiological properties. The large majority of cortical parvalbumin (PV)-positive interneurons specifically target the soma and proximal dendrites of pyramidal cells, and have been implicated in synchronizing the firing of neuronal populations and generating gamma oscillations (Cardin et al., 2009; Sohal et al., 2009; Takada et al., 2014), which are important for perception, selective attention, working memory and cognitive control in humans and rodents (Fries et al., 2001; Howard et al., 2003; Cho et al., 2006; Fries, 2009). PV cells are also involved in experience-dependent refinement of cortical circuits during postnatal development, or critical period plasticity. Indeed, many studies, in particular in sensory cortices, have demonstrated that the timing of critical period plasticity is set by PV cell maturation (Fagiolini and Hensch, 2000; Fagiolini et al., 2004; Di Cristo et al., 2007; Sugiyama et al., 2008; Kobayashi et al., 2015). Several lines of evidence suggest that alterations in PV cell function cause neuronal dysfunctions relevant for clinical features of psychiatric disorders such as schizophrenia (Cho et al., 2015; Do et al., 2015; Dienel and Lewis, 2018). Furthermore, reducing GABAergic inhibition has been shown to partly restore juvenile-like plasticity in adult visual cortex (Harauzov et al., 2010; Beurdeley et al., 2012), opening the enticing possibility that targeting specific aspects of GABAergic circuits might be exploited as a strategy for promoting rehabilitation in adults.

PV cell function relies on its pattern of connectivity: they innervate hundreds of postsynaptic targets with multiple synapses clustered around the cell body and proximal dendrites. In addition, PV cell connectivity has a prolonged developmental time course,

plateauing towards the end of adolescence (Chattopadhyaya et al., 2004). Recent studies have started to explore the molecular players underlying this unique innervation pattern, either in a cell-autonomous (Chattopadhyaya et al., 2007, 2013; Del Pino et al., 2013; Kobayashi et al., 2015) or cell non-autonomous fashion (Huang et al., 1999; Kohara et al., 2007; Sugiyama et al., 2008). Conversely, the involvement of inhibitory mechanisms in the establishment of PV cell connectivity during development is less clear. In addition, it is unknown whether similar inhibitory molecular mechanisms could be recruited in the adult brain to reduce PV cell connectivity, and in parallel, increase experience-dependent plasticity.

The neurotrophin receptor p75NTR is a multifunctional receptor modulating several critical steps in nervous system development and function, from apoptosis to synaptic plasticity (Lin et al., 2015). In particular, it has been shown that p75NTR interaction with the precursor form of BDNF, proBDNF, or with the prodomain alone, induces growth cone collapse and dendritic spine remodelling in hippocampal excitatory neurons (Anastasia et al., 2013; Giza et al., 2018) and alterations in this process may lead to long-term cognitive dysfunctions (Giza et al., 2018). Due to the difficulty in pinpointing p75NTR localisation in cortical tissue with temporal and single cell resolution, whether and how p75NTR plays a role on cortical GABAergic circuit development is not clear.

Using RNAscope and Proximity Ligation Essay, here, we show that cortical PV cells expressed p75NTR and that its expression level decreased during the maturation phase of PV cell connectivity. Conditional knockout of p75NTR in single PV cells promoted the formation of their perisomatic innervation in cortical organotypic cultures. This effect was mimicked by transfection of a p75NTR dominant negative form in wild-type PV cells and

was rescued by expression of p75NTR in p75NTR<sup>-/-</sup> PV cells. Conversely, increasing p75NTR signalling strongly reduced PV cell connectivity, both in young and mature organotypic cortical cultures. Further, conditional knockout of p75NTR in GABAergic cells derived from the medial ganglionic eminence promoted the precocious formation of PV cell perisomatic innervation and perineural nets (PNN) around PV cell somata *in vivo*. Finally, we observed that p75NTR activation in PV cells destabilized their innervation, dramatically reduced PNN density and intensity and promoted ocular dominance plasticity in adult visual cortex.

## 2.6 Methods and materials

### 2.6.1 Mice

Organotypic cortical cultures were prepared from C57Bl6 (Jackson Labs) or p75NTR<sup>lox/lox</sup> mice (Bogenmann et al., 2011), kindly provided by Dr. Vesa Kaartinen. In this mouse, exons 4-6 of p75NTR, which encode the transmembrane and all cytoplasmic domains, are flanked by two loxP sites. *PV\_Cre; p75NTR<sup>lox/lox</sup>* mice were generated by crossing p75NTR<sup>flx</sup> with PV\_Cre mice (Hippenmeyer et al., 2005; Jackson Laboratory, B6.129P2-Pvalb<sup>tm1(cre)Arbr/J</sup>, stock# 017320, RRID:IMSR\_JAX:017320). Cell-specificity of Cre-mediated recombination was analyzed by breeding PV\_Cre with RCE<sup>EGFP</sup> mice (*Gt(ROSA)26Sor<sup>tm1.1(CAG-EGFP)Fsh/Mjax</sup>*; Jackson laboratory stock#32037). This latter line carries a loxP-flanked STOP cassette upstream of the EGFP gene. Removal of the loxP-flanked STOP cassette by Cre-mediated recombination drives EGFP reporter expression. p75NTR<sup>lox/lox</sup> and p75NTR<sup>+/+</sup> mice were analyzed separately in all performed experiments; however, as we did not find any difference between these two genotypes in any experiments (t-test or Mann Whitney test,  $p > 0.1$ ), we pooled them together and indicated them as p75NTR<sup>Ctrl</sup>.

### 2.6.2 Cortical organotypic culture and biolistic transfection

Slice culture preparation was performed as in (Chattopadhyaya et al., 2004, 2013) using mice pups of either sex. Briefly, postnatal day 3 (P3) to P5 mice were decapitated, and brains were rapidly removed and immersed in culture medium, containing DMEM (Life Technologies, cat#11575-032), 20% horse serum (Life Technologies, cat#26050-088), 1 mM glutamine (Invitrogen, cat# 25030-081), 13 mM glucose (Sigma, cat#G5767), 1 mM

CaCl<sub>2</sub> (Sigma cat# C3881), 2 mM MgSO<sub>4</sub> (Sigma cat# M2773), 0.5 µm/ml insulin (Sigma cat# I5500), 30 mM HEPES (Sigma cat#H4034), 5 mM NaHCO<sub>3</sub> (Sigma cat#S5761) and 0.001% ascorbic acid (Sigma cat# A4544). Coronal brain slices, 400 µm thick, were cut with a chopper (Stoelting, Wood Dale, IL). Slices were then placed on transparent Millicell membrane inserts (Millipore, Bedford, MA Cat # PICM0RG0), usually 2-4 slices/insert, in 30 mm Petri dishes containing 750 µl of culture medium. Finally, they were incubated in a humidified incubator at 34°C with a 5% CO<sub>2</sub>-enriched atmosphere, and the medium was changed three times per week. All procedures were performed under sterile conditions.

Biolistic transfection was performed as described in (Chattopadhyaya et al., 2013). Constructs were incorporated into “bullets” that were made using 1.6 µm gold particles (Bio-Rad, Cat#1652264) coated with 25-30 µg of each of the plasmids of interest. When a gold particle coated with multiple constructs enters the neuron, all the constructs are co-expressed within the same cell since they are driven by the same P<sub>G67</sub> promoter. P<sub>G67</sub>\_GFP was originally generated by subcloning of a 10 kb region of *Gad1* gene promoter by gap repair in front of the GFP coding region in pEGFP (Clontech)(Chattopadhyaya et al., 2004). We have previously shown that this promoter is expressed mostly by PV cells, when transfected in cortical organotypic cultures with a Gene Gun (Chattopadhyaya et al., 2004, 2007, 2013). Bullets were used to transfect organotypic slices using a gene gun (Bio-Rad, Hercules, CA, Cat#1652411) at high pressure (180ψ), and the transfected slices were then incubated for 6-8 days, under the same conditions as described above, before imaging. To label control PV cells, slices were transfected with P<sub>G67</sub>\_GFP bullets, while p75NTR<sup>-/-</sup> PV cells were generated by

transfecting slices with both P<sub>G67</sub>\_GFP and P<sub>G67</sub>\_Cre. Age of cultures was indicated in equivalent postnatal (EP) days; for example EP10 cultures were prepared at P4 and then kept 6 days *in vitro*.

Recombinant mouse proneurotrophin, proBDNF (wt-proBDNF, 10 ng/ml, Alomone Labs, Cat#B-240) and cleavage resistant, recombinant mouse proBDNF (mut-proBDNF, 10 ng/ml, Alomone Labs, Cat#B-243) were respectively added with the culture medium during the specific time window indicated in the results section. To either disrupt or promote the cleavage of endogenous proBDNF induced by tissue plasminogen activator (tPA), the tPA inhibitor peptide, PPACK (50  $\mu$ M, Molecular Innovations, Cat# PPACK) or the active mouse tPA recombinant protein (0.6  $\mu$ g/ml, Molecular Innovations, Cat# MTPA) were respectively added within the culture medium. Every experimental data was repeated at least twice, using culture batches prepared in different days.

### **2.6.3 Western Blots**

Each sample corresponded to 6 organotypic cultures pooled together. In addition, control (Ctrl) samples were collected from every mouse used for organotypic cultures. Samples were quickly frozen in nitrogen and stored at -80°C until protein extraction procedure. Samples were dissociated in lysis buffer (2mM EDTA, 1% Igepal C-630 in TBS (50mM Tris, 150mM NaCl, pH7,6)) containing protease inhibitor (Roche, Cat# 11 836 153 001) and phosphatase inhibitor (Roche, Cat# 04 906 845 001) cocktails at 4°C, centrifuged 10 min at 10 000g/ 4°C, and the supernatants were dosed with Bradford buffer (Bio-Rad, Cat# 5000006). All samples used for western blot analysis of a specific protein were run on the same gel. Samples were diluted at the same concentration in Laemmli solution (20% glycerol, 4 % SDS, 10% 2,6-mercaptoethanol, 0,02%

bromophenol blue in 125mM Tris, pH6,8) and boiled at 95°C for 5 min. 20 µg of protein were migrated on precast gel, 4-15% acrylamide (Bio-Rad, Cat#456-1086) at 185V for 40 min. The proteins were transferred to a PVDF membrane (Millipore, Cat#IPVH00010) at 100V for 30 min in transfer buffer (20% methanol, 192mM glycine in 25mM Tris). The membranes were blocked in 5 % blocking solution (Bio-Rad, Cat#170-6404) in TBS/T during 2h at RT. Membranes were then probed with anti-mBDNF (1:200; Santa Cruz, Cat#sc-546, RRID: AB\_630940) and anti-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, 1:8000 (GAPDH, mouse monoclonal IgG; Thermo Fisher Scientific, Cat#AM4300, RRID:AB\_2536381) in 5% blocking solution/TBST (0,1% tween in TBS) overnight at 4°C. The membranes were washed in TBST (3 x 15 min at RT) and probed with the following secondary antibodies, anti-mouse-HRP (1:6500, Sigma-Aldrich Cat#A4416, RRID:AB\_258167) and anti-rabbit-HRP (1:10000, Abcam, Cat# ab6721, RRID:AB\_955447), for 2h at RT. The membranes were washed in TBST (3 x 15 min) and revealed with ECI (PerkinElmer, Cat#NEL\_103001EA).

Membranes were exposed to Bioflex MSI autoradiography / X-ray film for different time intervals, and only the films that showed easily identifiable, but not saturated, bands for every sample were used for quantification, using ImageJ software (RRID:SCR\_003070; <http://imagej.nih.gov/ij>). *Background mean grey value was subtracted and then values were normalized on GAPDH mean grey value.* The average of normalized mean grey value of control experiments was calculated and assigned a value of 1. The normalized values of the PPACK and tPA treatments were then expressed as the relative of the control samples. Specificity of the anti-BDNF antibody was verified using brain lysates from CaMKII\_Cre;BDNF<sup>lox/lox</sup> and their BDNF<sup>lox/lox</sup> adult littermates .



In addition, we tested the following anti-proBDNF antibodies: chicken anti-proBDNF (Millipore, Cat#AB9042, RRID:AB\_2274709), rabbit-anti-proBDNF (Alomone Labs, Cat#ANT-006, RRID:AB\_2039758) and guinea-pig-anti-proBDNF (Alomone Lab, Cat#AGP-032, RRID:AB\_2340967). However, in our hands, we could still detect the proBDNF band in lysates from CaMKII\_Cre; BDNF<sup>lox/lox</sup> mice, therefore we could not confirm their specificity and did not use them further in our studies.

#### **2.6.4 Proximity Ligation Assays (PLA)**

Mice of both sexes were anaesthetized and transcardially perfused with saline (0.9% NaCl) followed by 4% paraformaldehyde (PFA, Sigma-Aldrich, cat# P6148) in phosphate buffer (PB) 0.1M, pH 7.4. After extraction, brains were incubated in 4% PFA/PB overnight at 4°C. Sagittal sections, 60 µm thick, were blocked with 10 % horse serum and permeabilized with 0.2% Triton X-100 at room temperature. Experiments were then performed according to the manufacturer's instructions (Duolink® & PLA® Technology, Olink-Bioscience, Uppsala, Sweden). Briefly, sections were incubated with goat-anti p75NTR antibody (1:300, R&D Systems, Cat#AF1157, RRID:AB\_2298561) in 0.1% Triton and 5% horse serum at 4°C for 24-36 hours. PLA probes anti-goat plus and minus, which are secondary antibodies conjugated with oligonucleotides, were added and incubated for 1 h at 37°C in Antibody diluent (Sigma-Aldrich, Cat#DUO82015). Amplification template oligonucleotides were hybridized to pairs of PLA and circularized by ligation. The hence formed DNA circle was then amplified using rolling circle amplification and detection of the amplicons was carried out using the 624 Duolink *in situ* detection kits, resulting in red fluorescence signals. All the steps were done exactly as described in the provided manufacturer protocol. Sections were mounted and were

analyzed under a 40X oil immersion objective using a confocal microscope (Zeiss LSM 780 or Leica TCS SP8 X). Distinct bright spots contained within an area of the section designated by the experimenter were counted using an ImageJ macro. Briefly, for each image, we determined a pre-sized region of interest (ROI) that was applied for all images. Then, we performed segmentation by thresholding in order to generate binary images from each selection. The same threshold was applied to all images acquired during the same imaging session. The number of individual points was quantified using the macro “analyze particles” of ImageJ (RRID:SCR\_003070). The “Analyze Particles” feature was applied with a minimum area of 15 pixels to calculate numbers and total areas of identified objects. Data were exported to GraphPad Prism (RRID:SCR\_002798) for further analysis. For colocalization analysis, we used the Mander’s split coefficient to identify the fraction of PLA spots that colocalized with PV+ boutons. We confirmed by using the Costes randomization method with 100 iterations that any colocalization was more than expected from randomly distributed fluorophores (ImageJ colocalization analysis with JACop macro (Bolte, Cordelieres, 2007)). Each colocalization between PV and PLA signals were further verified manually using IMARIS software by an experimenter blind to the genotype. Each experiment was repeated 3 times. Specificity of anti-p75NTR antibody was tested by performing immunofluorescence staining in an adult p75NTR KO mouse and its wild-type littermate, kindly provided by Dr. JF Cloutier (data not shown).

### **2.6.5 Fluorescent multiplex RNAscope**

Mice of both sexes were anaesthetized and perfused with saline (0.9% NaCl) followed by 4% PFA/PB, as described above. Brains were dissected and post-fixed in 4%

PFA/PB for 24 hrs at 4°C, cryoprotected first in 15% and then in 30% sucrose in PBS and embedded in OCT. Brain sections (15 µm) were cut using a cryostat (Leica) and mounted on superfrost plus gold glass slides (Fisher Scientific #22-035-813). Slides were subsequently stored at -80°C. Probes against Ngfr mRNA (494261), which codes for p75NTR, and Pvalb mRNA (421931-C2), which codes for parvalbumin, as well as all other reagents for *in situ* hybridization and DAPI labeling, were purchased from Advanced Cell Diagnostics (ACD, Newark, CA). The tissue pretreatment, hybridization, amplification, and detection were performed according to User Manual for Fixed Frozen Tissue (ACD). During RNAscope hybridization, positive probes (Cat#320881), negative probes (Cat#320871) and Pvalb/Ngfr probes were processed simultaneously. Briefly, the slides were removed from -80°C and rinsed with PBS to remove OCT. After they were submerged into 1X Target retrieval solution (Cat#322000) for 5 min at 100°C, and then rinsed in distilled water followed by 100% EtOH dip to remove access water. Protease III (Cat#322337) was added to each section and incubated for 30 min at 40°C followed by washing in distilled water. For detection, probes were added to each section and incubated for 2 hr at 40°C. Unbound probes were subsequently washed away by rinsing slides in 1X wash buffer (Cat#310091). AMP reagents (AMP1 Cat#320852, AMP2 Cat#320853, AMP3 Cat#320854, AMP4A Cat#320855, C1 probes-Alexa-488; C2 probes-Atto-550) were added to each section and incubated for as per manufacturer's instructions, and washed in wash buffer for 2 min. Sections were stained with DAPI (Cat #320858) for 30 s, and then mounted with Prolong Gold Antifade Mountant (Invitrogen, Cat#P36961). Images were acquired with a Leica DMI8 microscope, using a HC PL APO 40x/0.85 DRY objective, voxel size: 0,163µm x 0,163µm x 0,346µm, and deconvolved using Huygen's express deconvolution option. The figures represent the

maximum projection of acquired z-stack. This experiment was performed using tissue from three different mice for each age point (two and eight postnatal weeks).

### **2.6.6 Immunohistochemistry**

Cortical organotypic cultures were fixed in 4% PFA/PB (pH 7.4) overnight at 4°C, then washed in PBS (3x10'), freeze-thawed in 30% sucrose/PBS, washed in PBS (3x10') and immunostained as previously described (Chattopadhyaya et al., 2004).

Mice of both sexes were perfused with saline (0.9% NaCl) followed by 4% PFA/PB (pH 7.4). Brains were then removed and post-fixed overnight at 4°C in the same fixative solution, cryoprotected in 30% sucrose/PBS for 1 to 2 days, then frozen in Tissue Tek (Leica Microsystem, Canada inc, cat#3801480). 40µm thick brain slices were obtained using a cryostat (Leica). The following primary antibodies were used: NeuN (mouse monoclonal, 1:400, Millipore; Cat#MAB377, RRID:AB\_2298772), PV (mouse monoclonal, 1:5000, Swant, Cat#235, RRID:AB\_10000343), PV (Rabbit polyclonal, 1:5000, Swant, Cat# PV25, RRID:AB\_10000344), vesicular GABA transporter (vGAT, Rabbit polyclonal, 1:400, Synaptic Systems, Cat#131003, RRID:AB\_887869), gephyrin (mouse monoclonal, 1:500, Synaptic Systems, Cat#147021, RRID:AB\_2232546). Briefly, brain slices were incubated in a blocking solution, containing 10% Normal Goat Serum (NGS, Life Technologies Cat#10000C) and 1% Triton in PBS for 2 hrs at room temperature (RT), followed by incubation with the primary antibodies (specific concentrations described above) in 5% NGS, 0.1% Triton in PBS for 24-48 hrs at 4°C. Slices were then washed in PBS (3 x10'), incubated with the appropriate Alexa555-conjugated or Alexa633-conjugated antibodies (Molecular Probes, 1: 400) in 5% NGS,

0.1% Triton in PBS for 2 hrs at RT, washed again in PBS (3x10') and mounted in Vectashield (Vector lab, Cat# H-1000) before imaging.

### **2.6.7 Perineuronal nets labeling**

To label perineuronal nets (PNN), brain slices were incubated in a solution of biotin-conjugated lectin *Wisteria floribunda* (WFA) (10 µg/ml; Sigma-Aldrich, Cat#L1516, RRID:AB\_2620171) for 1.5 hrs at RT in 5% NGS/ 0.1% Triton/PBS followed by Alexa 568-conjugated Streptavidin (1:500; Life Technologies, cat#S-11226, RRID:AB\_2315774) for 2 hrs at RT in 5% NGS/ 0.1% Triton/PBS. Tissue was then washed 3x10' in PBS and mounted in Vectashield mounting medium before imaging.

### **2.6.8 Analysis of PV cell innervation in cortical organotypic cultures**

Previous studies have shown that the basic features of maturation of perisomatic innervation by PV cells onto NeuN-positive neurons (which represent mostly pyramidal cells, Chattopadhyaya et al., 2004) are retained in cortical organotypic cultures. In organotypic cultures, PV cells start out with very sparse and simple axons, which develop into complex, highly branched arbours in the subsequent 4 weeks with a time course similar to that observed *in vivo* (Chattopadhyaya et al., 2004). We have previously shown that the vast majority of GFP-labeled boutons in our experimental conditions most likely represent presynaptic terminals (Chattopadhyaya et al., 2007, 2013; Di Cristo et al., 2007).

For each experimental group, we took care to acquire an equal number of PV cells localized in layer 2/3 and 5/6. In average, we acquired only one PV cell from each successfully transfected organotypic culture. Confocal images of the PV cell axon

arbour were taken in the first 150  $\mu\text{m}$  from the PV cell soma using a 63X glycerol objective (NA 1.3, Leica) and a Leica SPE or a Leica SP8 confocal microscope. Analysis of PV cell perisomatic innervation was performed as described in (Chattopadhyaya et al., 2013), using NeuroLucida Software (RRID:SCR\_001775). Briefly, neuron somata were identified by NeuN immunofluorescence and the axon of PV cells was traced in 3D. Only innervated NeuN-positive cells were included in this analysis. The following parameters were analyzed for each PV cell: a) perisomatic bouton density, b) axonal terminal branching around innervated somata and c) percentage of NeuN-positive somata innervated by a PV cell. In our 3D Sholl analysis, sholl spheres with a 1  $\mu\text{m}$  increment from the center of a NeuN-positive soma were used to quantify PV cell axon terminal branch complexity and bouton density around the NeuN-positive soma. Axon branch complexity around a single NeuN-positive soma was quantified by the average number of intersections between the PV cell axon and the sholl spheres in the first 9  $\mu\text{m}$  from the center of the NeuN-positive soma. We choose 9  $\mu\text{m}$  as the limiting radius for sholl spheres because it approximates the average NeuN-positive soma diameter. Between 10 and 15 NeuN-positive somata were analyzed for each PV cell. To quantify the fraction of NeuN-positive somata potentially innervated by a PV cell axon, we divided the number of NeuN-positive neurons contacted by at least one GFP positive-bouton by the total number of NeuN-positive cells, in a confocal stack (at least 2 stacks per PV cell). We measured NeuN-positive cell density and found it to be invariant with respect to the different manipulations. All data were first averaged per PV cell, thus statistical analysis was done using the number of PV cells as “n”.

### **2.6.9 Imaging and analysis of immunolabeling *in vivo***

For the analysis of PV, vGAT and PNN expression in minipump-implanted brains, sections were processed in parallel and images were all acquired the same day using identical confocal parameters. Confocal images (Leica, either SPE or SP8 confocal microscope) were acquired using either a 20x water immersion objective (NA 0.7; Leica) or a 63x glycerol objective (NA 1.3; Leica). For each animal, we acquired two confocal stacks in layer 5 in both hemispheres (infused, Ipsi vs non-infused, Contra). Data were obtained from 3 to 4 brain sections per animal. Z-stacks were acquired with a 1  $\mu\text{m}$  step, exported as TIFF files, and analyzed using ImageJ software (RRID:SCR\_003070). Briefly, PV, vGAT or PNN perisomatic rings (between 7 to 10 in each stack) were outlined and the mean gray values were measured, after background subtraction. Background was determined by measuring mean gray values in at least three different areas (region of interest, ROI), where immunolabeling was absent, in the same focal plane where PV, vGAT or PNN perisomatic rings were selected.

For the analysis of PV+/gephyrin+ puncta, confocal images (Leica SP8) were acquired using a 63x glycerol objective (NA 1.3; Leica). We acquired one confocal stack with a 0.3  $\mu\text{m}$  step in cortical layer 5 from 3 to 4 different brain sections per animal. Stacks were exported as TIFF files and puncta colocalisation was analyzed using Neurolucida software.

All analysis was done by operators blind to the mouse genotype or/and to the specific treatment.

### **2.6.10 Minipump implant and Monocular Deprivation (MD)**

Adult (>P100) mice were implanted with osmotic mini-pump under isoflurane anaesthesia. Minipumps (model 1007D; flow rate 0.5 µl/h; Alzet) were filled with mut-proBDNF (1 µg/ml in filtered PBS, Alomone Laboratories) or vehicle solution and connected to a cannula (gauge 30) implanted directly in the primary visual cortex (2.5 mm lateral to the midline, 2.5 mm anterior to lambda).

For electrophysiological analysis, a group of animals were monocularly deprived through eyelid suturing two days after the implant of the minipump, and then recorded 3 days after. Subjects with even minimal spontaneous eyelid re-opening were excluded from the study. For perisomatic GABAergic bouton density and PNN studies, a second group of animals was perfused 5 days after minipump implant.

### **2.6.11 *In Vivo* Electrophysiology**

After 3 days of MD, animals were sedated with isoflurane and anaesthetized with urethane (i.p. injection; 1.5 g/kg; 20% solution in saline; Sigma-Aldrich), then placed in a stereotaxic frame. Body temperature was maintained at 37°C. A hole was drilled in the skull, corresponding to the binocular portion of the primary visual cortex (binocular area Oc1B), contralateral to the deprived eye. Dexamethasone (2 mg/kg) was administered subcutaneously to reduce secretions and edema and saline was periodically infused to prevent dehydration. Eyes were covered with a thin layer of silicone oil to avoid corneal opacities. Recordings were made using silicon microprobes (16 channels, NeuroNexus Technologies a2x2-tet-3mm-150-121) inserted into the cortex 3.0-3.2 mm from the lambda point. Signals were acquired using Cheetah 5 (Neuralynx) and analyzed with custom software in Matlab (MathWorks).



### Visual Stimulation

Stimuli were generated in Matlab using the Psychophysics Toolbox (RRID:SCR\_002881) extensions and displayed with gamma correction on a monitor (Sony Trinitron G500, 60 Hz refresh rate, 32 cd/m<sup>2</sup> mean luminance) placed 20 cm from the mouse, subtending 60-75° of visual space.

### Visual evoked potentials (VEPs)

VEP were recorded as described in (Porciatti et al., 1999). We measured contralateral to ipsilateral ratio of VEP amplitude to measure ocular dominance plasticity. Extracellular signal was filtered from 1 to 275 Hz. VEPs in response to square wave patterns with a spatial frequency of 0.06 cpd and abrupt phase inversion (1 Hz temporal period), were evaluated in the time domain by measuring the P1 peak-to-baseline amplitude and latency. Computer controlled mechanical shutters were used to collect data from each eye.

### Single-Units

For single-unit recording extracellular signal was filtered from 0.6 to 6 kHz. Sampling rate: 33 kHz. Spiking events were detected on-line by voltage threshold crossing and waveforms of 1 ms were acquired around the time of threshold crossing. To improve isolation of units, recordings from groups of four neighboring sites (tetrode) were linked, so that each spike was composed by 4 waveforms. Then waveforms were processed using the OffLine Sorter software (Plexon). Drifting sinusoidal gratings were used as visual stimuli (1.5 s duration, temporal frequency of 2 Hz, 12 directions, 6 spatial frequency: 0.01, 0.02, 0.04, 0.08, 0.16, 0.32 cpd). Stimulation was repeated five times per eye, with stimulus conditions randomly interleaved, and two gray blank conditions

(mean luminance) were included in all stimulus sets to estimate the spontaneous firing rate.

The average spontaneous rate for each unit was calculated by averaging the rate over all blank condition presentations. Responses at each orientation and spatial frequency were calculated by averaging the spike rate during the 1.5 s stimulus presentations and subtracting the spontaneous rate. The preferred stimulus was determined finding the combination of spatial frequency and orientation that maximize the response, independently for each eye. Ocular Dominance Index (ODI) was calculated as follows:  $ODI = (respContra - respIpsi) / (respContra + respIpsi)$ , where 'resp' is the response evoked by the preferred stimulus, 'Contra' and 'Ipsi' are respectively: contralateral and ipsilateral eye. Experiments were done by operators blind to the genotype.

### **2.6.12 *In Vivo* Optical Imaging**

Optical imaging experiments were performed as in (Groleau et al., 2014). Briefly, mice were anaesthetized with urethane (1.25 g/kg, i.p.). Core body temperature was maintained at 37 °C using a feedback controlled heating pad (Harvard Apparatus, Saint-Laurent, Québec) and electrocardiogram (FHC, Bowdoin, ME, USA) was continuously monitored with sub-dermal electrodes. The visual cortex was imaged through the skull: an imaging chamber was placed over both hemispheres, glued on the skull, filled with agarose (1%) and sealed with a coverslip.

Stimulation. Visual stimulation was provided using VPixx and presented by an LCD projector on a screen placed at a distance of 20 cm in front of the mouse eyes (subtending 150 × 135° of visual angle). To assess visuotopy and characterize maps

and connectivity in V1, we used a continuous stimulation paradigm, where 2° thick light bars were periodically shifted horizontally (to obtain elevation maps) or vertically (to obtain azimuth maps) over a dark background at a frequency of 0.15 Hz. These relative retinotopic maps were used to assess several structural and functional parameters within V1. To examine the functional properties of V1 neurons, episodic full-field sine wave grating stimuli (270°) were presented during 2 s and spaced by a blank presentation lasting 18 s intervals (mean luminance 75 cd/m<sup>2</sup>). The amplitude of the hemodynamic responses was measured as a function of contrast and spatial frequency selectivity. Five contrasts (6%, 12%, 25%, 50% and 90%) and seven spatial frequencies (0.01, 0.025, 0.05, 0.12, 0.24, 0.32 and 0.48 cycle per degree (cpd)) were used to determine contrast sensitivity and spatial frequency selectivity, respectively.

Image acquisition. The cortex was illuminated at 545 nm to adjust the focus of the camera and at 630 nm to record the intrinsic signals. Optical images were recorded using a 12-bit CCD camera (1M60, Dalsa, Colorado Springs, USA) driven by the Imager 3001 system (Optical Imaging Inc.©) and fitted with a macroscopic lens (Nikon, AF Micro Nikon, 60 mm, 1:2.8D). Frames of 512 × 512 pixels were acquired at a rate of 4 Hz, giving a spatial resolution of 28 μm/pixel. The acquisition was sustained for 10 min during the continuous stimulation paradigm. During episodic stimulation, frames were acquired for 20 s for every contrast and spatial frequency tested. An average of 10 repetitions was used to obtain a good signal to noise ratio.

Data analysis. OIS data were analyzed with MATLAB (MathWorks, Nattick, MA). For each pixel of the cortex, a Fourier transform was applied on temporal signals collected during continuous stimulation. Fourier phase and amplitude were generated for each

frequency and used to map the retinotopy and perform quantification. The amplitude of neuronal activity was used to generate the “neuronal activation” map. In parallel, the phase at the stimulus frequency was related to the delay to activate the receptive field and was associated to the relative retinotopic position. The “retinotopic” map was obtained by multiplying the amplitude and phase maps. Regions of interest (ROI) located in the occipital cortex were manually delineated in the activation maps for each hemisphere. The area of V1 was calculated from the ROI borders. The shape of the ROI was fitted to an ellipse with MATLAB and the ratio of length of the two main axes of the ellipse determined (height/width) was calculated to measure the “ovality index”. The ratio of the number of the phases detected in the retinotopic maps over  $2\pi$  (i.e. the range of the phases displayed) was used to estimate the “apparent visual field”, i.e. the proportion of the activated visual field represented in V1. The difference between the phase of each pixel and its surrounding pixels was calculated on the phase map to evaluate the “scatter index”. Fourier amplitude at the stimulus frequency and second harmonic was used to evaluate the population receptive field (pRF) size of the underlying neurons (neurons within a ROI respond to a range of visual field locations and the region of the visual space that stimulates this local neuronal activity is called pRF).

The hemodynamic responses obtained during episodic stimulation were used for the functional analysis of the neuron features. The contrast and spatial frequency tuning curves for each pixel of V1 were established from the amplitude of the negative peak of the hemodynamic response. The spatial frequency producing the strongest hemodynamic response was calculated for each pixel. For each animal, the results of

each trial were pooled and an asymmetric Gaussian curve was fitted on the normalized values. Curves that did not meet the  $p < 0.05$  and  $r\text{-square} \geq 0.700$  were not used. The optimal spatial frequency was defined as the spatial frequency producing the strongest response. The visual acuity was measured using a linear fit. The curves of amplitude as a function of the contrast were fitted with a Naka-Rushton function to determine the contrast evoking 50% of the maximum response.

### **2.6.13 Experimental Design and Statistical Analysis**

Mice were assigned randomly to each experimental group. Data analysis was performed by operators that were in blind of the treatment/genotype. Data were expressed as mean  $\pm$  SEM unless otherwise specified in the legends. Normality tests were performed for all data analyzed. Differences between two groups were assessed with the Student's unpaired  $t$ -test for normally distributed data or with the Mann Whitney Rank Sum test for not-normally distributed data. Differences between multiple groups were assessed with one-way ANOVA. Statistical analysis was performed using Prism 8.0 (GraphPad Prism, RRID:SCR\_002798). No animal was excluded from the analysis.

## 2.7 Results

### 2.7.1 Cortical PV cells express p75NTR during development and in the adult brain

The temporal and cellular localization of p75NTR in cortical neurons has been an object of debate and discrepancy (Holm et al., 2009; Giza et al., 2018), likely due to low protein expression levels, especially in the adult brain, and suboptimal antibody sensitivity. To overcome these technical challenges, we used two novel experimental strategies. First, we used RNAscope multiplex fluorescent *in situ* hybridization (Advanced Cell Diagnostics), a novel RNA *in situ* hybridization technology that allows single-molecule detection (Wang et al., 2012), to label simultaneously the mRNAs coding for p75NTR (gene name: Ngfr) and Parvalbumin (gene name: Pvalb) in brain slices (Fig. 1A, B; Fig. 2). Importantly, we found cortical neurons co-expressing both mRNAs two weeks after birth (Fig. 1A, B), in contrast to basal ganglia wherein the mRNAs coding for p75NTR and PV were expressed by clearly non-overlapping populations (Fig. 2E). Secondly, we used a modified version of the proximity ligation assay (PLA) as described in Telley et al. (2016), coupled with PV immunolabeling. PLA is a very sensitive technique of amplification utilized to detect low level of protein expression or protein-protein interaction in tissues, using which we observed unprecedented clear and definite signal for p75NTR in PV cell somata and putative boutons in visual cortex of adult mice (P60) (Fig. 1C). To control for PLA signal specificity, we crossed p75NTR<sup>lox/lox</sup> mice with mice expressing Cre recombinase under the control of the PV promoter (PV\_Cre mice)(Hippenmeyer et al., 2005) and compared the PLA-mediated p75NTR labeling in

p75NTR<sup>lox/lox</sup> vs. PV\_Cre;p75NTR<sup>lox/lox</sup> littermates (Fig. 1C-F). We found that p75NTR signal was dramatically reduced in PV cells in the conditional knockout mice (Fig. 1E), demonstrating the specificity of our approach. Surprisingly, we also observed that the total p75NTR signal showed a ~60% reduction in conditional knockout mice compared to control littermates (Fig. 1F), suggesting that PV cells expressed a large proportion of p75NTR protein in the adult visual cortex.

Next, we asked whether p75NTR protein expression in PV cells was developmentally regulated in visual cortex. We found that p75NTR expression, identified using the PLA assay, in PV cells was significantly reduced between P14 and P26 (Fig. 3A-C, unpaired t-test with Welch's correction). In comparison to its expression in adult visual cortex, we observed similar localization pattern of p75NTR protein in PV cell somata and in putative perisomatic synapses at both P14 and P26. Similarly, we observed a similar decrease in the expression of the mRNA coding for p75NTR between P14 and adult mice, using RNAscope (data not shown). Overall, these data suggest that cortical PV cells express p75NTR and that this expression is developmentally regulated.

### **2.7.2 p75NTR downregulation during the first postnatal weeks induces the formation of exuberant PV cell innervation in cortical organotypic cultures**

Since the developmental down-regulation of p75NTR was inversely correlated with the maturation of PV cell innervation during the same time period in visual cortex (Chattopadhyaya et al., 2004), we hypothesized that higher p75NTR levels may hinder

the formation of PV cell synapses. To test this hypothesis, we used cortical organotypic cultures where we could label and manipulate isolated PV cells by driving GFP and/or Cre expression with a previously characterized promoter ( $P_{G67}$ ; (Chattopadhyaya et al., 2004, 2007, 2013; Di Cristo et al., 2007)). In organotypic cultures, PV cells start out with very sparse and simple axons, which develop into complex, highly branched arbours in the subsequent 3 weeks with a time course similar to that observed *in vivo* (Chattopadhyaya et al., 2004).

In the postnatal cortex, p75NTR is not expressed exclusively by PV cells (Fig. 3; and (Bracken and Turrigiano, 2009), thus to investigate whether p75NTR in PV cells plays a role in their maturation, we knocked-down p75NTR expression selectively in PV cells by transfecting  $P_{G67\_Cre}/GFP$  in organotypic cultures from  $p75NTR^{lox/lox}$  mice (Bogenmann et al., 2011) to generate  $p75NTR^{-/-}$  PV cells in an otherwise wild-type background (Fig. 4). PV cells were transfected with  $P_{G67\_Cre}/GFP$  from Equivalent Postnatal day (EP)10 (cultures prepared at P4 + 6 days *in vitro*) and fixed at EP18.  $p75NTR^{-/-}$  PV cells contacted more neuronal somata (identified by NeuN labeling) and formed more axonal branching and perisomatic boutons as compared to age-matched control  $p75NTR^{lox/lox}$  PV cells, which were transfected with  $P_{G67\_GFP}$  alone (Fig. 4A, B, C, E).  $p75NTR$  reduction in single PV cells during the peak of perisomatic bouton proliferation (EP16-24) also increased bouton density and terminal branching without increasing the percentage of contacted neurons (Fig. 4C-E). These data suggest that  $p75NTR$  expression constrains the maturation of PV cell innervation in a cell-autonomous manner.

To further test this hypothesis, we investigated whether transfecting wild-type PV cells



with a mutant form of p75NTR lacking the intracellular death domain and acting as dominant negative (p75 $\Delta$ DD (Charalampopoulos et al., 2012; Lin et al., 2015)) could affect their innervation (Fig. 5A, B). PV cells transfected with p75 $\Delta$ DD showed more complex perisomatic innervation (Fig. 5A,B,E), which was indistinguishable from those formed by p75NTR<sup>-/-</sup> PV cells (Fig. 5B,C,E).

It is conceivable that Cre-mediated removal of exons 4-6 in *p75NTR* might also delete intronic sequences that are important for PV cell synaptic development. To confirm that the deletion of p75NTR was indeed responsible for the exuberant perisomatic innervation of p75NTR<sup>-/-</sup> PV cells, we performed a rescue experiment by introducing p75NTR cDNA in p75NTR<sup>-/-</sup> PV cells. In particular, we co-transfected PV cells in organotypic cultures prepared from p75NTR<sup>lox/lox</sup> mice with either P<sub>G67</sub>\_Cre/GFP (to generate p75NTR<sup>-/-</sup> PV cells) or P<sub>G67</sub>\_Cre/GFP/p75wt (to re-express p75NTR in p75NTR<sup>-/-</sup> PV cells). The perisomatic innervation formed by reintroduction of p75NTR in p75NTR<sup>-/-</sup> PV cells was not significantly different from those formed by wild-type cells (Fig. 5A, D, E).

All together, these data demonstrate that p75NTR expression in cortical PV cells regulates the maturation of their connectivity, by constraining the formation of their perisomatic innervation.

### **2.7.3 Increased p75NTR activation inhibits the formation of PV cell innervation in cortical organotypic cultures**

p75NTR-mediated signalling can be strongly activated by both proneurotrophins or their prodomain alone (Yang et al., 2009; Rauskolb et al., 2010; Dieni et al., 2012; Anastasia et al., 2013; Zanin et al., 2017). Activation of p75NTR by proBDNF has been shown to reduce excitatory synapse density in hippocampal pyramidal neurons (Woo et al., 2005; Yang et al., 2014), to promote excitatory synapse elimination in the postnatal visual cortex (Winnubst et al., 2015) and at the developing neuromuscular junction (Je et al., 2013). To investigate whether proBDNF affects the development of inhibitory PV cell connectivity, we treated developing organotypic cultures either with a wild-type recombinant form (wt-proBDNF, 10ng/ml) or a cleavage-resistant mutant form of proBDNF (mut-proBDNF; 10ng/ml) from EP18-24. wt-proBDNF did not significantly affect PV cell perisomatic bouton number (Fig. 6A,B,E), but induced a significant increase of the terminal axonal branching complexity formed by PV cells around their targets (Fig. 6F). It is likely that proBDNF was at least partially cleaved by extracellular plasmin and metalloproteases, thus affecting the local, relative level of mBDNF and proBDNF (Pang et al., 2004). On the other hand, PV cells treated with mut-proBDNF contacted less than half of the NeuN-positive somata compared to age-matched controls, onto which they formed fewer boutons and terminal axonal branching (Fig. 6C,E-G). This effect was not secondary to neuronal death because neuron density (based on NeuN immunostaining) was not altered compared to control or wt-proBDNF treated slices even after 6 days of treatment (Ctrl:  $104 \pm 13$ , wt-proBDNF:  $174 \pm 10$  and mut-proBDNF:  $135 \pm 15 \times 10^3$  pyramidal cells/mm<sup>3</sup>; n = 6 ctrl slices, n = 6 wt-proBDNF

treated slices, n = 8 mut-proBDNF treated slices; One-way ANOVA,  $p > 0.1$ ). To investigate whether the effects of mut-proBDNF on PV cell innervation were specifically mediated by p75NTR activation, we knocked out p75NTR from single PV cells in organotypic cultures prepared from p75NTR<sup>lox/lox</sup> mice and simultaneously treated them with mut-proBDNF. We found that p75NTR<sup>-/-</sup> PV cells were insensitive to mut-proBDNF treatment; in fact, they formed significantly more complex innervations compared to both control and mut-proBDNF treated p75NTR<sup>lox/lox</sup> PV cells (Fig. 6A,D). The results suggest that specific activation of p75NTR strongly inhibits the formation of PV cell innervation during postnatal development.

Several studies suggested that mature BDNF (mBDNF) and BDNF prodomain (pBDNF) are the most abundant moieties in the adult brain, while proBDNF is abundant during early development, in particular during the first postnatal month (Rauskolb et al., 2010; Dieni et al., 2012; Anastasia et al., 2013; Yang et al., 2014). We thus asked whether altering endogenous levels of proBDNF and mBDNF affected the establishment of PV cell innervation in the first postnatal weeks. To address this question, we altered the activity levels of tissue plasminogen activator (tPA), since tPA-mediated activation of plasmin is one of the main molecular mechanisms responsible for the activity-dependent cleavage of proBDNF into mBDNF in the extracellular space (Pang et al., 2004; Schwartz et al., 2011). To modulate tPA activity levels, we added to the culture medium either PPACK (50  $\mu$ M), a tPA-inactivating peptide, or tPA itself (0.6  $\mu$ g/ $\mu$ l) from EP10-18, when PV cell axonal arborization and synaptic innervation are still quite immature (Chattopadhyaya et al., 2004). Firstly, we sought to quantify whether and how endogenous mBDNF and proBDNF levels were affected by these treatments by western

blot. While we confirmed the specificity of the anti-mBDNF antibody using brain lysates of BDNF KO mice (Fig. 7A), we tested several commercial proBDNF antibodies, but, in our hands, they could still detect a 32kDa band in brain lysates from BDNF KO mice (see Methods for details on tested antibodies), thus we could only quantify mBDNF levels. As predicted, we found that treatment with PPACK reliably induced a significant reduction (Fig. 7B), while tPA significantly increased, mBDNF protein level (Fig. 7C), suggesting that tPA may indeed regulate extracellular level of mBDNF in this developmental time window. Consistent with this hypothesis, PV cells in PPACK-treated cultures showed simpler innervation fields (Fig. 8A,B, E-G), while tPA addition drastically increased the complexity of PV cell axonal arborization compared to control, age-matched PV cells by increasing bouton density, terminal axonal branching and percentage of innervated targets (Fig. 8A,C,E-G).

Since mBDNF-mediated TrkB signalling is a potent regulator of GABAergic cell maturation (Huang et al., 1999; Kohara et al., 2007; Hong et al., 2008), it is possible that these effects might be solely due to alteration of mBDNF level, independently of p75NTR activation. To address this question, we reasoned that if the effects of tPA application on PV cell innervation was mediated not only by an increase in mBDNF but also by a decrease in proBDNF-mediated p75NTR signalling, then treatment with mut-proBDNF would reverse them. Supporting this prediction, we found that simultaneously treating organotypic cultures with tPA and mut-proBDNF rescued completely the effects of tPA-only application (Fig. 8D, E-G).

In summary, these results suggest that p75NTR activation, possibly mediated by endogenous proBDNF, can strongly inhibit the formation of cortical PV cell innervation during the first postnatal weeks.

#### **2.7.4 p75NTR regulates the timing of the maturation of PV cell connectivity *in vivo*.**

Our results show that p75NTR expression in PV cells declines during the maturation phase of PV cell connectivity and that removing p75NTR is sufficient to promote, while activating p75NTR inhibits, the formation of PV cell innervation. We next asked whether p75NTR plays a role in the maturation of PV cell connectivity *in vivo*.

In PV\_Cre mice, Cre expression is very specific to cortical PV cells, however it starts after P10 and does not plateau until weeks later (Hippenmeyer et al., 2005), well after the maturation of PV cell connectivity (Chattopadhyaya et al., 2004). Thus, to reduce p75NTR expression in PV cells before the peak of the maturation of PV cell connectivity, we generated Nkx2.1\_Cre;p75NTR<sup>lox/lox</sup> mice. Nkx2.1 is expressed in GABAergic precursors originating from the medial ganglionic eminence, which include PV and somatostatin expressing interneurons (Xu et al., 2008). We quantified the putative perisomatic synapses formed by PV cells, identified by the juxtaposition of PV and gephyrin, a scaffolding protein present in the postsynaptic sites of GABAergic synapses, in the visual cortex of P14 Nkx2.1\_Cre; p75NTR<sup>lox/lox</sup> mice compared to their control littermates (Fig. 9A,B). Both the density of PV+gephyrin+ puncta and the percentage of perisomatic PV puncta showing gephyrin co-labelling were significantly increased (Fig.

9C,D) in the conditional knockout mice.

One important indication of PV cell maturation is the appearance of perineuronal nets (PNN), which are specialized extracellular matrix structures enwrapping the soma and primary dendrites of mature cortical PV cells (Pizzorusso et al., 2002; Morishita et al., 2015). In *Nkx2.1\_Cre; p75NTR<sup>lox/lox</sup>*, we observed a significant increase in both the number of PV cells that were encircled by PNN, as revealed by WFA staining (Fig. 9E,F,G) and PNN immunofluorescence intensity around single PV cell somata (Fig. 9H). Overall, these data suggest that p75NTR expression level regulates PV cell maturation *in vivo*.

### **2.7.5 p75NTR activation destabilizes PV cell connectivity in adult brain**

Our expression studies show that p75NTR is still expressed, albeit at a low level, in cortical PV cells in adult mice (Fig. 1C,E,F). We thus wondered whether activation of p75NTR might destabilize PV cell connectivity after it had reached maturity (around the 4<sup>th</sup> postnatal week, both in cortical organotypic cultures and *in vivo* (Chattopadhyaya et al., 2004). In cortical organotypic cultures, PV cells treated with mut-proBDNF from EP26-32, after PV cell innervations have plateaued, show a dramatic loss in both synaptic contacts and complexity of perisomatic innervation as compared to age-matched, control PV cells (Fig. 10A, C, D-F), while treatment with wt-proBDNF did not affect any of the analyzed parameters (Fig. 10B, D-F). Next, we asked whether treatment with mut-proBDNF could destabilize PV cell innervation in the adult brain *in vivo*. To address this question, we implanted osmotic minipumps releasing either mut-

proBDNF (1  $\mu\text{g/ml}$ , flow rate 0.5  $\mu\text{l/h}$ ) or vehicle solution in primary visual cortex in adult mice for 5 days (Fig. 11A). We found that in the cortices infused with mut-proBDNF (ipsilateral to the minipump), the intensity of perisomatic puncta immune-positive for the vesicular GABA transporter (vGAT, which labels presynaptic GABAergic terminals, data not shown) or for PV (Fig.11B) was reduced as compared to those in the vehicle infused cortices (contralateral to the minipump) (Fig. 11B, D and data not shown; ~40% reduction for both PV+ and vGAT+ puncta/pyramidal soma in ipsi- compared to contralateral cortex).

Next, we asked whether mut-proBDNF acts via p75NTR activation in adult cortical PV cells, by using PV\_Cre mice to specifically remove p75NTR in PV cells well after the maturation of their connectivity (Chattopadhyaya et al., 2004). By introducing the RCE<sup>EGFP</sup> allele to drive EGFP expression in presence of Cre, we showed that around 90% of PV cells co-expressed GFP ( $92 \pm 1\%$ ;  $n = 4$  mice), while virtually all GFP+ cells expressed PV in the adult (>P60) visual cortex of PV\_Cre;p75NTR<sup>lox/lox</sup> mice. As expected, PV\_Cre;p75NTR<sup>lox/lox</sup> adult mice did not show any significant difference in the number and intensity of PV+ puncta formed around targeted cells compared to their control littermates (p75NTR<sup>Ctrl</sup>) (perisomatic PV ring intensity:  $84 \pm 6$  and  $67 \pm 9$  a. u.; number of perisomatic PV+ puncta:  $7.9 \pm 0.9$  vs.  $9.2 \pm 0.2$  for p75NTR<sup>Ctrl</sup> vs. PV\_Cre;p75NTR<sup>lox/lox</sup> mice, respectively; unpaired t-test,  $p > 0.1$ ;  $n = 6$  PV\_Cre;p75NTR<sup>lox/lox</sup> and  $n=4$  p75NTR<sup>Ctrl</sup> mice). In addition, visual cortex functional properties, analyzed by optical imaging, were not altered in adult PV\_Cre;p75NTR<sup>lox/lox</sup> mice compared to wild-type littermates (data not shown). Cre expression occurs slowly and starts well after P10 in this mouse line (Hippenmeyer et al., 2005), thus p75NTR

knockout likely occurs too late to influence the development of basic visual abilities, such as visual acuity or contrast sensitivity (Kang et al., 2013; Picard et al., 2014).

In contrast to what we observed following mut-proBDNF infusion in control mice, mut-proBDNF infusion in mutant, PV\_Cre;p75NTR<sup>lox/lox</sup> mice was unable to significantly alter perisomatic PV+ (Fig. 11B, D) and vGAT+ puncta intensity (data not shown), indicating that the effect of mut-proBDNF on perisomatic GABAergic boutons in adult mice was mediated by p75NTR expressed by PV cells. All together, these data suggest that activation of p75NTR onto PV cells, mediated by pharmacological proBDNF treatment, is able to destabilize PV cells connectivity in the adult brain.

### **2.7.6 proBDNF-mediated p75NTR activation in PV cells promotes cortical plasticity in adult mice**

Using ocular dominance plasticity in visual cortex as experimental model, recent studies showed that modulation of inhibition in adult brain can re-activate juvenile-like cortical plasticity mechanisms (Harauzov et al., 2010). Since our data showed that treatment with mut-proBDNF could destabilize PV cell innervation in the adult brain *in vivo*, we asked whether this could in turn promote cortical plasticity. To answer this question, we first analyzed PNN expression pattern in visual cortex of mice infused with mut-proBDNF (Fig. 11A), since it has been shown that PNN normally enwrap mature PV cells to limit adult plasticity (Pizzorusso et al., 2002; Morishita et al., 2015). In p75NTR<sup>Ctrl</sup> mice, mut-proBDNF infusion significantly reduced both the number of PV cells that were encircled by PNN, as revealed by WFA staining (Fig. 11C1, F) and PNN immunofluorescence



intensity around single PV+ cells (Fig. 11C2, E; ~55% reduction in ipsi- vs contralateral cortex). The effects of mut-proBDNF treatment on PNN were completely abolished in PV\_Cre;p75NTR<sup>lox/lox</sup> mice (Fig. 11C1-2, E, F). Importantly, PNN staining in visual cortex did not differ between untreated PV\_Cre;p75NTR<sup>lox/lox</sup> mice and control littermates (PNN intensity;  $143 \pm 6$  and  $148 \pm 5$  a. u.; percentage of PV cells encircled by PNN:  $87.6 \pm 1.0$  and  $87.1 \pm 0.9\%$ , for p75NTR<sup>Ctrl</sup> and PV\_Cre;p75NTR<sup>lox/lox</sup>, respectively; unpaired t-test,  $p > 0.1$ ,  $n = 6$  PV\_Cre;p75NTR<sup>lox/lox</sup> and  $n = 4$  p75NTR<sup>Ctrl</sup> mice), suggesting that p75NTR activation by mut-proBDNF treatment was the critical step leading to PNN reduction.

To directly test whether mut-proBDNF could reopen a window of plasticity in adult visual cortex, we performed electrophysiological recordings in binocular region of the primary visual cortex following a brief (3 days) monocular deprivation in adult mice. During the critical period for ocular dominance plasticity, the ratio of the amplitudes of visual evoked potentials (VEPs) evoked by eye stimulation shifts in favour of the non-deprived eye (ocular dominance shift). However, no significant ocular dominance shift can be observed following three days of monocular deprivation at or after P100 (Pizzorusso et al., 2002; Lehmann and Löwel, 2008). Consistently, we found that monocular deprivation did not affect the contralateral/ipsilateral (C/I) VEP ratio in vehicle-treated animals with respect to p75NTR<sup>Ctrl</sup> non-deprived mice, while in p75NTR<sup>Ctrl</sup> mice treated with mut-proBDNF we observed a marked ocular dominance shift in favour of the non-deprived eye, reflected by a significant decrease of the C/I VEP ratio (Fig. 12A,B). p75NTR deletion in PV cells (PV\_Cre;p75NTR<sup>lox/lox</sup>) completely prevented the ocular dominance shift induced by mut-proBDNF treatment (Fig. 12A,B).

To further confirm this data, we performed single-unit recordings. Ocular dominance of

cortical neurons was assessed by quantitative evaluation of responsiveness to optimal visual stimulation of either eye and an ocular dominance index (ODI) was assigned to every single cell recorded. ODI of vehicle-infused, monocularly deprived, p75NTR<sup>Ctrl</sup> mice displayed the typical bias towards the contralateral eye inputs as shown by non-deprived control mice, while mut-proBDNF infused, monocularly deprived, p75NTR<sup>Ctrl</sup> mice showed a prominent ocular dominance shift in favour of the open eye (Fig. 12C), which was abolished in PV\_Cre;p75NTR<sup>lox/lox</sup> mice (Fig. 12C), further proving that mut-proBDNF treatment was able to induce visual experience-dependent plasticity only in mice carrying intact p75NTR expression in PV cells. The absence of visual plasticity in PV\_Cre;p75NTR<sup>lox/lox</sup> mice infused with mut-proBDNF could be due to developmental confounding effects, but we think this unlikely since we did not find significant differences in PV cell perisomatic connectivity, PNN intensity and visual cortical properties in the visual cortex of adult PV\_Cre;p75NTR<sup>lox/lox</sup> mice compared to their control littermates. Interestingly, we found that spontaneous discharge of visual cortical neurons was increased by mut-proBDNF treatment only in p75NTR<sup>Ctrl</sup> mice (Fig. 12D), which could be partly due to reduced cortical inhibition following proBDNF-mediated p75NTR activation in PV cells.

In summary, these data demonstrate that p75NTR activation in cortical PV cells induces loss of PV cell connectivity and restoration of ocular dominance plasticity in adult mice.

## 2.8 Discussion

In this study we focused on the role of p75NTR in regulating interneuron synapse maturation during development and adult visual cortical plasticity. We had to first overcome the technical challenge of visualizing the presence of p75NTR in PV interneurons during development and in the adult cortex. Using two cutting-edge experimental approaches to detect very low levels of RNA and protein, we were able to confirm that PV cells express the mRNA for p75NTR and to specifically detect p75NTR in not just PV cell somata but also in presynaptic terminals. Next, we showed that p75NTR expression levels and activation modulate the formation of PV cell connectivity during development in organotypic cultures and *in vivo*. Finally, we proved that pharmacological activation of p75NTR in PV cells reduces PV cell connectivity and allows juvenile-like plasticity, in adult visual cortex.

During development, p75NTR is downregulated after the third postnatal week, while at the same time PV cells develop complex, highly branched axonal arbours that contact an increasingly higher number of potential postsynaptic targets (Chattopadhyaya et al., 2004). Our results show that PV cell-specific p75NTR gene loss accelerates, whereas p75NTR activation hinders the development of complex perisomatic innervation fields. In particular, the innervation promoting effects of p75NTR deletion in single, sparse PV cells in otherwise wild-type organotypic cultures suggest that p75NTR acts in a cell autonomous fashion to regulate PV cell innervation fields. Consistent with the results observed *in vitro*, early deletion of p75NTR in PV cells *in vivo* accelerates the development of PV cell perisomatic synapses and of PNN aggregation around PV cell somata, which is an indication of the maturation state of PV cells. Thus, p75NTR acts as

a negative signal constraining the formation of PV cell connectivity. The polysialic acid motif PSA was previously shown to hinder PV cell synapse formation before eye opening (Di Cristo et al., 2007). PSA is a general modulator of cell interactions and, as such, it likely acts as a permissive signal to allow optimal interactions between presynaptic PV axons and postsynaptic cells. On the other hand, here, our data show that p75NTR expression levels specifically in PV cells negatively regulates the extent of its innervations field. Therefore, it is possible that p75NTR expression level may act as an instructive signal for PV cell innervation refinement. In fact, using PLA, we found that a population of PV cell boutons colocalizes with p75NTR. Locally, p75NTR activation may inhibit the formation of PV cell innervation by promoting growth cone collapse, via activation of RhoA (Naska et al., 2010; Sun et al., 2012) and/or inactivation of Rac signalling, which leads to destabilization of actin filaments and collapse of neurite outgrowth (Deinhardt et al., 2011). Further, p75NTR activation may sensitizes neurons to other inhibitory, growth cone collapsing cues such as Nogo (Yamashita and Tohyama, 2003; Yamashita et al., 2005), ephrins and semaphorins (Lim et al., 2008; Naska et al., 2010). It will be interesting to study whether and how these inhibitory cues interact with p75NTR signalling to modulate the maturation of PV cell innervation. In addition to locally regulating cytoskeletal dynamics, p75NTR activation may cause changes in gene transcription, leading to modulation in expression of proteins modifying PV cell synaptic inputs and/or excitability, which would in turn regulate PV cell axon growth (Baho and Di Cristo, 2012).

There are open questions regarding mechanisms regulating p75NTR downregulation during development. One study suggests that p75NTR mRNA is negatively regulated by

visual experience *in vivo* (Bracken and Turrigiano, 2009). It is conceivable that activity levels in individual PV cells regulate their p75NTR expression, which in turn determines to what extent they respond to local changes in molecular p75NTR regulators. In addition, p75NTR expression is regulated by early growth response (Egr) factors 1 and 3, which are inducible transcriptional regulators modulating gene expression in response to a variety of extracellular stimuli influencing cellular growth, differentiation and response to injury (Gao et al., 2007), suggesting a potentially highly dynamic, and cell context-dependent mechanism for regulation of p75NTR expression during development or following injury. Accordingly, it has been shown that p75NTR is upregulated by pathological events, including cerebral ischemia (Irmady et al., 2014) and seizures (Unsain et al., 2008; Volosin et al., 2008). One implication of our findings is that pathology-induced upregulation of p75NTR levels occurring during early brain development impair the maturation of PV cell circuits, which may in turn affect the expression and/or timing of critical period plasticity (Di Cristo et al., 2007; Sugiyama et al., 2008), thus contributing to long-term cognitive and behavioural impairments.

In adults, the brain's intrinsic potential for plasticity is actively dampened by the increase in intracortical inhibition and the simultaneous expression of brake-like factors, which limit experience-dependent circuit rewiring beyond a critical period. Interestingly, many of these plasticity breaks converge onto PV cell function (Pizzorusso et al., 2002; Bavelier et al., 2010; Beurdeley et al., 2012). Our results demonstrate that reducing PV cell connectivity, by inducing p75NTR activation, is sufficient to reinstate ocular dominance plasticity in the adult cortex. p75NTR activation may directly affect the stability of PV cell axonal branches and synapses, by affecting local cytoskeletal

dynamics (Deinhardt et al., 2011; Sun et al., 2012) or/and affect the synthesis of specific proteins, including those required for PNN condensation around PV-positive cells (Carulli et al., 2010). Intact PNNs structurally limit synaptic rearrangements of inputs onto PV cells, which in turn regulate their excitability and synaptic release. Consistently, reduction of PV cell excitability leads to a reduction of their innervation fields even after reaching maturity (Baho and Di Cristo, 2012). Further, PNN disruption may prevent the persistent uptake of the homeoprotein Otx2 into PV cells, which is required by the PV cells for the maintenance of an adult phenotype (Sugiyama et al., 2008; Beurdeley et al., 2012).

Although our data show that PV cell perisomatic synapse formation and PNN colocalisation were significantly accelerated in the visual cortex of Nkx2.1\_Cre; p75NTR<sup>lox/lox</sup> mice in which Cre expression starts during early development, we did not find significant differences in neither PV cell perisomatic connectivity nor basic visual properties in adult PV\_Cre;p75NTR<sup>lox/lox</sup> mice. One likely explanation is that in these latter mice the removal of p75NTR protein occurs too late to affect the maturation of these parameters in the visual cortex, which have for the most part reached plateau by the first postnatal month (Chattopadhyaya et al., 2004; Kang et al., 2013; Picard et al., 2014). Since p75NTR expression differs among brain regions at the different ages (Holm et al., 2009; Giza et al., 2018), it would be interesting to investigate whether PV\_Cre;p75NTR<sup>lox/lox</sup> conditional knockout mice show altered cognitive functions implicating regions which mature later, such as the prefrontal cortex (Giza et al., 2018).

The role of neurotrophins and their precursor forms in p75NTR-mediated signalling has been the subject of several debates. Numerous studies have shown that proNGF and

proBDNF can promote cell death by interacting with a receptor complex consisting of p75NTR and sortilin (Nykjaer et al., 2004; Teng et al., 2005) and that the extracellular conversion from proBDNF into BDNF promotes long-term depression (LTD) in the hippocampus, by activating p75NTR (Pang et al., 2004; Woo et al., 2005). In addition, while it was well accepted that the pro-domain plays a role in the folding, stability and intracellular trafficking of BDNF (Kolbeck et al., 1994), recent data suggest that the prodomain *per se* may have diverse biological functions. First, Dieni et al (2012) reported that BDNF and its pro-peptide both stained large dense core vesicles in excitatory presynaptic terminals of the adult mouse hippocampus. Second, Mizui et al. (2015) showed that the BDNF pro-peptide facilitates LTD in the hippocampus. Third, Anastasia et al. (2013) showed that the prodomain is detected at high levels in the hippocampus *in vivo*, in particular after the first postnatal month, and that its secretion is activity-dependent in hippocampal neuronal cultures. Based on the relative expression of proBDNF, mBDNF and BDNF prodomain during development and in the adult brain (Yang et al., 2009; Rauskolb et al., 2010; Dieni et al., 2012; Anastasia et al., 2013), it has been hypothesized that secreted proBDNF may play a role during early development while the secreted prodomain may have biological effects in the adolescent and adult brain (Zanin et al., 2017). Consistently, our data show that modulating endogenous mBDNF levels by acting on tPA activity before the third postnatal week affects the development of PV cell innervation and that this depends on p75NTR expression by PV cells.

A common single-nucleotide polymorphism (SNP) in the human *BDNF* gene results in a Val66Met substitution in the BDNF prodomain region which is associated with

impairments in specific forms of learning and memory and with enhanced risk of developing depression and anxiety disorders in humans and mice (Chen et al., 2006; Soliman et al., 2010; Zhang et al., 2014). Since at least a subset of PV cells express p75NTR even in adulthood, it will be interesting to investigate whether the presence of the Met66 variant alters the formation and/or plasticity of PV cell innervation, thereby contributing to the endophenotypes related to neuropsychiatric disorders associated with the Val66Met polymorphism in humans.



## 2.9 References

- Anastasia A, Deinhardt K, Chao MV, Will NE, Irmady K, Lee FS, Hempstead BL, Bracken C (2013) Val66Met polymorphism of BDNF alters prodomain structure to induce neuronal growth cone retraction. *Nat Commun* 4:2490.
- Baho E, Di Cristo G (2012) Neural activity and neurotransmission regulate the maturation of the innervation field of cortical GABAergic interneurons in an age-dependent manner. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 32:911–918.
- Bavelier D, Levi DM, Li RW, Dan Y, Hensch TK (2010) Removing brakes on adult brain plasticity: from molecular to behavioral interventions. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 30:14964–14971.
- Beurdeley M, Spatazza J, Lee HHC, Sugiyama S, Bernard C, Di Nardo AA, Hensch TK, Prochiantz A (2012) Otx2 binding to perineuronal nets persistently regulates plasticity in the mature visual cortex. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 32:9429–9437.
- Bogenmann E, Thomas PS, Li Q, Kim J, Yang L-T, Pierchala B, Kaartinen V (2011) Generation of mice with a conditional allele for the p75(NTR) neurotrophin receptor gene. *Genes N Y N* 2000 49:862–869.
- Bolte S, Cordelieres FP (2007). A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *Journal of Microscopy* 224:213-232
- Bracken BK, Turrigiano GG (2009) Experience-dependent regulation of TrkB isoforms in rodent visual cortex. *Dev Neurobiol* 69:267–278.
- Cardin JA, Carlén M, Meletis K, Knoblich U, Zhang F, Deisseroth K, Tsai L-H, Moore CI (2009) Driving fast-spiking cells induces gamma rhythm and controls sensory responses. *Nature* 459:663–667.
- Carulli D, Pizzorusso T, Kwok JCF, Putignano E, Poli A, Forostyak S, Andrews MR, Deepa SS, Glant TT, Fawcett JW (2010) Animals lacking link protein have attenuated perineuronal nets and persistent plasticity. *Brain J Neurol* 133:2331–2347.
- Charalampopoulos I, Vicario A, Pediaditakis I, Gravanis A, Simi A, Ibáñez CF (2012) Genetic Dissection of Neurotrophin Signaling through the p75 Neurotrophin Receptor. *Cell Rep* 2:1563–1570.

- Chattopadhyaya B, Baho E, Huang ZJ, Schachner M, Di Cristo G (2013) Neural cell adhesion molecule-mediated Fyn activation promotes GABAergic synapse maturation in postnatal mouse cortex. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 33:5957–5968.
- Chattopadhyaya B, Di Cristo G, Higashiyama H, Knott GW, Kuhlman SJ, Welker E, Huang ZJ (2004) Experience and activity-dependent maturation of perisomatic GABAergic innervation in primary visual cortex during a postnatal critical period. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 24:9598–9611.
- Chattopadhyaya B, Di Cristo G, Wu CZ, Knott G, Kuhlman S, Fu Y, Palmiter RD, Huang ZJ (2007) GAD67-mediated GABA synthesis and signaling regulate inhibitory synaptic innervation in the visual cortex. *Neuron* 54:889–903.
- Chen Z-Y, Jing D, Bath KG, Ieraci A, Khan T, Siao C-J, Herrera DG, Toth M, Yang C, McEwen BS, Hempstead BL, Lee FS (2006) Genetic variant BDNF (Val66Met) polymorphism alters anxiety-related behavior. *Science* 314:140–143.
- Cho KK, Hoch R, Lee AT, Patel T, Rubenstein JL, Sohal VS (2015) Gamma rhythms link prefrontal interneuron dysfunction with cognitive inflexibility in *Dlx5/6(+/-)* mice. *Neuron* 85:1332–1343.
- Cho RY, Konecky RO, Carter CS (2006) Impairments in frontal cortical gamma synchrony and cognitive control in schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:19878–19883.
- Deinhardt K, Kim T, Spellman DS, Mains RE, Eipper BA, Neubert TA, Chao MV, Hempstead BL (2011) Neuronal growth cone retraction relies on proneurotrophin receptor signaling through Rac. *Sci Signal* 4:ra82.
- Del Pino I, García-Frigola C, Dehorter N, Brotons-Mas JR, Alvarez-Salvado E, Martínez de Lagrán M, Ciceri G, Gabaldón MV, Moratal D, Dierssen M, Canals S, Marín O, Rico B (2013) *ErbB4* deletion from fast-spiking interneurons causes schizophrenia-like phenotypes. *Neuron* 79:1152–1168.
- Di Cristo G, Chattopadhyaya B, Kuhlman SJ, Fu Y, Bélanger M-C, Wu CZ, Rutishauser U, Maffei L, Huang ZJ (2007) Activity-dependent PSA expression regulates inhibitory maturation and onset of critical period plasticity. *Nat Neurosci* 10:1569–1577.
- Dienel SJ, Lewis DA (2018) Alterations in cortical interneurons and cognitive function in schizophrenia. *Neurobiol Dis*. Available at: <http://europepmc.org/abstract/med/29936230> [Accessed September 26, 2018].

- Dieni S, Matsumoto T, Dekkers M, Rauskolb S, Ionescu MS, Deogracias R, Gundelfinger ED, Kojima M, Nestel S, Frotscher M, Barde Y-A (2012) BDNF and its pro-peptide are stored in presynaptic dense core vesicles in brain neurons. *J Cell Biol* 196:775–788.
- Do KQ, Cuenod M, Hensch TK (2015) Targeting Oxidative Stress and Aberrant Critical Period Plasticity in the Developmental Trajectory to Schizophrenia. *Schizophr Bull* 41:835–846.
- Fagiolini M, Fritschy J-M, Löw K, Möhler H, Rudolph U, Hensch TK (2004) Specific GABAA circuits for visual cortical plasticity. *Science* 303:1681–1683.
- Fagiolini M, Hensch TK (2000) Inhibitory threshold for critical-period activation in primary visual cortex. *Nature* 404:183–186.
- Fries P (2009) Neuronal gamma-band synchronization as a fundamental process in cortical computation. *Annu Rev Neurosci* 32:209–224.
- Fries P, Reynolds JH, Rorie AE, Desimone R (2001) Modulation of oscillatory neuronal synchronization by selective visual attention. *Science* 291:1560–1563.
- Gao X, Daugherty RL, Tourtellotte WG (2007) Regulation of low affinity neurotrophin receptor (p75NTR) by early growth response (Egr) transcriptional regulators. *Mol Cell Neurosci* 36:501–514.
- Giza JL, Kim J, Meyer HC, Anastasia A, Dincheva I, Zheng CI, Lopez K, Bains H, Yang J, Bracken C, Liston C, Jing D, Hempstead BL, Lee FS (2018) The BDNF Val66Met Prodomain Disassembles Dendritic Spines Altering Fear Extinction Circuitry and Behavior. *Neuron* 99:163-178.e6.
- Groleau M, Nguyen HN, Vanni MP, Huppé-Gourgues F, Casanova C, Vaucher E (2014) Impaired functional organization in the visual cortex of muscarinic receptor knock-out mice. *NeuroImage* 98:233–242.
- Harauzov A, Spolidoro M, DiCristo G, De Pasquale R, Cancedda L, Pizzorusso T, Viegi A, Berardi N, Maffei L (2010) Reducing intracortical inhibition in the adult visual cortex promotes ocular dominance plasticity. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 30:361–371.
- Hippenmeyer S, Vrieseling E, Sigrist M, Portmann T, Laengle C, Ladle DR, Arber S (2005) A developmental switch in the response of DRG neurons to ETS transcription factor signaling. *PLoS Biol* 3:e159.

- Holm MM, Nieto-Gonzalez JL, Vardya I, Vaegter CB, Nykjaer A, Jensen K (2009) Mature BDNF, but not proBDNF, reduces excitability of fast-spiking interneurons in mouse dentate gyrus. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 29:12412–12418.
- Hong EJ, McCord AE, Greenberg ME (2008) A biological function for the neuronal activity-dependent component of Bdnf transcription in the development of cortical inhibition. *Neuron* 60:610–624.
- Howard MW, Rizzuto DS, Caplan JB, Madsen JR, Lisman J, Aschenbrenner-Scheibe R, Schulze-Bonhage A, Kahana MJ (2003) Gamma oscillations correlate with working memory load in humans. *Cereb Cortex N Y N 1991* 13:1369–1374.
- Huang ZJ, Kirkwood A, Pizzorusso T, Porciatti V, Morales B, Bear MF, Maffei L, Tonegawa S (1999) BDNF regulates the maturation of inhibition and the critical period of plasticity in mouse visual cortex. *Cell* 98:739–755.
- Irmady K, Jackman KA, Padow VA, Shahani N, Martin LA, Cerchietti L, Unsicker K, Iadecola C, Hempstead BL (2014) Mir-592 regulates the induction and cell death-promoting activity of p75<sup>NTR</sup> in neuronal ischemic injury. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 34:3419–3428.
- Je HS, Yang F, Ji Y, Potluri S, Fu X-Q, Luo Z-G, Nagappan G, Chan JP, Hempstead B, Son Y-J, Lu B (2013) ProBDNF and mature BDNF as punishment and reward signals for synapse elimination at mouse neuromuscular junctions. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 33:9957–9962.
- Kang E, Durand S, LeBlanc JJ, Hensch TK, Chen C, Fagiolini M (2013) Visual Acuity Development and Plasticity in the Absence of Sensory Experience. *J Neurosci* 33:17789–17796.
- Kobayashi Y, Ye Z, Hensch TK (2015) Clock genes control cortical critical period timing. *Neuron* 86:264–275.
- Kohara K, Yasuda H, Huang Y, Adachi N, Sohya K, Tsumoto T (2007) A local reduction in cortical GABAergic synapses after a loss of endogenous brain-derived neurotrophic factor, as revealed by single-cell gene knock-out method. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 27:7234–7244.
- Kolbeck R, Jungbluth S, Barde YA (1994) Characterisation of neurotrophin dimers and monomers. *Eur J Biochem* 225:995–1003.
- Lehmann K, Löwel S (2008) Age-dependent ocular dominance plasticity in adult mice. *PLoS One* 3:e3120.

- Lim Y-S, McLaughlin T, Sung T-C, Santiago A, Lee K-F, O'Leary DDM (2008) p75(NTR) mediates ephrin-A reverse signaling required for axon repulsion and mapping. *Neuron* 59:746–758.
- Lin Z, Tann JY, Goh ETH, Kelly C, Lim KB, Gao JF, Ibanez CF (2015) Structural basis of death domain signaling in the p75 neurotrophin receptor. *eLife* 4:e11692.
- Mizui T, Ishikawa Y, Kumanogoh H, Lume M, Matsumoto T, Hara T, Yamawaki S, Takahashi M, Shiosaka S, Itami C, Uegaki K, Saarma M, Kojima M (2015) BDNF pro-peptide actions facilitate hippocampal LTD and are altered by the common BDNF polymorphism Val66Met. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112:E3067-3074.
- Morishita H, Cabungcal J-H, Chen Y, Do KQ, Hensch TK (2015) Prolonged Period of Cortical Plasticity upon Redox Dysregulation in Fast-Spiking Interneurons. *Biol Psychiatry* 78:396–402.
- Naska S, Lin DC, Miller FD, Kaplan DR (2010) p75NTR is an obligate signaling receptor required for cues that cause sympathetic neuron growth cone collapse. *Mol Cell Neurosci* 45:108–120.
- Nykjaer A, Lee R, Teng KK, Jansen P, Madsen P, Nielsen MS, Jacobsen C, Kliemann M, Schwarz E, Willnow TE, Hempstead BL, Petersen CM (2004) Sortilin is essential for proNGF-induced neuronal cell death. *Nature* 427:843–848.
- Pang PT, Teng HK, Zaitsev E, Woo NT, Sakata K, Zhen S, Teng KK, Yung W-H, Hempstead BL, Lu B (2004) Cleavage of proBDNF by tPA/plasmin is essential for long-term hippocampal plasticity. *Science* 306:487–491.
- Picard N, Leslie JH, Trowbridge SK, Subramanian J, Nedivi E, Fagiolini M (2014) Aberrant development and plasticity of excitatory visual cortical networks in the absence of cpg15. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 34:3517–3522.
- Pizzorusso T, Medini P, Berardi N, Chierzi S, Fawcett JW, Maffei L (2002) Reactivation of ocular dominance plasticity in the adult visual cortex. *Science* 298:1248–1251.
- Porciatti V, Pizzorusso T, Maffei L (1999) The visual physiology of the wild type mouse determined with pattern VEPs. *Vision Res* 39:3071–3081.
- Rauskolb S, Zagrebelsky M, Dreznjak A, Deogracias R, Matsumoto T, Wiese S, Erne B, Sendtner M, Schaeren-Wiemers N, Korte M, Barde Y-A (2010) Global deprivation of brain-derived neurotrophic factor in the CNS reveals an area-specific requirement for dendritic growth. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 30:1739–1749.

- Schwartz N, Schohl A, Ruthazer ES (2011) Activity-dependent transcription of BDNF enhances visual acuity during development. *Neuron* 70:455–467.
- Sohal VS, Zhang F, Yizhar O, Deisseroth K (2009) Parvalbumin neurons and gamma rhythms enhance cortical circuit performance. *Nature* 459:698–702.
- Soliman F, Glatt CE, Bath KG, Levita L, Jones RM, Pattwell SS, Jing D, Tottenham N, Amso D, Somerville LH, Voss HU, Glover G, Ballon DJ, Liston C, Teslovich T, Van Kempen T, Lee FS, Casey BJ (2010) A genetic variant BDNF polymorphism alters extinction learning in both mouse and human. *Science* 327:863–866.
- Sugiyama S, Di Nardo AA, Aizawa S, Matsuo I, Volovitch M, Prochiantz A, Hensch TK (2008) Experience-dependent transfer of Otx2 homeoprotein into the visual cortex activates postnatal plasticity. *Cell* 134:508–520.
- Sun Y, Lim Y, Li F, Liu S, Lu J-J, Haberberger R, Zhong J-H, Zhou X-F (2012) ProBDNF collapses neurite outgrowth of primary neurons by activating RhoA. *PloS One* 7:e35883.
- Takada N, Pi HJ, Sousa VH, Waters J, Fishell G, Kepecs A, Osten P (2014) A developmental cell-type switch in cortical interneurons leads to a selective defect in cortical oscillations. *Nat Commun* 5:5333.
- Telley L, Cadilhac C, Cioni J-M, Saywell V, Jahannault-Talignani C, Huettl RE, Sarrailh-Faivre C, Dayer A, Huber AB, Ango F (2016) Dual Function of NRP1 in Axon Guidance and Subcellular Target Recognition in Cerebellum. *Neuron* 91:1276–1291.
- Teng HK, Teng KK, Lee R, Wright S, Tevar S, Almeida RD, Kermani P, Torkin R, Chen Z-Y, Lee FS, Kraemer RT, Nykjaer A, Hempstead BL (2005) ProBDNF induces neuronal apoptosis via activation of a receptor complex of p75NTR and sortilin. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 25:5455–5463.
- Unsain N, Nuñez N, Anastasía A, Mascó DH (2008) Status epilepticus induces a TrkB to p75 neurotrophin receptor switch and increases brain-derived neurotrophic factor interaction with p75 neurotrophin receptor: an initial event in neuronal injury induction. *Neuroscience* 154:978–993.
- Volosin M, Trotter C, Cragolini A, Kenchappa RS, Light M, Hempstead BL, Carter BD, Friedman WJ (2008) Induction of proneurotrophins and activation of p75NTR-mediated apoptosis via neurotrophin receptor-interacting factor in hippocampal neurons after seizures. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 28:9870–9879.

- Wang F, Flanagan J, Su N, Wang L-C, Bui S, Nielson A, Wu X, Vo H-T, Ma X-J, Luo Y (2012) RNAscope: a novel in situ RNA analysis platform for formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *J Mol Diagn JMD* 14:22–29.
- Winnubst J, Cheyne JE, Niculescu D, Lohmann C (2015) Spontaneous Activity Drives Local Synaptic Plasticity In Vivo. *Neuron* 87:399–410.
- Woo NH, Teng HK, Siao C-J, Chiaruttini C, Pang PT, Milner TA, Hempstead BL, Lu B (2005) Activation of p75NTR by proBDNF facilitates hippocampal long-term depression. *Nat Neurosci* 8:1069–1077.
- Xu Q, Tam M, Anderson SA (2008) Fate mapping Nkx2.1-lineage cells in the mouse telencephalon. *J Comp Neurol* 506:16–29.
- Yamashita T, Fujitani M, Yamagishi S, Hata K, Mimura F (2005) Multiple signals regulate axon regeneration through the Nogo receptor complex. *Mol Neurobiol* 32:105–111.
- Yamashita T, Tohyama M (2003) The p75 receptor acts as a displacement factor that releases Rho from Rho-GDI. *Nat Neurosci* 6:461–467.
- Yang J, Harte-Hargrove LC, Siao C-J, Marinic T, Clarke R, Ma Q, Jing D, Lafrancois JJ, Bath KG, Mark W, Ballon D, Lee FS, Scharfman HE, Hempstead BL (2014) proBDNF negatively regulates neuronal remodeling, synaptic transmission, and synaptic plasticity in hippocampus. *Cell Rep* 7:796–806.
- Yang J, Siao C-J, Nagappan G, Marinic T, Jing D, McGrath K, Chen Z-Y, Mark W, Tessarollo L, Lee FS, Lu B, Hempstead BL (2009) Neuronal release of proBDNF. *Nat Neurosci* 12:113–115.
- Zanin JP, Unsain N, Anastasia A (2017) Growth factors and hormones pro-peptides: the unexpected adventures of the BDNF prodomain. *J Neurochem* 141:330–340.
- Zhang L, Benedek DM, Fullerton CS, Forsten RD, Naifeh JA, Li XX, Hu XZ, Li H, Jia M, Xing GQ, Benevides KN, Ursano RJ (2014) PTSD risk is associated with BDNF Val66Met and BDNF overexpression. *Mol Psychiatry* 19:8–10.

# 2.10 Figures

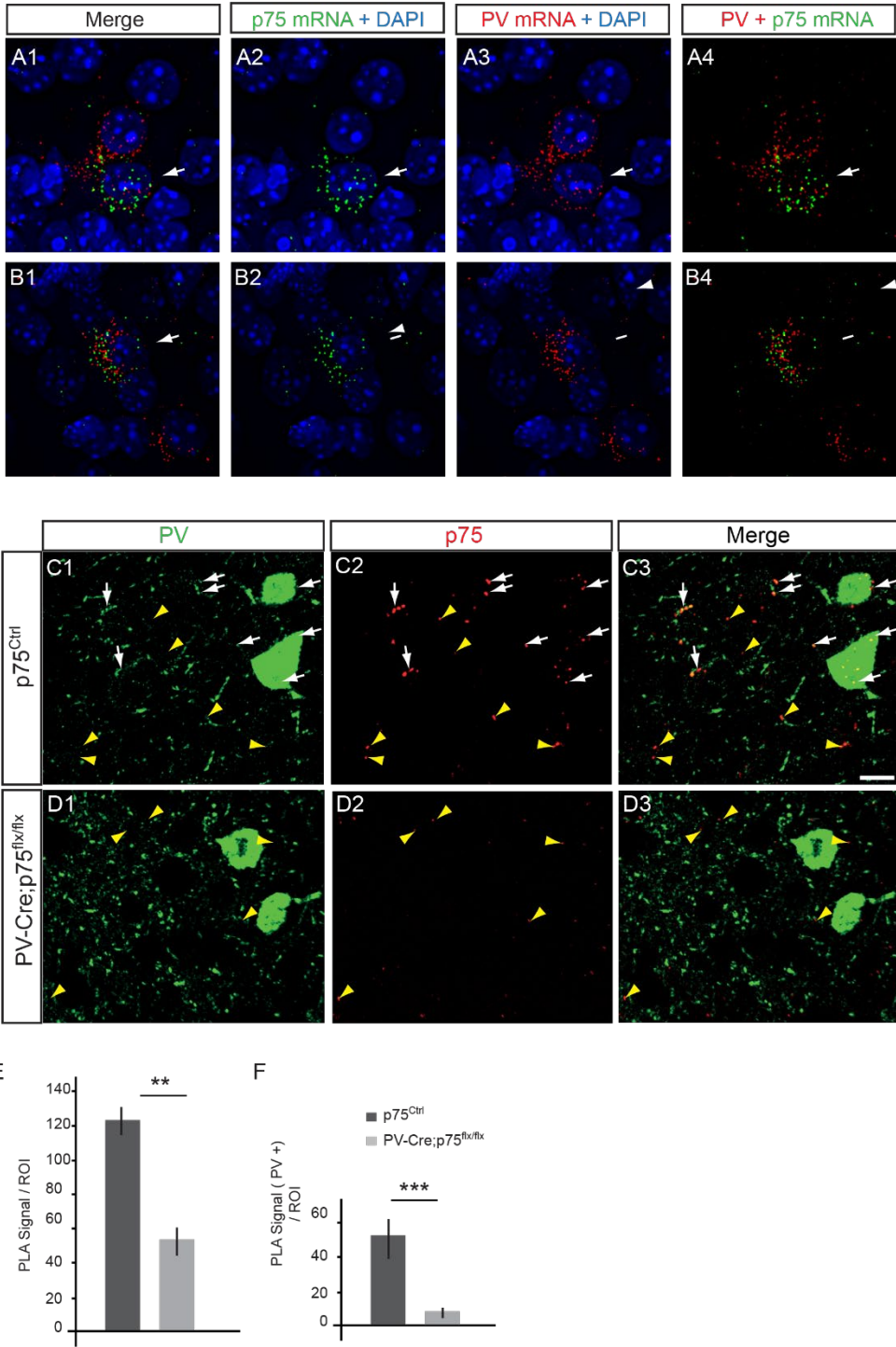


Figure 1. – A subset of PV cells express p75NTR mRNA and protein.



(A, B). Images from coronal brain section of P14 mouse hybridized with PV (Pvalb) and p75 (Ngfr) probes using fluorescent multiplex RNAscope technology. p75 mRNA (A2, B2; green dots) is detected in cells expressing PV mRNA (A3, B3; red dots). White arrows point to p75 and PV signals around the same nucleus, identified by DAPI staining (blue). (C, D) Cortical slices from p75NTR<sup>flx/flx</sup> (C) or PV\_Cre;p75NTR<sup>flx/flx</sup> (D) P60 mice co-immunostained with PV (C1, D1; green) and p75NTR using PLA (C2, D2; Red dots). White arrows point to PLA signals that colocalize with PV signals (C1-3, D1-3). Note that p75NTR signal can be observed in PV cell boutons. Yellow arrowheads show PLA signals without PV colocalization (C1-3, D1-3). Scale bar: 10µm (E) Quantification of PLA signal reveals a significant reduction of total PLA signals per ROI in PV\_Cre;p75NTR<sup>flx/flx</sup> as compared to wild-type littermates. t-test, df=8, t=5.391, p=0.004. (F) Further, PLA signals that co-localized with PV labeling decrease significantly in PV\_Cre;p75NTR<sup>flx/flx</sup> as compared to wild-type littermates. t-test, df=8, t=8,728, p=0.0006.

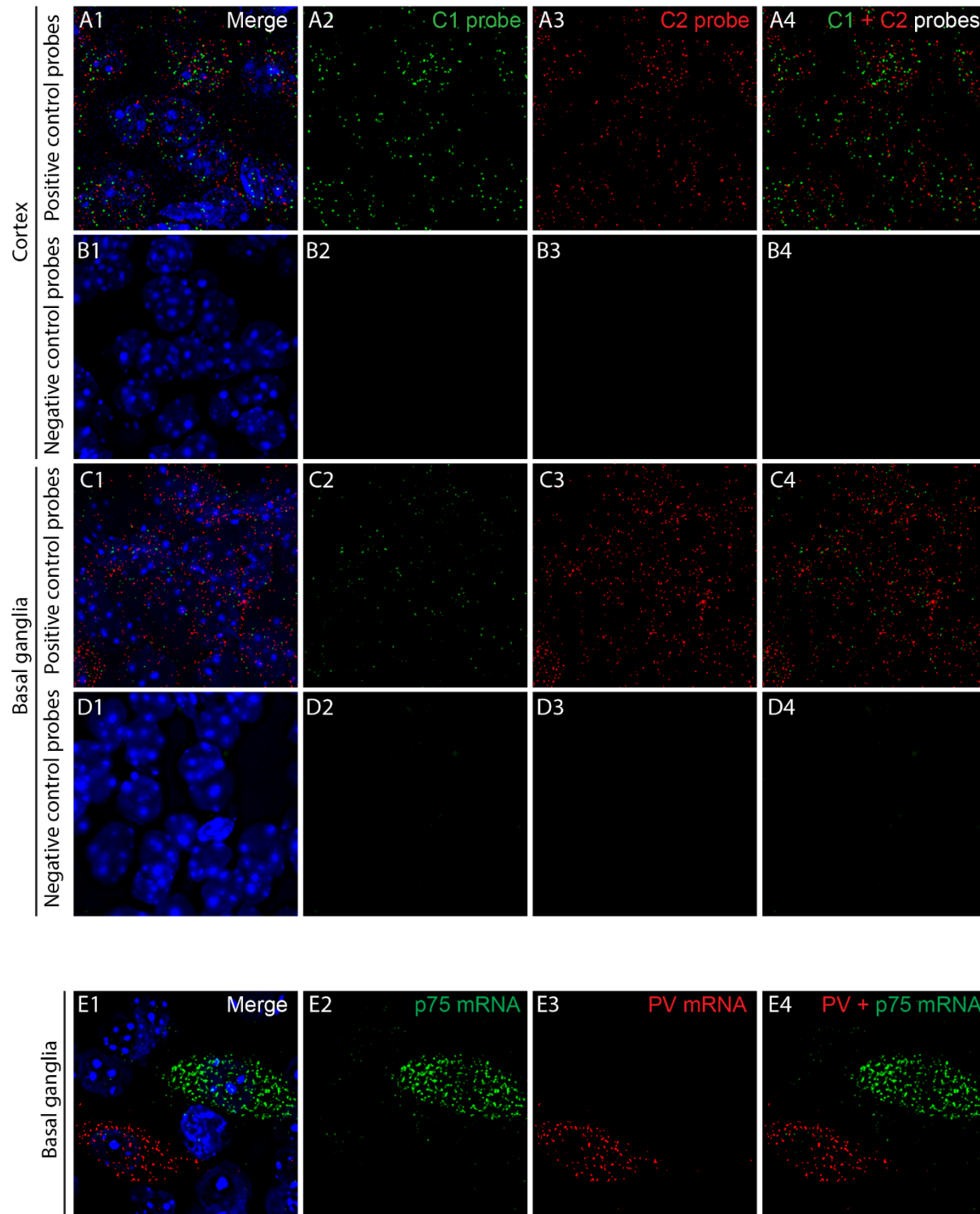
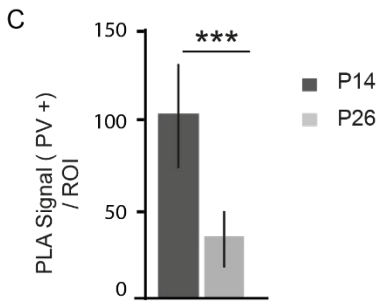
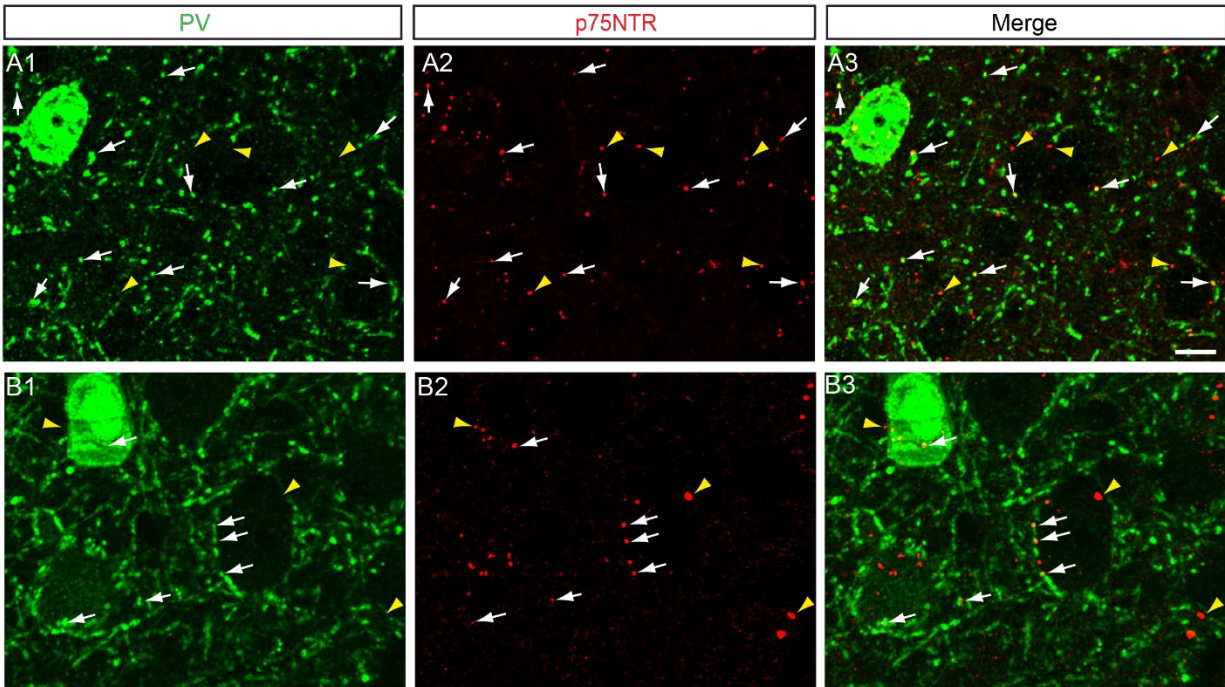


Figure 2. – Controls for RNAscope probe specificity.

(A-D) Validation of the RNAscope Fluorescent Multiplex assay using positive and negative control probes, provided by the manufacturer. Coronal brain slices were hybridized with the RNAscope positive control probes (A, C) and negative control probes (B, D). Images were taken from the cortex (A, B) and the basal ganglia (C-E). (E) In the basal ganglia cells express exclusively either PV mRNA or p75 mRNA.



**Figure 3. – p75NTR expression in cortical PV cells decreases during the first postnatal month.**

(A, B) Cortical slices from P14 (A) and P26 (B) wild-type mice immunostained with parvalbumin (PV) to label PV cells (A1, B1; green) and PLA-mediated labeling for p75NTR (A2, B2; red dots, henceforth indicated in figures as p75). White arrows point to PLA signals that co-localize with PV signals (A1-3, B1-3). Yellow arrowheads show PLA signals without PV co-localization (A1-3, B1-3). Note that at both ages, p75NTR signal can be found in both PV-positive cell somata and putative boutons. Scale bar: 10µm.

(C) Quantification of p75NTR PLA intensity in PV cells at different postnatal ages shows a significantly decline of p75NTR signal in PV cells and boutons between P14 and P26 (unpaired t-test with Welch's correction,  $df=22.44$ ,  $t=7.642$ ,  $p<0.0001$ ).  $n=4$  animals for each age point.

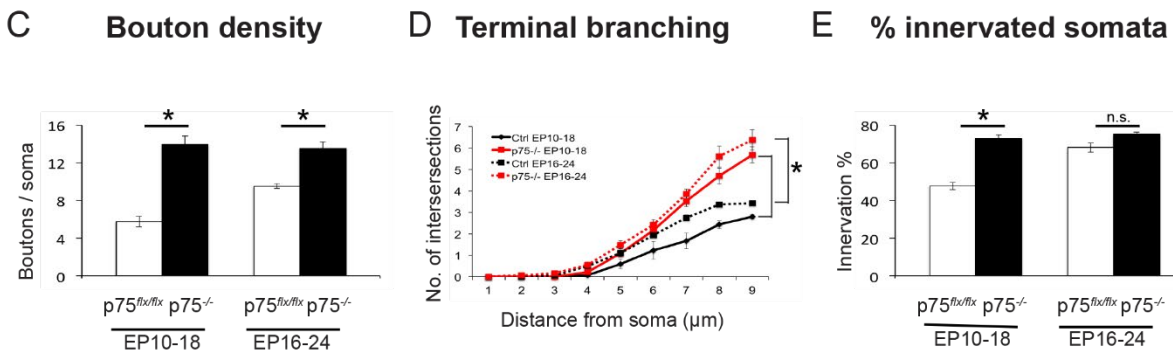
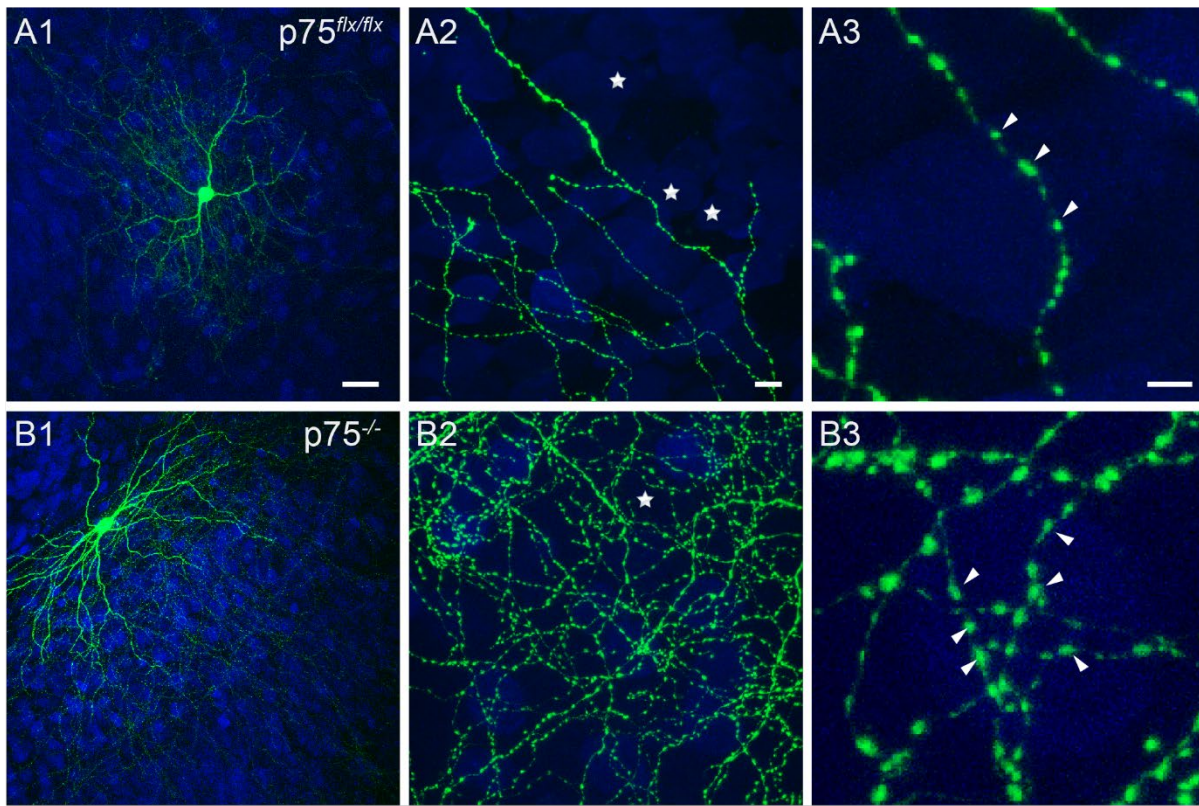


Figure 4. – **Cre-mediated inactivation of p75NTR in single PV cells induces the formation of more complex innervations.**

(A) Control PV cell transfected with P<sub>G67</sub>-GFP (Ctrl, green) in EP18 organotypic cultures from p75<sup>flx/flx</sup> mice shows immature perisomatic innervation with one terminal, axonal branching and small boutons. (B) PV cells transfected with P<sub>G67</sub>-Cre/GFP from EP10-18

(p75<sup>-/-</sup> PV cells) shows exuberant perisomatic innervation characterized by multiple terminal axonal branches (B2) bearing numerous clustered boutons (B3; arrowheads) around neuronal somata (NeuN immunostaining, blue). Stars indicate NeuN-positive somata that are not innervated. (A3) and (B3) are from regions in (A2) and (B2). Scale bar, A1, B1: 50µm; A2, B2: 5µm; A3, B3: 3µm. Perisomatic boutons density (C), terminal branching (D) and percentage of innervated cells (E) of p75<sup>flx/flx</sup> and p75<sup>-/-</sup> PV cells transfected at EP10-18 or EP16-24 (C) EP10-18: unpaired t-test, df=13, t=8.835, p<0.0001, EP16-24: Mann Whitney test, p=0.0022. (D) EP10-18: Mann Whitney test: at 5,6 µm, p=0.0037; at 7,8,9 µm, p=0.0003; EP16-24: unpaired t-test: at 6 µm, df=10, t=2.513, p=0.0307; at 7µm, df=10, t=4.908, p=0.0006; at 8µm, df=10, t=5.065, p=0.0005; at 9µm, df=10, t=6.063, p=0.0001. (E) EP10-18: unpaired t-test, df=13, t=7.017, p<0.0001; EP16-24: unpaired t-test, df=10, t=1.642, p=0.1315. EP10-18: n = 8 p75<sup>-/-</sup> PV cells, n = 7 p75<sup>flx/flx</sup> PV cells. EP16-24: n = 6 p75<sup>-/-</sup> PV cells, n = 6 p75<sup>flx/flx</sup> PV cells.

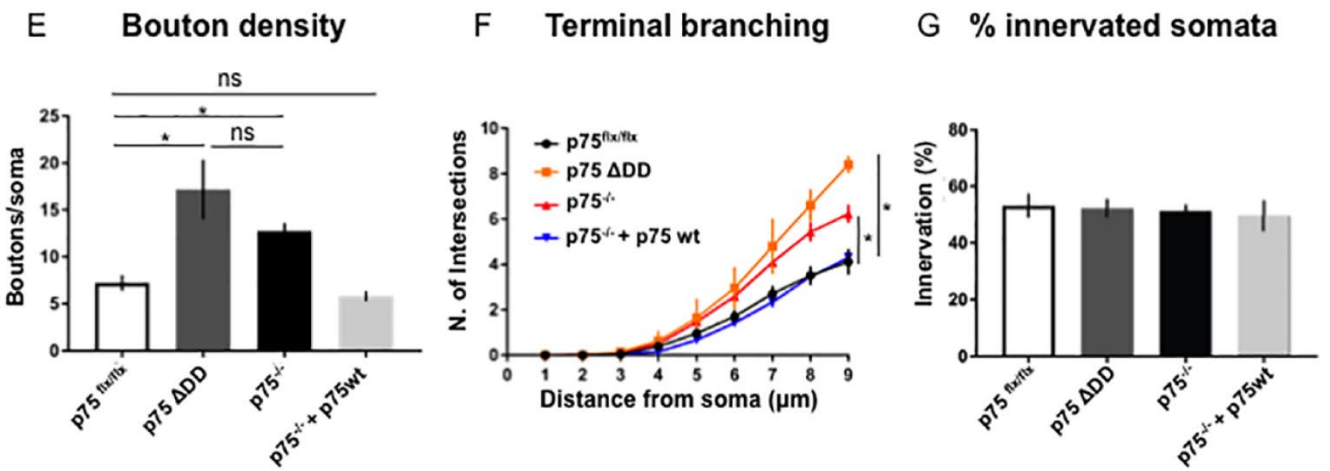
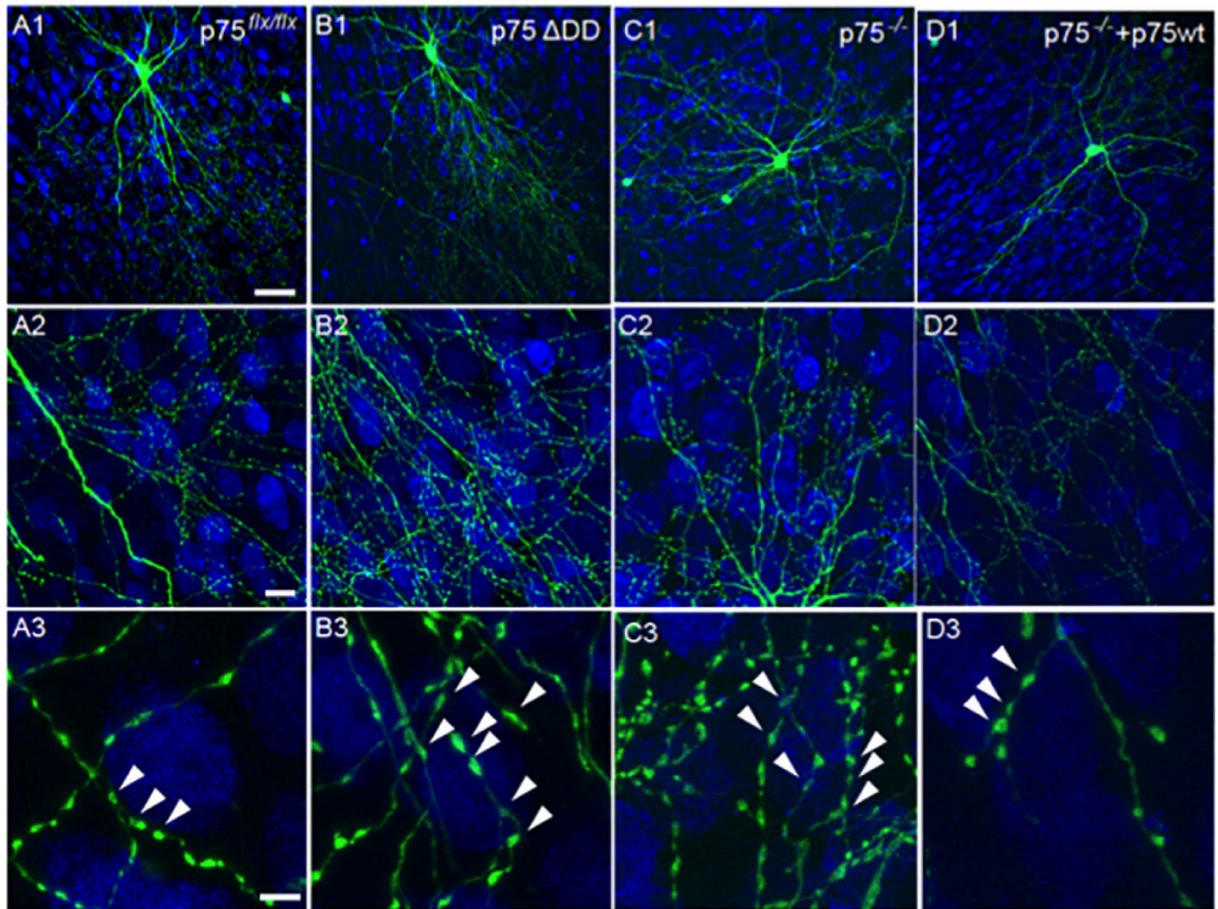


Figure 5. – p75NTR $\Delta\Delta\Delta$  mimics, while p75NTRwt rescues the innervation phenotype of p75NTR<sup>-/-</sup> PV cells.



(A) Control PV cell transfected with P<sub>G67</sub>-GFP (Ctrl, green) in EP24 organotypic cultures from p75<sup>flx/flx</sup> mice. (B) PV cells transfected with P<sub>G67</sub>-GFP and a dominant negative mutant form of p75NTR, p75NTR $\Delta$ DD, from EP16-24 (p75<sup>-/-</sup> p75 $\Delta$ DD PV cells) shows more complex perisomatic innervation characterized by multiple terminal axonal branches (B2) bearing numerous clustered boutons (B3; arrowheads) around NeuN-positive somata (blue). (C) PV cells transfected with P<sub>G67</sub>-Cre/GFP (p75<sup>-/-</sup> PV cells) resemble p75 $\Delta$ DD PV cells. (D) p75<sup>-/-</sup> PV cells transfected with p75NTR cDNA (p75<sup>-/-</sup> + p75wt PV cells) are indistinguishable from control PV cells. A3-D3 are from regions in A2-D2. Scale bar, A1-D1: 50 $\mu$ m; A2-D2: 10 $\mu$ m; A3-D3: 5 $\mu$ m. (E) Perisomatic boutons density (one-way Anova, F(3,26)=8.854, p=0.0003). (F) Terminal branching (one-way Anova, at 7 $\mu$ m F(3,26)=4.529, p=0.0110; at 8 $\mu$ m F(3,26)=10.15, p=0.0001; at 9 $\mu$ m F(3,26)=16.05, p<0.0001). (G) Percentage of innervated cells (one-Anova, F(3, 26)=1.303, p=0.3101). PV cells: n = 9 p75<sup>flx/flx</sup>, n= 5 p75 $\Delta$ DD, n = 9 p75<sup>-/-</sup> PV cells, n = 7 p75<sup>-/-</sup> + p75wt.

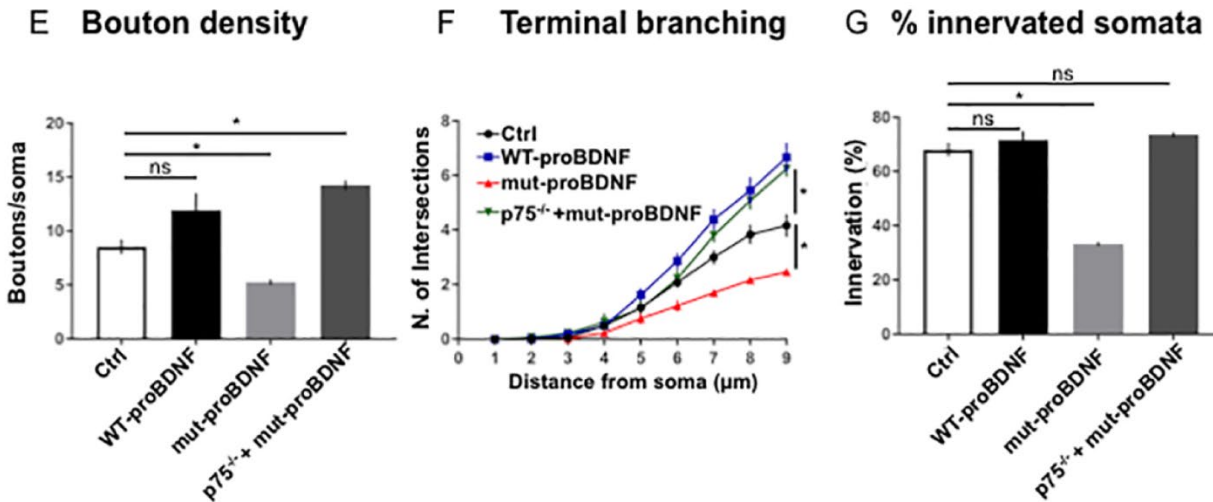
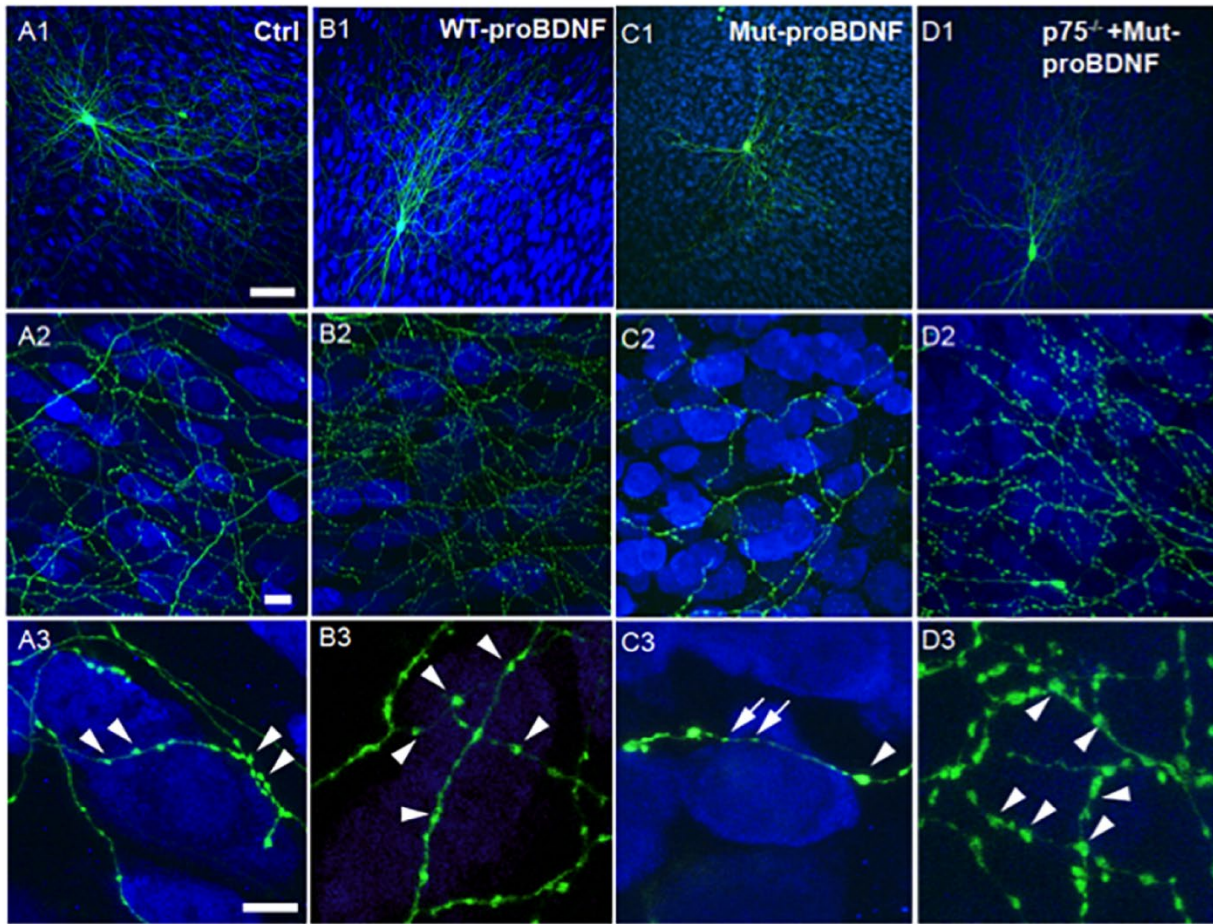
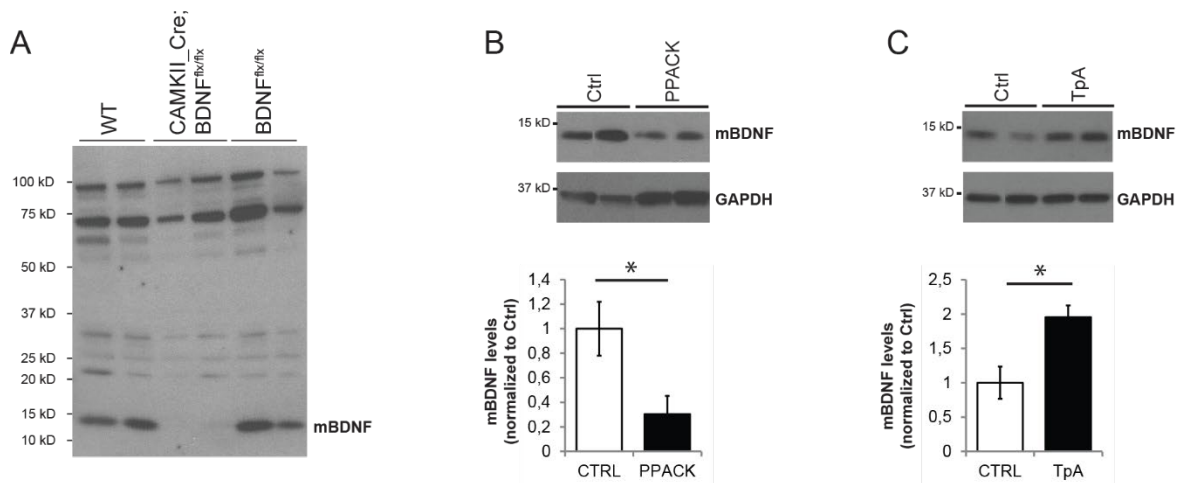


Figure 6. – mut-proBDNF mediated activation of p75NTR in PV cells during their maturation phase impairs the development of their innervations.

(A) Control PV cell (A1, Ctrl, green) at EP24 with exuberant innervation field characterized by extensive branching contacting the majority of potential targets, dense boutons along axons (A2), and terminal branches with prominent and clustered boutons (A3; arrowheads) around NeuN-positive somata (blue). (B) PV cell treated with wt-proBDNF from EP16-24 shows overall similar axon size (B1) and perisomatic bouton density (B3; arrowheads), however axonal branching appear slightly increased (B3). (C) PV cell treated with mut-proBDNF shows a reduction both in percentage of innervated cells (C2) and perisomatic innervation (C3). Boutons appear more irregular with some large (arrowheads) and many smaller ones (arrows). (D) p75NTR<sup>-/-</sup> PV cells treated with mut-proBDNF are undistinguishable from untreated p75NTR<sup>-/-</sup> PV cells (compared with Figure 4B1-3). Scale bar, A1-D1: 50µm; A2-D2: 10µm; A3-D3: 5µm. (E) Perisomatic boutons density (one-way Anova,  $F(3,31)=11.89$ ,  $p<0.0001$ ; p75<sup>fix/fix</sup> vs p75 $\Delta$ DD PV cells,  $p=0.0002$ ; p75<sup>fix/fix</sup> vs p75<sup>-/-</sup> PV cells,  $p=0.0141$ ; p75<sup>fix/fix</sup> vs p75<sup>-/-</sup> + p75wt PV cells,  $p=0.8533$ ; p75 $\Delta$ DD vs p75<sup>-/-</sup> PV cells,  $p=0.1314$ ). (F) Terminal branching (one-way Anova, at 7µm  $F(3,31)=15.27$ ,  $p<0.0001$ ; at 8µm  $F(3,31)=14.10$ ,  $p<0.0001$ ; at 9µm  $F(3,31)=21.08$ ,  $p<0.0001$ ). Note that both wild-type PV cells treated with wt-proBDNF and p75NTR<sup>-/-</sup> cells treated with mut-proBDNF show significantly higher Scholl intersection numbers than ctrl PV cell at 8 and 9 µm ( $p<0.05$ ), while PV cells treated with mut-proBDNF show significantly reduced Scholl intersection numbers than ctrl PV cell at 7, 8 and 9 µm ( $p<0.01$ ). (G) Percentage of innervated cells of the four experimental groups (one-way Anova,  $F(3,31)=69.65$ ,  $p<0.0001$ ).  $n = 9$  ctrl PV cells,  $n = 11$  wt-proBDNF treated PV cells,  $n = 8$  mut-proBDNF treated PV cells,  $n = 7$  mut-proBDNF treated p75<sup>-/-</sup> PV cells.



**Figure 7. – Blocking or increasing tPA activity during early postnatal development reduces and increases mBDNF levels in organotypic cultures, respectively.**

(A) Full western blot of mBDNF expression in brain samples from adult wt, CaMKII; BDNF<sup>flox/flox</sup> and BDNF<sup>flox/flox</sup> mice. Each lane represents a different mouse brain. Note that the 14kDa band, corresponding to mBDNF, is not detectable when *Bdnf* is deleted in pyramidal cells (CaMKII-Cre;BDNF<sup>lox/lox</sup> conditional knockout mouse) thus confirming the specificity of the antibody we used for these experiments (1:200, Santa Cruz, N20:sc-546). (B, C) Western blot analysis of mBDNF (14KDa) of cortical organotypic cultures treated with either PPACK (B) or tPA (C) for 8 days, from EP10-18. Each lane corresponds to a single sample, which is constituted by 6 organotypic cultures pooled together. PPACK treatment significantly decreases mBDNF levels (B), while tPA increases them (C). Unpaired t-test,  $p < 0.05$  (B)  $n = 3$  Ctrl and  $n = 3$  PPACK treated samples. (C).  $n = 5$  Ctrl and  $n = 4$  tPA treated samples. Samples are from different mice.

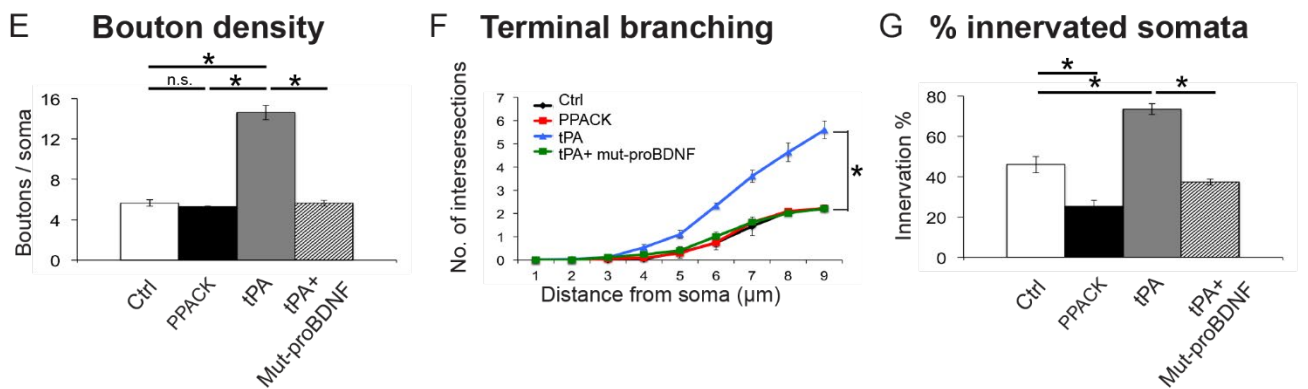
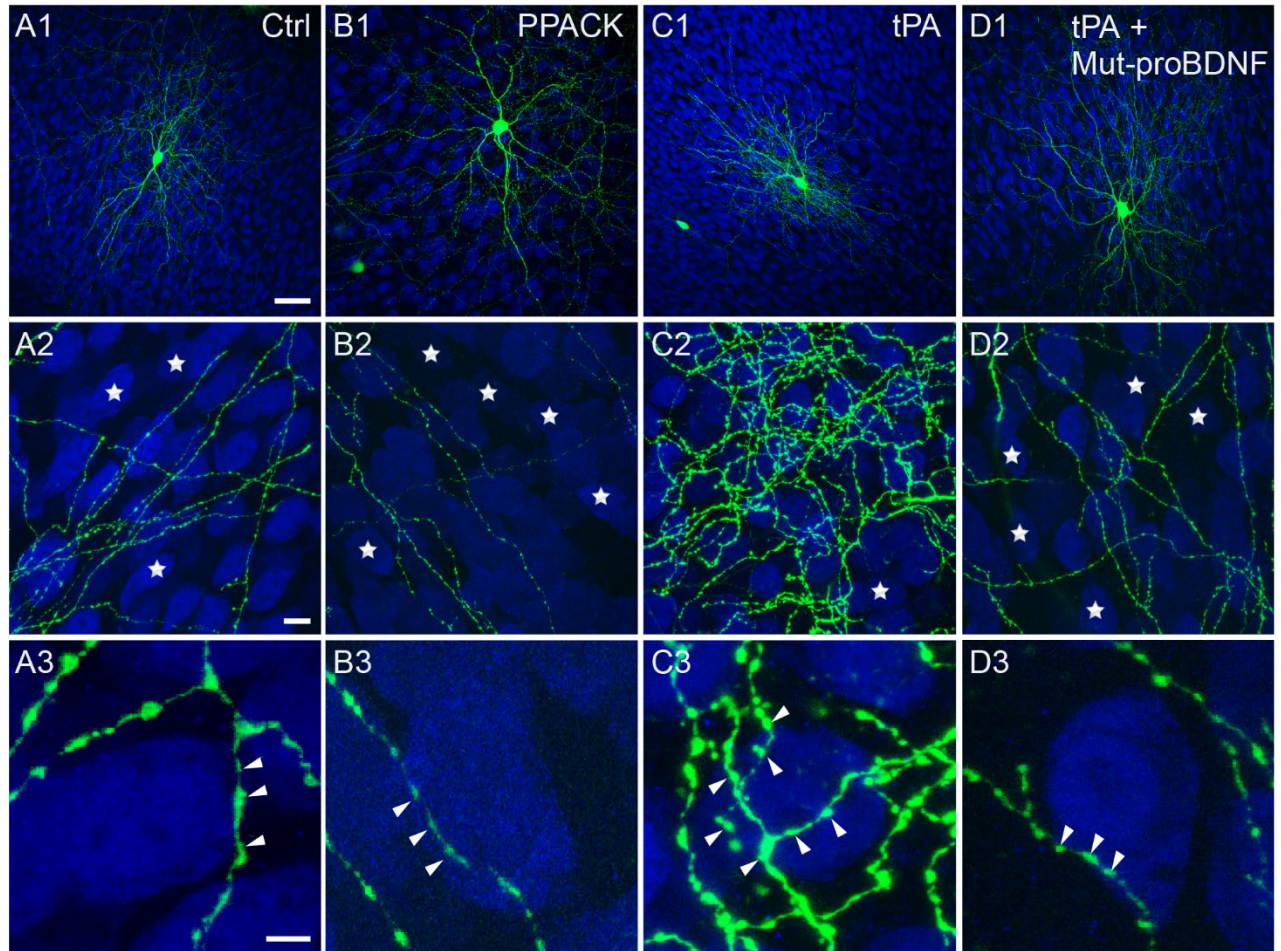


Figure 8. – **Modulation of tPA activity affects the formation of PV cell innervations during early postnatal development.**

(A) Control EP18 PV cell (A1, Ctrl, green). (B) PV cell treated with the tPA inhibitor PPACK from EP10-18 shows simpler axonal arborisation, contacting less potential

targets (B2, NeuN-positive somata in blue). (C) PV cell treated with tPA in the same time window shows a very complex axonal arbour (C2) and an increase in both terminal branching and perisomatic boutons (C3, arrowheads) compared to control cells (A2, A3). (D) PV cell treated simultaneously with tPA and mut-proBDNF shows axonal branching and perisomatic innervation more similar to those formed by PV cell treated with mut-proBDNF alone, suggesting that the effects of tPA application may be mediated by a decrease in endogenous proBDNF/mBDNF ratio. Scale bar, A1-D1: 50 $\mu$ m; A2-D2: 10 $\mu$ m; A3-D3: 5 $\mu$ m. (E) Perisomatic boutons density (one-way Anova,  $F(3,20)=121.2$ ,  $p<0.0001$ ). (F) terminal branching (one-way Anova, at 5 $\mu$ m  $F(3,20)=5.692$ ,  $p=0.0055$ , at 6 $\mu$ m  $F(3,20)=19.67$ ,  $p<0.0001$ ; at 7 $\mu$ m  $F(3,20)=34.58$ ,  $p<0.0001$ ; at 8 $\mu$ m  $F(3,20)=32.81$ ,  $p<0.0001$ ; at 9 $\mu$ m  $F(3,20)=62.47$ ,  $p<0.0001$ ). (G) Percentage of innervated cells (one-way Anova,  $F(3,20)=61.99$ ,  $p <0.0001$ ) of the four experimental groups. N = 6 PV cells for all experimental groups.

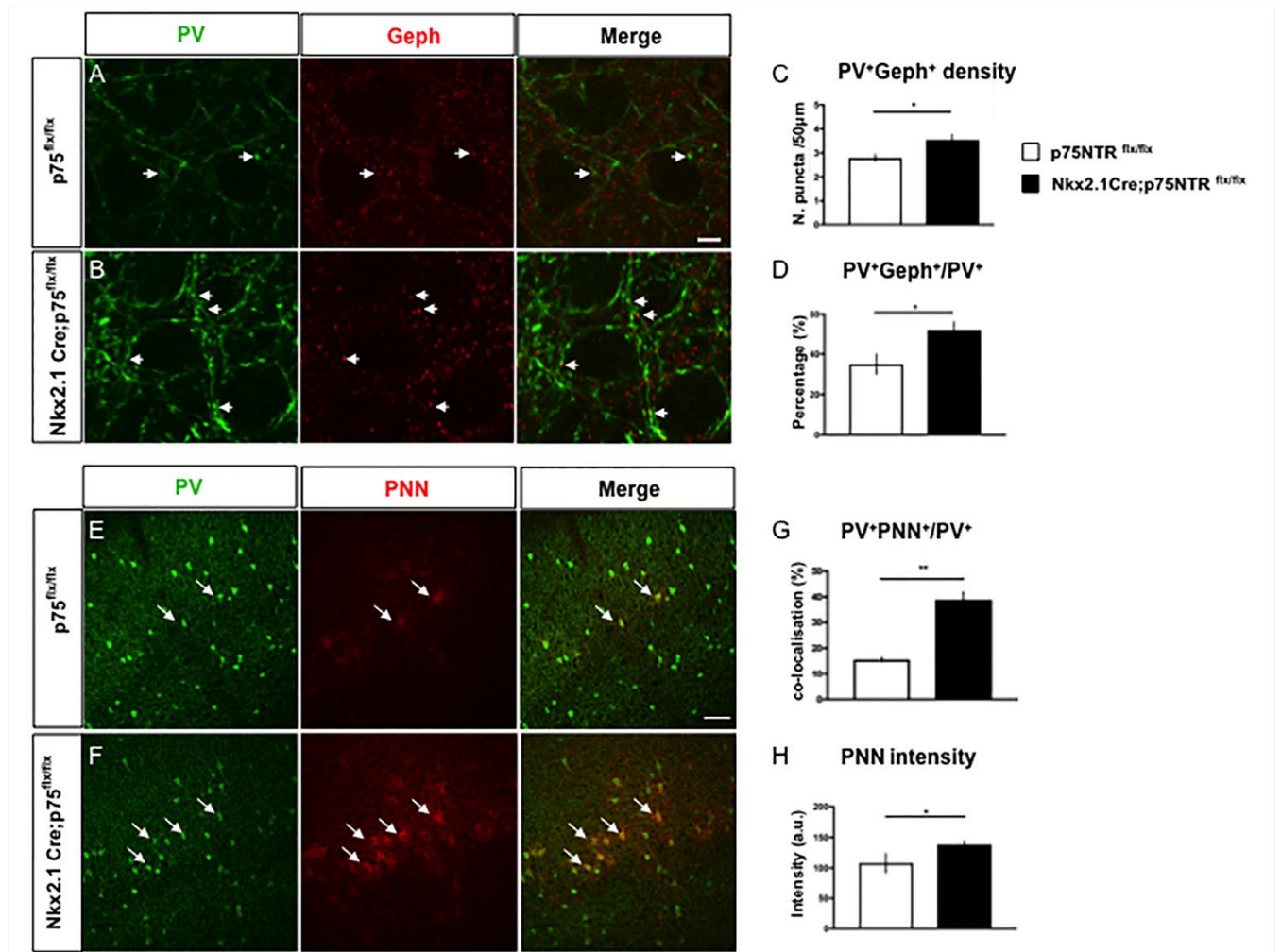


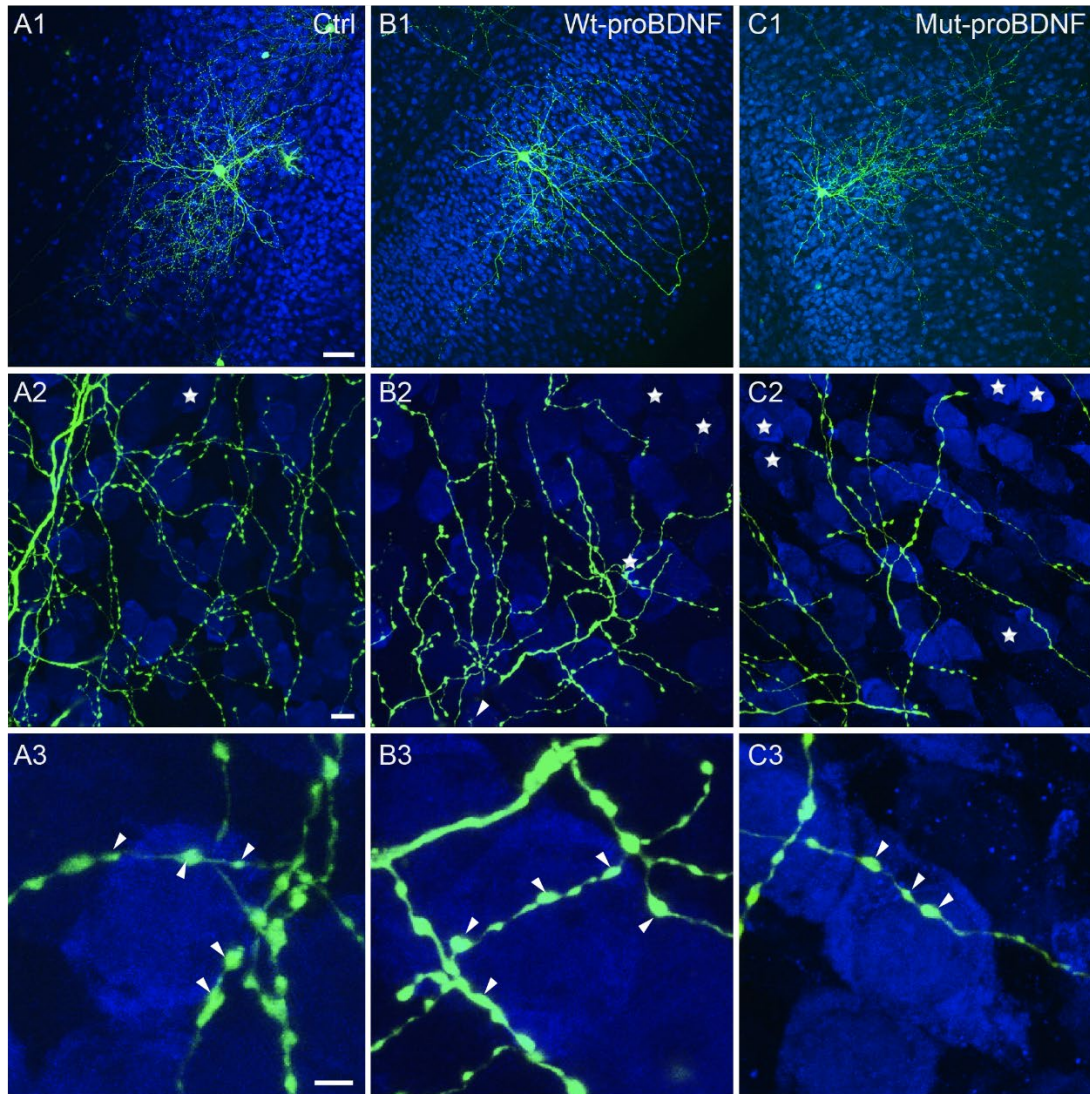
Figure 9. – **Cortical PV cells form more perisomatic boutons and are precociously enveloped by PNN in Nkx2.1\_Cre; P75NTR<sup>flx/flx</sup> mice.**

(A, B) Cortical slices from P14 p75NTR<sup>flx/flx</sup> (A) or Nkx2.1\_Cre;p75NTR<sup>flx/flx</sup> (B) mice co-immunostained with PV (green) and gephyrin (Geph, red). Arrows indicate examples of perisomatic PV+Geph+ puncta. (C, D) Perisomatic PV+Geph+ density (C) and percentage of PV+ puncta co-labeled with gephyrin (D) are significantly increased in Nkx2.1\_Cre; p75NTR<sup>flx/flx</sup> mice compared to control littermates. (C) Unpaired t-test,

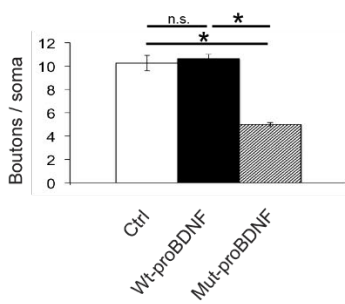
df=8, t=2.438, p=0.0407. (D) Unpaired t-test, df=8, t=2.404, p=0.0429. N=4 p75NTR<sup>flx/flx</sup> and 6 Nkx2.1Cre; p75NTR<sup>flx/flx</sup> mice.

(E, F) Cortical slices from P18 p75NTR<sup>flx/flx</sup> (E) or Nkx2.1\_Cre;p75NTR<sup>flx/flx</sup> (F) mice labeled with anti-PV antibody (green) and WFA, which stains perineuronal nets (PNN, red). Arrows indicate examples of PV+ somata enwrapped by PNN. (G, H) The proportion of PV somata surrounded by PNN (G) and mean PNN intensity (H) are significantly increased in Nkx2.1\_Cre;p75NTR<sup>flx/flx</sup> mice compared to control littermates. (G) Unpaired t-test, df=4, t=7.369, p=0.0018. (H) Unpaired t-test, df=4, t=3.157, p=0.0343. N=3 mice for both genotypes.

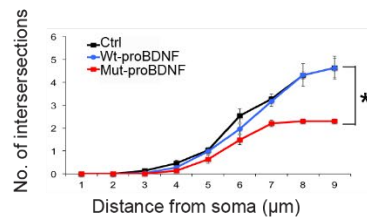




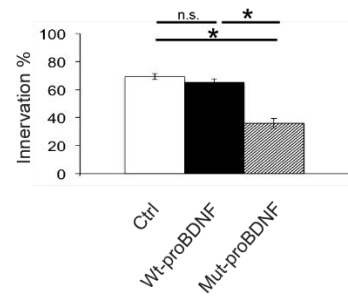
**D Bouton density**



**E Terminal branching**



**F % innervated somata**



**Figure 10. – mut-proBDNF destabilizes PV cell innervation even after it has reached maturity.**

(A) Control PV cell (A1, Ctrl, green) at EP32 with exuberant innervation field characterized by extensive branching contacting the majority of potential targets, dense boutons along axons (A2), and terminal branches with prominent and clustered boutons (A3; arrowheads) around NeuN-positive somata (blue). (B) PV cell treated with wt-proBDNF from EP26-32 shows overall similar axon size (B1), percentage of potentially targeted neurons (B2) and perisomatic innervations (B3) as control, untreated PV cells. (C) PV cell treated with mut-proBDNF from EP26-32 shows a drastic reduction both in percentage of innervated cells (C2) and perisomatic innervation (C3). Stars indicate NeuN-positive somata that are not innervated. Scale bar, A1-C1: 50 $\mu$ m; A2-C2: 10 $\mu$ m; A3-C3: 5 $\mu$ m. (D) Perisomatic bouton density (one-way Anova,  $F(2,18)=93.34$ ,  $p<0.0001$ ). (E) terminal branching (one-way Anova, at 5 $\mu$ m  $F(2,18)=5.994$ ,  $p=0.0101$ , at 6 $\mu$ m  $F(2,18)=4.790$ ,  $p=0.0215$ , at 7 $\mu$ m  $F(2,18)=7.444$ ,  $p=0.0044$ ; at 8 $\mu$ m  $F(2,18)=14.77$ ,  $p=0.0002$ , at 9 $\mu$ m  $F(2,18)=24.12$ ,  $p<0.0001$ ) and (F) percentage of innervated cells of the three experimental groups (one-way Anova,  $F(2,18)=44.29$ ,  $p<0.0001$ ).  $n = 9$  Ctrl,  $n = 6$  wt-proBDNF treated PV cells,  $n = 6$  mut-proBDNF treated PV cells.

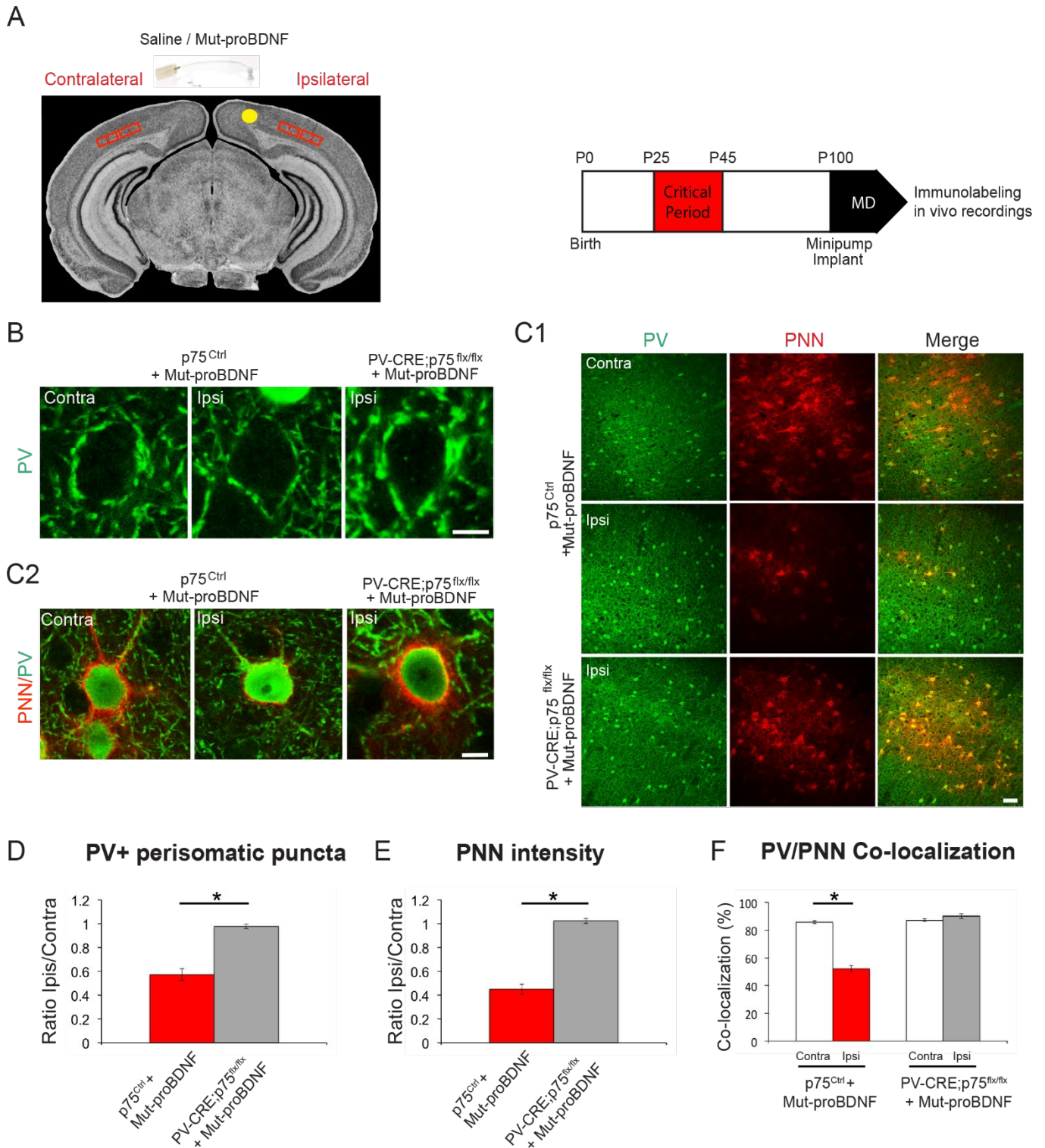
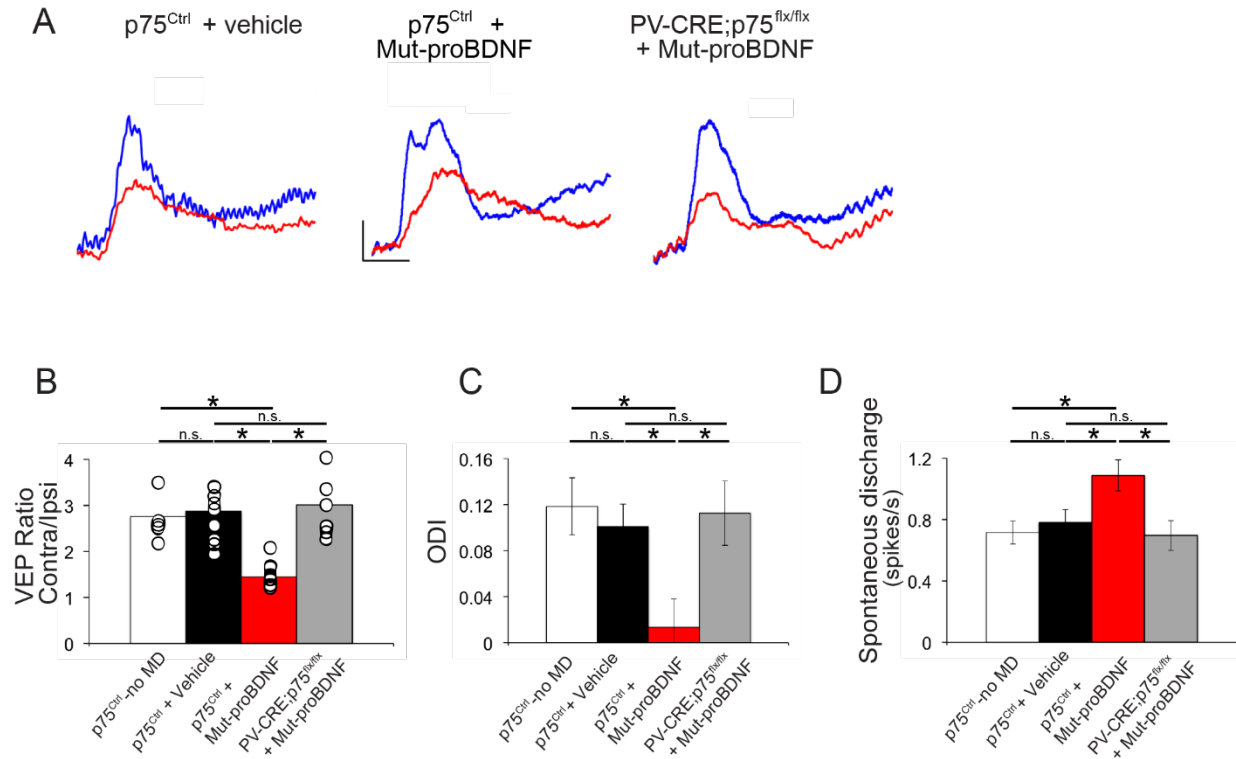


Figure 11. – proBDNF-mediated p75NTR activation in cortical PV cells reduces their perisomatic boutons.

(A) Experimental approach. (B) The intensity of perisomatic PV immunostaining (green) is reduced in the binocular visual cortex ipsilateral to the minipump releasing mut-proBDNF (Ipsi) compared to the contralateral cortex (Contra) in the same animal. On the other hand, perisomatic PV intensity in the ipsilateral cortex of PV\_Cre; p75<sup>flx/flx</sup> mice is similar to that observed in the contralateral, untreated cortex. (C) Low (C1) and high (C2) magnification of PNN (red, WFA staining) enwrapping PV cells (green) show a dramatic reduction in both PNN density and intensity in the visual cortex infused with mut-proBDNF. This effects is abolished in PV\_Cre; p75<sup>flx/flx</sup> mice. Scale bar, C1: 100µm; B, C2: 10µm. (D) Quantification of the mean intensity of perisomatic PV-positive puncta in ipsilateral compared to contralateral cortex. Ipsi/Contra ratio is obtained for each animal, and then averaged between different animals. Mean Ipsi/Contra ratio is significantly reduced in Mut-proBDNF infused p75<sup>Ctrl</sup> mice compared to Mut-proBDNF infused PV\_Cre; p75<sup>flx/flx</sup> mice (unpaired t-test, df=8, t=6.077, p=0.0003). (E) The ratio of mean PNN intensity around PV cells in ipsilateral vs contralateral cortex is significantly lower in p75<sup>Ctrl</sup> than PV\_Cre; p75<sup>flx/flx</sup> mice infused with mut-proBDNF (unpaired t-test, df=8, t=15.33, p<0.001). (F) The percentage of PV cells colocalizing with PNN is significantly reduced in the cortex infused with mut-proBDNF (Ipsi) compared to the untreated cortex (Contra) in p75<sup>Ctrl</sup> (paired t-test, df=5, t=15.33, p<0.0001) but not PV\_Cre; p75<sup>flx/flx</sup> (paired t-test, df=3, t=1.521, p=0.2255). n= 6 p75<sup>Ctrl</sup> mice; n=4 PV\_Cre; p75<sup>flx/flx</sup> mice.



**Figure 12. – proBDNF-mediated p75NTR activation in cortical PV cells restores ocular dominance plasticity in adult visual cortex *in vivo*.**

(A) Typical visual evoked potentials (VEP) responses to the stimulation of either contralateral (blue) or ipsilateral (red) eye to the cortex in which the recording is performed in p75NTR<sup>Ctrl</sup> mice infused with either vehicle or mut-proBDNF, and PV\_Cre; p75NTR<sup>flx/flx</sup> mice infused with mut-proBDNF. Calibration bars: 50 $\mu$ V, 100 ms. (B) Contralateral to ipsilateral eye (C/I) VEP ratio mean values. Three days of MD do not affect the C/I VEP ratio in adult mice, whereas it leads to a significant decrease in the C/I VEP ratio in animals treated with mut-proBDNF. Mut-proBDNF effects are however abolished in PV\_Cre; p75<sup>flx/flx</sup> mice (one-way Anova,  $F(2,18)=8.903$ ,  $p=0.0021$ ). p75NTR<sup>Ctrl</sup> + vehicle: n=9 mice, p75NTR<sup>Ctrl</sup> + mut-proBDNF: n=5 mice, PV\_Cre; p75<sup>flx/flx</sup>

+mut-proBDNF: n=7 mice. (C) Ocular dominance index (ODI) of p75NTR<sup>Ctrl</sup> mice infused with vehicle solution and PV\_Cre; p75<sup>flx/flx</sup> mice infused with mut-proBDNF are not significantly different from those of undeprived animals, while ODIs in p75<sup>Ctrl</sup> mice treated with mut-proBDNF are significantly shifted towards the open eye (One Way Anova, F(2, 443)=5.203, p=0.0058). (D) Mean spontaneous discharge is significantly increased only in p75<sup>Ctrl</sup> mice treated with mut-proBDNF (One Way Anova, F(2, 443)=4.580, p=0.0107). p75NTR<sup>Ctrl</sup> + vehicle: n = 9 mice, 174 cells; p75NTR<sup>Ctrl</sup> + mut-proBDNF: n=5 mice, 147 cells; PV\_Cre; p75<sup>flx/flx</sup> +mut-proBDNF: n=6 mice, 125 cells. The grey area denotes the C/I VEP ratio (B) or the ODI range (C) (average  $\pm$  SEM) in adult non-deprived animals (n=5 mice, 99 cells).

## Chapitre 3

# Enhancing adult neuroplasticity by epigenetic regulation of parvalbumin-expressing GABAergic cells

Marisol Lavertu-Jolin<sup>1,2</sup>, Bidisha Chattopadhyaya<sup>1</sup>, Pegah Chehrazi<sup>1,2</sup>, Denise Carrier<sup>1</sup>, Florian Wünnemann<sup>1</sup>, Séverine Lecler<sup>1</sup>, Félix Dumouchel<sup>1,2</sup>, Derek Robertson<sup>1</sup>, Hicham Affia<sup>1</sup>, Gregor Andelfinger<sup>1,4</sup>, Graçielá Pineyro<sup>1,3</sup>, Graziella Di Cristo<sup>1,2</sup>.

### Author affiliation:

<sup>1</sup> Centre de Recherche, CHU Sainte-Justine (CHUSJ)

<sup>2</sup> Department of Neurosciences, Université de Montréal

<sup>3</sup> Department of Pharmacology, Université de Montréal

<sup>4</sup> Department of Pediatrics, Université de Montréal

\*Corresponding authors:

Graziella Di Cristo,

Centre de Recherche, CHU Sainte-Justine,

3175, Côte-Sainte-Catherine, Montréal, QC H3T 1C5, Canada.

E-mail: [graziella.di.cristo@umontreal.ca](mailto:graziella.di.cristo@umontreal.ca)

### 3.1 Author contribution:

Pour la soumission de ce manuscrit, Marisol Lavertu Jolin a travaillé sous la supervision de Dre Graziella Di Cristo. Au niveau expérimental, voici la contribution de chacun des auteurs :

Marisol, avec la contribution de Pegah Chehrazi, a détaillé le patron d'expression de Hdac2 à l'aide d'immunofluorescence et validé la diminution d'expression dans les interneurons PV<sup>+</sup> du cortex somatosensoriel, du cortex préfrontal et de l'amygdale chez les animaux *PV\_Cre;Hdac2<sup>lox/lox</sup>*, validant le modèle murin au cœur de l'étude. Les résultats sont présentés à la figure supplémentaire 1.

Marisol et Denise Carrier ont procédé aux études comportementales des souris conditionnelles mutantes. Marisol a fait les expériences d'arène en aire ouverte, de labyrinthe surélevé en croix, de conditionnement, d'extinction, de récupération et de renouvellement de la peur présentées aux figures 1, 6 et 8. Denise a fait les expériences de conditionnement, d'extinction, de récupération et de renouvellement de la peur présentées à la figure 7 et à la figure supplémentaire 2. Marisol a analysé, assemblé et présenté les résultats.

Marisol a étudié l'expression des filets périneuronaux et d'une de ses composantes, la protéine agrécane, chez les souris conditionnelles mutantes, ainsi que suite à l'injection de l'inhibiteur de Hdac2 (modèle d'inhibition aiguë). Elle a perfusé les souris et collecté les tranches de cerveaux, procédé aux diverses immunofluorescences, acquis les données en microscopie confocale et analysés les résultats. Son travail a permis de déterminer la diminution de l'agglomération des filets périneuronaux ainsi que



de la protéine aggrécane autour du corps cellulaire des interneurons PV<sup>+</sup> suite à l'inactivation génétique ou pharmacologique de Hdac2. Les résultats sont présentés aux figures 2 et 4.

L'étude des transcriptomes des cellules uniques du cortex préfrontal de souris contrôles s'est déroulée sous la supervision des Dr Gregor Andelfinger et Dr Graçuela Pineyro. Derek Robertson et Séverine Leclerc ont préparé les échantillons de cortex préfrontaux de souris contrôles. Florian Wünnemann et Hicham Affia ont analysé les résultats. Derek a présenté les résultats de la figure 3 et la figure supplémentaire 3 et 4.

Les travaux de quantification de l'ARNm par hybridation *in situ* ont été faits par Marisol. Elle a préparé les échantillons, procédé aux expériences d'hybridation *in situ* de type RNAscope, acquis et déconvolutionné les données acquises en imagerie confocale, développé la méthode d'analyse des puncta à l'aide du logiciel Fiji et présenté les résultats aux figures 4, 6 et 7.

La surexpression de Hdac2 dans le cortex préfrontal des souris conditionnelles mutantes a permis d'établir son rôle dans la régulation de l'expression de la protéine aggrécane et l'agglomération des filets périneuronaux. Le clonage de la séquence codante pour Hdac2 dans le vecteur viral, ainsi que la production des particules virales, ont été fait par la plateforme canadienne de neurophotonique. Bidisha Chattopadhyaya a fait les chirurgies nécessaires à l'injection virale dans le cortex préfrontal. Marisol a perfusé les animaux, collecté les tranches, procédé aux diverses immunofluorescence, à l'acquisition et l'analyse des données en imagerie confocale. Les résultats sont présentés à la figure 5.

L'étude morphologique des synapses efférentes des interneurons PV<sup>+</sup> a permis de démontrer l'importance du remodelage des synapses PV<sup>+</sup> au cours de l'extinction de la peur pour le maintien de la mémoire d'extinction dans le temps. Pour ce faire, les expériences comportementales de conditionnement et d'extinction de la peur ont été faites par Marisol, tandis que les perfusions, la collecte des tranches, les immunofluorescences PV-Gephyrin, l'imagerie confocale et l'analyse des données a été fournis par Marisol avec la collaboration de Félix Dumouchel. Les résultats sont présentés à la figure 8.

Marisol et Graziella ont collaboré au design expérimental de l'étude. Marisol et Graziella ont analysé et présenté les résultats obtenus. Marisol et Graziella ont écrit le manuscrit. Tous les auteurs ont corrigé le manuscrit.

Le manuscrit est maintenant prêt pour la soumission.

## 3.2 Acknowledgements

We thank Dr. Elsa Rossignol for her insightful suggestions and critical reading of the manuscript. We would like to thank Josianne Nunes-Carriço, Antônia Samia Fernandes do Nascimento and Antoine Farley for their technical assistance, the Comité Institutionnel de Bonne Pratiques Animales en Recherche (CIBPAR), Dr. Elke Küster-Schöck and the plateforme d'imagerie microscopique (PIM) and all the personnel of the animal facility of the Research Center of CHU Sainte-Justine (Université de Montreal) for their instrumental technical support. We thank J. Huber at the IRIC genomic platform for performing the Illumina sequencing for the Drop-seq libraries and P. Gendron at the IRIC Bioinformatics platform for data demultiplexing. We also would like to thank Andrei Vlad Varlan and Kayleigh Gauvin for their help with data analysis.

### 3.3 Abstract

Persistence of fear memories is important for survival. However, the inability to effectively adapt to trauma leads to post-traumatic stress disorder. Extinction training only temporarily suppresses fear memories in adults, but it is highly effective in juvenile rodents. Studies in sensory cortex strongly indicate that the maturation of GABAergic innervation, in particular of parvalbumin-positive (PV+) cells, is one of the factors restricting plasticity in the adult brain. Therefore, increasing PV+ cell plasticity might promote the suppression of fear memories following extinction training in adults. Histone acetylation levels control gene accessibility for transcription and help couple synaptic activity to changes in gene expression. In particular, histone deacetylases 2 (Hdac2) restrains both structural and functional synaptic plasticity. However, its specific role in the plastic potential of postnatal PV+ cells is unknown.

Here, we show that PV+-cell specific Hdac2 deletion leads to enhanced retention of fear memory extinction in adult mice, increased PV cell bouton plasticity, and reduced condensation of perineuronal nets (PNN), a marker of mature PV+ cells, in prefrontal cortex and basolateral amygdala. Drop-Seq analysis, followed by RNAScope in situ hybridization, shows that *Acan*, which encodes for the critical PNN component Aggrecan, is highly enriched in PV+ cells of the adult prefrontal cortex. *Acan* expression is reduced in PV+-cell specific Hdac2 KO mice, and this reduction is rescued by re-expression of Hdac2. Moreover, a single injection of an Hdac2 inhibitor before extinction training is sufficient to increase retention of fear extinction, and to concomitantly reduce *Acan* expression in prefrontal cortex of wild-type adult mice. Notably, these effects are

occluded in PV+-cell specific Hdac2 conditional mutant mice. Finally, both Hdac2 genetic deletion and pharmacological inhibition promote dynamic changes in Acan levels following extinction training. Altogether, these data suggest that controlled manipulation of PV+ cell plastic state by targeting Hdac2 activity, and its downstream effector Acan, promotes the long-term efficacy of extinction training in adults.

### 3.4 Introduction

Persistence of fear memories is important for survival, while the inability to effectively adapt to trauma is characteristic of post-traumatic stress disorder (PTSD), anxiety disorders, and phobias. Pairing a neutral tone (conditioned stimulus, CS) with an aversive foot shock (unconditioned stimulus, US) leads to the formation of a robust fear memory that can last an entire lifetime (1). The reduction of fear responses through fear extinction learning is at the heart of clinical exposure psychotherapies applied in the case of PTSD (2,3). In adults, extinction learning is neither robust nor permanent since conditioned fear responses can recover spontaneously with the passage of time; in other words, extinction learning is unstable in adults (1,4,5). Strategies aimed at enhancing the ability to inhibit responses to associations that are no longer relevant may have strong therapeutic value. Several studies suggested that the maturation of GABAergic neurotransmission contributes to the reduced retention of fear extinction learning in adults (6,7). Therefore, modulating GABAergic synapse plasticity may be an attractive target to improve the long-term efficacy of fear extinction training in adults. However, global or prolonged reduction of GABAergic drive may generate undesirable effects such as epilepsy. Therefore, the modulation of the GABAergic transmission to foster adult brain plasticity should be considered in a cell type-specific and temporally-controlled fashion.

Several recent studies suggest that controlled manipulation of parvalbumin-expressing (PV+) interneuron connectivity might help reinstate heightened plasticity in the adult brain. In fact, PV+ cells play a critical role in fear memory extinction. First, extinction training induces remodelling of perisomatic PV+ synapses around excitatory neurons

that were previously activated during fear conditioning in the basolateral amygdala (BLA) (8). Second, PV+ cell-specific deletion of Nogo Receptor 1, a neuronal receptor for myelin-associated growth inhibitors (9), enhances both BLA PV+ synapse remodeling and the retention of fear memory extinction (10). PV+ interneurons are the only cortical cell type surrounded by perineuronal nets (PNNs), lattice-like aggregates of chondroitin sulfate proteoglycans-containing extracellular matrix (11). Recent evidence shows that PNNs stabilize afferent synaptic contacts onto mature cortical PV+ cells, thus limiting their plasticity (11-13). In fact, the percentage of PV+ enwrapped by PNN increases during development, and degradation of PNNs in adult BLA increases extinction retention (14). Thus, molecular approaches aimed at modulating PNN agglomeration and PV+ cell maturation state may be a viable strategy to promote retention of extinction learning in the adult brain.

PV+ cell synaptic plasticity and PNN agglomeration are activity-regulated processes. Besides, transcriptional mechanisms coupling synaptic activity to changes in gene expression are critical to sustain the cellular processes that mediate behavioural adaptations. Accessibility of the chromatin to activate these transcriptional programs is modulated by changes in histone acetylation's state of the chromatin. The activation of endogenous histone deacetylase (Hdac) appears to restrain both structural and functional synaptic plasticity (15,16) that is required to modify behaviour and improve performance during learning. Accordingly, administration of pan-Hdac inhibitors in adult mice reactivates visual cortical plasticity (17) and enhances extinction learning (18). Several studies have shown that, of the many Hdacs expressed in the mammalian brain, Hdac2 plays a critical role in fear learning and memory. Whether Hdac2 expression

specifically in PV+ cells regulates their plasticity, thus improving behavioural flexibility, is not known.

Here, we investigated whether PV+ cell-restricted Hdac2 deletion enhances retention of fear extinction memory in adults, by promoting PV+ cell plastic responses triggered by extinction training.



## 3.5 Materiel and Methods

### 3.5.1 Animals

*Hdac2<sup>lox/lox</sup>* (The Jackson laboratory (JAX), *B6.Cg-Hdac2<sup>tm1.1Rdp</sup>/J*, 022625) mice, in which exons 5 and 6 of *Hdac2* gene, encoding the HDAC-catalytic core of the protein, are flanked by loxP sites, were crossed to the *PV-Cre* (JAX, *B6.129P2-Pvalb<sup>tm1(cre)Arbr</sup>/J*, 017320) line to generate *PV-Cre<sup>+/-</sup>;Hdac2<sup>lox/lox</sup>* (*Hdac2* cKO) mice. These lines were maintained through crosses of *PV-Cre<sup>+/-</sup>;Hdac2<sup>lox/+</sup>* females and *Hdac2<sup>lox/lox</sup>* males to generate *PV-Cre<sup>+/-</sup>;Hdac2<sup>lox/lox</sup>* and *PV-Cre<sup>-/-</sup>;Hdac2<sup>lox/lox</sup>* or *PV-Cre<sup>-/-</sup>;Hdac2<sup>lox/+</sup>* control littermates, or *PV-Cre<sup>+/+</sup>;Hdac2<sup>lox/+</sup>* females and *Hdac2<sup>lox/+</sup>* males to generate *PV-Cre<sup>+/-</sup>;Hdac2<sup>lox/lox</sup>* and *PV-Cre<sup>+/-</sup>;Hdac2<sup>+/+</sup>* control littermates, on a mixed 129sv/C57BL/6J background. Cell specificity of Cre-mediated recombination was analyzed by breeding *PV-Cre* with *RCE<sup>EGFP</sup>* mice (JAX, *Gt(ROSA)26Sor<sup>tm1.1(CAG-EGFP)Fsh</sup>/Mjax*, 32037). All animals were kept under a light-dark cycle (12 h light–12 h dark) in a temperature and humidity-controlled room. Food and water were available *ad libitum*. All procedures described here had been approved by the Comité Institutionnel de Bonnes Pratiques Animales en Recherche (CIBPAR) of the Research Center of Sainte-Justine Hospital in accordance with the principles published in the Canadian Council on Animal's Care's (Guide to the Care and Use of Experimental Animals). Room lights were kept low during all procedures.

### 3.5.2 Mice genotyping

DNA was extracted from mouse tails and genotyped to detect the presence of Cre alleles and *Hdac2* conditional and wild-type alleles. Polymerase chain reaction (PCR)

was performed using either a set of 2 separated primers (F1 5'-TGGTATGTGCATTTGGGAGA-3' and R1 5'-ATTTACAGCCCCAGCTAAGA-3') to identify the *Hdac2* floxed versus the wildtype allele or a set of 3 separate primers (5'-ATTTGGGAGAAGGCCAGTTT-3', 5'-AATTTACAGCCCCAGCTAAG-3' and 5'-CGAAATACCTGGGTAGATAAAGC-3') to assure the absence of the *Hdac2* null allele: with band sizes of 720 bp for the wild-type, 560 bp for the floxed and 380 bp for the null allele. The 3 separate primers used to detect *Cre* in *PV\_Cre* were: F1 (5'-CAGCCTCTGTTCCACATACTCC-3'), F2 (5'-GCTCAGAGCCTCCATTCCCT-3') and R1 (5'-TCACTCGAGAGTACCAAGCAGGCAGGA GATATC-3') which generate 400 bp and 526 bp (mutant and wild-type) bands. To detect the presence of the RCE allele, 3 separate primers namely, RCE-Rosa1 (5'-CCCAAAGTCGCTCTGAGTTGTTATC-3'), RCE-Rosa2 (5'-GAAGGAGCGGGAGAAATGGATATG-3,) and RCE-Cag3 (5'-CCAGGCGGGC CATTACCGTAAG-3') were used, which generated 350bp and 550bp bands.

### 3.5.3 Immunohistochemistry

Mice of both sexes were anesthetized, then perfused intracardially with PBS followed by 4% (w/v) paraformaldehyde (PFA) in PBS. Intact brains were extracted and post-fixed in 4% PFA/PBS overnight at 4 °C. The tissue was then cryoprotected in 30% (w/v) sucrose (Sigma) in PBS, sectioned coronally at 40µm on a cryostat (Leica VT100) and stored as floating sections in PBS. For immunohistological analysis, brain sections were blocked in 10% normal goat serum (NGS, Invitrogen, 10000C) in PBS containing 1% (v/v) Triton X-100 for 2 h at room temperature. Primary antibodies were diluted in 5% goat serum in

PBS containing 0.1% (v/v) Triton X-100 and incubated 24h-48h at 4 °C. Slices were then washed in PBS (3 x 10'), incubated in the appropriate Alexa-conjugated antibodies in 5% NGS, 0,1% Triton in PBS for 2h at room temperature, washed again in PBS (3 x 10'), and mounted in Vectashield (Vector Lab, H-1000) before imaging.

The primary antibodies used in this study and their working concentrations are as follows: rabbit monoclonal anti-Hdac2 (1:500; Abcam, 32117, RRID:AB\_732777); mouse monoclonal anti-PV (1:2000; Swant, 235, RRID:AB\_10000343); rabbit polyclonal anti-PV (1:4000; Swant, PV27, RRID:AB\_2631173); guinea pig polyclonal anti-PV (1:1000; Synaptic Systems, 195004, RRID:AB\_2156476); mouse monoclonal anti-gephyrin (1:500; Synaptic Systems, 147021, RRID:AB\_22325461); rabbit polyclonal anti-aggrecan (1:500; Millipore, AB1031, RRID:AB\_90460); chicken polyclonal anti-GFP (1:1000; Abcam, 13970, RRID:AB\_300798). To label PNNs, a solution of biotin-conjugated lectin *Wisteria floribunda* (WFA) (10 µg/ml; Sigma-Aldrich, L1516) was added in the primary antibody solution.

The secondary antibodies used in this study and their working concentrations are as follows: goat anti-chicken Alexa488 conjugated (1:1000; Abcam, ab150169), goat anti-rabbit Alexa633 conjugated (1:400; Life technologies, A21072), goat anti-mouse Alexa555 conjugated (1:1000; Cell Signaling, 4409S), goat anti-mouse Alexa647 conjugated (1:1000; Cell signaling, 4410S), goat anti-rabbit Alexa555 conjugated (1:400; Life technologies, A21430), goat anti-guinea pig Alexa647 conjugated (1:400; Life technologies, AB21450) and Alexa 568-conjugated streptavidin (1:500; Invitrogen, S-11226).

All immunohistological experiments were performed on at least three different sections per brain region per animal.

### **3.5.4 Confocal imaging**

All images were acquired using Leica confocal microscopes (SP8 or SP8-STED). We imaged somatosensory (SSCX) and prefrontal cortex (PFC) layer 5 and basolateral amygdala (BLA) using 20X multi-immersion (NA 0.75) and 63X oil (NA1.4) objectives. We focussed on layer 5 of SSCX and PFC because PV<sup>+</sup> cells are more abundant in this layer. The 20X objective was used to acquire images to analyze the percentage of: GFP<sup>+</sup>PV<sup>+</sup>/PV<sup>+</sup> cells (recombination rate), GFP<sup>+</sup>PV<sup>+</sup>/GFP<sup>+</sup> cells (Cre-recombination specificity), PNN<sup>+</sup>PV<sup>+</sup>/PV<sup>+</sup> cells and Agg<sup>+</sup>PV<sup>+</sup>/PV<sup>+</sup> cells. The 63X objective was used to acquire images to analyse the perisomatic innervation (number of perisomatic PV<sup>+</sup> boutons and gephyrin<sup>+</sup> punctas). At least three confocal images from three different brain sections were acquired per brain region with z-step size of 2 μm (20X) and 0.5 μm (63X). All the confocal parameters were maintained constant throughout the acquisition of an experiment.

### **3.5.5 Image analysis**

The number of positive cells (GFP<sup>+</sup>, PV<sup>+</sup>, PNN<sup>+</sup> and/or Agg<sup>+</sup>) were manually identified and counted using ImageJ-Fiji software. To quantify the number of PV<sup>+</sup>, gephyrin<sup>+</sup> and PV<sup>+</sup>/gephyrin<sup>+</sup> punctas, images were exported as TIFF files and analyzed using Neurolucida software. PV<sup>+</sup> boutons and gephyrin<sup>+</sup> punctas were independently

identified around the perimeter of a targeted cell after selecting the focal plane with the highest soma circumference. At least 4 perisomatically innervated somata were selected in each confocal image. Investigators were blind to the genotypes or conditions during the analysis.

### **3.5.6 Behavioral testing**

For all experiments, a camera was mounted above the arena; images were captured and transmitted to a computer running the Smart software (Panlab, Harvard Apparatus) or FreezeFrame software IMAQ 3 (Version 3.0.1.0). The sequence of animals tested was randomized by the genotype. Care was taken to test litters containing both the genotypes specific to the breeding.

#### *Open Field*

Each subject (P60) was gently placed at the center of the open-field arena and recorded by a video camera for 10 min. The recorded video file was later analyzed with the SMART video tracking system (v3.0, Harvard Apparatus). The open field arena was cleaned with 70% ethanol and wiped with paper towels between each trial. The time spent in the center (45% of the surface) versus the periphery was calculated. Locomotor activity was indexed as the total distance travelled (m).

#### *Elevated plus maze*

The apparatus consisted of two open arms without walls across from each other and perpendicular to two closed arms with walls joining at a central platform. Each subject (P60) was placed at the junction of the two open and closed arms and allowed to

explore the maze during 5min while video recorded. The recorded video file was later analyzed with the SMART video tracking system (v3.0, Harvard Apparatus) to evaluate the percentage of time spent in the open arms ( $\text{open}/(\text{open}+\text{closed}) \times 100$ ) and the number of entries in the open arms as a measure of anxiety-related behavior.

### *Fear conditioning and fear extinction*

Fear conditioning and extinction were evaluated in two different contexts (contexts A and B, respectively). The context A consisted of white walls, a grid floor, and was washed with 70% ethanol before and after each session. The context B consisted of black and white striped walls, a white plexiglass floor, and was washed with 1% acetic acid before and after each session. Two different fear conditioning protocols have been used in this study, as published in (14).

*PV-Cre<sup>+/-</sup>;Hdac2<sup>lox/lox</sup>* males and their *PV-Cre<sup>-/-</sup>;Hdac2<sup>lox/lox</sup>* or *PV-Cre<sup>-/-</sup>;Hdac2<sup>lox/+</sup>* control males littermates, or *Hdac2<sup>lox</sup>* wildtype mice, were conditioned using the following protocol. On day 1, mice have been allowed to freely explore the context A for habituation. On day 2, mice were conditioned using 5 pairings of the CS (CS duration 5 s, white noise, 80 dB) with a co-terminating US (1s foot-shock, 0.6mA, inter-trial interval: 30 – 60 s). On days 3 and 4, conditioned mice were submitted to extinction training in context B, which they were presented 12 CS at 30 s intervals on each day. Retrieval of extinction and context-dependent fear renewal were tested 7 days later in context B and A, respectively, using 4 presentations of the CS.

*PV-Cre<sup>+/-</sup>;Hdac2<sup>lox/lox</sup>* males and their *PV-Cre<sup>+/-</sup>;Hdac2<sup>+/+</sup>* control males littermates were conditioned using the following protocol. On day 1, mice have been allowed to freely

explore the context A for habituation. On day 2, mice were conditioned using 5 pairings of the CS (CS duration 30 s, 50ms pips repeated at 0.9Hz, 2ms rise and fall, pip frequency: 7.5 kHz, 80 dB) with a US (1s foot-shock, 0.6mA, inter-trial interval: 30 – 150 s). The onset of the US coincided with the offset of the CS. On days 3 and 4, conditioned mice were submitted to extinction training in context B which they were presented 12 CS at 30 s intervals on each day. Retrieval of extinction and context-dependent fear renewal were tested 7 days later in context B and A, respectively, using 4 presentations of the CS.

Mice were excluded from analysis if they did not show effective fear extinction (EXT2 CS11-12 freezing more than 80% of time): Figure 1: n=3 control mice excluded, n=0 *PV-Cre<sup>+/-</sup>;Hdac2<sup>lox/lox</sup>* mouse excluded, Figure 6b: n=0 vehicle-injected *Hdac2<sup>lox</sup>* mouse excluded, n=1 BRD6688-injected *Hdac2<sup>lox</sup>* mouse excluded, Supplemental Figure 2: n=0 *PV-Cre<sup>+/-</sup>;Hdac2<sup>+/+</sup>* mouse excluded, n=1 *PV-Cre<sup>+/-</sup>;Hdac2<sup>lox/lox</sup>* mouse excluded. Mice were also excluded from analysis if they did not show effective fear acquisition (EXT1 CS1-2 freezing less than 15% of time): Supplemental Figure 2: n=0 *PV-Cre<sup>+/-</sup>;Hdac2<sup>+/+</sup>* mouse excluded, n=1 *PV-Cre<sup>+/-</sup>;Hdac2<sup>lox/lox</sup>* mouse excluded.

### 3.5.7 Viral vector and stereotaxic injections

pAAV.EF1 $\alpha$ -DIO-Flag-Hdac2\_T2A\_GFP (titre – 1E13 GC/mL) was cloned from pCIG-HDAC2<sup>WT</sup>-IRES-eGFP (51) and produced as AAV2/9 serotype by the Canadian Neurophotonics Platform, similar to the pAAV\_EF1 $\alpha$ \_DIO\_eYFP control virus (titre – 5E13 GC/mL [injected at 1:6 dilution]). *PV-Cre;Hdac2<sup>+/+</sup>* or *PV-Cre;Hdac2<sup>lox/lox</sup>* mice

were used at PND 42-50 for all surgeries. Unilateral viral injections were performed at the following stereotaxic coordinates: +1.9mm Anterior-Posterior (from Bregma), +0.4mm Medio-Lateral and 1.6mm Depth from the cortical surface. Surgical procedures were standardized to minimize the variability of AAV injections. Glass pipette with the virus was lowered at the right depth and kept for 2 min before starting the injections. Each injection volume was kept to 46nl, and a total of 8 injections per mouse were done for each virus. To ensure minimal leakage into surrounding brain areas and to optimise viral spread in the desired area, injection pipettes were kept in the same position following the injection for 5 min. They were withdrawn at the rate of 0.25mm/min following the injection. Mice were kept for 3 weeks following viral injections to allow for optimal gene expression.

### **3.5.8 Neuronal cell dissection and dissociation.**

Male mice aged P40-P43, were anesthetized with ketamine/xylazine (4:1), transcardially perfused with ice-cold aCSF solution of the following composition (in mM): 62.5 NaCl, 70 sucrose, 2.5 KCl, 25 NaHCO<sub>3</sub>, 1.25 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 7 MgCl<sub>2</sub>, 1 CaCl<sub>2</sub>, 20 HEPES and 20 glucose. Brains were then quickly removed, transferred to ice-cold aCSF solution and fixed to a stage allowing to cut 300 µm slices with a VT1200 S, Leica vibratome. Slices were then individually transferred to a cutting surface in ice-cold aCSF, where frontal cortex was micro dissected from the slices. Dissected tissue was then dissociated into a single cell suspension (52) using the Papain dissociation system (Worthington) as per manufacturer's instructions, with the addition of trehalose as described in (53). Post trituration, cells were then counted using iNCYTO C-Chip



hemocytometers, and resuspended at 150-200 cells/ $\mu$ l in DropSeq Buffer (in mM): x1 HBSS, 7 MgCl, 1 CaCl, 20 glucose, 5% Trehalose and 10% BSA.

### **3.5.9 Single cell capture and sequencing**

Re-suspended cells were run through a custom Drop-Seq setup allowing to capture single cells and barcoded beads (ChemGenes) within nanoliter droplets as described in the original Drop-seq protocol (<http://mccarrolllab.com/dropseq/>) (54). The used setup closely resembled the original one (54), with minor modifications. In particular, Medfusion 3500 syringe pumps (Smiths Medical) instead of KD Scientific Legato 100 pumps were used, as well as a different RNase inhibitor (SUPERase<sup>•</sup> In; catalog no. AM2694; Thermo Fisher Scientific).

Single-cell suspensions (150-200 cells/ $\mu$ l) were run alongside barcoded beads (140 beads  $\mu$ l/1) in 1.7 ml of cell lysis buffer (Tris 200mM, EDTA 20 mM, 20 % Sarkosyl, 20% Ficoll, DTT 50 mM; also containing 50  $\mu$ l of RNase inhibitor), to produce beads attached to single-cell transcriptomes. Beads attached to single-cell transcriptomes were subsequently washed, reverse-transcribed, treated with exonuclease and counted using a Fuchs-Rosenthal hemocytometer (INCYTO C-Chip Cat-Nr:82030–474), as described in the original Drop-seq protocol (54). Bead counting was performed using water and bead counting solution (10% polyethylene glycol, 2.5 M NaCl) in a 1:1 ratio as described in Gierahn et al. 2017 (55). For PCR amplification 4,000 beads (approximately 200 single-cell transcriptomes attached to microparticles) were used as input for each PCR. Individual PCR reactions were then pooled to achieve the desired number of single-cell transcriptomes attached to microparticles (STAMPS). In this experiment we used 2000

STAMPS which were cleaned up with AMPure XP (Beckmann Coulter Life Sciences) beads at a ratio of 0.6X prior to sequencing.

Correct size distribution and concentration of complementary DNA was determined using a Bioanalyzer High Sensitivity DNA assay (catalog no. 5067–4626; Agilent Technologies). Library preparation was performed using the Nextera XT DNA Library Preparation Kit (Illumina) with 600 pg input according to the Drop-seq protocol using Illumina i7 primers (N701—N706) together with a custom P5 primer (GCCTGTCCGCGGAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTAC) in the library PCR amplification (see the Drop-seq protocol (54)). Libraries were quality-controlled for size and concentration using the Bioanalyzer High Sensitivity DNA assay. Libraries were quantified using the Universal Library Quantification Kit (KAPA) before sequencing on a NextSeq 550 system (Illumina) at the Institute for Research in Immunology and Cancer (IRIC) in Montreal. Sequencing was performed on a NextSeq 500 system with the read settings R1 = 20 bp, R2 = 63 bp and index = 8 bp.

### **3.5.10 Computational analysis of single-cell transcriptomic data**

Demultiplexing of raw Illumina sequencing data was performed with bcl2fastq v.2.17 by the Institute for Research in Immunology and Cancer (IRIC) in Montreal. Fastq files were quality controlled and processed using the Drop-seq computational pipeline, similar to (56) (Drop-seq alignment cookbook v.1.2, January 2016) using Drop-seq tools v.1.12, to produce digital gene expression (DGE) matrices for each sample (54). DGE matrices were processed in R (3.5.2) using Seurat (v.2.2.0) (57, 58). Cells with less than 250 genes expressed and genes detected in less than 3 cells were filtered out from further

analysis. Cell cycle scores for filtered cells were calculated using the function `CellCycleScoring` from Seurat with cell cycle gene lists from Nestorowa et al. (59) ([https://satijalab.org/seurat/articles/cell\\_cycle\\_vignette.html](https://satijalab.org/seurat/articles/cell_cycle_vignette.html)). Expression values were normalized and scaled to 10000 transcripts with Seurat's `Normalize` function. Normalized expression values were scaled using the `ScaleData` function from Seurat, regressing out the number of UMIs, Mouse ID, percent mitochondrial genes as well as S and G2M scores from cell cycle prediction. Wild-type cells from different experiments were further aligned with using canonical correlation analysis (CCA) (58) using the `RunMultiCCA` using the top 1000 overlapping highly variable genes between samples function followed by `AlignSubspace` function in Seurat, using the experiment as a grouping variable with 15 cca dimensions. Dimensions selection was decided after visual inspection of the inflection point of the elbow plot generated by `Seurat ElbowPlot()` function. Dimensional reduction was performed using `RunTSNE` with 15 cca dimensions to represent cells in 2 tSNE dimensions. Clusters were identified using the `FindClusters` function on the first 15 aligned cca dimensions with a resolution parameter of 1.2. Cells were subsequently plotted in 2 tSNE dimensions to and biological cell types annotated manually based on known markers for brain cell types. Violin Plots were plotted using the `VlnPlot` function from Seurat with normalized gene expression values.

### **3.5.11 Cell type Identification**

Final cell types were attributed based on the identified top markers in each cluster. Clusters containing `VGLUT1` were considered to be pyramidal Neurons, while clusters containing `GAD1` and `GAD2` were considered to be GABAergic interneurons (Figure 3a,

Supplementary Figure 3). For more in depth analysis of neuron types as well as identification of non-neuronal cell subtypes, we took the top 30 and 50 markers from each cluster and compared them to the DropVis database (60). The number of markers shared for each cluster was then calculated, and a percentage identity with DropViz clusters calculated.

### **3.5.12 Fluorescent multiplex RNAscope**

To evaluate *Acan* mRNA expression in naive condition, mice of both sexes were cervically dislocated, brains were dissected, fast-frozen in cold isopentane (~-70°C) and conserved at -80°C. To evaluate *Acan* mRNA expression after extinction training, adult males were cervically dislocated 3 hours after the end of extinction training on day 4 (late extinction).

Coronal brain sections (20 µm) were cut using a cryostat (Leica Microsystems) and mounted on Superfrost Plus Gold Glass Slides (Fisher Scientific, 22-035-813). Slides were subsequently stored at -80°C. Probes against *Acan* mRNA (439101), which codes for aggrecan, and *Pvalb* mRNA (421931-C2), which codes for PV, as well as other reagents for ISH and DAPI labelling, were purchased from Advanced Cell Diagnostics (ACD). Tissue pre-treatment, hybridization, amplification and detection were performed according to the *RNAscope Sample Preparation and Pretreatment Guide for Fresh Frozen Tissue using RNAscope Fluorescent Multiplex Assay* manual (ACD). During RNAscope hybridization, positive probes (320881), negative probes (320871), and *acan/Pvalb* probes were processed simultaneously. Briefly, the slides were removed

from -80°C and immediately post-fixed in 4% PFA/PB for 15 min before dehydration in 5 min consecutive baths (70% EtOH, 50% EtOH, 2 x 100% EtOH). The slides were air dried and hydrophobic barrier was created around each section with ImmEdge Pen (310018). Protease IV (322336) was added to each section and incubated at room temperature for 30 min followed by two washes in distilled water. For detection, probes were added to each section and incubated for 2h at 40°C. Unbound probes were subsequently washed away by rinsing slides in 1X wash buffer (310091) 2 x 2 min. AMP reagents (AMP1 (320852), AMP2 (320853), AMP3 (320854), AMP4A (C1 probes-Alexa-488 and C2 probes-Atto-550) (320855)) were added to each section and incubates for as per the manufacturer's instructions (*RNAscope Fluorescent Multiplex Reagent Kit PART 2 Manual*), and washed in wash buffer for 2 x 2min. Sections were stained with DAPI (320858) for 30 s, and then mounted with Prolong Diamond Antifade Mountant (Invitrogen P36961). Images were acquired with a SP8-STED confocal microscope (Leica Microsystems), using a 63X (NA 1.4) objective, voxel size: 0.06µm x 0.06µm x 0.299µm, and deconvolved using Huygen's express deconvolution option. These experiments were performed using tissue from three different mice for each genotype and/or treatment. To determine the number of *Acan* dots per PV<sup>+</sup> cell, images were analysed using a custom-made ImageJ-Fiji macro. Briefly, a dark region was selected on each focal plane to measure the mean grey value (MGV) as background (BCKG). Then, for each channel and each focal plane, the BCKG value was subtracted, and intensity value of each pixel was readjusted by multiplying it with 65535/(65535-BCKG). Then, each PV<sup>+</sup> cell was manually selected, filtered with the Gaussian Blur 3D option and analyzed using the 3D objects counter (threshold = 4500, minimal voxel size = 6). Results are presented as mean of the number of objects per PV<sup>+</sup> cell ± s.e.m.

### 3.5.13 Drug treatment

BRD6688 (Glxxx Lab, #GLXC-05908) was dissolved in DMSO (1% of the total resultant solution) and then diluted in 30% Cremophor/69% in physiological saline (H<sub>2</sub>O containing 0.9% NaCl (Hospira, 04888)), for a final dosage solution of 1 mg/kg. Vehicle solutions consisted of the aforementioned solution without the compound. Solutions were prepared immediately before injection and administered to either *Hdac2<sup>lox</sup>* wildtype or *PV-Cre<sup>+/-</sup>;Hdac2<sup>lox/lox</sup>* via intraperitoneal injection 6 hours prior to extinction training.

### 3.5.14 Statistical analysis.

Data were systematically tested for normal distribution, with the D'Agostino & Pearson omnibus normality test. Differences between two groups of normally distributed data with homogenous variances were analyzed using parametric student's t-test, while not normally distributed data were analyzed with the Mann-Whitney test. To evaluate genotype effects on PV<sup>+</sup>Gephyrin<sup>+</sup> perisomatic puncta in naive mice and in mice following extinction training, 2-ways ANOVA (F) test was performed followed by Sidak *posthoc* test. To evaluate the effect of the virally-expressed *Hdac2* in *PV-Cre<sup>+/-</sup>;Hdac2<sup>lox/lox</sup>* on Aggrecan and PNN, Kruskal-Wallis tests were performed followed by Dunn's multiple comparison test. Significance level was set to 5% ( $p = 0.05$ ). Results were considered significant for values of  $P < 0.05$ . Data are presented as mean  $\pm$  standard error of mean.

### **3.5.14 Data availability**

All data are available upon reasonable request.

## 3.6 Results

### 3.6.1 Adult *PV-Cre;Hdac2<sup>lox/lox</sup>* mice show enhanced retention of fear extinction

To evaluate whether and how *Hdac2* deletion specifically in PV<sup>+</sup> cells affects fear memory formation, extinction and spontaneous recovery, we used a mouse carrying a conditional allele of *Hdac2* (*Hdac2<sup>lox/lox</sup>*, (15)), which allows cell-specific developmental stage restricted manipulation of *Hdac2*, bred to a mouse line expressing the Cre recombinase under the control of the PV promoter (*PV-Cre*, (19)). In cortical GABAergic cells, PV starts to be expressed after the first postnatal week and peaks after the third week. This breeding scheme generated PV<sup>+</sup>-cell restricted homozygous (*PV-Cre<sup>+/-</sup>;Hdac2<sup>lox/lox</sup>*) mice and their control *PV-Cre<sup>-/-</sup>* littermates not expressing Cre (*PV-Cre<sup>-/-</sup>;Hdac2<sup>lox/lox</sup>* and *PV-Cre<sup>-/-</sup>;Hdac2<sup>lox/+</sup>* mice, referred to hereafter as *Hdac2<sup>lox</sup>*). To confirm the specificity of Cre expression in *PV-Cre<sup>+/-</sup>;Hdac2<sup>lox/lox</sup>* mice, we bred them with *RCE<sup>GFP</sup>* reporter mice (20) and quantified GFP<sup>+</sup>/PV<sup>+</sup> colocalization in somatosensory cortex (SSCX), prefrontal cortex (PFC) and basolateral amygdala (BLA). At P60, we observed that all GFP<sup>+</sup> cells in all brain regions studied expressed PV. However, the recombination rate was region specific (GFP<sup>+</sup>PV<sup>+</sup>/PV<sup>+</sup> cells: SSCX: 82 ± 5 %, N=3; PFC: 58 ± 8 %, N=5; BLA: 38 ± 3 %, N=3). Co-immunolabelling of PV and *Hdac2* in coronal brain sections confirmed that *Hdac2* expression levels were significantly reduced in PV<sup>+</sup> cells cKO mice compared to their control littermates (Supplementary Fig. 1). We then assessed fear memory formation, extinction rate and spontaneous recovery in *PV-Cre;Hdac2<sup>lox/lox</sup>* mice (Fig. 1a). After fear conditioning, both *PV-Cre;Hdac2<sup>lox/lox</sup>* and *Hdac2<sup>lox</sup>*



mice presented strong freezing behaviour, suggesting that fear learning was not affected by *Hdac2* deletion in PV<sup>+</sup> cells (freezing time at early extinction CS1-2, Mann-Whitney test,  $P = 0.1878$ , Fig. 1b). Compared to wild-type littermates, conditional KO mice showed similar extinction rate during training, but significantly less freezing during the retrieval and renewal tests 7 days later (Fig.1b), suggesting stronger retention of fear extinction. The reduced fear expression was not due to spontaneous forgetting, since in absence of extinction training, freezing levels were undistinguishable between the conditional knockout and control mice 10 days after fear conditioning (Fig.1c). Further, this was not due to altered motor or anxiety behavior, since we found no differences in performance in the open field and elevated plus maze assays in mutants compared to control littermates (Fig. 1d, e).

To ensure that the observed phenotype was caused by the genetic deletion of *Hdac2* rather than any side-effect of the *Cre* insertion in the *PV* locus (19), we generated a second mouse line in which control littermates also carried the *PV-Cre* allele, while the *Hdac2* locus remained wild-type (*PV-Cre*<sup>+/-</sup>;*Hdac2*<sup>+/+</sup> mice). Consistent with our previous observations, these conditional KO mice showed significantly reduced freezing during the retrieval test compared to their control littermates (Supplementary Fig. 2a). In absence of extinction training, both genotypes showed strong fear memory 10 days after fear learning (Supplementary Fig. 2b). Overall, these data suggest that the deletion of *Hdac2* restricted to postnatal PV<sup>+</sup> cells is sufficient to improve retention of fear extinction over time in adults.

### 3.6.2 Postnatal deletion of Hdac2 in PV+ cells reduces their enwrapping by PNN

PNN appearance around PV<sup>+</sup> cell somata and dendrites is developmentally regulated, and correlates with increased inhibition and critical period closure in sensory cortices (21). PV<sup>+</sup> cell enwrapping by PNN has been shown to be a limiting factor for adult brain plasticity (11-13). In particular, chondroitin sulfate proteoglycans assembly into PNNs promotes the formation of extinction-resistant memories (14). Since we observed increased retention of fear extinction in adult *PV-Cre;Hdac2<sup>lox/lox</sup>* mice, we reasoned that this process may reflect PNNs reduction in cKO mice. Using WFA staining to label PNN, we found a significant decrease in the percentage of PV<sup>+</sup> cells surrounded by PNNs in PFC and BLA, two regions directly implicated in fear behaviour regulation, in naive conditional knockout mice compared to control littermates (Fig. 2a, b). Of note, we observed that PNNs were not localized exclusively around PV<sup>+</sup> cells in the BLA (data not shown), consistent with previous reports (22,23). Unexpectedly, we did not observe a significant difference in the percentage of PNN<sup>+</sup>PV<sup>+</sup> cells in the SSCX of *PV-Cre;Hdac2<sup>lox/lox</sup>* compared to *Hdac2<sup>lox</sup>* mice (Fig. 2b), suggesting that epigenetic regulation of PNN organization is region-specific in the cortex.

During their maturation process, PV<sup>+</sup> cells form more perisomatic synapses on pyramidal cells (24). To investigate whether Hdac2 reduction in PV<sup>+</sup> cells affects their efferent connectivity as well, we quantified putative perisomatic synapse density formed by PV<sup>+</sup> cells onto pyramidal cells by co-immunolabeling with vGAT (vesicular GABA transporter, presynaptic), gephyrin (scaffolding protein associated with GABA-

A receptor, postsynaptic) and PV, in PFC and BLA. We found that the density of PV<sup>+</sup> boutons co-localizing with gephyrin was significantly reduced in both PFC and BLA of naive conditional KO mice compared to their control littermates (Fig. 2c, e). This difference was not due to decreased PV expression, since the density of perisomatic PV<sup>+</sup> boutons was not significantly different between the two genotypes (Fig. 2d).

### **3.6.3 Hdac2 regulates Aggrecan expression in PV<sup>+</sup> cells**

WFA specifically bind to lectican's CAG-chains (25). Since we observed decreased WFA labeling surrounding PV<sup>+</sup> cell somata in brain regions involved in fear regulation in *PV-Cre;Hdac2<sup>lox/lox</sup>* mice (Fig. 2a,b), we next sought to identify which lecticans are cell-autonomously expressed by PV<sup>+</sup> cells, and thus directly affected by PV<sup>+</sup> cell-specific *Hdac2* deletion. To this end, we used Drop-Seq to transcriptionally profile frontal cortical cells of 6 weeks old wild-type mice. Samples from 5 biological replicates yielded 19393 cells that were sequenced to a median depth of 15,555 aligned reads/cell (representing a median of 1427 genes/cell). Transcriptomes were then clustered and represented in t-Distributed Stochastic Neighbor Embedding (t-SNE) plots (Fig. 3a). Cell clusters were defined as glutamatergic neurons, GABAergic neurons or non-neuronal cells based on *Slc17a7*, *Gad1* and *Gad2* detection (Supplementary Fig.3). Using the Dropviz database as a template for murine cortical transcriptomes, clusters were then associated with well-known neuronal and non-neuronal cell groups. Among the latter, we distinguished astrocytes, oligodendrocytes/polydendrocytes, microglial cells/macrophages as well as endothelial cells. Within neuronal cell types, VGLUT<sup>+</sup> glutamatergic neurons and Gad1<sup>+</sup>/Gad2<sup>+</sup> interneurons were identified, including PV-expressing interneurons (cluster 9, Supplementary Fig.3).

Next, we analyzed which cell types express mRNAs coding for PNN structural components and remodelling enzymes (metalloproteases). We confirmed that the metalloproteases *Adamts8*, *Adamts15*, and *Mme* were highly enriched in PV<sup>+</sup> cells, (Fig. 3c and Supplementary Fig. 4), as previously reported (26, 27). Of the 4 analyzed lecticans, *Neurocan* was the most abundant and was expressed by different neuronal cell types and astrocytes. *Brevican* was also expressed by different cell types, including PV<sup>+</sup> cells, but it was highly enriched in astrocytes and in CP5G4-expressing NG2<sup>+</sup> polydendrocytes. The latter were also the major source of *Versican* (Fig. 3b and Supplementary Fig. 4). *Acan*, on the other hand, was mostly expressed by PV<sup>+</sup> cells and, to a lesser extent, by polydendrocytes (Fig. 3b and Supplementary Fig. 4). None of the other PNN components analyzed (*Hapln1*, *Hapln4*, *Tnr*) showed cell type-specific expression (Fig. 3d and Supplementary Fig. 4).

Aggrecan, coded by *Acan*, plays a critical role in PNN formation, as shown in brain-wide homozygous *Acan* mutant mice and by virally-induced *Acan* deletion (13). To investigate whether *Acan* expression is regulated by Hdac2 in PV<sup>+</sup> cells, we analyzed *Acan* transcripts by RNAscope hybridization *in situ* in PFC, BLA and SSCX of adult *PV-Cre;Hdac2<sup>lox/lox</sup>* mice and control littermates (Fig. 4). We confirmed that a majority of PFC PV<sup>+</sup> cells expressed *Acan* in wildtype mice (percentage of PV<sup>+</sup>*Acan*<sup>+</sup>/*Acan*<sup>+</sup> cells = 69± 4 %, N=7). In *PV-Cre;Hdac2<sup>lox/lox</sup>* mice, *Acan* expression was significantly reduced in PFC, but neither in SSCX nor in BLA, compared to control littermates (Fig. 4 a, b). This decrease in *Acan* expression was accompanied by a significant decrease in the percentage of PV<sup>+</sup> cells surrounded by aggrecan immunostaining specifically in the PFC

as well (Fig. 4 c, d). Unaltered Aggrecan expression levels in SSCX of mutant mice is consistent with the observation that the percentage of PNN<sup>+</sup>PV<sup>+</sup> cells in the SSCX was not affected (Fig. 2 a, b). Conversely, the percentage of PNN<sup>+</sup>PV<sup>+</sup> cells was reduced in the BLA in absence of parallel changes in the percentage of Aggrecan<sup>+</sup>PV<sup>+</sup> cells, suggesting a strict requirement for aggrecan in PNN formation specifically around cortical PV<sup>+</sup> cells.

The effects of a PV<sup>+</sup> cell-specific *Hdac2* deletion on PNN remodeling may be due to a direct regulation of the expression of critical PNN components by *Hdac2*, or to secondary homeostatic effects caused by long-term *Hdac2* deletion. To test whether *Hdac2* regulates Aggrecan expression in PV<sup>+</sup> cells, we virally re-expressed *Hdac2* specifically in prefrontal cortical PV<sup>+</sup> cells of adult *PV-Cre;Hdac2<sup>lox/lox</sup>* and *PV-Cre;Hdac2<sup>+/+</sup>* mice for three weeks using an inverted double-floxed *Hdac2* coding region driven by a ubiquitous EF1a promoter (Fig. 6a). Consistent with our previous data (Fig. 4d), we observed a significant reduction in the percentage of PV<sup>+</sup> cells enwrapped by aggrecan in conditional knockout mice compared with wildtype littermates when both were injected with the control virus (AAV\_DIO\_EGFP; Fig. 5 b, c). On the other hand, injection of AAV\_DIO\_Hdac2-T2A-EGFP was sufficient to rescue the percentage of Aggrecan<sup>+</sup>PV<sup>+</sup> cells (Fig. 5 c) and to increase (albeit not significantly) the number of PV<sup>+</sup> cells surrounded by WFA-stained PNN in *PV-Cre;Hdac2<sup>lox/lox</sup>* mice (Fig. 5 d, e).

In summary, these data showed that PV<sup>+</sup> cells were the major source of Aggrecan in the PFC. Moreover, the reintroduction of *Hdac2* specifically in PFC PV<sup>+</sup> cells was sufficient

to rescue Aggrecan expression in conditional knockout mice, arguing for a role of Hdac2 in *Acan* transcription in PV<sup>+</sup> cells.

### **3.6.4 Acute pharmacological Hdac2 inhibition in PV<sup>+</sup> cells after fear training increases the retention of fear extinction and reduces *Acan*/Aggrecan expression.**

Enzymatic degradation of PNN in the BLA of adult mice rendered fear memories susceptible to erasure following extinction training but only if PNN were degraded before fear memory acquisition (14). Similarly, increased retention of extinction memories in adult *PV-Cre;Hdac2<sup>lox/lox</sup>* mice could be reliant on different mechanisms recruited during fear memory acquisition in the mutant mice compare to control littermates. Alternatively, *Hdac2* deletion in PV<sup>+</sup> cells may specifically affect the retention of extinction memories. To test this latter hypothesis, we used BRD6688 (28), a small molecule demonstrating preferential selectivity for Hdac2 compared to Hdac1, a close family member showing 92% homology within the catalytic domain with Hdac2 (29), by 6 hrs after I.P. injection. We first asked whether pharmacological inhibition of Hdac2 after fear learning but before the onset of extinction training was sufficient to promote long-term extinction retention (Fig. 6 a). Compared to vehicle-injected mice, BRD6688-injected mice presented less freezing behavior at the retrieval test. Therefore, combining a brief HDAC2 inhibition with extinction training rendered fear memories amenable to persistent and specific attenuation (Fig. 6 b). Circuits other than PV<sup>+</sup> cells may contribute to the facilitating effect of Hdac2 inhibition on the retention of extinction memories. On the other hand, BRD6688 treatment could not further improve retention of extinction

memories in *PV-Cre;Hdac2<sup>lox/lox</sup>* mice (Fig. 6 c), further supporting the hypothesis that the state of chromatin acetylation specifically in PV<sup>+</sup> cells plays a critical role in the retention of extinction memories.

Since our data showed that Hdac2 levels in PV<sup>+</sup> cells modulate Aggrecan expression (Fig. 5), we next asked whether acute pharmacological inhibition of Hdac2 activity is sufficient to also reduce Aggrecan expression. Indeed, we found a significant decrease in the number of *Acan* mRNA molecules in PFC PV<sup>+</sup> cell somata (Fig. 6 d, e) and in the proportion of PV<sup>+</sup> cells enwrapped by Aggrecan<sup>+</sup> nets (Fig. 6 g, h) 17h after BRD6688 i.p. injection in wild-type mice. Conversely, the same treatment was unable to further reduce *Acan*/Aggrecan expression in *PV-Cre;Hdac2<sup>lox/lox</sup>* mice (Fig. 6 f, i). Overall, these results thus suggesting that Hdac2 dynamically regulates PNN integrity around PFC PV cell somata by controlling *Acan* transcription in PV<sup>+</sup> cells.

### **3.6.5 *Hdac2* deletion in PFC PV<sup>+</sup> cells promotes dynamic changes in *Acan* expression**

Class 1 Hdacs (including Hdac2) inhibition has been shown to prime the expression of neuroplasticity-related genes (16). Thus, we asked whether *Acan* expression might be more dynamic in *Hdac2<sup>-/-</sup>* PV<sup>+</sup> cells. To answer this question, we collected brains from *PV-Cre;Hdac2<sup>lox/lox</sup>* mice and control littermates 3 hours after the end of extinction training (Fig. 7a, b) and quantified *Acan* mRNA expression in PV<sup>+</sup> cells from the PFC (Fig. 7 c, d). We found that, although *Acan* expression was reduced in PFC PV<sup>+</sup> cells from naive mutant mice compared to wild-type littermates (Fig. 4b, 6e), its expression

reached wild-type levels after extinction training (Fig. 7 d). Next, we asked whether acute pharmacological HDAC2 inhibition could also promote *Acan* dynamic changes triggered by extinction learning. Whereas naive mice injected with BRD6688 showed reduced *Acan* levels (Fig. 6 d, e), mice injected with BRD6688 after fear learning but before the onset of extinction training showed no significant difference between *Acan* levels compared to vehicle-treated controls (Fig. 7f,g). Altogether, these results suggest that either *Hdac2* deletion or pharmacological inhibition in PV<sup>+</sup> cells allows for increased changes in *Acan* expression following extinction training.

### **3.6.6 Postnatal deletion of *Hdac2* in PV<sup>+</sup> cells enhances their remodelling potential**

Previous reports showed that remodeling of perisomatic inhibitory synapses was critical for efficient extinction of fear memories (8,10). To investigate whether PV<sup>+</sup> cell remodelling potential was increased by *Hdac2* deletion, we analyzed PV<sup>+</sup> cell perisomatic synapses in both PFC and BLA 24 hrs after the end of fear extinction training in *PV-Cre;Hdac2<sup>lox/lox</sup>* mice and their control littermates. Whereas naive conditional mutant mice showed decreased number of putative perisomatic synapses, identified by the colocalization of gephyrin puncta with perisomatic PV<sup>+</sup> boutons, compared to control mice in both PFC and BLA (Fig. 2a, 8a, b, e), no significant difference could be detected between the two genotypes following extinction training (Fig. 8c, d, e). These results suggest that fear extinction training promoted more extensive PV<sup>+</sup> cell synapse remodelling in *PV-Cre;Hdac2<sup>lox/lox</sup>* mice than in *Hdac2<sup>lox</sup>*



littermates, reinforcing the hypothesis that changes in PV inhibitory drive might be critical for the long-term retention of extinction memory (8).

### 3.7 Discussion

The development of GABAergic circuits, in particular of PV<sup>+</sup> cells, is one of the factors believed to restrict critical period plasticity in the adult brain (21,30,31); hence, controlled manipulation of cortical PV<sup>+</sup> cell connectivity should help reinstate heightened plasticity, thereby creating an opportunity for therapeutic intervention (32,33). To this purpose, it is essential to gain a better understanding of the molecular mechanisms limiting PV<sup>+</sup> cell plasticity in the adult brain. Here, we showed that PV<sup>+</sup> cell epigenetic changes regulate their plastic potential, thereby affecting adult neuroplasticity. In particular, our results demonstrate that PV<sup>+</sup> cell-specific *Hdac2* deletion allows for PV<sup>+</sup> cell synapse remodeling during extinction training and lead to decreased spontaneous recovery of fear memories with time. Long-term retention of extinction memory was not due to more labile fear memory acquisition in conditional knockout mice, since pharmacological inhibition of Hdac2 after fear memory training in wild-type mice also led to significantly increased retention of fear memory extinction. We further found that Hdac2 levels controlled the expression of the lectican Aggrecan, which is a critical regulator of PNN condensation, by regulating its transcription specifically in PFC PV<sup>+</sup> cells.

Numerous studies have addressed the role of epigenetic modifiers, either by pharmacological inhibition or genetic deletion of different HDACs, on fear memories formation and extinction (34). In particular, an elegant study demonstrated that pharmacological inhibition of Hdac2 during contextual fear extinction prevents the spontaneous recovery of freezing behaviour during the recall of even remote fear memories by upregulating neuroplasticity-related gene expression (16). On the other

hand, whether Hdac2 plays different role in different neuron types thus leading to distinct behavioural outputs, was not clear. A previous study showed that *Hdac2* deletion in postmitotic forebrain glutamatergic neurons (using CaMKII $\alpha$ Cre mice) led to a robust acceleration of extinction learning, which was however followed by a normal spontaneous recovery of fear memories 5 days after the end of the extinction (35). Conversely, our data showed that *Hdac2* deletion specifically in postnatal PV<sup>+</sup> cells did not affect the rate of extinction learning but led to decreased spontaneous recovery of fear memories with time. The specific role of Hdac2 expressed by PV<sup>+</sup> cells in limiting the extinction of fear memories was further supported by the fact that the beneficial effect of Hdac2 inhibitor and PV<sup>+</sup> cell-specific deletion of Hdac2 on preventing the recovery of fear memory were not additive. The effects of *Hdac2* deletion on specific components of fear memory extinction (e.g., extinction learning vs extinction retention), may partly reflect the differential gene-regulation by Hdac2 in distinct neural circuits that mediate specific forms of learning and/or different stages of memory formation and stability.

The main problem with fear extinction is the reappearance, or spontaneous recovery, of the original fear after extinction training. To explain this phenomena, two opposite models of extinction have been proposed and strongly debated: one posits that the extinction training leads to the erasure of the fear memory itself (10,14), while the second proposes that extinction creates new inhibitory learning, which controls the fear memory (36,37). It has been suggested that extinction learning could be seen as an equilibrium between erasure and inhibition, where any behavioural manipulation which influences fear expression would either promote a functional erasure of the original fear

trace or have permissive effects on the new inhibitory memory (38). In the field of cognitive neuroepigenetics, it has been proposed that “there exists an equilibrium in epigenetic states that can be pushed in one direction or another” (38). The data presented in this work support the hypothesis that increasing chromatin acetylation level, likely at specific genes, enhances fear extinction memory and its retention over time. In particular, we identified PV<sup>+</sup> cell-epigenetic state as a major determinant in the long-term retention of extinction memories. Whether Hdac2 inhibition in PV<sup>+</sup> cells leads to a stronger inhibitory memory controlling the fear memory, or to erasure of the original fear memory is not clear. However, the lack of generalisation of fear extinction memory, as observed by similar freezing time at the renewal test in *PV-Cre;Hdac2<sup>lox/lox</sup>* versus *PV-Cre;Hdac2<sup>+/+</sup>* mice (Suppl. Fig. 2) or following Hdac2 inhibition after fear memory acquisition (Fig. 6 b), argues against the erasure of the original fear memory, instead supporting the hypothesis that PV<sup>+</sup> cell heightened plastic remodelling could contribute to forming stronger inhibitory memory.

The development of cortical PV<sup>+</sup> cells is a prolonged process that reaches plateau only by the end of adolescence (24). During their postnatal maturation phase, cortical PV<sup>+</sup> cells form exuberant innervation fields characterized by strings of perisomatic synapses. In addition, during their maturation phase, PV<sup>+</sup> cell somata and dendrites are progressively enwrapped in PNNs, which are thought to stabilize their synaptic inputs (39,40) and protect them from oxidative stress (41). Our data suggest that PV<sup>+</sup> cell-epigenetic state likely regulates their maturation state, since *PV-Cre;Hdac2<sup>lox/lox</sup>* mice showed significantly reduced PNN condensation around PV<sup>+</sup> cells and decreased density of PV<sup>+</sup> cell perisomatic synapses in the PFC and BLA, two brain regions

implicated in fear behavior regulation. This data is consistent with the observation that PV<sup>+</sup> cell-restricted *Hdac2* deletion reduces inhibitory input onto pyramidal cells in the visual cortex of adult mice, and coincides with enhanced long-term depression that is more typical of younger mice (42). Increased acetylation levels in PV<sup>+</sup> cells likely modulate their plasticity potential as well, since we observed increased *Acan* expression and synaptic remodelling following extinction training. Such heightened synaptic remodelling and expression of PNN critical components might in turn contribute to long-term retention of extinction memory. In accordance with this hypothesis, Trouche et al. (8) showed that extinction training induced a structural remodelling of perisomatic PV<sup>+</sup> cell synapses specifically around excitatory neurons that had been previously activated during the encoding of the original fear memory (fear neurons) in the BLA. In addition, Bhagat et al. (10) reported that PV<sup>+</sup> cell-specific deletion of Nogo Receptor 1, a neuronal receptor for myelin-associated growth inhibitors, enhances both BLA PV<sup>+</sup> cell synaptic structural remodelling and the retention of fear memory extinction. In *PV-Cre;Hdac2<sup>lox/lox</sup>* mice, we observed increased remodelling of PV<sup>+</sup> cell synapses in both BLA and PFC following extinction training. Elegant work demonstrated that PFC PV<sup>+</sup> cell firing inversely correlates with freezing behaviour and that their optogenetic activation reduces freezing behaviour (43), thus, it is possible that reinforcing PFC PV<sup>+</sup> cell-mediated inhibitory drive at the end of extinction training could contribute to the maintenance of the extinction memory, thereby leading to reduced freezing at the retrieval test.

How and to what extent PV<sup>+</sup> cells control the development, integrity and dynamic of the PNNs surrounding their somata and dendrites, in a cell-autonomous fashion, is still an

open question. By using single-cell transcriptomic analysis, we found that PFC PV<sup>+</sup> cells express a variety of PNN's molecular components and metalloproteases. While most of these factors were expressed by other cell types as well, *Acan* transcription appeared to be mostly restricted to PV<sup>+</sup> cells, consistent with previous reports (44,45). *In vitro* (46,47) and *in vivo* (13) experiments revealed that Aggrecan, coded by *Acan*, plays a critical role in PNN formation. For instance, brain-wide targeting of *Acan* (*Nes\_Cre; Acan<sup>lox/lox</sup>* mice) or viral-mediated local *Acan* deletion in adult visual cortex led to complete loss of WFA-stained PNN, while conditional deletion of one *Acan* allele was sufficient to reduce WFA staining intensity (13). Therefore, the reduced aggrecan levels we observed in *PV\_Cre;Hdac2<sup>lox/lox</sup>* or BRD6688-injected mice likely contribute to impaired aggregation of other extracellular matrix molecules into PNNs. Our data showed that PV<sup>+</sup> cell-specific *Hdac2* deletion reduced *Acan*/Aggrecan expression levels in PV<sup>+</sup> cells, while re-introduction of *Hdac2* in *Hdac2<sup>-/-</sup>* mutants rescued *Acan*/Aggrecan expression levels, thus suggesting that *Hdac2* controls *Acan* levels in PV<sup>+</sup> cells. By determining Aggrecan expression levels, PV<sup>+</sup> cells cell-autonomously modulate PNN dynamics and integrity, thereby regulating the stability of their synaptic inputs (39,40,48). Further, a recent study showed that four days of monocular deprivation were sufficient to produce a strong shift in ocular dominance in adult *Acan<sup>lox/lox</sup>* mice injected with AAV-Cre, suggesting that *Acan* expression in the adult brain acts as a brake on neuroplasticity (13). Consistently, decreased Aggrecan levels in *PV-Cre;Hdac2<sup>lox/lox</sup>* or BRD6688- injected mice may contribute to increase neuroplasticity leading to higher retention of extinction memory. Furthermore, we showed that PV<sup>+</sup> cell-specific *Hdac2* deletion reduced *Acan* transcription selectively in PFC, but not in somatosensory cortex, PV<sup>+</sup> cells. This surprising regional specificity suggests that PV<sup>+</sup> cell circuits in different

adult cortical areas might differ more, at least in term of epigenetic regulation, than what was previously assumed. In particular, region-specific dynamic epigenetic regulation of PV<sup>+</sup> cells may contribute to increased plasticity of PFC networks compared to primary sensory areas in the adult brain.

In contrast to what we observed in the PFC, the reduced numbers of PV<sup>+</sup> cells enwrapped by PNN in the BLA of *PV-Cre;Hdac2<sup>lox/lox</sup>* mice was not accompanied by reduced *Acan*/Aggrecan expression, indicating that different molecular organizers might be at play in the two regions. In BLA, PNN enwrap not only PV<sup>+</sup> cells, but also a population of excitatory neurons (49), therefore PNNs components produced by excitatory neurons may contribute to PNN aggregation around PV<sup>+</sup> cells. Finally, consistent with previous findings (26), we observed that the expression of the metalloproteases *Adamts8*, *Adamts15* and *Mme* was highly enriched in, but not restricted to, PV<sup>+</sup> cells. Increased metalloproteases expression might lead to Aggrecan cleavage and PNN disassembly. Whether their expression levels are regulated, directly or indirectly, by *Hdac2* remains to be explored.

Finally, we observed that *Acan* gene expression in PFC PV<sup>+</sup> cells was upregulated by extinction training both in *PV\_Cre;Hdac2<sup>lox/lox</sup>* and in BRD6688-injected wild-type mice. Increased *Acan* expression likely leads to increased PNN aggregation and stabilisation surrounding PV<sup>+</sup> cells (23,45,46). It has been suggested that new PNN formation plays a critical role in memory consolidation, by modulating PV<sup>+</sup> cell activity (50); therefore it is possible that the ability to dynamically regulate *Acan*, and thus PNN formation/stability, and not absolute levels of *Acan*, determines the long-term retention of fear extinction memory. A recent study showed that *Hdac2* S-nitrosylation was upregulated in the

hippocampus during the extinction of contextual fear memories. Hdac2 S-nitrosylation in turn led to Hdac2 dislocation from the chromatin and increased chromatin acetylation, thereby priming the expression of neuroplasticity-regulated genes ("transcriptionally permissive state") (16). Whether the same epigenetic mechanism is at play in PFC PV<sup>+</sup> cells during cued-fear extinction learning and whether Aggrecan expression is downstream of such regulation, remains to be investigated.

Taken together, our data support a model in which acetylation level of PV<sup>+</sup> cell chromatin primes *Acan* gene in PFC, and possibly different genes coding for PNN components in BLA, to be dynamically expressed during learning of extinction memory. Increased Aggrecan expression would then promote PNN condensation (23,45,46), and modulate PV<sup>+</sup> cell-mediated inhibition. Increased PFC inhibition would in turn contribute to reducing fear expression. In addition, acetylation level of PV<sup>+</sup> cell chromatin regulates the ability of PV<sup>+</sup> cell synapses to remodel their output induced by extinction training, which could promote the selective inhibition of fear memory traces. Since spontaneous recovery of fear memories following extinction training remains an important challenge in exposure therapy, any manipulation that potentiate the plasticity of PV<sup>+</sup> cell connectivity, whether it is through modulating chromatin accessibility or the expression of PNN components, could in turn foster adult brain plasticity and be of future therapeutic interest.



### 3.8 References

- 1 Myers, K. M. & Davis, M. Mechanisms of fear extinction. *Mol Psychiatry* 12, 120-150, doi:10.1038/sj.mp.4001939 (2007).
- 2 Rothbaum, B. O. & Davis, M. Applying learning principles to the treatment of post-trauma reactions. *Ann N Y Acad Sci* 1008, 112-121, doi:10.1196/annals.1301.012 (2003).
- 3 Rodriguez, B. I., Craske, M. G., Mineka, S. & Hladek, D. Context-specificity of relapse: effects of therapist and environmental context on return of fear. *Behav Res Ther* 37, 845-862, doi:10.1016/s0005-7967(98)00106-5 (1999).
- 4 Bouton, M. E., Westbrook, R. F., Corcoran, K. A. & Maren, S. Contextual and temporal modulation of extinction: behavioral and biological mechanisms. *Biol Psychiatry* 60, 352-360, doi:10.1016/j.biopsych.2005.12.015 (2006).
- 5 Quirk, G. J. Memory for extinction of conditioned fear is long-lasting and persists following spontaneous recovery. *Learn Mem* 9, 402-407, doi:10.1101/lm.49602 (2002).
- 6 Kim, J. H. & Richardson, R. A developmental dissociation of context and GABA effects on extinguished fear in rats. *Behav Neurosci* 121, 131-139, doi:10.1037/0735-7044.121.1.131 (2007).
- 7 Makkar, S. R., Zhang, S. Q. & Cranney, J. Behavioral and neural analysis of GABA in the acquisition, consolidation, reconsolidation, and extinction of fear memory. *Neuropsychopharmacology* 35, 1625-1652, doi:10.1038/npp.2010.53 (2010).

- 8 Trouche, S., Sasaki, J. M., Tu, T. & Reijmers, L. G. Fear extinction causes target-specific remodeling of perisomatic inhibitory synapses. *Neuron* 80, 1054-1065, doi:10.1016/j.neuron.2013.07.047 (2013).
- 9 Brittis, P. A. & Flanagan, J. G. Nogo domains and a Nogo receptor: implications for axon regeneration. *Neuron* 30, 11-14, doi:10.1016/s0896-6273(01)00258-6 (2001).
- 10 Bhagat, S. M., Butler, S. S., Taylor, J. R., McEwen, B. S. & Strittmatter, S. M. Erasure of fear memories is prevented by Nogo Receptor 1 in adulthood. *Mol Psychiatry* 21, 1281-1289, doi:10.1038/mp.2015.179 (2016).
- 11 Pizzorusso, T. et al. Reactivation of ocular dominance plasticity in the adult visual cortex. *Science (New York, N.Y.)* 298, 1248-1251, doi:10.1126/science.1072699 (2002).
- 12 Carulli, D. et al. Animals lacking link protein have attenuated perineuronal nets and persistent plasticity. *Brain* 133, 2331-2347, doi:10.1093/brain/awq145 (2010).
- 13 Rowlands, D. et al. Aggrecan Directs Extracellular Matrix-Mediated Neuronal Plasticity. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 38, 10102-10113, doi:10.1523/JNEUROSCI.1122-18.2018 (2018).
- 14 Gogolla, N., Caroni, P., Luthi, A. & Herry, C. Perineuronal nets protect fear memories from erasure. *Science (New York, N.Y.)* 325, 1258-1261, doi:10.1126/science.1174146 (2009).
- 15 Guan, J. S. et al. HDAC2 negatively regulates memory formation and synaptic plasticity. *Nature* 459, 55-60, doi:10.1038/nature07925 (2009).

- 16 Graff, J. et al. Epigenetic priming of memory updating during reconsolidation to attenuate remote fear memories. *Cell* 156, 261-276, doi:10.1016/j.cell.2013.12.020 (2014).
- 17 Putignano, E. et al. Developmental downregulation of histone posttranslational modifications regulates visual cortical plasticity. *Neuron* 53, 747-759, doi:10.1016/j.neuron.2007.02.007 (2007).
- 18 Stafford, J. M., Raybuck, J. D., Ryabinin, A. E. & Lattal, K. M. Increasing histone acetylation in the hippocampus-infralimbic network enhances fear extinction. *Biol Psychiatry* 72, 25-33, doi:10.1016/j.biopsych.2011.12.012 (2012).
- 19 Hippenmeyer, S. et al. A developmental switch in the response of DRG neurons to ETS transcription factor signaling. *PLoS Biol* 3, e159, doi:10.1371/journal.pbio.0030159 (2005).
- 20 Sousa, V. H., Miyoshi, G., Hjerling-Leffler, J., Karayannis, T. & Fishell, G. Characterization of Nkx6-2-derived neocortical interneuron lineages. *Cereb Cortex* 19 Suppl 1, i1-10, doi:10.1093/cercor/bhp038 (2009).
- 21 Beurdeley, M. et al. Otx2 binding to perineuronal nets persistently regulates plasticity in the mature visual cortex. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 32, 9429-9437, doi:10.1523/JNEUROSCI.0394-12.2012 (2012).
- 22 Hartig, W., Bruckner, G., Brauer, K., Schmidt, C. & Bigl, V. Allocation of perineuronal nets and parvalbumin-, calbindin-D28k- and glutamic acid

- decarboxylase-immunoreactivity in the amygdala of the rhesus monkey. *Brain Res* 698, 265-269, doi:10.1016/0006-8993(95)01016-o (1995).
- 23 Morikawa, S., Ikegaya, Y., Narita, M. & Tamura, H. Activation of perineuronal net-expressing excitatory neurons during associative memory encoding and retrieval. *Sci Rep* 7, 46024, doi:10.1038/srep46024 (2017).
- 24 Chattopadhyaya, B. et al. Experience and activity-dependent maturation of perisomatic GABAergic innervation in primary visual cortex during a postnatal critical period. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 24, 9598-9611, doi:10.1523/JNEUROSCI.1851-04.2004 (2004).
- 25 Hartig, W., Brauer, K., Bigl, V. & Bruckner, G. Chondroitin sulfate proteoglycan-immunoreactivity of lectin-labeled perineuronal nets around parvalbumin-containing neurons. *Brain Res* 635, 307-311, doi:10.1016/0006-8993(94)91452-4 (1994).
- 26 Rossier, J. et al. Cortical fast-spiking parvalbumin interneurons enwrapped in the perineuronal net express the metallopeptidases Adamts8, Adamts15 and Neprilysin. *Mol Psychiatry* 20, 154-161, doi:10.1038/mp.2014.162 (2015).
- 27 Devienne, G. et al. Regulation of perineuronal nets in the adult cortex by the electrical activity of parvalbumin interneurons. 671719, doi:10.1101/671719 %J bioRxiv (2019).
- 28 Wagner, F. F. et al. Kinetically Selective Inhibitors of Histone Deacetylase 2 (HDAC2) as Cognition Enhancers. *Chem Sci* 6, 804-815, doi:10.1039/C4SC02130D (2015).

- 29 Segre, C. V. & Chiocca, S. Regulating the regulators: the post-translational code of class I HDAC1 and HDAC2. *J Biomed Biotechnol* 2011, 690848, doi:10.1155/2011/690848 (2011).
- 30 Baho, E. et al. p75 Neurotrophin Receptor Activation Regulates the Timing of the Maturation of Cortical Parvalbumin Interneuron Connectivity and Promotes Juvenile-like Plasticity in Adult Visual Cortex. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 39, 4489-4510, doi:10.1523/JNEUROSCI.2881-18.2019 (2019).
- 31 Ribic, A., Crair, M. C. & Biederer, T. Synapse-Selective Control of Cortical Maturation and Plasticity by Parvalbumin-Autonomous Action of SynCAM 1. *Cell Rep* 26, 381-393 e386, doi:10.1016/j.celrep.2018.12.069 (2019).
- 32 Bavelier, D., Levi, D. M., Li, R. W., Dan, Y. & Hensch, T. K. Removing brakes on adult brain plasticity: from molecular to behavioral interventions. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30, 14964-14971, doi:10.1523/JNEUROSCI.4812-10.2010 (2010).
- 33 Dehorter, N. & Del Pino, I. Shifting Developmental Trajectories During Critical Periods of Brain Formation. *Front Cell Neurosci* 14, 283, doi:10.3389/fncel.2020.00283 (2020).
- 34 Ganai, S. A., Ramadoss, M. & Mahadevan, V. Histone Deacetylase (HDAC) Inhibitors - emerging roles in neuronal memory, learning, synaptic plasticity and neural regeneration. *Curr Neuropharmacol* 14, 55-71, doi:10.2174/1570159x13666151021111609 (2016).

- 35 Morris, M. J., Mahgoub, M., Na, E. S., Pranav, H. & Monteggia, L. M. Loss of histone deacetylase 2 improves working memory and accelerates extinction learning. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 33, 6401-6411, doi:10.1523/JNEUROSCI.1001-12.2013 (2013).
- 36 Bouton, M. E. Context, time, and memory retrieval in the interference paradigms of Pavlovian learning. *Psychol Bull* 114, 80-99, doi:10.1037/0033-2909.114.1.80 (1993).
- 37 Craske, M. G., Treanor, M., Conway, C. C., Zbozinek, T. & Vervliet, B. Maximizing exposure therapy: an inhibitory learning approach. *Behav Res Ther* 58, 10-23, doi:10.1016/j.brat.2014.04.006 (2014).
- 38 Marshall, P. R. & Bredy, T. W. Neuroepigenetic mechanisms underlying fear extinction: emerging concepts. *Psychopharmacology (Berl)* 236, 133-142, doi:10.1007/s00213-018-5084-4 (2019).
- 39 Favuzzi, E. et al. Activity-Dependent Gating of Parvalbumin Interneuron Function by the Perineuronal Net Protein Brevican. *Neuron* 95, 639-655 e610, doi:10.1016/j.neuron.2017.06.028 (2017).
- 40 Carceller, H., Guirado, R., Ripolles-Campos, E., Teruel-Marti, V. & Nacher, J. Perineuronal Nets Regulate the Inhibitory Perisomatic Input onto Parvalbumin Interneurons and gamma Activity in the Prefrontal Cortex. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 40, 5008-5018, doi:10.1523/JNEUROSCI.0291-20.2020 (2020).

- 41 Cabungcal, J. H. et al. Perineuronal nets protect fast-spiking interneurons against oxidative stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, 9130-9135, doi:10.1073/pnas.1300454110 (2013).
- 42 Nott, A., Cho, S., Seo, J. & Tsai, L. H. HDAC2 expression in parvalbumin interneurons regulates synaptic plasticity in the mouse visual cortex. *Neuroepigenetics* 1, 34-40, doi:10.1016/j.nepig.2014.10.005 (2015).
- 43 Courtin, J. et al. Prefrontal parvalbumin interneurons shape neuronal activity to drive fear expression. *Nature* 505, 92-96, doi:10.1038/nature12755 (2014).
- 44 Tasic, B. et al. Shared and distinct transcriptomic cell types across neocortical areas. *Nature* 563, 72-78, doi:10.1038/s41586-018-0654-5 (2018).
- 45 Devienne, G. et al. Regulation of perineuronal nets in the adult cortex by the activity of the cortical network. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, doi:10.1523/JNEUROSCI.0434-21.2021 (2021).
- 46 Giamanco, K. A., Morawski, M. & Matthews, R. T. Perineuronal net formation and structure in aggrecan knockout mice. *Neuroscience* 170, 1314-1327, doi:10.1016/j.neuroscience.2010.08.032 (2010).
- 47 Kwok, J. C., Carulli, D. & Fawcett, J. W. In vitro modeling of perineuronal nets: hyaluronan synthase and link protein are necessary for their formation and integrity. *J Neurochem* 114, 1447-1459, doi:10.1111/j.1471-4159.2010.06878.x (2010).
- 48 Faini, G. et al. Perineuronal nets control visual input via thalamic recruitment of cortical PV interneurons. *Elife* 7, doi:10.7554/eLife.41520 (2018).

- 49 Baker, K. D., Gray, A. R. & Richardson, R. The development of perineuronal nets around parvalbumin gabaergic neurons in the medial prefrontal cortex and basolateral amygdala of rats. *Behav Neurosci* 131, 289-303, doi:10.1037/bne0000203 (2017).
- 50 Shi, W. et al. Perineuronal nets protect long-term memory by limiting activity-dependent inhibition from parvalbumin interneurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, doi:10.1073/pnas.1902680116 (2019).
- 51 Nott, A. et al. S-nitrosylation of HDAC2 regulates the expression of the chromatin-remodeling factor Brm during radial neuron migration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, 3113-3118, doi:10.1073/pnas.1218126110 (2013).
- 52 Munoz-Manchado, A. B. et al. Diversity of Interneurons in the Dorsal Striatum Revealed by Single-Cell RNA Sequencing and PatchSeq. *Cell Rep* 24, 2179-2190 e2177, doi:10.1016/j.celrep.2018.07.053 (2018).
- 53 Saxena, A. et al. Trehalose-enhanced isolation of neuronal sub-types from adult mouse brain. *Biotechniques* 52, 381-385, doi:10.2144/0000113878 (2012).
- 54 Macosko, E. Z. et al. Highly Parallel Genome-wide Expression Profiling of Individual Cells Using Nanoliter Droplets. *Cell* 161, 1202-1214, doi:10.1016/j.cell.2015.05.002 (2015).
- 55 Gierahn, T. M. et al. Seq-Well: portable, low-cost RNA sequencing of single cells at high throughput. *Nat Methods* 14, 395-398, doi:10.1038/nmeth.4179 (2017).



- 56 Wunnemann, F. et al. Loss of ADAMTS19 causes progressive non-syndromic heart valve disease. *Nat Genet* 52, 40-47, doi:10.1038/s41588-019-0536-2 (2020).
- 57 Satija, R., Farrell, J. A., Gennert, D., Schier, A. F. & Regev, A. Spatial reconstruction of single-cell gene expression data. *Nat Biotechnol* 33, 495-502, doi:10.1038/nbt.3192 (2015).
- 58 Butler, A., Hoffman, P., Smibert, P., Papalexi, E. & Satija, R. Integrating single-cell transcriptomic data across different conditions, technologies, and species. *Nat Biotechnol* 36, 411-420, doi:10.1038/nbt.4096 (2018).
- 59 Nestorowa, S. et al. A single-cell resolution map of mouse hematopoietic stem and progenitor cell differentiation. *Blood* 128, e20-31, doi:10.1182/blood-2016-05-716480 (2016).
- 60 Saunders, A. et al. Molecular Diversity and Specializations among the Cells of the Adult Mouse Brain. *Cell* 174, 1015-1030 e1016, doi:10.1016/j.cell.2018.07.028 (2018).

### 3.9 Figures

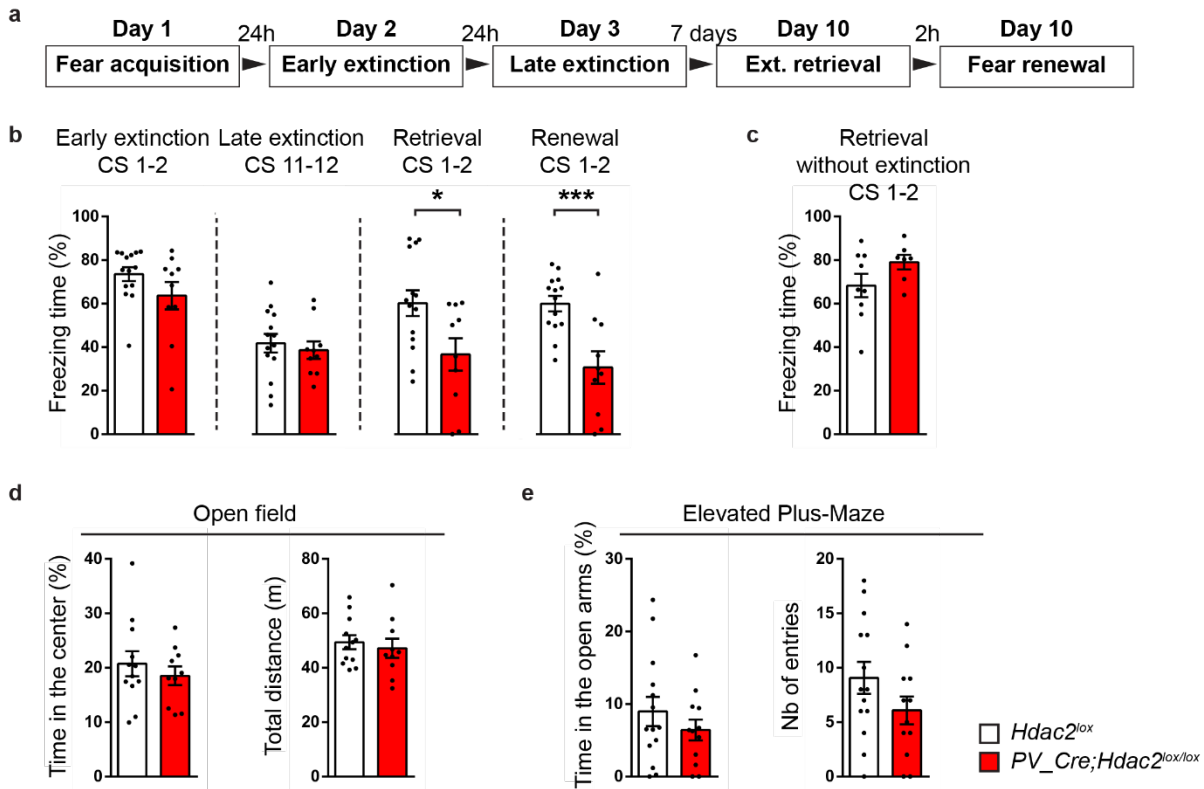


Figure 1. – Postnatal *Hdac2* deletion restricted to PV<sup>+</sup> cells decreases the spontaneous recovery of fear memory after extinction in adult mice.

(a) Schematic representation of the experimental protocol. Ext.: extinction. (b) Wild-type, but not *PV-Cre;Hdac2<sup>lox/lox</sup>* littermates, show spontaneous recovery and context-dependent renewal of fear memory. Unpaired two-tailed *t*-tests,  $P=0.0205$  for fear retrieval;  $P=0.0008$  for fear renewal. Number of mice: *Hdac2<sup>lox/+</sup>* or *Hdac2<sup>lox/lox</sup>*  $n=14$ ; *PV-Cre;Hdac2<sup>lox/lox</sup>*  $n=10$ . (c) In the absence of extinction training, *PV-Cre;Hdac2<sup>lox/lox</sup>* mice show stable fear memory 10 days after conditioning, as control littermates (Mann-Whitney test,  $P=0.2509$ ). Number of mice: *Hdac2<sup>lox/+</sup>* or *Hdac2<sup>lox/lox</sup>*  $n=9$ ; *PV-*

*Cre;Hdac2<sup>lox/lox</sup>* n=7. (d) In the open field test, there is no significant difference in time spent in the center of the open field (unpaired two-tailed *t*-test,  $P=0.4635$ ) nor the total distance travelled (unpaired two-tailed *t*-test,  $P=0.6083$ ) between the two genotypes. Number of mice: *Hdac2<sup>lox/+</sup>* or *Hdac2<sup>lox/lox</sup>* n=12; *PV-Cre;Hdac2<sup>lox/lox</sup>* n=10. (e) In the elevated plus maze test, there is no genotype-dependent difference in time spent (unpaired two-tailed *t*-test,  $P=0.3279$ ) nor the number of entries in the open arms (unpaired two-tailed *t*-test,  $P=0.1449$ ). Number of mice: *Hdac2<sup>lox/+</sup>* or *Hdac2<sup>lox/lox</sup>* n=14; *PV-Cre;Hdac2<sup>lox/lox</sup>* n=12. Graph bars represent mean  $\pm$  s.e.m. Circles represent individual mouse values. \*  $P < 0.05$ , \*\*\*  $P < 0.001$ .

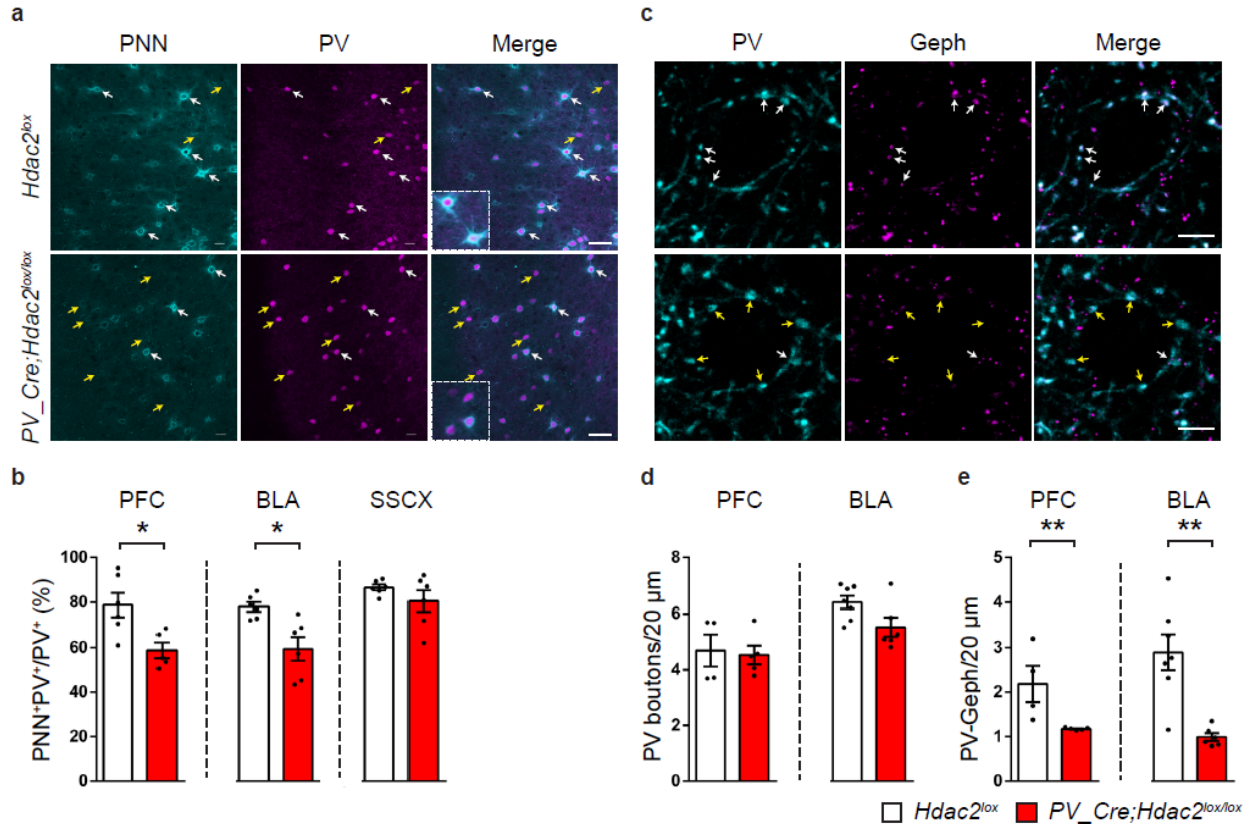
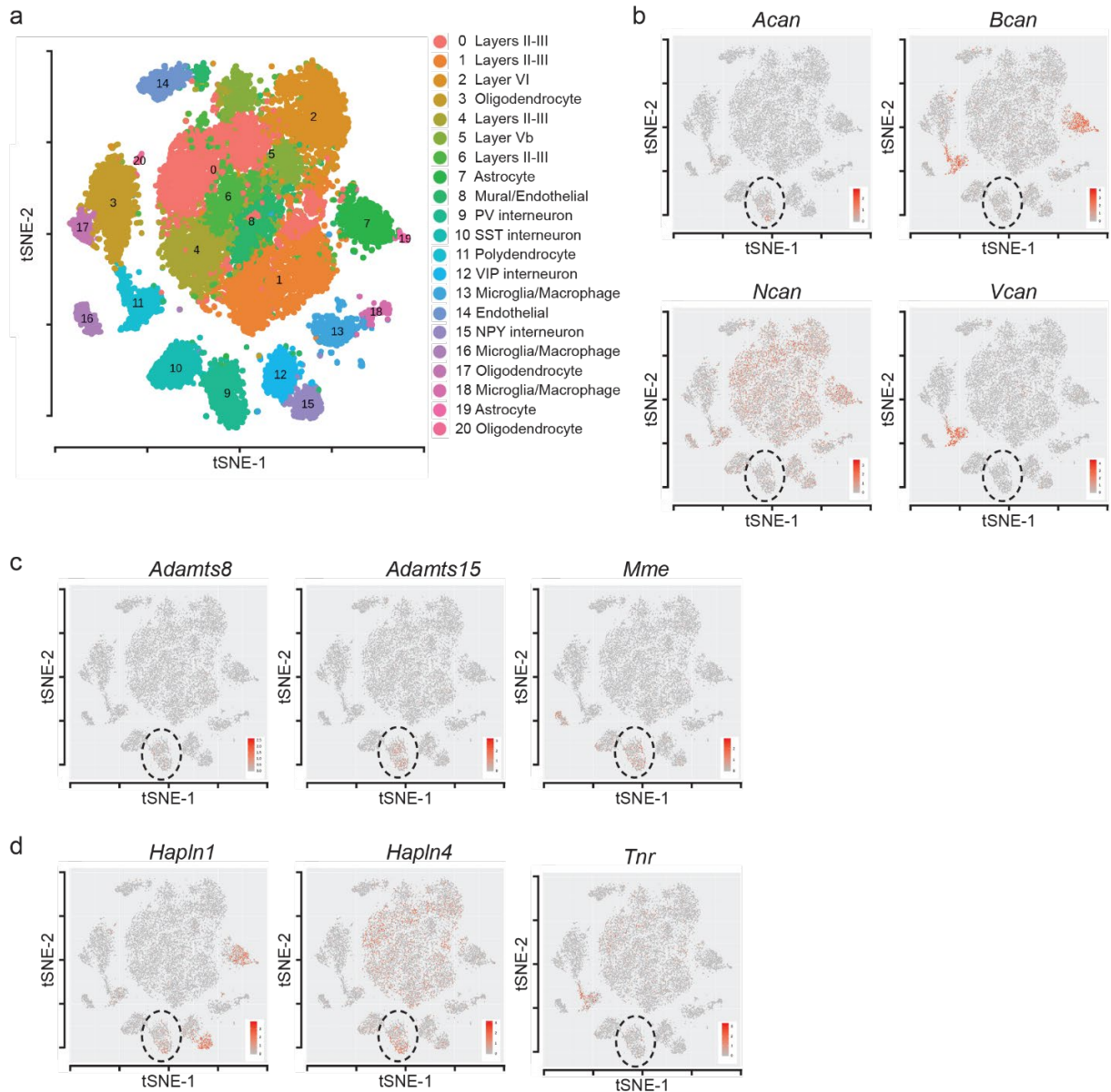


Figure 2. – *PV\_Cre;Hdac2<sup>lox/lox</sup>* mice show reduced PNN agglomeration around cortical PV<sup>+</sup> cell bodies and decreased PV<sup>+</sup> cell efferent synaptic connectivity.

(a) Coronal sections of PFC of *PV\_Cre;Hdac2<sup>lox/lox</sup>* and control littermates labelled with WFA (PNN, cyan) and PV (magenta). White arrows indicate PV<sup>+</sup>PNN<sup>+</sup> cell bodies while yellow arrows point to PV<sup>+</sup>PNN<sup>-</sup> cell bodies. Scale bar, 40 μm. (b) The percentage of PV<sup>+</sup> cell bodies surrounded by WFA-stained PNN is significantly reduced in the PFC and BLA, but not in the SSCX, of conditional KO mice compared to their littermates. PFC: Mann-Whitney test,  $P=0.0173$ , *Hdac2<sup>lox/lox</sup>*, n=6; *PV\_Cre;Hdac2<sup>lox/lox</sup>*, n=5. BLA: Mann-Whitney test,  $P=0.0087$ , *Hdac2<sup>lox/lox</sup>*, n=6; *PV\_Cre;Hdac2<sup>lox/lox</sup>*, n=6. SSCX: Mann-Whitney test,  $P=0.6753$ , *Hdac2<sup>lox/lox</sup>*, n=6; *PV\_Cre;Hdac2<sup>lox/lox</sup>*, n=6. (c) Coronal sections of prefrontal cortex of *PV\_Cre;Hdac2<sup>lox/lox</sup>* and control littermates immunolabeled for PV

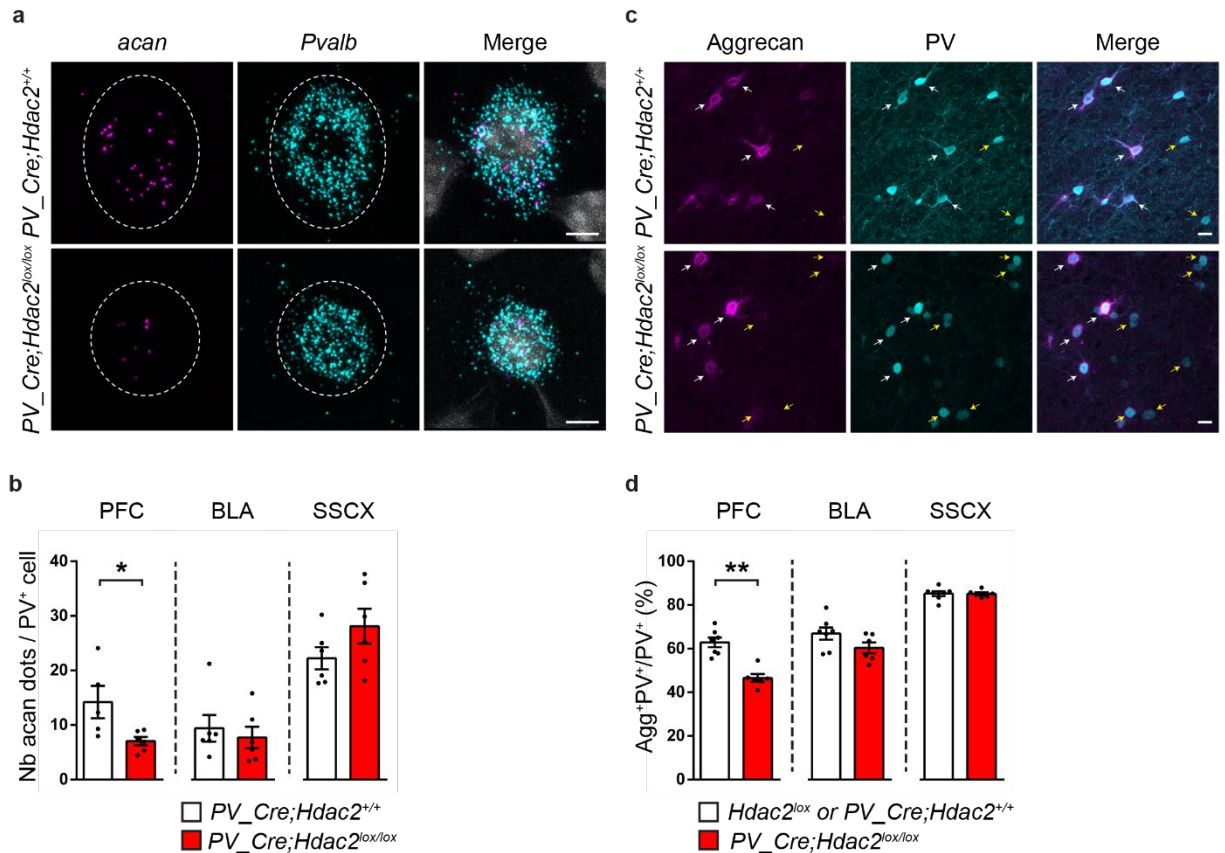
(cyan) and gephyrin (magenta). White arrows indicate perisomatic PV<sup>+</sup>Gephyrin<sup>+</sup> boutons, yellow arrows indicate PV<sup>+</sup>Gephyrin<sup>-</sup> boutons. Scale bar, 5 μm. **(d)** The density of perisomatic PV<sup>+</sup> boutons is not significantly different neither in PFC nor in BLA between the two genotypes. PFC: Mann-Whitney test,  $P=0.6825$ , *Hdac2*<sup>lox/lox</sup> n=4; *PV\_Cre;Hdac2*<sup>lox/lox</sup> n=5;. BLA: Mann-Whitney test,  $P=0.1014$ , *Hdac2*<sup>lox/lox</sup> n=7; *PV\_Cre;Hdac2*<sup>lox/lox</sup> n=6. **(e)** The density of perisomatic PV<sup>+</sup> boutons co-localizing with gephyrin puncta is significantly reduced in both PFC and BLA of conditional KO mice compared to their littermates. PFC: Mann-Whitney test,  $P=0.0159$ , *Hdac2*<sup>lox/lox</sup> n=4; *PV\_Cre;Hdac2*<sup>lox/lox</sup> n=5. BLA: Mann-Whitney test,  $P=0.0140$ , *Hdac2*<sup>lox/lox</sup> n=7; *PV\_Cre;Hdac2*<sup>lox/lox</sup> n= 6). Data represent mean ± s.e.m. Black circle represent individual data points. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ .



**Figure 3. – PNN components and metalloproteases are expressed by different cell types in mouse PFC.**

(a) Single cell RNA-sequencing (DropSeq) from PFC cells of P40-43 wild-type mice (n=8 mice). t-SNE visualization of identified cell types; cluster 9 refers to PV<sup>+</sup> cells. (b-d) Expression localisation of critical components of PNN structure and remodeling, including lecticans (b, *Acan*, *Bcan*, *Ncan*, and *Vcan*), metalloproteases known to be

expressed by PV<sup>+</sup> cells (**c**, *Adamts8*, *Adamts15*, and *Mme*) and other critical PNN components (**d**, *Halpn1*, *Halpn4*, and *Tnr*).



**Figure 4. – PV<sup>+</sup> cell-specific Hdac2 deletion leads to reduced Acan mRNA expression and Aggrecan condensation around PV<sup>+</sup> cell bodies in adult mouse PFC.**

**(a)** Representative images of fluorescent RNAscope *in situ* hybridization against *Acan* (Aggrecan, magenta) and *Pvalb* (PV, cyan) in prefrontal cortex of *PV\_Cre;Hdac2<sup>lox/lox</sup>* and control littermates (DAPI labeling is in grey). Scale bar, 5  $\mu$ m. **(b)** The mean number of *Acan* dots detected in *Pvalb*<sup>+</sup> cells is significantly lower in PFC, but not BLA or SSCX, of conditional knockout mice compared to their control littermates. PFC: Mann-Whitney test,  $P=0.0173$ , *PV\_Cre;Hdac2<sup>+/+</sup>* n=5, *PV\_Cre;Hdac2<sup>lox/lox</sup>* n=6. BLA: Mann-Whitney test,  $P=0.3974$ , *PV\_Cre;Hdac2<sup>+/+</sup>* n=6, *PV\_Cre;Hdac2<sup>lox/lox</sup>* n=6. SSCX: Mann-Whitney test,  $P=0.1797$ , *PV\_Cre;Hdac2<sup>+/+</sup>* n=6, *PV\_Cre;Hdac2<sup>lox/lox</sup>* n=6. **(c)** Prefrontal cortex coronal



sections labelled for Aggrecan (cyan) and PV (magenta) in *PV\_Cre;Hdac2<sup>lox/lox</sup>* and control littermates. White arrows indicate PV<sup>+</sup>Aggrecan<sup>+</sup> cell bodies, while yellow arrows point to PV<sup>+</sup>Aggrecan<sup>-</sup> cell bodies. Scale bar, 10  $\mu$ m. (d) The percentage of PV<sup>+</sup> cell bodies surrounded by aggrecan is significantly reduced in PFC, but not BLA or SSCX, of conditional knockout mice compared to their control littermates. PFC: Mann Whitney test,  $P=0.0012$ , BLA: Mann Whitney test  $P=0.0513$ , SSCX: Mann Whitney test  $P=0.6037$ . For all three brain regions, *Hdac2<sup>lox/lox</sup>* or *PV\_Cre;Hdac2<sup>+/+</sup>* n=7; *PV\_Cre;Hdac2<sup>lox/lox</sup>* n= 6. Data represent mean  $\pm$  s.e.m. Black circle represent individual data points. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ .

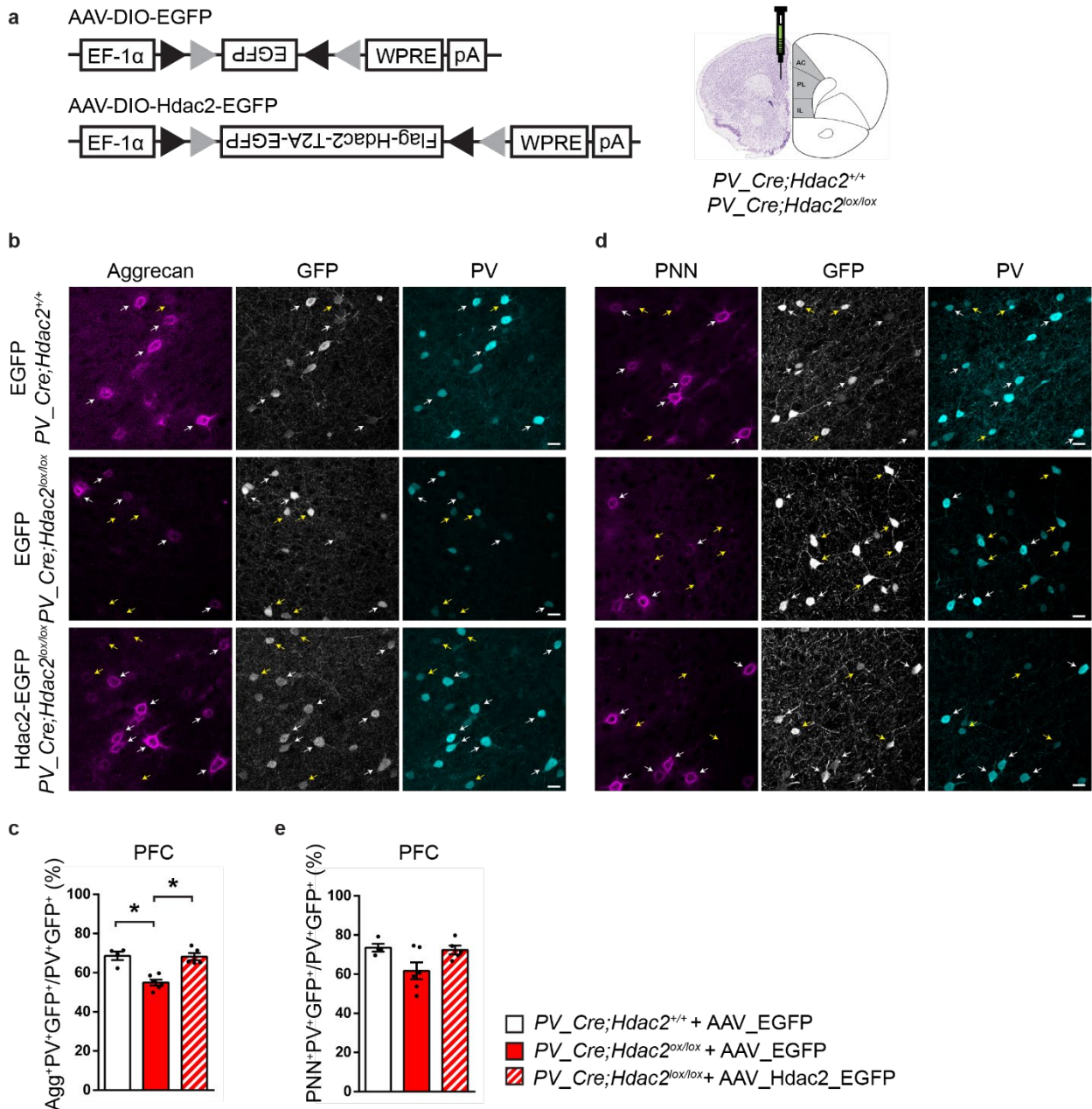


Figure 5. – **PV<sup>+</sup> cell-specific Hdac2 re-expression in *PV\_Cre;Hdac2<sup>lox/lox</sup>* mice rescues Aggrecan condensation around PV<sup>+</sup> cell bodies in PFC.**

(a) Schematic representation of Cre-dependent viral vectors and experimental approach. (b) Immunolabelling of Aggrecan (magenta), GFP (grey) and PV (cyan) in PFC coronal sections from *PV\_Cre;Hdac2<sup>+/+</sup>* and *PV\_Cre;Hdac2<sup>lox/lox</sup>* mice injected with

the control AAV (AAV\_DIO\_EGFP) and from *PV\_Cre;Hdac2<sup>lox/lox</sup>* mice injected with the Cre-dependent Hdac2 expressing virus (AAV\_DIO\_Hdac2\_T2A\_EGFP). White arrows point to PV<sup>+</sup>GFP<sup>+</sup>Aggrecan<sup>+</sup> cell bodies, while yellow arrows indicate PV<sup>+</sup>GFP<sup>+</sup>Aggrecan<sup>-</sup> cell bodies. Scale bar, 10  $\mu$ m. (c) Percentage of PV<sup>+</sup>GFP<sup>+</sup> cell bodies surrounded by Aggrecan. Kruskal-Wallis with Dunn's *posthoc* test,  $P=0.0008$ . (d) Labelling for WFA (PNN, magenta), GFP (grey) and PV (cyan) in the three experimental groups. White arrows indicate PV<sup>+</sup>GFP<sup>+</sup>PNN<sup>+</sup> cell bodies, while yellow arrows indicate PV<sup>+</sup>GFP<sup>+</sup>PNN<sup>-</sup> cell bodies. Scale bar, 10  $\mu$ m. (e) Percentage of PV<sup>+</sup>GFP<sup>+</sup> cell bodies surrounded by WFA-stained PNN in the prefrontal cortex. Kruskal-Wallis with Dunn's *posthoc* test,  $P=0.2603$ . Number of mice: *PV\_Cre;Hdac2<sup>+/+</sup>* + AAV\_DIO\_EGFP, n=4, *PV\_Cre;Hdac2<sup>lox/lox</sup>* + AAV\_DIO\_EGFP, n=6, *PV\_Cre;Hdac2<sup>lox/lox</sup>* + AAV\_DIO\_Hdac2\_T2A\_EGFP, n= 5. Data represent mean  $\pm$  s.e.m. Black circle represent individual data points. \*  $P < 0.05$ .

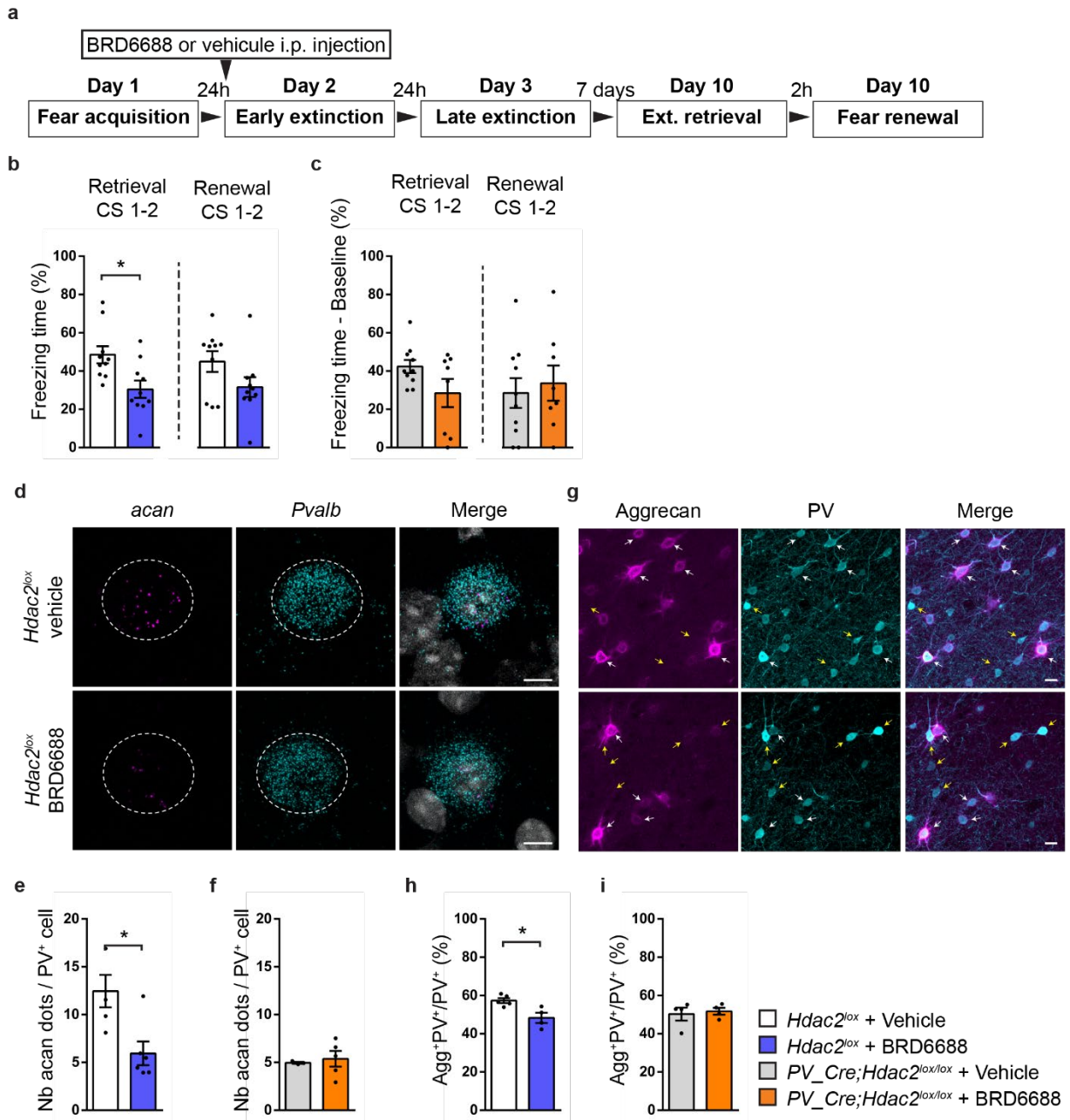


Figure 6. – Hdac2 inhibition before extinction training decreases the spontaneous recovery of fear memory, while decreasing *Acan* mRNA expression and Aggrecan agglomeration around PFC PV<sup>+</sup> cell somata in wild-type but not in *PV-Cre;Hdac2<sup>lox/lox</sup>* mice.

(a) Schematic representation of the experimental protocol. Hdac2 inhibitor BRD6688 or the vehicle are injected intraperitoneally (i.p.) 6 hours before the early extinction procedure. (b) One week after extinction training, freezing levels are significantly different in the spontaneous recovery test between vehicle- and BRD6688-injected *Hdac2<sup>lox/lox</sup>* (c) but not between vehicle- and BRD6688-injected *PV\_Cre;Hdac2<sup>lox/lox</sup>* mice. (b) Extinction retrieval unpaired two-tailed *t*-test,  $P=0.0030$ ; fear renewal, unpaired two-tailed *t*-test,  $P=0.1246$ . Number of *Hdac2<sup>lox/lox</sup>* mice injected with vehicle,  $n=10$  or BRD6688,  $n=9$ . (c) Extinction retrieval unpaired two-tailed *t*-test  $P=0.0850$ , fear renewal unpaired two-tailed *t*-test  $P=0.6733$ . Number of *PV\_Cre;Hdac2<sup>lox/lox</sup>* mice injected with vehicle,  $n=10$  or BRD6688,  $n=8$ . (d) Representative images of fluorescent RNAscope *in situ* against *Acan* (Aggrecan, magenta) and *Pvalb* (PV, cyan) around a DAPI (grey) nucleus in PFC of *Hdac2<sup>lox/lox</sup>* mice 17 hours after i.p. injection of either the Hdac2 inhibitor BRD6688 or the vehicle. Scale bar, 5  $\mu\text{m}$ . (e) The mean number of *Acan* dots present around in *Pvalb*<sup>+</sup> cell is reduced in BRD6688-treated wild-type (Mann-Whitney test,  $P=0.0303$ ) but not conditional knockout mice (Mann-Whitney test,  $P=0.6786$ ). Number of *Hdac2<sup>lox/lox</sup>* injected with vehicle,  $n=5$  or BRD6688,  $n=6$ . Number of *PV\_Cre;Hdac2<sup>lox/lox</sup>* mice injected with vehicle  $n=3$  or BRD6688,  $n=5$ . (e) PFC coronal sections immunolabeled for Aggrecan (cyan) and PV (magenta) in *Hdac2<sup>lox/lox</sup>* mice 17 hours after i.p. injection of either the Hdac2 inhibitor BRD6688 or the vehicle. Scale bar, 10  $\mu\text{m}$ . (f) The percentage of PV<sup>+</sup> cell bodies surrounded by Aggrecan is reduced by BDR6688 injection in control (Mann-Whitney test,  $P=0.0317$ ) but not conditional knockout mice (Mann-Whitney test,  $P=0.8286$ ). Number of *Hdac2<sup>lox/lox</sup>* injected with vehicle,  $n=5$  or BRD6688,  $n=4$ . Number of *PV\_Cre;Hdac2<sup>lox/lox</sup>* mice injected with

vehicle, n=4 or BRD6688, n=4. Graph bars represent mean  $\pm$  s.e.m. Circles represent individual mouse values. \*  $P < 0.05$ .

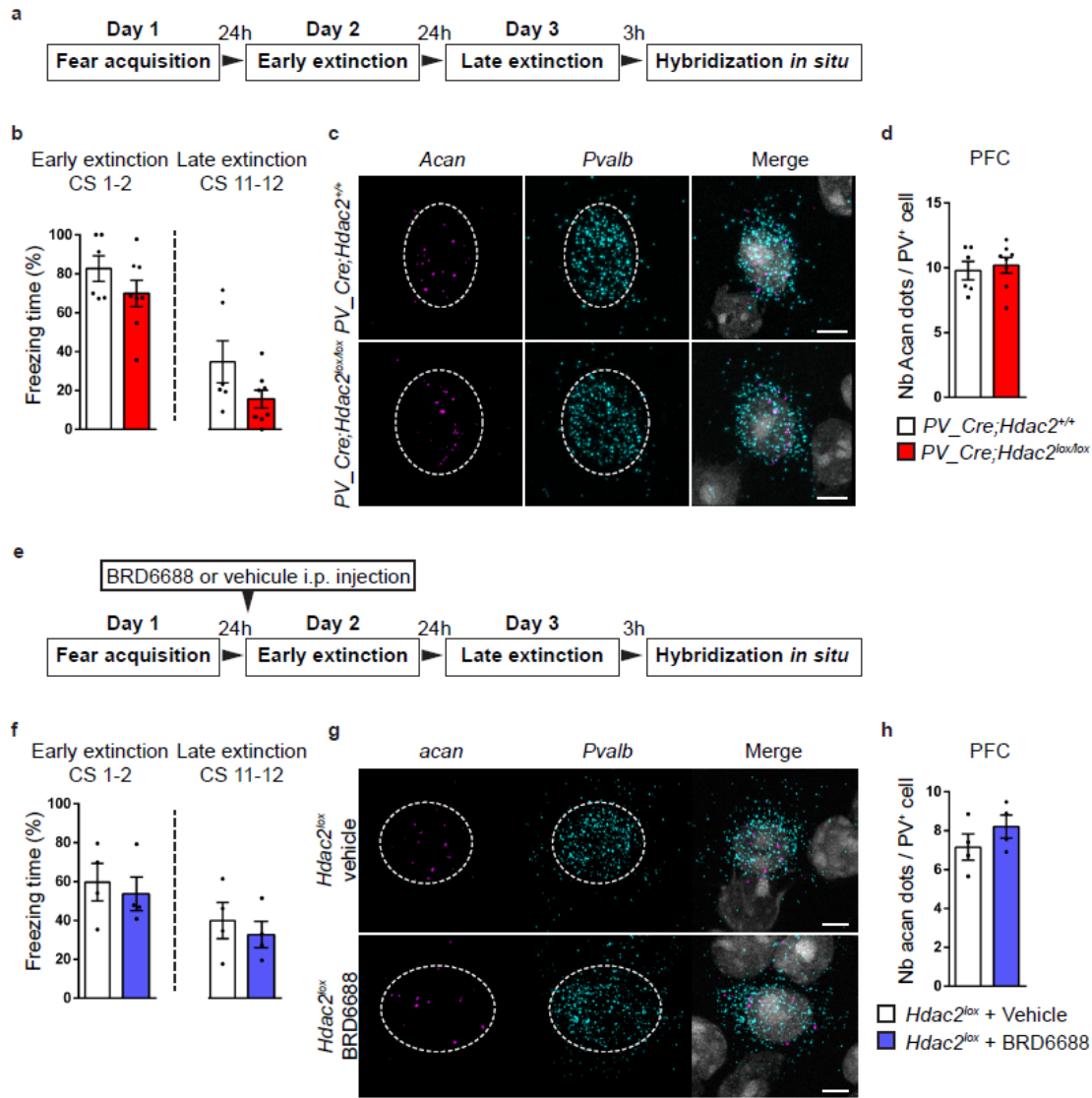


Figure 7. – Hdac2 deletion or pharmacological inhibition promotes *Acan* dynamic expression in PFC PV<sup>+</sup> cells following fear extinction training.

(a) Schematic representation of the experimental protocol. Brains of *PV-Cre;Hdac2<sup>lox/lox</sup>* mice and their control littermates have been collected 3 hours after late extinction training for *in situ* hybridization. (b) Both *PV-Cre;Hdac2<sup>lox/lox</sup>* mice and controls show efficient fear extinction. Repeated two-way ANOVA;  $F_{\text{genotype}}(1,12)=7.554$ ,  $P=0.0177$ ,  $F_{\text{extinction}}(11,132)=9.148$ ,  $P<0.0001$ ,  $F_{\text{genotype}^*\text{extinction}}(11,132)=1.107$ ,  $P=0.3605$ . (c)

Representative images of fluorescent RNAscope *in situ* against *Acan* (Aggrecan, magenta) and *Pvalb* (PV, cyan) around a DAPI (grey) nucleus in PFC of *PV-Cre;Hdac2<sup>+/+</sup>* and *PV-Cre;Hdac2<sup>lox/lox</sup>* mice 3 hours after late extinction training. Scale bar, 5  $\mu$ m. **(d)** The mean number of *Acan* dots present around a prefrontal *Pvalb*<sup>+</sup> cell 3 hours after late extinction training is comparable between *PV-Cre;Hdac2<sup>+/+</sup>* and *PV-Cre;Hdac2<sup>lox/lox</sup>* mice (Mann-Whitney test,  $P=0.8112$ ). Number of mice: *PV-Cre;Hdac2<sup>+/+</sup>*  $n=6$ ; *PV-Cre;Hdac2<sup>lox/lox</sup>*  $n=8$ . **(e)** Schematic representation of the experimental protocol. Brains of BRD6688-injected or vehicle-injected mice 6 hours before extinction training have been collected 3 hours after late extinction training for *in situ* hybridization. **(b)** Both BRD6688-injected and vehicle-injected controls show efficient fear extinction. Repeated two-way ANOVA;  $F_{\text{treatment}}(1,6)=1.093$ ,  $P=0.3362$ ,  $F_{\text{extinction}}(11,66)=3.902$ ,  $P=0.0002$ ,  $F_{\text{genotype}^* \text{extinction}}(11,66)=0.7446$ ,  $P=0.6922$ . **(c)** Representative images of fluorescent RNAscope *in situ* against *Acan* (Aggrecan, magenta) and *Pvalb* (PV, cyan) around a DAPI (grey) nucleus in PFC of BRD6688-injected and vehicle-injected mice 3 hours after late extinction training. Scale bar, 5  $\mu$ m. **(d)** The mean number of *Acan* dots present around a prefrontal *Pvalb*<sup>+</sup> cell 3 hours after late extinction training is comparable between BRD6688-injected and vehicle-injected mice (Mann-Whitney test,  $P=0.2$ ). Number of mice: vehicle-injected  $n=4$ ; BRD6688-injected  $n=4$ .



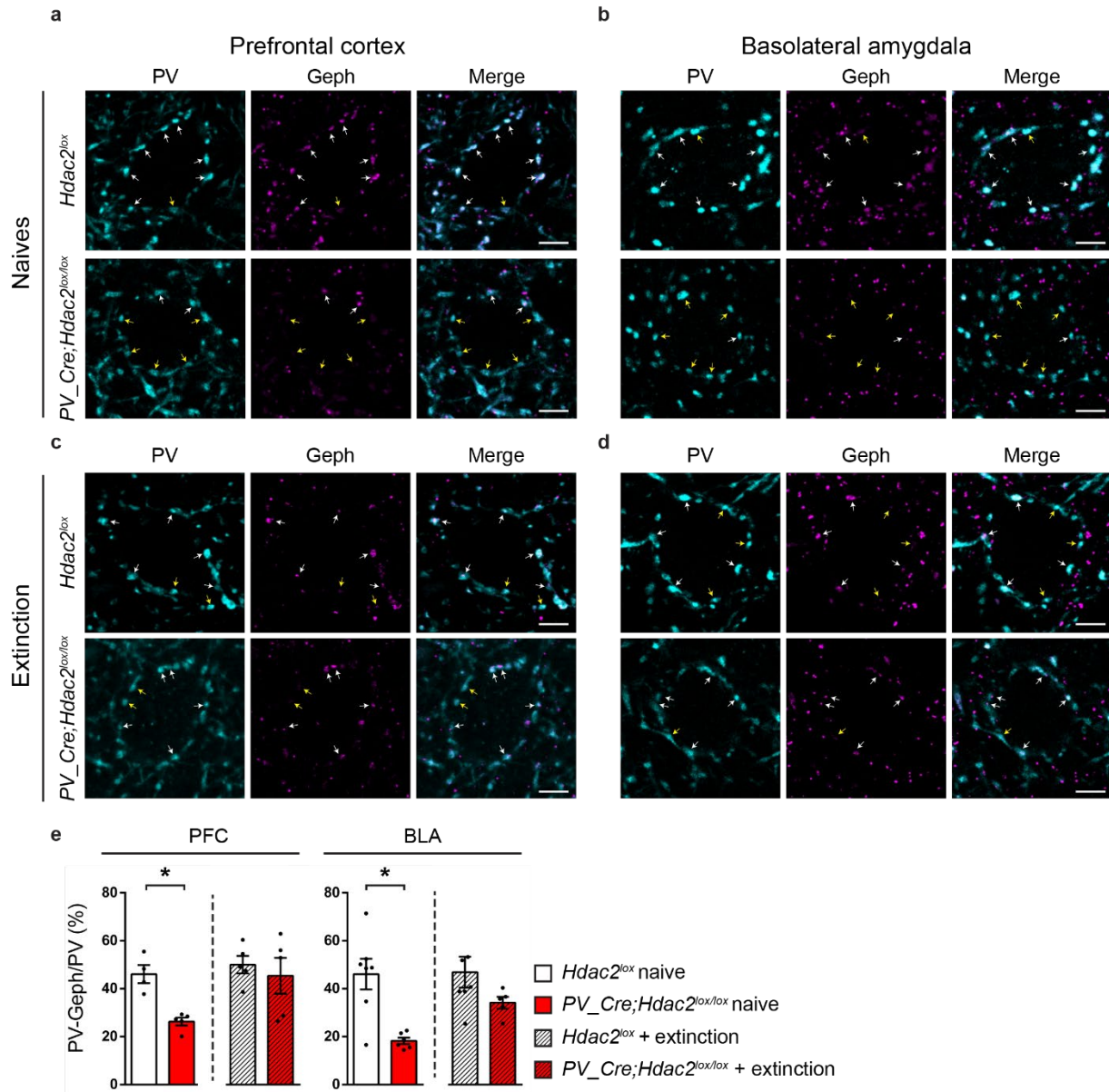


Figure 8. – **PV<sup>+</sup> cell perisomatic connectivity show increased remodeling following extinction training in PFC and BLA of *PV-Cre;Hdac2<sup>lox/lox</sup>* mice.**

**(a-d)** Coronal brain sections of PFC **(a, c)** and BLA **(b, d)** immunolabeled for PV (cyan) and gephyrin (magenta) **(a, b)** Naive *PV-Cre;Hdac2<sup>lox/lox</sup>* and control littermates. **(c, d)** *PV-Cre;Hdac2<sup>lox/lox</sup>* and control littermates 24h after late extinction training. Scale bar, 10  $\mu$ m. **(e)** The percentage of perisomatic PV<sup>+</sup> boutons co-localising with gephyrin is significantly different between the two genotypes in naive conditions but not 24 hrs after

extinction training. PFC: two-way ANOVA;  $F_{\text{genotype}}$  (1,15)=6.564,  $P=0.0217$ ,  $F_{\text{extinction}}$ (1,15)=5.861,  $P=0.0286$ ,  $F_{\text{genotype}^*\text{extinction}}$ (1,15)=2.523,  $P=0.1331$ . BLA: two-way ANOVA;  $F_{\text{genotype}}$  (1,21)=14.56,  $P=0.0010$ ,  $F_{\text{extinction}}$ (1,21)=2.478,  $P=0.1304$ ,  $F_{\text{genotype}^*\text{extinction}}$ (1,21)=2.018,  $P=0.1701$ . Sidak's *posthoc* test show statistical significance in PFC and BLA between *PV-Cre;Hdac2<sup>lox/lox</sup>* and control littermates only in naive condition (PFC: naives:  $P=0.0241$ , extinction:  $P=0.7386$ ; BLA: naives:  $P=0.0021$ , extinction:  $P=0.2140$ ). Mice numbers: PFC: Naives control n=4, *PV-Cre;Hdac2<sup>lox/lox</sup>* n=5; Extinction control n=5, *PV-Cre;Hdac2<sup>lox/lox</sup>* n=5. BLA: Naives control n=7, *PV-Cre;Hdac2<sup>lox/lox</sup>* n=6; Extinction control n=7, *PV-Cre;Hdac2<sup>lox/lox</sup>* n=5.

### 3.10 Supplementary Figures

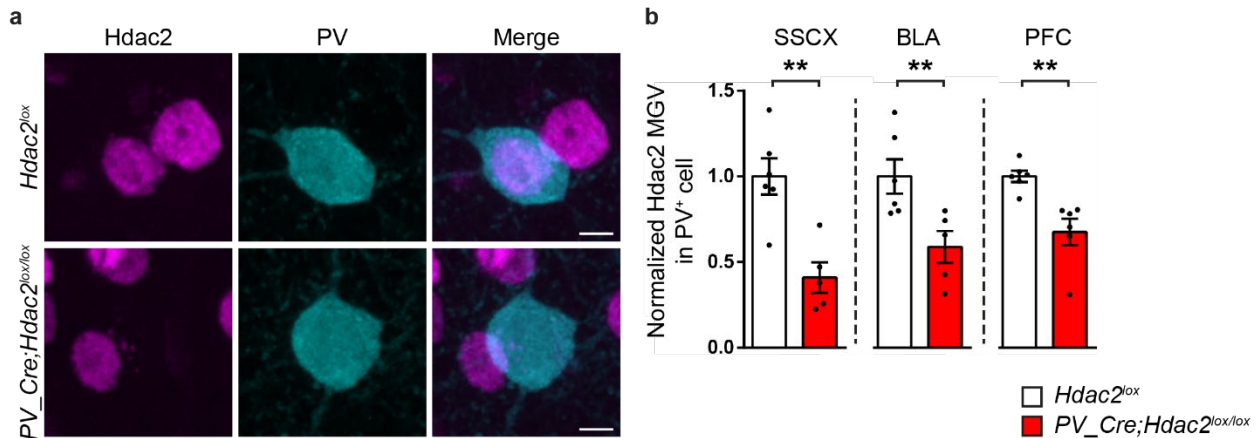


Figure 1. – **Supplementary. Hdac2 expression is decreased in PV<sup>+</sup> cells of *PV\_Cre;Hdac2<sup>lox/lox</sup>* mice.**

(a) PFC coronal sections from P60 *PV\_Cre;Hdac2<sup>lox/lox</sup>* and control littermates immunolabeled for Hdac2 (magenta) and PV (cyan). Scale bar, 5  $\mu$ m. (b) Mean normalized fluorescent intensity of Hdac2 signal in PV<sup>+</sup> cell nuclei is reduced in conditional knockout mice compared to control littermates in somatosensory cortex (SSCX, Mann-Whitney test,  $P=0.0087$ ), basolateral amygdala (BLA, Mann-Whitney test,  $P=0.0087$ ) and prefrontal cortex (PFC, Mann-Whitney test,  $P=0.0022$ ). Number of mice: PFC: *Hdac2<sup>lox/lox</sup>* n=6; *PV\_Cre;Hdac2<sup>lox/lox</sup>* n= 6, BLA and SSCX: *Hdac2<sup>lox/lox</sup>* n=6; *PV\_Cre;Hdac2<sup>lox/lox</sup>* n= 5. MGV = mean grey value. Graph bars represent mean  $\pm$  s.e.m. Circles represent individual mouse values. \*\*  $P < 0.01$ .

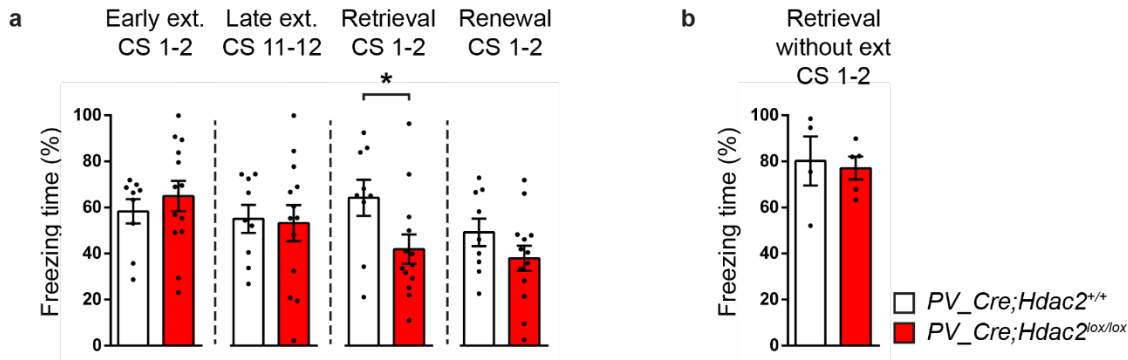


Figure 2. – **Supplementary. Adult *PV\_Cre;Hdac2<sup>lox/lox</sup>* mice show increased fear extinction retention compared to their control *PV\_Cre;Hdac2<sup>+/+</sup>* littermates.**

(a) One week after extinction training, *PV\_Cre;Hdac2<sup>lox/lox</sup>* mice show significantly reduced freezing time than *PV\_Cre;Hdac2<sup>+/+</sup>* mice in the fear retrieval test (unpaired two-tailed *t*-test,  $P=0.0380$ ), but not in the fear renewal test (unpaired two-tailed *t*-test,  $P = 0.1871$ ). Number of mice: *PV\_Cre;Hdac2<sup>+/+</sup>*  $n=9$ , *PV\_Cre;Hdac2<sup>lox/lox</sup>*  $n=13$ . (b) In the absence of extinction training, *PV\_Cre;Hdac2<sup>lox/lox</sup>* male mice show similar freezing time as their control littermates 10 days after fear training (Mann-Whitney test,  $P=0.7143$ ). Number of mice: *PV\_Cre;Hdac2<sup>+/+</sup>*  $n=4$ , *PV\_Cre;Hdac2<sup>lox/lox</sup>*  $n=5$ . Graph bars represent mean  $\pm$  s.e.m. Circles represent individual mouse values. \*  $P < 0.05$ .

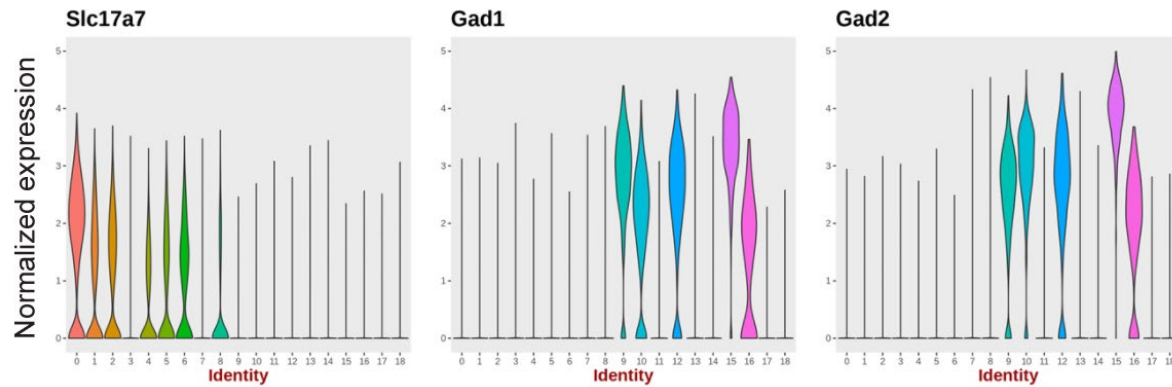


Figure 3. – **Supplementary. Expression levels of VGLUT1 (Slc17a7), GAD1 (Gad1) and GAD2 (Gad2) in clusters 1-18.**

**Related to Figure 3.**

Expression levels are shown as normalized gene expression for each cluster. Cells containing VGLUT1 are considered as glutamatergic neurons, cells containing GAD1 and GAD2 are described as GABAergic neurons. Cells without these markers were labeled as non-neuronal.

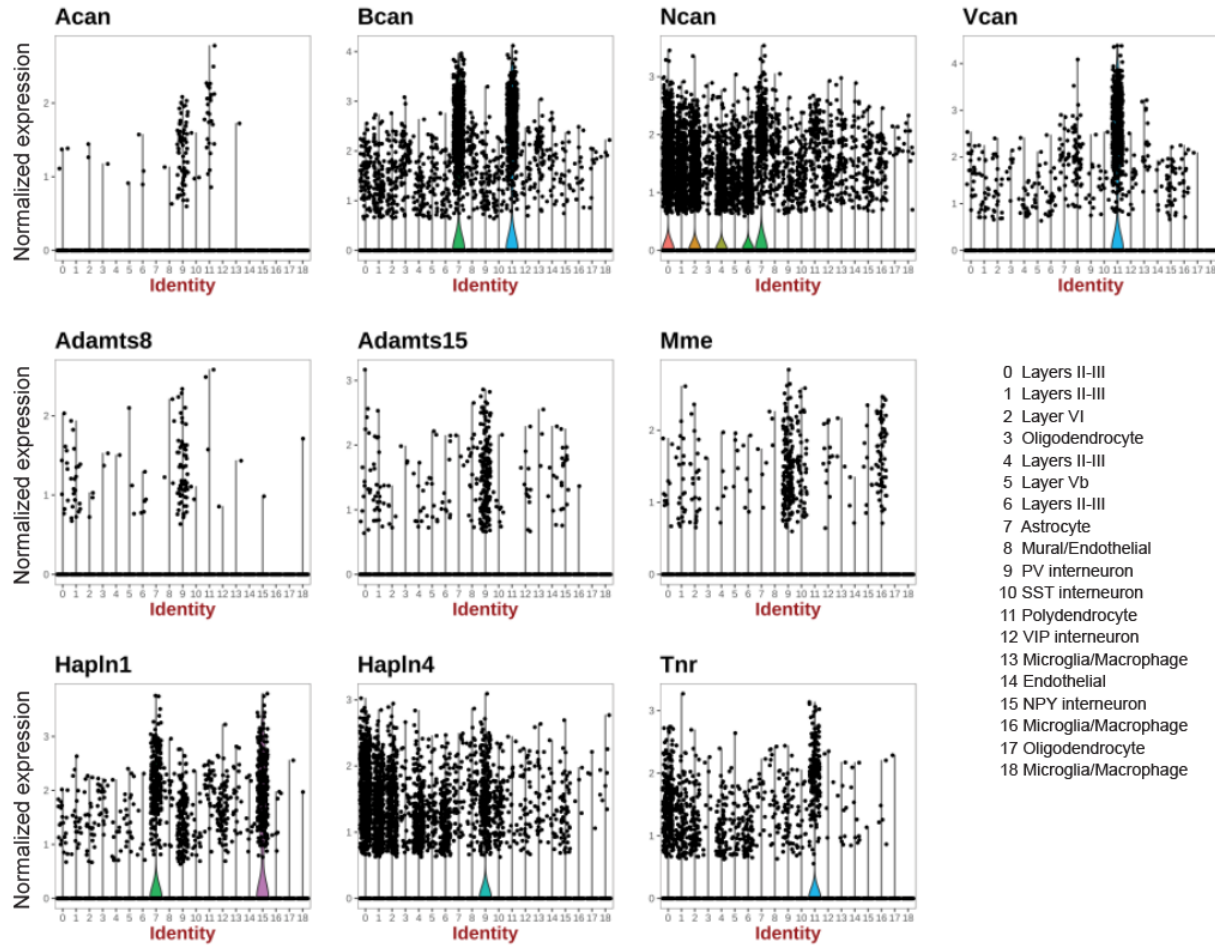


Figure 4. – **Supplementary.** mRNA expression of different PNN components and metalloproteases in distinct cell types in prefrontal cortex of P40 mice identified by single cell RNAseq (DropSeq).

**Related to Figure 3.**

Data is shown as violin plots, where clusters are graphed against normalized expression levels for each gene. *Acan* expression is mostly restricted to PV<sup>+</sup> cells and, to a lesser extent, polydendrocytes.

## Chapitre 4 – Discussion et perspectives

Cette thèse avait pour but d'identifier des moyens moléculaires de favoriser, lors d'une stimulation comportementale, la plasticité cérébrale. Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à une signalisation capable de restreindre la formation des synapses durant la longue phase de maturation des circuits PV<sup>+</sup>, qui peut s'étendre jusqu'à la fin de l'adolescence : la signalisation proBDNF/p75<sup>NRT</sup>. Dans un deuxième temps, nous avons voulu comprendre les mécanismes épigénétiques favorisant la connectivité efférente des circuits PV<sup>+</sup> ainsi que l'agglomération des filets périneuronaux autour de leur corps cellulaire. Nous avons alors identifié Hdac2 comme régulateur de l'expression de *Acan*, une des composantes des PNNs.

### 4.1 Résumé des résultats

Ce travail nous informe que la stimulation de la signalisation via p75<sup>NTR</sup> par proBDNF sur les circuits PV<sup>+</sup>, ou l'inhibition de Hdac2 dans les interneurons PV<sup>+</sup>, sont deux moyens efficaces pour stimuler la plasticité cérébrale adulte [**Figure 1, p. 240**]. Premièrement, l'infusion de proBDNF et la signalisation résultante via le récepteur p75<sup>NTR</sup> chez les interneurons PV<sup>+</sup> vient stimuler la plasticité corticale lors de la privation monoculaire chez l'adulte ; deuxièmement, l'inhibition aiguë de la déacétylase Hdac2 dans les circuits inhibiteurs PV<sup>+</sup> permet d'augmenter la rétention des souvenirs d'extinction dans le temps chez l'adulte.

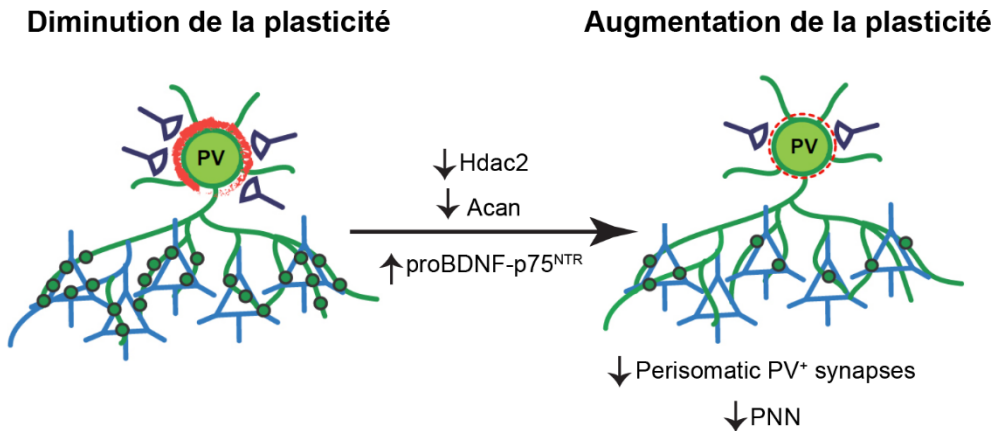


Figure 1. – **Modèle des rôles opposés de la signalisation proBDNF-p75<sup>NTR</sup> et de Hdac2 sur le phénotype cellulaire des interneurons PV<sup>+</sup> et la plasticité du cerveau adulte.**

En premier lieu, le chapitre 2 détaille les effets de la signalisation via p75<sup>NTR</sup> sur la maturation de la connectivité des circuits PV<sup>+</sup> au cours du développement. Pour commencer, il aura fallu démontrer l'expression du récepteur par les interneurons PV<sup>+</sup>. Pour ce faire, deux technologies de pointe ont dû être utilisées : l'hybridation *in situ* de type RNAscope, permettant de visualiser les molécules d'ARN messager, et l'essai par ligation de proximité qui permet de détecter avec une sensibilité accrue les faibles présences de protéines. Nous avons donc démontré la présence de l'ARNm et de la protéine p75<sup>NTR</sup> chez un sous-ensemble d'interneurons PV<sup>+</sup>, et la diminution de son expression au cours de l'adolescence. Ce patron d'expression concorde avec l'hypothèse selon laquelle la signalisation via proBDNF/p75<sup>NTR</sup> restreint la formation des synapses inhibitrices des interneurons PV<sup>+</sup> au cours de leur développement. Cette hypothèse a d'abord été investiguée en manipulant l'expression du récepteur dans une



cellule PV<sup>+</sup> unique en culture organotypique : soit par l'ablation génétique de *p75<sup>NTR</sup>*, soit par la surexpression d'un mutant manquant le domaine intracellulaire. Puis cette hypothèse a été étudiée en manipulant la présence du ligand de *p75<sup>NTR</sup>* : l'inhibition de tPA diminue le clivage de proBDNF en mBDNF et augmente donc le ratio proBDNF/mBDNF, ce qui entraîne une diminution du nombre de boutons périsonomatiques et d'embranchements formés par les interneurons PV<sup>+</sup> en culture organotypique alors que l'ajout de tPA exogène résulte en une augmentation du clivage de proBDNF en mBDNF et favorise l'arborisation et la formation de boutons présynaptiques PV<sup>+</sup>. Enfin, la signalisation proBDNF/*p75<sup>NTR</sup>* est capable de déstabiliser l'arborescence axonale mature des circuits PV<sup>+</sup> : l'ajout de proBDNF exogène mutant, insensible au clivage, à des cultures organotypiques où les circuits PV<sup>+</sup> ont atteint leur maturité, engendre une diminution drastique du nombre de boutons et d'embranchement des interneurons PV<sup>+</sup>.

*In vivo*, dans le même sens, la souris conditionnelle mutante *Nkx2.1\_p75<sup>NTR</sup> lox/lox* montre une augmentation des synapses périsonomatiques marquées PV-Geph dans le cortex visuel à P14. Et la signalisation proBDNF/*p75<sup>NTR</sup>* n'agit pas que sur la connectivité efférente des circuits PV<sup>+</sup>. Elle réduit l'agglomération des PNNs autour des corps cellulaires PV<sup>+</sup>. En effet, la souris conditionnelle mutante pour *p75<sup>NTR</sup>* montre une augmentation significative du nombre de cellules PV<sup>+</sup> dont le corps cellulaire est entouré de PNN dans le cortex visuel à P18. Tous ces résultats ont permis de conclure que la signalisation via proBDNF/*p75<sup>NTR</sup>* régule la temporalité de la maturation et de la connectivité des interneurons PV<sup>+</sup> au cours du développement postnatal.

Restait à savoir si la signalisation via proBDNF/p75<sup>NTR</sup> peut être recrutée, *in vivo*, chez l'adulte, afin de favoriser la plasticité corticale lors d'une intervention comportementale. Pour tester cette hypothèse, proBDNF exogène mutant, insensible au clivage, a été infusé dans le cortex visuel de souris adulte (P100) durant 5 jours. En comparaison au cortex contra-latéral, sans infusion, la signalisation proBDNF/p75<sup>NTR</sup> a entraîné une diminution du nombre de boutons périsonmatiques PV<sup>+</sup> de même qu'une diminution du nombre de corps cellulaires PV<sup>+</sup> entourés de PNNs. Enfin, au niveau fonctionnel, il a été démontré que l'infusion de proBDNF, accompagnée d'une privation monoculaire de 3 jours chez l'adulte, mène à un tournant de la sensibilité des neurones du cortex binoculaire vers l'œil ouvert, alors que ce changement est inobservable chez les souris conditionnelles *PV\_Cre;p75<sup>NTR</sup> lox/lox*. Cette seconde partie de l'étude a permis de conclure que la signalisation via proBDNF/p75<sup>NTR</sup> est capable de déstabiliser la connectivité efférente des circuits PV<sup>+</sup> du cortex visuel adulte et, de ce fait, favoriser la plasticité cérébrale chez l'adulte.

En deuxième partie, au chapitre 3, nous avons investigué les mécanismes épigénétiques qui pourraient réguler la maturation des circuits PV<sup>+</sup> au cours du développement postnatal. Pour ce faire, nous avons inactivé *Hdac2* spécifiquement au niveau des interneurones PV<sup>+</sup> au moyen de la souris *PV\_Cre*. Les souris conditionnelles mutantes ont montré une augmentation de la maintenance de la mémoire d'extinction, témoignant d'une augmentation de la plasticité cérébrale adulte. En effet, nous avons pris la peine de valider ce phénotype avec les souris contrôles porteuses de l'allèle *PV\_Cre* pour éviter des effets confondants possibles dû à l'insertion

de la séquence *Cre* dans le locus *Pvalb*. De plus, les *PV\_Cre;Hdac2<sup>lox/lox</sup>* n'oublient pas spontanément la mémoire de la peur puisque la diminution du comportement de peur est dépendante du protocole d'extinction. Ensuite, nous avons observé une diminution de l'agglomération des PNNs ainsi que de la connectivité efférente des circuits PV<sup>+</sup> dans les régions régulant la mémoire de peur, c'est-à-dire l'amygdale et le cortex préfrontal, chez les animaux naïfs. Or, de façon intéressante, nous avons aussi montré que le protocole d'extinction entraîne une augmentation du remodelage des synapses pérismetriques PV<sup>+</sup>, et ce spécifiquement chez les souris conditionnelles mutantes, renforçant l'hypothèse selon laquelle la puissance d'inhibition par les circuits PV<sup>+</sup> puisse être critique pour la rétention de la mémoire d'extinction (73, 75). Quant à l'expression des PNNs, nous présentons ici, à notre connaissance pour la première fois, que la régulation de l'expression des composantes des PNNs peut être différentielle selon les régions corticales. Afin d'identifier les composantes des PNNs synthétisées par les interneurons PV<sup>+</sup> du cortex préfrontal, nous avons procédé à du séquençage d'ARNm de cellules uniques (*Drop-seq*) pour trouver qu'*Acan*, codant pour la lectine aggrécane, est principalement exprimée par les cellules PV<sup>+</sup> dans le cortex préfrontal adolescent, ce qui a été confirmé à l'aide d'hybridation *in situ* de type RNAscope. La régulation de l'expression de *Acan* par *Hdac2* a été investiguée chez le modèle cKO, de même que lors de la suppression virale de *Hdac2* dans le cortex préfrontal des cKOs.

Afin de réfuter l'hypothèse selon laquelle la formation de la mémoire de peur est différentiellement affectée chez les *PV\_Cre;Hdac2<sup>lox/lox</sup>*, ce qui la rendrait plus labile, plus prompt à être modifiée lors du protocole d'extinction de la peur, nous avons testé les effets d'une seule injection systémique d'un nouvel inhibiteur spécifique pour *Hdac2*

(312), et ce seulement après la formation de la mémoire de peur, c'est-à-dire 6h avant le début de la procédure d'extinction. Or, l'inhibition aiguë de Hdac2 durant l'extinction de la peur est suffisante pour augmenter la plasticité cérébrale et maintenir la mémoire d'extinction dans le temps, chez l'adulte. Cette augmentation de la rétention de la mémoire d'extinction est accompagnée d'une diminution de l'expression de *Acan*/aggrécane au niveau du cortex préfrontal durant la phase d'extinction. Enfin, par souci de rigueur scientifique, nous avons voulu écarter la possibilité que l'inhibiteur agisse sur Hdac2 présent dans d'autres types cellulaires, ou sur son homologue Hdac1. Pour cela, nous avons testé la rétention de la mémoire d'extinction chez des cKO injectées avec l'inhibiteur, pour ne trouver aucun effet additionnel. Finalement, en utilisant à la fois le modèle de délétion conditionnelle de Hdac2 et celui de l'inhibition aiguë de Hdac2 juste avant le protocole d'extinction, nous avons trouvé que suite à la procédure d'extinction, le nombre d'ARNm codant pour Aggrécane étant maintenant semblable au souris sauvage dans les cellules PV<sup>+</sup> du cortex préfrontal. Ceci, en plus d'un nombre équivalent de boutons périsonatiques PV<sup>+</sup> accompagnés d'une densité postsynaptique Gephyrin nous a amené à poser l'hypothèse selon laquelle l'absence ou l'inhibition de Hdac2 permet un remodelage des synapses périsonatiques PV<sup>+</sup> en plus de favoriser l'agglomération de PNNs porteurs de la protéine Aggrécane, ce qui pourrait aider à maintenir la mémoire d'extinction dans le temps et diminuer la réponse de peur lors du test de récupération.

En somme, ces deux études argumentent en faveur de la possibilité de manipuler les circuits PV<sup>+</sup> corticaux pour favoriser la plasticité cérébrale. Cette modulation, en harmonie avec un traitement comportemental adéquat (la privation monoculaire, la

thérapie d'exposition, la réhabilitation ou le traitement des dépendances en exemples), pourrait augmenter les capacités d'adaptation et d'apprentissage du système nerveux central adulte en augmentant ses capacités de plasticité structurale, typiques de la plasticité juvénile.

## **4.2 Discussion et perspectives**

Les hypothèses et questionnements avancés dans cette étude permettent de concevoir des moyens de manipuler la plasticité du système nerveux central adulte afin d'en favoriser les capacités d'apprentissage et d'adaptation. Toutefois, les conceptions et techniques expérimentales utilisées possèdent leurs limites, qui seront discutées ici de même que les perspectives envisagées.

### **4.2.1 L'expression de p75<sup>NTR</sup> chez les interneurones PV<sup>+</sup>**

Démontrer l'expression du récepteur p75<sup>NTR</sup> chez les interneurones a représenté un défi de taille, qui a été résolu par l'utilisation de deux technologies de pointe. Toutefois, il demeure des questions en suspens. On pourrait se demander ce qui différencie la privation monoculaire au cours de la période critique de plasticité versus chez l'adulte. Est-ce que la privation monoculaire au cours de la période critique entraîne une augmentation de l'expression de p75<sup>NTR</sup> chez les interneurones PV<sup>+</sup>, ce qui les rendrait plus sensibles à une signalisation par de faibles concentrations de proBDNF et pourrait alors faciliter le tournant vers la stimulation visuelle provenant de l'œil ipsilatéral ? Ou sinon, est-ce que c'est la présence de proBDNF qui diffère ? Peut-être que le taux d'expression de *Bdnf* est plus important au cours de la période critique de plasticité et

que la privation monoculaire entraîne une diminution du taux de clivage, augmentant ainsi le ratio proBDNF/mBDNF et de cette façon la signalisation proBDNF/p75<sup>NTR</sup> est plus efficace pendant la période critique de plasticité que chez l'adulte. Investiguer les niveaux d'expression de p75<sup>NTR</sup> avant/pendant/après la privation monoculaire, qu'elle soit faite pendant la période critique de plasticité ou chez l'adulte permettrait d'avancer sur ces questions.

#### **4.2.2 Le polymorphisme Val66Met de *BDNF***

Les personnes porteuses d'un polymorphisme d'un seul nucléotide (SNP) dans le gène codant pour BDNF (Val66Met; rs6265) démontre une altération de l'apprentissage de l'extinction de la peur (313), une diminution de réponse suite à la thérapie d'exposition ainsi qu'un risque rehaussé de développer un désordre relié à la mémoire de la peur, tel qu'un trouble d'anxiété ou un syndrome de stress post-traumatique (314, 315). Ce polymorphisme se trouve dans la région codante pour la section du prodomaine, réduisant alors l'interaction avec sortiline, ce qui diminue la circulation intracellulaire ainsi que la sécrétion activité-dépendante de mBDNF (316-318). Les défauts au niveau de l'extinction de la peur ont donc d'abord été attribués à une diminution de la signalisation via mBDNF/TrkB. Toutefois, des travaux récents ont montré que le prodomaine clivé de BDNF peut lui aussi être sécrété d'une façon dépendante de l'activité et agir en tant que ligand par lui-même (319). De plus, le polymorphisme Met entraîne un changement conformationnel du prodomaine, augmentant son affinité pour SorCS2 et entraînant la rétraction du cône de croissance en présence de p75<sup>NTR</sup> (319). Enfin, l'infusion du prodomaine contenant le polymorphisme Met induit une réduction

des épines dendritiques des neurones hippocampiques par son action sur les régulateurs de l'actine (320). Or, étant donné l'importance de la signalisation via p75<sup>NTR</sup> sur le développement postnatal des interneurones PV<sup>+</sup>, comme décrit au chapitre 2, il serait important d'investiguer les propriétés fonctionnelles du prodomaine en lui-même, de même que l'effet du polymorphisme sur les interneurones PV<sup>+</sup>. D'abord, il faudrait vérifier l'expression de SorCS2 par les interneurones PV<sup>+</sup> au cours de leur développement, et chez l'adulte, puisqu'il semble que le prodomaine ne peut directement lier p75<sup>NTR</sup> (319). Ensuite, on pourrait vérifier l'effet de l'infusion de proBDNF, ou du prodomaine seul, muté sur le développement et la maturation de l'arborescence axonale et des synapses périsonotiques des interneurones PV<sup>+</sup> en culture organotypique, puis *in vivo*, tel que montré au chapitre 2. Enfin, il serait possible d'investiguer la part du phénotype de réduction de l'extinction de la peur engendrée par le polymorphisme qui est causée par une altération des circuits PV<sup>+</sup> soit en infusant *in vivo* le proBDNF et/ou le prodomaine mutés au niveau du cortex préfrontal ou de l'amygdale chez les souris conditionnelles mutantes pour p75<sup>NTR</sup> chez les interneurones PV<sup>+</sup>, ou encore en croisant les souris *knock-in BDNF<sup>Met</sup>* avec les *PV\_Cre;p75<sup>NTR</sup> lox/lox*. Nous nous attendrions à ce que la perte d'expression de p75<sup>NTR</sup> chez les interneurones PV<sup>+</sup> atténue les défauts d'apprentissage de l'extinction de la peur chez les souris porteuses du polymorphisme.

### **4.2.3 La signalisation intracellulaire en aval de p75<sup>NTR</sup> dans les interneurones PV<sup>+</sup>**

Que ce soit *in vitro*, en culture organotypique, ou *in vivo*, au niveau du cortex visuel, les travaux du chapitre 2 ont montré que la signalisation via proBDNF/p75<sup>NTR</sup> mène à l'élagage des boutons périsonmatiques PV<sup>+</sup> et au contrôle de l'innervation axonale et du territoire synaptique des cellules PV<sup>+</sup> au cours du développement postnatal. Or, la signalisation intracellulaire en aval de l'activation du récepteur dans les boutons présynaptiques PV<sup>+</sup> demeure nébuleuse. Étant données les voies signalétiques connues, nous pouvons envisager que la liaison de proBDNF sur p75<sup>NTR</sup> entraîne une activation de RhoA (321, 322) et/ou une inactivation de la signalisation de Rac (322, 323). Ces voies mènent à une déstabilisation des filaments d'actine de même qu'à l'effondrement de la croissance des neurites. Ceci pourrait donc expliquer l'inhibition de la formation des territoires d'innervation des interneurones PV<sup>+</sup> par l'effondrement des cônes de croissance au cours du développement. De plus, il a été suggéré que le récepteur p75<sup>NRT</sup> agisse conjointement pour amplifier la réponse de certains corécepteurs. Il reste donc à investiguer quels sont ces acteurs inhibiteurs du cône de croissance. Des candidats potentiels sont les récepteurs pour Nogo (257, 324), les éphrines et les sémaphorines (257, 321, 324, 325). Il serait donc intéressant de poursuivre et de détailler les voies signalétiques moléculaires qui agissent localement sur la dynamique du cytosquelette et sur le raffinement de l'arborisation synaptique des interneurones PV<sup>+</sup>. Il est donc concevable de poursuivre en investiguant les effets de ces voies signalétiques en imageant le réarrangement des filaments d'actine des axones de interneurones PV<sup>+</sup> dans des cultures organotypiques vivantes afin de mieux



comprendre les mécanismes structuraux de croissance et de maturation des synapses PV<sup>+</sup> au cours du développement. Il faudrait aussi savoir si ce sont les mêmes voies signalétiques intracellulaires qui sont recrutées par la signalisation p75<sup>NTR</sup> en cours de développement des interneurons PV<sup>+</sup> que chez l'adulte.

#### **4.2.4 La régulation de l'expression génique en aval de la signalisation via p75<sup>NTR</sup>**

Une autre hypothèse à envisager est que la signalisation via p75<sup>NTR</sup> mène à la régulation différentielle de certains gènes. Il est possible qu'en aval de l'activation du récepteur se trouve une modulation d'expression des gènes importants pour l'établissement des structures postsynaptiques ou encore sur le profil d'excitabilité des interneurons PV<sup>+</sup>, ce qui en retour influence la croissance de l'arborescence axonale (163). Les résultats obtenus quant à l'agglomération des PNNs abondent en ce sens : l'absence de p75<sup>NTR</sup> au cours du développement précoce des interneurons PV<sup>+</sup> (*Nkx\_Cre*) entraînent une augmentation de PNNs, tandis que la stimulation de la signalisation par l'infusion de proBDNF mutant, insensible au clivage, mène à une diminution des PNNs. Ceci suggère un modèle où p75<sup>NTR</sup> aurait un impact sur l'expression de molécules importantes pour la formation des PNNs et exprimées de façon autonome à la cellule par les interneurons PV<sup>+</sup>. Comme les données obtenues par séquençage d'ARNm ont montré que les interneurons PV<sup>+</sup> du cortex préfrontal expriment certaines de ces molécules (*Acan*, *Brevican*, *Neurocan*, *Versican*), il serait important de s'intéresser au patron d'expression moléculaire, par hybridation *in situ* évidemment, des différentes composantes des PNNs chez les animaux mutants pour

p75<sup>NTR</sup>. Peut-être qu'au niveau basal, les différences seront insignifiantes, mais il faudrait penser à stimuler le système pour en observer les effets : lors d'une privation monoculaire (en période critique versus chez l'adulte) ou lors d'une stimulation visuelle suite à l'élevage dans le noir. Est-ce que les animaux déficients en p75<sup>NTR</sup> expriment de façon différente les composantes des PNNs ? Ou encore, peut-être n'est-il aucune différence d'expression des gènes des composantes des PNNs, mais seulement une agglomération différentielle en raison de la perte de p75<sup>NTR</sup> ? Pour répondre à cette question, il vaudrait mieux alors procéder au moyen d'immunofluorescences pour caractériser la présence de ces différentes composantes dans les PNNs qui entourent les interneurons PV<sup>+</sup>. Comme les PNNs ont un rôle de stabilisation envers les connexions afférentes vers les neurones qu'ils entourent (223, 326), ceci serait par conséquent un moyen efficace d'expliquer en quoi une variation d'expression ou de stimulation de p75<sup>NTR</sup> pourraient mener à un changement d'excitabilité des interneurons PV<sup>+</sup> et ainsi varier la complexité axonale et l'efficacité de leurs connexions efférentes.

#### **4.2.5 Les synapses périsonmatiques PV<sup>+</sup>**

Autant au chapitre 2 qu'au chapitre 3, nous avons investigué le nombre de synapses putatives périsonmatiques *in vivo* au moyen de marquage en immunofluorescence contre la protéine PV ainsi que contre la protéine caractéristique des densités post-synaptique des synapses inhibitrices, géphyrine. Il a clairement été démontré que les deux modèles expérimentaux présentés, l'infusion de proBDNF mutant insensible au clivage ou l'inactivation de *Hdac2*, entraînent une diminution du nombre de synapses

périsomatiques PV<sup>+</sup>. Toutefois, ces conditions expérimentales ont des limites et ne questionnent pas les propriétés fonctionnelles de ces synapses PV<sup>+</sup>, ni les possibles conséquences et/ou effets compensatoires par les synapses formées par les autres types cellulaires des circuits corticaux. Des études en électrophysiologie patch-clamp devraient être envisagées pour évaluer les fréquences des décharges des interneurons PV<sup>+</sup> sur les cellules excitatrices de même que leur amplitude en enregistrement spontanés et évoqués, autant chez les souris conditionnelles mutantes pour *Hdac2* que pour *p75<sup>NTR</sup>*. De même, il serait intéressant d'approfondir les propriétés des synapses afférentes aux interneurons PV<sup>+</sup> dans nos deux modèles. En effet, comme on observe des effets sur les PNNs, nous pensons qu'il est important d'investiguer les fréquences ainsi que l'amplitude des courants excitateurs sur les interneurons PV<sup>+</sup>, étant donné le rôle de la protéine brévican, autre composante des PNNs, sur la stabilisation des afférences excitatrices sur les corps cellulaires des interneurons PV<sup>+</sup> qui en sont porteurs (223).

#### **4.2.6 La S-nitrosylation de Hdac2**

L'étude du rôle de Hdac2 dans l'extinction des souvenirs de peur contextuelle a proposé un modèle où Hdac2 subit une S-nitrosylation suite au rappel des souvenirs de peur durant la procédure d'extinction dans les neurones excitateurs de l'hippocampe (327). La S-nitrosylation de Hdac2 mène alors à l'expression des gènes de neuroplasticité en raison d'une diminution de son affinité pour la chromatine et l'acétylation qui en résulte. Ainsi, l'utilisation d'une version mutante de Hdac2 incapable d'être S-nitrosylée (328), ou l'injection d'un inhibiteur de la NO synthase (L-NAME), avant une procédure

d'extinction massive n'empêche pas l'atténuation du comportement de peur durant l'extinction *per se*, mais aura un impact sur la rétention de celle-ci, puisqu'on observe la résurgence du comportement de peur lors des tests de récupération de la peur (327). Est-ce que les fonctions de Hdac2 dans les interneurons PV<sup>+</sup> sont régulées par des modifications post-traductionnelles telle que la S-nitrosylation ? Il serait informatif d'exprimer exclusivement dans les interneurons PV<sup>+</sup> du cortex préfrontal et/ou de l'amygdale au moyen d'un virus Cre-dépendant le Hdac2 mutant incapable d'être nitrosylé chez les souris *PV\_Cre;Hdac2<sup>lox/lox</sup>* et d'évaluer alors le niveau d'expression de *Acan* et l'impact sur l'assemblage des PNNs et/ou sur les synapses périsonomatiques PV<sup>+</sup>. Ce modèle moléculaire de régulation post-traductionnelle de Hdac2 est en concordance avec le modèle proposé au chapitre 3, où l'inhibition aiguë de Hdac2 avant la procédure d'extinction amorce l'état de la chromatine pour être dynamiquement exprimé lors d'une intervention comportementale, telle que l'extinction.

#### **4.2.7 p75<sup>NTR</sup> et Hdac2 : deux voies distinctes ou imbriquées ?**

La stimulation de la voie proBDNF/p75<sup>NTR</sup> et l'inhibition de Hdac2 entraînent le même phénotype cellulaire des interneurons PV<sup>+</sup> (connectivité efférente, agglomération des PNNs) et comportemental (augmentation de la plasticité cérébrale adulte). De ce fait, l'inactivation génétique de *p75<sup>NTR</sup>* et de *Hdac2*, indépendamment, entraînent des phénotypes opposés. Alors que le mutant conditionnel pour *Hdac2* montre une diminution du nombre de synapses PV<sup>+</sup> périsonomatiques et une diminution de l'agglomération des PNNs, le mutant conditionnel de *p75<sup>NTR</sup>* montre une augmentation des PNNs ainsi qu'une augmentation du nombre de synapses PV<sup>+</sup> périsonomatiques. De

plus, certaines données générées au laboratoire et encore non-publiées ont montré une absence d'extinction du comportement de peur chez les souris mutantes pour  $p75^{NTR}$  ( $PV\_Cre;p75^{NTR lox/lox}$ ) qui conservent donc un haut niveau de comportement de peur lors du test de récupération de la peur. Ainsi, on peut poser l'hypothèse selon laquelle ces deux voies moléculaires sont imbriquées l'une dans l'autre [Figure 2, p. 253].

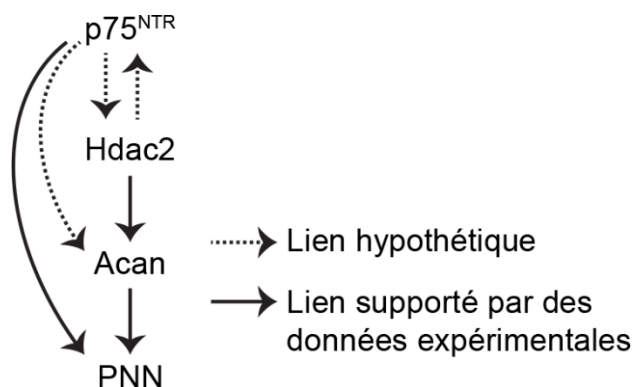


Figure 2. – **Relations entre le récepteur  $p75^{NTR}$  et Hdac2.**

Nous posons l'hypothèse selon laquelle les deux voies, soit celle de la signalisation via  $p75^{NTR}$  et celle de la régulation de l'expression génique par Hdac2 puisse être imbriquées.

Il faudrait d'abord aborder ce problème en évaluant si la mutation de l'un entraîne un changement dans l'expression de l'autre (évaluer l'expression de  $p75^{NTR}$  chez la souris  $PV\_Cre;Hdac2^{lox/lox}$  et *vice versa*). Toutefois, même dans le cas où les patrons d'expression demeurent inchangés, il est possible que la mutation de l'un entraîne des changements au niveau fonctionnel dans la voie moléculaire de l'autre, par exemple en modifiant le patron d'expression de partenaires signalétiques requis. Ces observations nous apportent donc à l'importance d'analyser les interactions génétiques entre ces mutations. Pour ce faire, les animaux doubles conditionnels mutants devraient être

généérés. Nous privilégierions une hypothèse en particulier : celle de l'épistasie dominante de *Hdac2*, où *Hdac2* réprimerait l'expression du récepteur *p75<sup>NTR</sup>*. D'abord, il faut mentionner que comme autant les hétérozygotes pour *Hdac2* que ceux pour *p75<sup>NTR</sup>* ne présentent aucun phénotype particulier en ce qui nous concerne, nous nous attendrions à ce que le double hétérozygote n'en présente pas non plus, surtout que les deux mutants montrent indépendamment des phénotypes opposés, nous ne nous attendons pas à une aggravation du phénotype. Ce qui serait utile de comparer serait donc la gradation des phénotypes potentiels. Que ce soit au niveau comportemental, en mesurant par exemple la rétention de l'extinction de la peur avec le test de récupération, ou au niveau moléculaire et cellulaire, en observant par exemple le niveau d'expression de *Acan* et la formation des PNNs autour des cellules PV<sup>+</sup>, il serait important de comparer les animaux contrôles, les mutants pour *Hdac2* ainsi que les animaux sauveteurs *PV\_Cre;Hdac2<sup>lox/lox</sup>;p75<sup>lox/+</sup>* et *PV\_Cre;Hdac2<sup>lox/lox</sup>;p75<sup>lox/lox</sup>*. Nous posons comme hypothèse que la perte allélique d'expression de *p75<sup>NTR</sup>* vienne compenser la perte d'expression de *Hdac2* et que le phénotype comportemental, cellulaire et/ou moléculaire se rapproche de celui des animaux de type sauvage.

#### **4.2.8 L'extinction de la mémoire de peur versus la diminution de l'expression de la peur**

Au chapitre 3, nous avons montré que l'inhibition aiguë de *Hdac2*, avant la procédure d'extinction de la peur, engendre une diminution significative du comportement de peur lors du test de récupération de la peur, 7 jours plus tard. Nous interprétons ce résultat comme une augmentation de la rétention de la mémoire d'extinction par un ré-encodage

efficace de la mémoire de peur au cours de la procédure d'extinction en raison d'une augmentation de la flexibilité cognitive chez nos sujets traités. Il serait important de questionner, d'abord, la durée de cette rétention en évaluant le maintien à long terme de cette mémoire d'extinction au moyen d'un test de récupération de la peur 30 jours après la procédure d'extinction. Également, comme le cortex prélimbique, structure dorsale du cortex préfrontal, est impliqué dans l'expression de la peur au moyen de connexions neuronales directes vers le centre de régulation du comportement de peur, l'amygdale (329), il serait important d'envisager l'hypothèse selon laquelle les souris traitées de témoignent pas d'une augmentation du maintien de la mémoire d'extinction, mais plutôt d'une diminution de l'expression de la peur. En effet, il est possible qu'en augmentant la puissance inhibitrice des circuits PV<sup>+</sup> du cortex préfrontal, on se trouve en fait à inhiber l'activité des neurones pyramidaux du cortex prélimbique et de ce fait, à réduire l'expression du comportement de peur. Pour ce faire, le test de réacquisition de la peur, où 7 jours après l'extinction une série de SC-SI sont de nouveau présentés (76), devrait être utilisé. En effet, des souris qui n'ont pas efficacement intégrée la mémoire d'extinction réacquièrent le comportement plus rapidement que des souris naïves. Ainsi, en comparant le taux de réacquisition du comportement de peur entre des souris sauvages naïves et des souris traitées avec l'inhibiteur BRD6688 avant l'extinction, nous pourrions clairement démontrer si les effets de BRD6688 sont bénéfiques pour la rétention de la mémoire d'extinction. Toutefois, comme nous n'observons aucune différence quant au comportement de peur au cours de la procédure d'extinction suite à l'injection de l'inhibiteur, que ce soit au début de la procédure le jour de l'injection ou à la fin le jour suivant, il est peu plausible que BRD6688 est un effet direct sur l'expression de la peur en elle-même.

#### **4.2.9 L'extinction de la mémoire de peur et le sexe**

Nous avons étudié la mémoire d'extinction de la peur seulement chez les animaux mâles. En effet, il est décrit dans la littérature que les animaux femelles ne réagissent pas de la même façon aux divers stimuli employés durant le conditionnement de la peur. Les études préliminaires du projet présenté en chapitre 3 ont effectivement utilisé des animaux des deux sexes, se référant aux travaux sur les PNNs pour l'établissement du protocole expérimental de conditionnement et d'extinction de la peur (20). Or, il s'est avéré que nous pouvions effectivement reproduire les données publiés avec nos animaux mâles mais les femelles ne montraient toutefois aucune extinction de la peur. Nous avons donc poursuivi nos travaux en excluant les femelles puisque le protocole ne leur était pas adapté. Toutefois, les études montrent que la prévalence du syndrome de stress post-traumatique est deux fois plus élevée chez les femmes que les hommes (330, 331). Il est donc primordial que les mécanismes biologiques qui supportent cette problématique soient approfondis chez les animaux femelles. Des études importantes ont touché à la complexité du problème : certains ont montré que les femelles présentaient un déficit dans la rétention de la mémoire d'extinction en comparaison des mâles et ceci en utilisant seulement 2 associations SC-SI. Ainsi, nous proposons de modifier le protocole de conditionnement et d'extinction de la peur utilisé dans cette thèse, que ce soit en diminuant la force du choc électrique, en diminuant le nombre d'association SC-SI ou en augmentant le nombre de présentations du SC lors d'une session d'extinction ou d'augmenter le nombre de session d'extinction, afin de pouvoir étudier la rétention de la mémoire d'extinction chez ce groupe. Aussi, il ne faut pas



oublier qu'en étudiant les femelles, il faut tenir en compte du cycle menstruel, chose que nous n'avons pas fait lors des études préliminaires mentionnées ci-haut. En effet, des études ont montré que la mémoire de peur, ainsi que le comportement suite à l'extinction de la peur, varient selon que les candidates soient en phase d'*oestrus* ou de *diestrus*, et varie chez les femelles vierges ou reproductrices (332, 333). En somme, les principes régulateurs de la mémoire et du comportement de peur et d'extinction de la peur sont différents selon le sexe et on ne peut se permettre de poursuivre en ignorant les femelles des études. Puisque les troubles d'anxiété et le syndrome de stress post-traumatique sont plus prévalents chez les femmes, il est important d'approfondir nos connaissances sur les mécanismes moléculaires et cellulaires qui sous-tendent la mémoire de la peur chez ce groupe afin d'identifier des voies thérapeutiques qui leur sont propres.

#### **4.2.10 Les modèles du syndrome de stress post-traumatique**

Au chapitre 3, nous avons identifié l'usage d'un nouvel inhibiteur pour Hdac2, BRD6688, qui est capable de diminuer l'expression de *Acan*, l'agglomération de agrécane autour du corps cellulaire des interneurons PV<sup>+</sup> et d'augmenter la rétention de la mémoire d'extinction chez l'adulte, témoignant d'une augmentation de la plasticité cérébrale. Afin d'aller plus loin, il serait intéressant de tester ce moyen de diminuer la réponse de peur suite à l'extinction chez des modèles établis de syndrome de stress post-traumatique (PTSD). Un modèle génétique de PTSD est la lignée de souris 129S1/SvImJ. Cette lignée est caractérisée par une incapacité à éteindre les souvenirs de peur (334). De façon intéressante, ce modèle permet d'étudier les mécanismes moléculaires et les

prédispositions génétiques. Un modèle environnemental, voulant reproduire les expériences vécues par les soldats en temps de guerre, allie la présentation chronique d'éléments stressants, tels que la restriction de mouvement, la nage forcée ou l'exposition au prédateur, à la présentation aiguë d'un événement traumatique, tel que le choc électrique. On se retrouve alors en présence d'un modèle de PTSD à traiter et il serait alors intéressant d'investiguer l'action de BRD6688 autant pour traiter les symptômes de PTSD que pour prévenir leur apparition. Enfin, il serait intéressant de tester les bienfaits de BRD6688 sur un modèle de dépendance à l'alcool. En effet, un des symptômes de l'usage incontrôlé de l'alcool est l'anxiété. Or, des études ont montré que l'alcool pourrait augmenter les risques de développer un trouble d'anxiété suite à un trauma en perturbant l'extinction de la peur par le cortex préfrontal chez la souris (335) et modifiait l'apprentissage de la peur chez l'humain dépendant en dérégulant l'activité de l'amygdale (336). Ainsi, il serait intéressant de valider l'usage de BRD6688 pour augmenter l'apprentissage de l'extinction de la peur traumatique chez des sujets animaux rendus alcooliques dans un premier temps, puis d'aller plus loin en tentant de diminuer, peut-être, les niveaux d'anxiété générés lors des états de manque, facteur aggravant menant aux rechutes.

## Chapitre 5 – Conclusion

En somme, cette thèse a voulu s'intéresser au développement et à la régulation des circuits GABAergiques exprimant la PV dans l'optique d'en ajuster temporairement les fonctions afin de favoriser la plasticité cérébrale chez l'adulte. Deux voies particulières, soit l'activation de la signalisation via le récepteur p75<sup>NTR</sup> ou l'inhibition de la déacétylase Hdac2, sont capables à la fois de diminuer l'agglomération des filets périneuronaux autour des corps cellulaires des interneurons PV<sup>+</sup>, de diminuer la connectivité efférente de ceux-ci et de favoriser la plasticité cérébrale durant une intervention comportementale : la privation monoculaire ou l'extinction de la mémoire de la peur. Approfondir nos connaissances sur les mécanismes régulant le développement des circuits inhibiteurs PV<sup>+</sup> est primordial afin de développer de meilleures stratégies d'intervention thérapeutiques pour les gens atteints de troubles neurodéveloppementaux, tels que l'autisme et les troubles cognitifs, de troubles de gestion de la mémoire émotionnelle tels que le PTSD ou l'anxiété, ou encore pour les gens en réhabilitation suite à un trauma ou un accident cérébro-vasculaire.



## Références bibliographiques

1. Malenka RC, Bear MF. LTP and LTD: an embarrassment of riches. *Neuron*. 2004;44(1):5-21.
2. Raymond CR. LTP forms 1, 2 and 3: different mechanisms for the "long" in long-term potentiation. *Trends Neurosci*. 2007;30(4):167-75.
3. Massey PV, Bashir ZI. Long-term depression: multiple forms and implications for brain function. *Trends Neurosci*. 2007;30(4):176-84.
4. Butz M, Worgotter F, van Ooyen A. Activity-dependent structural plasticity. *Brain Res Rev*. 2009;60(2):287-305.
5. Reh RK, Dias BG, Nelson CA, 3rd, Kaufer D, Werker JF, Kolb B, et al. Critical period regulation across multiple timescales. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2020;117(38):23242-51.
6. Hensch TK. Recovery in the blink of an eye. *Neuron*. 2005;48(2):166-8.
7. Barkat TR, Polley DB, Hensch TK. A critical period for auditory thalamocortical connectivity. *Nat Neurosci*. 2011;14(9):1189-94.
8. Wiesel TN, Hubel DH. Single-Cell Responses in Striate Cortex of Kittens Deprived of Vision in One Eye. *J Neurophysiol*. 1963;26:1003-17.
9. Belford GR, Killackey HP. The sensitive period in the development of the trigeminal system of the neonatal rat. *J Comp Neurol*. 1980;193(2):335-50.
10. Knudsen EI. Experience alters the spatial tuning of auditory units in the optic tectum during a sensitive period in the barn owl. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 1985;5(11):3094-109.

11. Doupe AJ, Kuhl PK. Birdsong and human speech: common themes and mechanisms. *Annu Rev Neurosci.* 1999;22:567-631.
12. Werker JF, Hensch TK. Critical periods in speech perception: new directions. *Annu Rev Psychol.* 2015;66:173-96.
13. Hensch TK. Critical period regulation. *Annu Rev Neurosci.* 2004;27:549-79.
14. LeBlanc JJ, Fagiolini M. Autism: a "critical period" disorder? *Neural Plast.* 2011;2011:921680.
15. Yao JK, Keshavan MS. Antioxidants, redox signaling, and pathophysiology in schizophrenia: an integrative view. *Antioxid Redox Signal.* 2011;15(7):2011-35.
16. Morishita H, Cabungcal JH, Chen Y, Do KQ, Hensch TK. Prolonged Period of Cortical Plasticity upon Redox Dysregulation in Fast-Spiking Interneurons. *Biol Psychiatry.* 2015;78(6):396-402.
17. Lendvai B, Stern EA, Chen B, Svoboda K. Experience-dependent plasticity of dendritic spines in the developing rat barrel cortex in vivo. *Nature.* 2000;404(6780):876-81.
18. Stern EA, Maravall M, Svoboda K. Rapid development and plasticity of layer 2/3 maps in rat barrel cortex in vivo. *Neuron.* 2001;31(2):305-15.
19. Gogolla N, Takesian AE, Feng G, Fagiolini M, Hensch TK. Sensory integration in mouse insular cortex reflects GABA circuit maturation. *Neuron.* 2014;83(4):894-905.
20. Gogolla N, Caroni P, Luthi A, Herry C. Perineuronal nets protect fear memories from erasure. *Science (New York, NY).* 2009;325(5945):1258-61.
21. Sugiyama S, Di Nardo AA, Aizawa S, Matsuo I, Volovitch M, Prochiantz A, et al. Experience-dependent transfer of Otx2 homeoprotein into the visual cortex activates postnatal plasticity. *Cell.* 2008;134(3):508-20.

22. Gu Y, Tran T, Murase S, Borrell A, Kirkwood A, Quinlan EM. Neuregulin-Dependent Regulation of Fast-Spiking Interneuron Excitability Controls the Timing of the Critical Period. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2016;36(40):10285-95.
23. Kalish BT, Barkat TR, Diel EE, Zhang EJ, Greenberg ME, Hensch TK. Single-nucleus RNA sequencing of mouse auditory cortex reveals critical period triggers and brakes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2020;117(21):11744-52.
24. Pattwell SS, Duhoux S, Hartley CA, Johnson DC, Jing D, Elliott MD, et al. Altered fear learning across development in both mouse and human. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012;109(40):16318-23.
25. Bicks LK, Yamamuro K, Flanigan ME, Kim JM, Kato D, Lucas EK, et al. Prefrontal parvalbumin interneurons require juvenile social experience to establish adult social behavior. *Nat Commun*. 2020;11(1):1003.
26. Mower GD. The effect of dark rearing on the time course of the critical period in cat visual cortex. *Brain Res Dev Brain Res*. 1991;58(2):151-8.
27. Morales B, Choi SY, Kirkwood A. Dark rearing alters the development of GABAergic transmission in visual cortex. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2002;22(18):8084-90.
28. Baroncelli L, Braschi C, Spolidoro M, Begenisic T, Sale A, Maffei L. Nurturing brain plasticity: impact of environmental enrichment. *Cell Death Differ*. 2010;17(7):1092-103.

29. Ball NJ, Mercado E, 3rd, Orduna I. Enriched Environments as a Potential Treatment for Developmental Disorders: A Critical Assessment. *Front Psychol.* 2019;10:466.
30. Kral A. Auditory critical periods: a review from system's perspective. *Neuroscience.* 2013;247:117-33.
31. Erzurumlu RS, Gaspar P. Development and critical period plasticity of the barrel cortex. *Eur J Neurosci.* 2012;35(10):1540-53.
32. Kim JH, Richardson R. A developmental dissociation of context and GABA effects on extinguished fear in rats. *Behav Neurosci.* 2007;121(1):131-9.
33. Kim JH, Richardson R. A developmental dissociation in reinstatement of an extinguished fear response in rats. *Neurobiol Learn Mem.* 2007;88(1):48-57.
34. Porac C, Coren S. The dominant eye. *Psychol Bull.* 1976;83(5):880-97.
35. Gordon JA, Stryker MP. Experience-dependent plasticity of binocular responses in the primary visual cortex of the mouse. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience.* 1996;16(10):3274-86.
36. Hensch TK. Critical period plasticity in local cortical circuits. *Nature Reviews Neuroscience.* 2005;6(11):877-88.
37. Hubel DH, Wiesel TN. Shape and arrangement of columns in cat's striate cortex. *J Physiol.* 1963;165:559-68.
38. Hubel DH, Wiesel TN. Receptive Fields of Cells in Striate Cortex of Very Young, Visually Inexperienced Kittens. *J Neurophysiol.* 1963;26:994-1002.
39. Hubel DH, Wiesel TN. Effects of Monocular Deprivation in Kittens. *Naunyn Schmiedebergs Arch Exp Pathol Pharmacol.* 1964;248:492-7.



40. Hubel DH, Wiesel TN. Receptive fields, binocular interaction and functional architecture in the cat's visual cortex. *J Physiol.* 1962;160:106-54.
41. Berardi N, Pizzorusso T, Maffei L. Critical periods during sensory development. *Curr Opin Neurobiol.* 2000;10(1):138-45.
42. Movshon JA. Reversal of the physiological effects of monocular deprivation in the kitten's visual cortex. *J Physiol.* 1976;261(1):125-74.
43. Movshon JA. Reversal of the behavioural effects of monocular deprivation in the kitten. *J Physiol.* 1976;261(1):175-87.
44. LeDoux JE. Emotion circuits in the brain. *Annu Rev Neurosci.* 2000;23:155-84.
45. LeDoux JE, Cicchetti P, Xagoraris A, Romanski LM. The lateral amygdaloid nucleus: sensory interface of the amygdala in fear conditioning. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience.* 1990;10(4):1062-9.
46. Phelps EA, LeDoux JE. Contributions of the amygdala to emotion processing: from animal models to human behavior. *Neuron.* 2005;48(2):175-87.
47. Maren S, Quirk GJ. Neuronal signalling of fear memory. *Nat Rev Neurosci.* 2004;5(11):844-52.
48. Myers KM, Davis M. Mechanisms of fear extinction. *Mol Psychiatry.* 2007;12(2):120-50.
49. Quirk GJ, Mueller D. Neural mechanisms of extinction learning and retrieval. *Neuropsychopharmacology.* 2008;33(1):56-72.
50. Meis S, Endres T, Lessmann V. Neurotrophin signalling in amygdala-dependent cued fear learning. *Cell Tissue Res.* 2020;382(1):161-72.
51. Graham BM, Milad MR. The study of fear extinction: implications for anxiety disorders. *Am J Psychiatry.* 2011;168(12):1255-65.

52. Pitman RK, Rasmusson AM, Koenen KC, Shin LM, Orr SP, Gilbertson MW, et al. Biological studies of post-traumatic stress disorder. *Nat Rev Neurosci.* 2012;13(11):769-87.
53. Craske MG, Stein MB, Eley TC, Milad MR, Holmes A, Rapee RM, et al. Anxiety disorders. *Nat Rev Dis Primers.* 2017;3:17024.
54. Knott GW, Quairiaux C, Genoud C, Welker E. Formation of dendritic spines with GABAergic synapses induced by whisker stimulation in adult mice. *Neuron.* 2002;34(2):265-73.
55. Pape HC, Pare D. Plastic synaptic networks of the amygdala for the acquisition, expression, and extinction of conditioned fear. *Physiological reviews.* 2010;90(2):419-63.
56. Sotres-Bayon F, Quirk GJ. Prefrontal control of fear: more than just extinction. *Curr Opin Neurobiol.* 2010;20(2):231-5.
57. Maren S, Phan KL, Liberzon I. The contextual brain: implications for fear conditioning, extinction and psychopathology. *Nat Rev Neurosci.* 2013;14(6):417-28.
58. Duvarci S, Pare D. Amygdala microcircuits controlling learned fear. *Neuron.* 2014;82(5):966-80.
59. Tovote P, Fadok JP, Luthi A. Neuronal circuits for fear and anxiety. *Nat Rev Neurosci.* 2015;16(6):317-31.
60. Quirk GJ, Armony JL, LeDoux JE. Fear conditioning enhances different temporal components of tone-evoked spike trains in auditory cortex and lateral amygdala. *Neuron.* 1997;19(3):613-24.

61. Repa JC, Muller J, Apergis J, Desrochers TM, Zhou Y, LeDoux JE. Two different lateral amygdala cell populations contribute to the initiation and storage of memory. *Nat Neurosci.* 2001;4(7):724-31.
62. Johansen JP, Hamanaka H, Monfils MH, Behnia R, Deisseroth K, Blair HT, et al. Optical activation of lateral amygdala pyramidal cells instructs associative fear learning. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2010;107(28):12692-7.
63. Rainnie DG, Mania I, Mascagni F, McDonald AJ. Physiological and morphological characterization of parvalbumin-containing interneurons of the rat basolateral amygdala. *J Comp Neurol.* 2006;498(1):142-61.
64. Bienvenu TC, Busti D, Magill PJ, Ferraguti F, Capogna M. Cell-type-specific recruitment of amygdala interneurons to hippocampal theta rhythm and noxious stimuli in vivo. *Neuron.* 2012;74(6):1059-74.
65. Muller JF, Mascagni F, McDonald AJ. Pyramidal cells of the rat basolateral amygdala: synaptology and innervation by parvalbumin-immunoreactive interneurons. *J Comp Neurol.* 2006;494(4):635-50.
66. Muller JF, Mascagni F, McDonald AJ. Postsynaptic targets of somatostatin-containing interneurons in the rat basolateral amygdala. *J Comp Neurol.* 2007;500(3):513-29.
67. Ozawa M, Davis P, Ni J, Maguire J, Papouin T, Reijmers L. Experience-dependent resonance in amygdalo-cortical circuits supports fear memory retrieval following extinction. *Nat Commun.* 2020;11(1):4358.

68. Senn V, Wolff SB, Herry C, Grenier F, Ehrlich I, Grundemann J, et al. Long-range connectivity defines behavioral specificity of amygdala neurons. *Neuron*. 2014;81(2):428-37.
69. Heldt SA, Ressler KJ. Training-induced changes in the expression of GABAA-associated genes in the amygdala after the acquisition and extinction of Pavlovian fear. *Eur J Neurosci*. 2007;26(12):3631-44.
70. Lin HC, Mao SC, Gean PW. Block of gamma-aminobutyric acid-A receptor insertion in the amygdala impairs extinction of conditioned fear. *Biol Psychiatry*. 2009;66(7):665-73.
71. Likhtik E, Popa D, Apergis-Schoute J, Fidacaro GA, Pare D. Amygdala intercalated neurons are required for expression of fear extinction. *Nature*. 2008;454(7204):642-5.
72. Pare D, Smith Y. The intercalated cell masses project to the central and medial nuclei of the amygdala in cats. *Neuroscience*. 1993;57(4):1077-90.
73. Trouche S, Sasaki JM, Tu T, Reijmers LG. Fear extinction causes target-specific remodeling of perisomatic inhibitory synapses. *Neuron*. 2013;80(4):1054-65.
74. Davis P, Zaki Y, Maguire J, Reijmers LG. Cellular and oscillatory substrates of fear extinction learning. *Nat Neurosci*. 2017;20(11):1624-33.
75. Courtin J, Chaudun F, Rozeske RR, Karalis N, Gonzalez-Campo C, Wurtz H, et al. Prefrontal parvalbumin interneurons shape neuronal activity to drive fear expression. *Nature*. 2014;505(7481):92-6.
76. Bhagat SM, Butler SS, Taylor JR, McEwen BS, Strittmatter SM. Erasure of fear memories is prevented by Nogo Receptor 1 in adulthood. *Mol Psychiatry*. 2016;21(9):1281-9.

77. Zhang X, Kim J, Tonegawa S. Amygdala Reward Neurons Form and Store Fear Extinction Memory. *Neuron*. 2020;105(6):1077-93 e7.
78. Bukalo O, Pinard CR, Silverstein S, Brehm C, Hartley ND, Whittle N, et al. Prefrontal inputs to the amygdala instruct fear extinction memory formation. *Sci Adv*. 2015;1(6).
79. Davis P, Reijmers LG. The dynamic nature of fear engrams in the basolateral amygdala. *Brain Res Bull*. 2018;141:44-9.
80. Kim JH, Richardson R. New findings on extinction of conditioned fear early in development: theoretical and clinical implications. *Biol Psychiatry*. 2010;67(4):297-303.
81. Golub Y, Mauch CP, Dahlhoff M, Wotjak CT. Consequences of extinction training on associative and non-associative fear in a mouse model of Posttraumatic Stress Disorder (PTSD). *Behav Brain Res*. 2009;205(2):544-9.
82. Nabel EM, Morishita H. Regulating critical period plasticity: insight from the visual system to fear circuitry for therapeutic interventions. *Front Psychiatry*. 2013;4:146.
83. Asada H, Kawamura Y, Maruyama K, Kume H, Ding RG, Kanbara N, et al. Cleft palate and decreased brain gamma-aminobutyric acid in mice lacking the 67-kDa isoform of glutamic acid decarboxylase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1997;94(12):6496-9.
84. Hensch TK, Fagiolini M, Mataga N, Stryker MP, Baekkeskov S, Kash SF. Local GABA circuit control of experience-dependent plasticity in developing visual cortex. *Science (New York, NY)*. 1998;282(5393):1504-8.
85. Soghomonian JJ, Martin DL. Two isoforms of glutamate decarboxylase: why? *Trends Pharmacol Sci*. 1998;19(12):500-5.

86. Patz S, Wirth MJ, Gorba T, Klostermann O, Wahle P. Neuronal activity and neurotrophic factors regulate GAD-65/67 mRNA and protein expression in organotypic cultures of rat visual cortex. *Eur J Neurosci*. 2003;18(1):1-12.
87. Pinal CS, Tobin AJ. Uniqueness and redundancy in GABA production. *Perspect Dev Neurobiol*. 1998;5(2-3):109-18.
88. Tian N, Petersen C, Kash S, Baekkeskov S, Copenhagen D, Nicoll R. The role of the synthetic enzyme GAD65 in the control of neuronal gamma-aminobutyric acid release. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1999;96(22):12911-6.
89. Fagiolini M, Hensch TK. Inhibitory threshold for critical-period activation in primary visual cortex. *Nature*. 2000;404(6774):183-6.
90. Katagiri H, Fagiolini M, Hensch TK. Optimization of somatic inhibition at critical period onset in mouse visual cortex. *Neuron*. 2007;53(6):805-12.
91. Huang ZJ, Kirkwood A, Pizzorusso T, Porciatti V, Morales B, Bear MF, et al. BDNF regulates the maturation of inhibition and the critical period of plasticity in mouse visual cortex. *Cell*. 1999;98(6):739-55.
92. Hanover JL, Huang ZJ, Tonegawa S, Stryker MP. Brain-derived neurotrophic factor overexpression induces precocious critical period in mouse visual cortex. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 1999;19(22):RC40.
93. Spatazza J, Lee HH, Di Nardo AA, Tibaldi L, Joliot A, Hensch TK, et al. Choroid-plexus-derived Otx2 homeoprotein constrains adult cortical plasticity. *Cell Rep*. 2013;3(6):1815-23.

94. Di Cristo G, Chattopadhyaya B, Kuhlman SJ, Fu Y, Belanger MC, Wu CZ, et al. Activity-dependent PSA expression regulates inhibitory maturation and onset of critical period plasticity. *Nat Neurosci.* 2007;10(12):1569-77.
95. Durand S, Patrizi A, Quast KB, Hachigian L, Pavlyuk R, Saxena A, et al. NMDA receptor regulation prevents regression of visual cortical function in the absence of *Mecp2*. *Neuron.* 2012;76(6):1078-90.
96. Krishnan K, Wang BS, Lu J, Wang L, Maffei A, Cang J, et al. MeCP2 regulates the timing of critical period plasticity that shapes functional connectivity in primary visual cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2015;112(34):E4782-91.
97. Castren E, Zafra F, Thoenen H, Lindholm D. Light regulates expression of brain-derived neurotrophic factor mRNA in rat visual cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1992;89(20):9444-8.
98. Chen L, Yang C, Mower GD. 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.* 2001;88(1-2):135-43.
99. Iwai Y, Fagiolini M, Obata K, Hensch TK. Rapid critical period induction by tonic inhibition in visual cortex. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience.* 2003;23(17):6695-702.
100. Fagiolini M, Katagiri H, Miyamoto H, Mori H, Grant SG, Mishina M, et al. Separable features of visual cortical plasticity revealed by N-methyl-D-aspartate receptor 2A signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2003;100(5):2854-9.

101. Gianfranceschi L, Siciliano R, Walls J, Morales B, Kirkwood A, Huang ZJ, et al. Visual cortex is rescued from the effects of dark rearing by overexpression of BDNF. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(21):12486-91.
102. Bartoletti A, Medini P, Berardi N, Maffei L. Environmental enrichment prevents effects of dark-rearing in the rat visual cortex. *Nat Neurosci*. 2004;7(3):215-6.
103. Carnahan J, Nawa H. Regulation of neuropeptide expression in the brain by neurotrophins. Potential role in vivo. *Mol Neurobiol*. 1995;10(2-3):135-49.
104. Sala R, Viegi A, Rossi FM, Pizzorusso T, Bonanno G, Raiteri M, et al. Nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor increase neurotransmitter release in the rat visual cortex. *Eur J Neurosci*. 1998;10(6):2185-91.
105. Rutherford LC, Nelson SB, Turrigiano GG. BDNF has opposite effects on the quantal amplitude of pyramidal neuron and interneuron excitatory synapses. *Neuron*. 1998;21(3):521-30.
106. Morishita H, Hensch TK. Critical period revisited: impact on vision. *Curr Opin Neurobiol*. 2008;18(1):101-7.
107. Bavelier D, Levi DM, Li RW, Dan Y, Hensch TK. Removing brakes on adult brain plasticity: from molecular to behavioral interventions. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2010;30(45):14964-71.
108. Pizzorusso T, Medini P, Berardi N, Chierzi S, Fawcett JW, Maffei L. Reactivation of ocular dominance plasticity in the adult visual cortex. *Science (New York, NY)*. 2002;298(5596):1248-51.



109. McGee AW, Yang Y, Fischer QS, Daw NW, Strittmatter SM. Experience-driven plasticity of visual cortex limited by myelin and Nogo receptor. *Science (New York, NY)*. 2005;309(5744):2222-6.
110. Syken J, Grandpre T, Kanold PO, Shatz CJ. PirB restricts ocular-dominance plasticity in visual cortex. *Science (New York, NY)*. 2006;313(5794):1795-800.
111. Morishita H, Miwa JM, Heintz N, Hensch TK. Lynx1, a cholinergic brake, limits plasticity in adult visual cortex. *Science (New York, NY)*. 2010;330(6008):1238-40.
112. Baroncelli L, Scali M, Sansevero G, Olimpico F, Manno I, Costa M, et al. Experience Affects Critical Period Plasticity in the Visual Cortex through an Epigenetic Regulation of Histone Post-Translational Modifications. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2016;36(12):3430-40.
113. Putignano E, Lonetti G, Cancedda L, Ratto G, Costa M, Maffei L, et al. Developmental downregulation of histone posttranslational modifications regulates visual cortical plasticity. *Neuron*. 2007;53(5):747-59.
114. Silingardi D, Scali M, Belluomini G, Pizzorusso T. Epigenetic treatments of adult rats promote recovery from visual acuity deficits induced by long-term monocular deprivation. *Eur J Neurosci*. 2010;31(12):2185-92.
115. Hensch TK, Quinlan EM. Critical periods in amblyopia. *Vis Neurosci*. 2018;35:E014.
116. Huang ZJ. Toward a genetic dissection of cortical circuits in the mouse. *Neuron*. 2014;83(6):1284-302.
117. Hu H, Gan J, Jonas P. Interneurons. Fast-spiking, parvalbumin(+) GABAergic interneurons: from cellular design to microcircuit function. *Science (New York, NY)*. 2014;345(6196):1255-263.

118. Pouille F, Scanziani M. Enforcement of temporal fidelity in pyramidal cells by somatic feed-forward inhibition. *Science (New York, NY)*. 2001;293(5532):1159-63.
119. Cardin JA, Carlen M, Meletis K, Knoblich U, Zhang F, Deisseroth K, et al. Driving fast-spiking cells induces gamma rhythm and controls sensory responses. *Nature*. 2009;459(7247):663-7.
120. Sohal VS, Zhang F, Yizhar O, Deisseroth K. Parvalbumin neurons and gamma rhythms enhance cortical circuit performance. *Nature*. 2009;459(7247):698-702.
121. Vitalis T, Rossier J. New insights into cortical interneurons development and classification: contribution of developmental studies. *Dev Neurobiol*. 2011;71(1):34-44.
122. Lim L, Mi D, Llorca A, Marin O. Development and Functional Diversification of Cortical Interneurons. *Neuron*. 2018;100(2):294-313.
123. Wonders CP, Anderson SA. The origin and specification of cortical interneurons. *Nat Rev Neurosci*. 2006;7(9):687-96.
124. Markram H, Toledo-Rodriguez M, Wang Y, Gupta A, Silberberg G, Wu C. Interneurons of the neocortical inhibitory system. *Nat Rev Neurosci*. 2004;5(10):793-807.
125. Fishell G, Rudy B. Mechanisms of inhibition within the telencephalon: "where the wild things are". *Annu Rev Neurosci*. 2011;34:535-67.
126. Somogyi P, Freund TF, Cowey A. The axo-axonic interneuron in the cerebral cortex of the rat, cat and monkey. *Neuroscience*. 1982;7(11):2577-607.
127. Inda MC, DeFelipe J, Munoz A. Morphology and distribution of chandelier cell axon terminals in the mouse cerebral cortex and claustramygdaloid complex. *Cereb Cortex*. 2009;19(1):41-54.

128. Taniguchi H, Lu J, Huang ZJ. The spatial and temporal origin of chandelier cells in mouse neocortex. *Science (New York, NY)*. 2013;339(6115):70-4.
129. Buchanan KA, Blackman AV, Moreau AW, Elgar D, Costa RP, Lalanne T, et al. Target-specific expression of presynaptic NMDA receptors in neocortical microcircuits. *Neuron*. 2012;75(3):451-66.
130. Bortone DS, Olsen SR, Scanziani M. Translaminar inhibitory cells recruited by layer 6 corticothalamic neurons suppress visual cortex. *Neuron*. 2014;82(2):474-85.
131. Gelman DM, Martini FJ, Nobrega-Pereira S, Pierani A, Kessaris N, Marin O. The embryonic preoptic area is a novel source of cortical GABAergic interneurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2009;29(29):9380-9.
132. Marin O, Rubenstein JL. A long, remarkable journey: tangential migration in the telencephalon. *Nat Rev Neurosci*. 2001;2(11):780-90.
133. Lee S, Hjerling-Leffler J, Zaghera E, Fishell G, Rudy B. The largest group of superficial neocortical GABAergic interneurons expresses ionotropic serotonin receptors. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2010;30(50):16796-808.
134. Cauli B, Zhou X, Tricoire L, Toussay X, Staiger JF. Revisiting enigmatic cortical calretinin-expressing interneurons. *Front Neuroanat*. 2014;8:52.
135. Casarosa S, Fode C, Guillemot F. Mash1 regulates neurogenesis in the ventral telencephalon. *Development*. 1999;126(3):525-34.
136. Stuhmer T, Anderson SA, Ekker M, Rubenstein JL. Ectopic expression of the *Dlx* genes induces glutamic acid decarboxylase and *Dlx* expression. *Development*. 2002;129(1):245-52.

137. Bulfone A, Wang F, Hevner R, Anderson S, Cutforth T, Chen S, et al. An olfactory sensory map develops in the absence of normal projection neurons or GABAergic interneurons. *Neuron*. 1998;21(6):1273-82.
138. Butt SJ, Sousa VH, Fuccillo MV, Hjerling-Leffler J, Miyoshi G, Kimura S, et al. The requirement of Nkx2-1 in the temporal specification of cortical interneuron subtypes. *Neuron*. 2008;59(5):722-32.
139. Gulacsi AA, Anderson SA. Beta-catenin-mediated Wnt signaling regulates neurogenesis in the ventral telencephalon. *Nat Neurosci*. 2008;11(12):1383-91.
140. Xu Q, Guo L, Moore H, Waclaw RR, Campbell K, Anderson SA. Sonic hedgehog signaling confers ventral telencephalic progenitors with distinct cortical interneuron fates. *Neuron*. 2010;65(3):328-40.
141. Marin O, Valdeolmillos M, Moya F. Neurons in motion: same principles for different shapes? *Trends Neurosci*. 2006;29(12):655-61.
142. Martini FJ, Valiente M, Lopez Bendito G, Szabo G, Moya F, Valdeolmillos M, et al. Biased selection of leading process branches mediates chemotaxis during tangential neuronal migration. *Development*. 2009;136(1):41-50.
143. Yanagida M, Miyoshi R, Toyokuni R, Zhu Y, Murakami F. Dynamics of the leading process, nucleus, and Golgi apparatus of migrating cortical interneurons in living mouse embryos. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012;109(41):16737-42.
144. Bean JC, Lin TW, Sathyamurthy A, Liu F, Yin DM, Xiong WC, et al. Genetic labeling reveals novel cellular targets of schizophrenia susceptibility gene: distribution of GABA and non-GABA ErbB4-positive cells in adult mouse brain. *The Journal of*

neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience. 2014;34(40):13549-66.

145. Flames N, Long JE, Garratt AN, Fischer TM, Gassmann M, Birchmeier C, et al. Short- and long-range attraction of cortical GABAergic interneurons by neuregulin-1. *Neuron*. 2004;44(2):251-61.

146. Li G, Adesnik H, Li J, Long J, Nicoll RA, Rubenstein JL, et al. Regional distribution of cortical interneurons and development of inhibitory tone are regulated by Cxcl12/Cxcr4 signaling. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2008;28(5):1085-98.

147. Bartolini G, Sanchez-Alcaniz JA, Osorio C, Valiente M, Garcia-Frigola C, Marin O. Neuregulin 3 Mediates Cortical Plate Invasion and Laminar Allocation of GABAergic Interneurons. *Cell Rep*. 2017;18(5):1157-70.

148. Lodato S, Rouaux C, Quast KB, Jantrachotechatchawan C, Studer M, Hensch TK, et al. Excitatory projection neuron subtypes control the distribution of local inhibitory interneurons in the cerebral cortex. *Neuron*. 2011;69(4):763-79.

149. Pla R, Borrell V, Flames N, Marin O. Layer acquisition by cortical GABAergic interneurons is independent of Reelin signaling. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2006;26(26):6924-34.

150. Bortone D, Polleux F. KCC2 expression promotes the termination of cortical interneuron migration in a voltage-sensitive calcium-dependent manner. *Neuron*. 2009;62(1):53-71.

151. De Marco Garcia NV, Karayannis T, Fishell G. Neuronal activity is required for the development of specific cortical interneuron subtypes. *Nature*. 2011;472(7343):351-5.

152. Chattopadhyaya B, Di Cristo G, Higashiyama H, Knott GW, Kuhlman SJ, Welker E, et al. Experience and activity-dependent maturation of perisomatic GABAergic innervation in primary visual cortex during a postnatal critical period. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2004;24(43):9598-611.
153. Jiao Y, Zhang C, Yanagawa Y, Sun QQ. Major effects of sensory experiences on the neocortical inhibitory circuits. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2006;26(34):8691-701.
154. Micheva KD, Beaulieu C. An anatomical substrate for experience-dependent plasticity of the rat barrel field cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1995;92(25):11834-8.
155. Chattopadhyaya B, Di Cristo G, Wu CZ, Knott G, Kuhlman S, Fu Y, et al. GAD67-mediated GABA synthesis and signaling regulate inhibitory synaptic innervation in the visual cortex. *Neuron*. 2007;54(6):889-903.
156. Dunlap K. Two types of gamma-aminobutyric acid receptor on embryonic sensory neurones. *Br J Pharmacol*. 1981;74(3):579-85.
157. Gonchar Y, Pang L, Malitschek B, Bettler B, Burkhalter A. Subcellular localization of GABA(B) receptor subunits in rat visual cortex. *J Comp Neurol*. 2001;431(2):182-97.
158. Henley J, Poo MM. Guiding neuronal growth cones using Ca<sup>2+</sup> signals. *Trends Cell Biol*. 2004;14(6):320-30.
159. Huang ZJ, Di Cristo G, Ango F. Development of GABA innervation in the cerebral and cerebellar cortices. *Nat Rev Neurosci*. 2007;8(9):673-86.
160. Wu X, Fu Y, Knott G, Lu J, Di Cristo G, Huang ZJ. GABA signaling promotes synapse elimination and axon pruning in developing cortical inhibitory interneurons. *The*

Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience. 2012;32(1):331-43.

161. Birgul N, Weise C, Kreienkamp HJ, Richter D. Reverse physiology in drosophila: identification of a novel allatostatin-like neuropeptide and its cognate receptor structurally related to the mammalian somatostatin/galanin/opioid receptor family. EMBO J. 1999;18(21):5892-900.

162. Ben Fredj N, Hammond S, Otsuna H, Chien CB, Burrone J, Meyer MP. Synaptic activity and activity-dependent competition regulates axon arbor maturation, growth arrest, and territory in the retinotectal projection. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience. 2010;30(32):10939-51.

163. Baho E, Di Cristo G. Neural activity and neurotransmission regulate the maturation of the innervation field of cortical GABAergic interneurons in an age-dependent manner. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience. 2012;32(3):911-8.

164. McAllister AK, Katz LC, Lo DC. Neurotrophins and synaptic plasticity. Annu Rev Neurosci. 1999;22:295-318.

165. Nagappan G, Lu B. Activity-dependent modulation of the BDNF receptor TrkB: mechanisms and implications. Trends Neurosci. 2005;28(9):464-71.

166. Palizvan MR, Sohya K, Kohara K, Maruyama A, Yasuda H, Kimura F, et al. Brain-derived neurotrophic factor increases inhibitory synapses, revealed in solitary neurons cultured from rat visual cortex. Neuroscience. 2004;126(4):955-66.

167. Rutherford LC, DeWan A, Lauer HM, Turrigiano GG. Brain-derived neurotrophic factor mediates the activity-dependent regulation of inhibition in neocortical cultures. The

Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience. 1997;17(12):4527-35.

168. Vicario-Abejon C, Collin C, McKay RD, Segal M. Neurotrophins induce formation of functional excitatory and inhibitory synapses between cultured hippocampal neurons. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience. 1998;18(18):7256-71.

169. Tenkumo C, Ohta KI, Suzuki S, Warita K, Irie K, Teradaya S, et al. Repeated maternal separation causes transient reduction in BDNF expression in the medial prefrontal cortex during early brain development, affecting inhibitory neuron development. Heliyon. 2020;6(8):e04781.

170. Ohba S, Ikeda T, Ikegaya Y, Nishiyama N, Matsuki N, Yamada MK. BDNF locally potentiates GABAergic presynaptic machineries: target-selective circuit inhibition. Cereb Cortex. 2005;15(3):291-8.

171. Kohara K, Kitamura A, Morishima M, Tsumoto T. Activity-dependent transfer of brain-derived neurotrophic factor to postsynaptic neurons. Science (New York, NY). 2001;291(5512):2419-23.

172. Adachi N, Kohara K, Tsumoto T. Difference in trafficking of brain-derived neurotrophic factor between axons and dendrites of cortical neurons, revealed by live-cell imaging. BMC Neurosci. 2005;6:42.

173. Kohara K, Yasuda H, Huang Y, Adachi N, Sohya K, Tsumoto T. A local reduction in cortical GABAergic synapses after a loss of endogenous brain-derived neurotrophic factor, as revealed by single-cell gene knock-out method. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience. 2007;27(27):7234-44.



174. Spiegel I, Mardinly AR, Gabel HW, Bazinet JE, Couch CH, Tzeng CP, et al. Npas4 regulates excitatory-inhibitory balance within neural circuits through cell-type-specific gene programs. *Cell*. 2014;157(5):1216-29.
175. Mardinly AR, Spiegel I, Patrizi A, Centofante E, Bazinet JE, Tzeng CP, et al. Sensory experience regulates cortical inhibition by inducing IGF1 in VIP neurons. *Nature*. 2016;531(7594):371-5.
176. Dehorter N, Ciceri G, Bartolini G, Lim L, del Pino I, Marin O. Tuning of fast-spiking interneuron properties by an activity-dependent transcriptional switch. *Science (New York, NY)*. 2015;349(6253):1216-20.
177. Goldberg EM, Clark BD, Zaghera E, Nahmani M, Erisir A, Rudy B. K<sup>+</sup> channels at the axon initial segment dampen near-threshold excitability of neocortical fast-spiking GABAergic interneurons. *Neuron*. 2008;58(3):387-400.
178. Acheson A, Sunshine JL, Rutishauser U. NCAM polysialic acid can regulate both cell-cell and cell-substrate interactions. *The Journal of cell biology*. 1991;114(1):143-53.
179. Fujimoto I, Bruses JL, Rutishauser U. Regulation of cell adhesion by polysialic acid. Effects on cadherin, immunoglobulin cell adhesion molecule, and integrin function and independence from neural cell adhesion molecule binding or signaling activity. *J Biol Chem*. 2001;276(34):31745-51.
180. Rothbard JB, Brackenbury R, Cunningham BA, Edelman GM. Differences in the carbohydrate structures of neural cell-adhesion molecules from adult and embryonic chicken brains. *J Biol Chem*. 1982;257(18):11064-9.
181. Lau LW, Cua R, Keough MB, Haylock-Jacobs S, Yong VW. Pathophysiology of the brain extracellular matrix: a new target for remyelination. *Nat Rev Neurosci*. 2013;14(10):722-9.

182. Härtig W, Brauer K, Brückner G. Wisteria floribunda agglutinin-labelled nets surround parvalbumin-containing neurons. *Neuroreport*. 1992;3(10):869-72.
183. Tsien RY. Very long-term memories may be stored in the pattern of holes in the perineuronal net. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013;110(30):12456-61.
184. Brückner G, Brauer K, Härtig W, Wolff JR, Rickmann MJ, Derouiche A, et al. Perineuronal nets provide a polyanionic, glia-associated form of microenvironment around certain neurons in many parts of the rat brain. *Glia*. 1993;8(3):183-200.
185. Li Y, Li ZX, Jin T, Wang ZY, Zhao P. Tau Pathology Promotes the Reorganization of the Extracellular Matrix and Inhibits the Formation of Perineuronal Nets by Regulating the Expression and the Distribution of Hyaluronic Acid Synthases. *J Alzheimers Dis*. 2017;57(2):395-409.
186. Bandtlow CE, Zimmermann DR. Proteoglycans in the developing brain: new conceptual insights for old proteins. *Physiological reviews*. 2000;80(4):1267-90.
187. Galtrey CM, Fawcett JW. The role of chondroitin sulfate proteoglycans in regeneration and plasticity in the central nervous system. *Brain Res Rev*. 2007;54(1):1-18.
188. Gama CI, Tully SE, Sotogaku N, Clark PM, Rawat M, Vaidehi N, et al. Sulfation patterns of glycosaminoglycans encode molecular recognition and activity. *Nature chemical biology*. 2006;2(9):467-73.
189. Deepa SS, Carulli D, Galtrey C, Rhodes K, Fukuda J, Mikami T, et al. Composition of perineuronal net extracellular matrix in rat brain: a different disaccharide composition for the net-associated proteoglycans. *J Biol Chem*. 2006;281(26):17789-800.

190. Aono S, Oohira A. Chondroitin sulfate proteoglycans in the brain. *Advances in pharmacology* (San Diego, Calif). 2006;53:323-36.
191. Kjellén L, Lindahl U. Proteoglycans: structures and interactions. *Annual review of biochemistry*. 1991;60:443-75.
192. Yamaguchi Y. Lecticans: organizers of the brain extracellular matrix. *Cell Mol Life Sci*. 2000;57(2):276-89.
193. Giamanco KA, Morawski M, Matthews RT. Perineuronal net formation and structure in aggrecan knockout mice. *Neuroscience*. 2010;170(4):1314-27.
194. Seidenbecher CI, Richter K, Rauch U, Fässler R, Garner CC, Gundelfinger ED. Brevican, a chondroitin sulfate proteoglycan of rat brain, occurs as secreted and cell surface glycosylphosphatidylinositol-anchored isoforms. *J Biol Chem*. 1995;270(45):27206-12.
195. Novak U, Kaye AH. Extracellular matrix and the brain: components and function. *Journal of clinical neuroscience : official journal of the Neurosurgical Society of Australasia*. 2000;7(4):280-90.
196. Testa D, Prochiantz A, Di Nardo AA. Perineuronal nets in brain physiology and disease. *Seminars in cell & developmental biology*. 2019;89:125-35.
197. Day JM, Olin AI, Murdoch AD, Canfield A, Sasaki T, Timpl R, et al. Alternative splicing in the aggrecan G3 domain influences binding interactions with tenascin-C and other extracellular matrix proteins. *J Biol Chem*. 2004;279(13):12511-8.
198. Rauch U, Clement A, Retzler C, Fröhlich L, Fässler R, Göhring W, et al. Mapping of a defined neurocan binding site to distinct domains of tenascin-C. *J Biol Chem*. 1997;272(43):26905-12.

199. Aspberg A, Binkert C, Ruoslahti E. The versican C-type lectin domain recognizes the adhesion protein tenascin-R. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1995;92(23):10590-4.
200. Carulli D, Laabs T, Geller HM, Fawcett JW. Chondroitin sulfate proteoglycans in neural development and regeneration. *Curr Opin Neurobiol*. 2005;15(1):116-20.
201. Nörenberg U, Hubert M, Rathjen FG. Structural and functional characterization of tenascin-R (restrictin), an extracellular matrix glycoprotein of glial cells and neurons. *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience*. 1996;14(3):217-31.
202. Götz B, Scholze A, Clement A, Joester A, Schütte K, Wigger F, et al. Tenascin-C contains distinct adhesive, anti-adhesive, and neurite outgrowth promoting sites for neurons. *The Journal of cell biology*. 1996;132(4):681-99.
203. Brückner G, Grosche J, Schmidt S, Härtig W, Margolis RU, Delpech B, et al. Postnatal development of perineuronal nets in wild-type mice and in a mutant deficient in tenascin-R. *J Comp Neurol*. 2000;428(4):616-29.
204. Spicer AP, Joo A, Bowling RA, Jr. 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*. 2003;278(23):21083-91.
205. Oohashi T, Edamatsu M, Bekku Y, Carulli D. The hyaluronan and proteoglycan link proteins: Organizers of the brain extracellular matrix and key molecules for neuronal function and plasticity. *Exp Neurol*. 2015;274(Pt B):134-44.
206. Bekku Y, Su WD, Hirakawa S, Fassler R, Ohtsuka A, Kang JS, et al. Molecular cloning of Bral2, a novel brain-specific link protein, and immunohistochemical colocalization with brevican in perineuronal nets. *Mol Cell Neurosci*. 2003;24(1):148-59.

207. Kwok JC, Carulli D, Fawcett JW. In vitro modeling of perineuronal nets: hyaluronan synthase and link protein are necessary for their formation and integrity. *J Neurochem.* 2010;114(5):1447-59.
208. Carulli D, Pizzorusso T, Kwok JC, Putignano E, Poli A, Forostyak S, et al. Animals lacking link protein have attenuated perineuronal nets and persistent plasticity. *Brain.* 2010;133(Pt 8):2331-47.
209. Cross AK, Haddock G, Stock CJ, Allan S, Surr J, Bunning RA, et al. ADAMTS-1 and -4 are up-regulated following transient middle cerebral artery occlusion in the rat and their expression is modulated by TNF in cultured astrocytes. *Brain Res.* 2006;1088(1):19-30.
210. Hamel MG, Ajmo JM, Leonardo CC, Zuo F, Sandy JD, Gottschall PE. Multimodal signaling by the ADAMTSs (a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs) promotes neurite extension. *Exp Neurol.* 2008;210(2):428-40.
211. Rossier J, Bernard A, Cabungcal JH, Perrenoud Q, Savoye A, Gallopin T, et al. Cortical fast-spiking parvalbumin interneurons enwrapped in the perineuronal net express the metalloproteinases Adamts8, Adamts15 and Neprilysin. *Mol Psychiatry.* 2015;20(2):154-61.
212. Wen TH, Afroz S, Reinhard SM, Palacios AR, Tapia K, Binder DK, et al. Genetic Reduction of Matrix Metalloproteinase-9 Promotes Formation of Perineuronal Nets Around Parvalbumin-Expressing Interneurons and Normalizes Auditory Cortex Responses in Developing Fmr1 Knock-Out Mice. *Cereb Cortex.* 2018;28(11):3951-64.
213. Härtig W, Derouiche A, Welt K, Brauer K, Grosche J, Mäder M, et al. 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.* 1999;842(1):15-29.

214. Morawski M, Reinert T, Meyer-Klaucke W, Wagner FE, Troger W, Reinert A, et al. Ion exchanger in the brain: Quantitative analysis of perineuronally fixed anionic binding sites suggests diffusion barriers with ion sorting properties. *Sci Rep.* 2015;5:16471.

215. Suttikus A, Rohn S, Weigel S, Glockner P, Arendt T, Morawski M. Aggrecan, link protein and tenascin-R are essential components of the perineuronal net to protect neurons against iron-induced oxidative stress. *Cell Death Dis.* 2014;5:e1119.

216. Frischknecht R, Heine M, Perrais D, Seidenbecher CI, Choquet D, Gundelfinger ED. Brain extracellular matrix affects AMPA receptor lateral mobility and short-term synaptic plasticity. *Nat Neurosci.* 2009;12(7):897-904.

217. Donato F, Rompani SB, Caroni P. Parvalbumin-expressing basket-cell network plasticity induced by experience regulates adult learning. *Nature.* 2013;504(7479):272-6.

218. Cardin AD, Weintraub HJ. Molecular modeling of protein-glycosaminoglycan interactions. *Arteriosclerosis (Dallas, Tex).* 1989;9(1):21-32.

219. Hou X, Yoshioka N, Tsukano H, Sakai A, Miyata S, Watanabe Y, et al. Chondroitin Sulfate Is Required for Onset and Offset of Critical Period Plasticity in Visual Cortex. *Sci Rep.* 2017;7(1):12646.

220. Vo T, Carulli D, Ehlert EM, Kwok JC, Dick G, Mecollari V, et al. The chemorepulsive axon guidance protein semaphorin3A is a constituent of perineuronal nets in the adult rodent brain. *Mol Cell Neurosci.* 2013;56:186-200.

221. Nakamura M, Nakano K, Morita S, Nakashima T, Oohira A, Miyata S. Expression of chondroitin sulfate proteoglycans in barrel field of mouse and rat somatosensory cortex. *Brain Res.* 2009;1252:117-29.

222. Dityatev A, Bruckner G, Dityateva G, Grosche J, Kleene R, Schachner M. Activity-dependent formation and functions of chondroitin sulfate-rich extracellular matrix of perineuronal nets. *Dev Neurobiol.* 2007;67(5):570-88.
223. Favuzzi E, Marques-Smith A, Deogracias R, Winterflood CM, Sanchez-Aguilera A, Mantoan L, et al. Activity-Dependent Gating of Parvalbumin Interneuron Function by the Perineuronal Net Protein Brevican. *Neuron.* 2017;95(3):639-55 e10.
224. Slaker M, Churchill L, Todd RP, Blacktop JM, Zuloaga DG, Raber J, et al. Removal of perineuronal nets in the medial prefrontal cortex impairs the acquisition and reconsolidation of a cocaine-induced conditioned place preference memory. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience.* 2015;35(10):4190-202.
225. Kochlamazashvili G, Henneberger C, Bukalo O, Dvoretzkova E, Senkov O, Lievens PM, et al. The extracellular matrix molecule hyaluronic acid regulates hippocampal synaptic plasticity by modulating postsynaptic L-type Ca(2+) channels. *Neuron.* 2010;67(1):116-28.
226. Hylin MJ, Orsi SA, Moore AN, Dash PK. Disruption of the perineuronal net in the hippocampus or medial prefrontal cortex impairs fear conditioning. *Learn Mem.* 2013;20(5):267-73.
227. Romberg C, Yang S, Melani R, Andrews MR, Horner AE, Spillantini MG, et al. Depletion of perineuronal nets enhances recognition memory and long-term depression in the perirhinal cortex. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience.* 2013;33(16):7057-65.
228. Happel MF, Niekisch H, Castiblanco Rivera LL, Ohl FW, Deliano M, Frischknecht R. Enhanced cognitive flexibility in reversal learning induced by removal of the

extracellular matrix in auditory cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2014;111(7):2800-5.

229. Hong EJ, McCord AE, Greenberg ME. A biological function for the neuronal activity-dependent component of Bdnf transcription in the development of cortical inhibition. *Neuron*. 2008;60(4):610-24.

230. Yang F, Je HS, Ji Y, Nagappan G, Hempstead B, Lu B. Pro-BDNF-induced synaptic depression and retraction at developing neuromuscular synapses. *The Journal of cell biology*. 2009;185(4):727-41.

231. Lu B, Pang PT, Woo NH. The yin and yang of neurotrophin action. *Nat Rev Neurosci*. 2005;6(8):603-14.

232. Jiao Y, Zhang Z, Zhang C, Wang X, Sakata K, Lu B, et al. A key mechanism underlying sensory experience-dependent maturation of neocortical GABAergic circuits in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011;108(29):12131-6.

233. Underwood CK, Coulson EJ. The p75 neurotrophin receptor. *Int J Biochem Cell Biol*. 2008;40(9):1664-8.

234. Dechant G, Barde YA. The neurotrophin receptor p75(NTR): novel functions and implications for diseases of the nervous system. *Nat Neurosci*. 2002;5(11):1131-6.

235. Roux PP, Barker PA. Neurotrophin signaling through the p75 neurotrophin receptor. *Prog Neurobiol*. 2002;67(3):203-33.

236. Herrup K, Shooter EM. Properties of the beta nerve growth factor receptor of avian dorsal root ganglia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1973;70(12):3884-8.



237. Reichardt LF. Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2006;361(1473):1545-64.
238. Patapoutian A, Reichardt LF. Trk receptors: mediators of neurotrophin action. *Curr Opin Neurobiol.* 2001;11(3):272-80.
239. Barker PA. p75<sup>NTR</sup> is positively promiscuous: novel partners and new insights. *Neuron.* 2004;42(4):529-33.
240. Chao MV, Bothwell M. Neurotrophins: to cleave or not to cleave. *Neuron.* 2002;33(1):9-12.
241. Lee R, Kermani P, Teng KK, Hempstead BL. Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science (New York, NY).* 2001;294(5548):1945-8.
242. Wang KC, Kim JA, Sivasankaran R, Segal R, He Z. P75 interacts with the Nogo receptor as a co-receptor for Nogo, MAG and OMgp. *Nature.* 2002;420(6911):74-8.
243. Wong ST, Henley JR, Kanning KC, Huang KH, Bothwell M, Poo MM. A p75<sup>(NTR)</sup> and Nogo receptor complex mediates repulsive signaling by myelin-associated glycoprotein. *Nat Neurosci.* 2002;5(12):1302-8.
244. Tuffereau C, Benejean J, Blondel D, Kieffer B, Flamand A. Low-affinity nerve-growth factor receptor (P75<sup>NTR</sup>) can serve as a receptor for rabies virus. *EMBO J.* 1998;17(24):7250-9.
245. Knowles JK, Rajadas J, Nguyen TV, Yang T, LeMieux MC, Vander Griend L, et al. The p75 neurotrophin receptor promotes amyloid-beta(1-42)-induced neuritic dystrophy in vitro and in vivo. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience.* 2009;29(34):10627-37.

246. Perini G, Della-Bianca V, Politi V, Della Valle G, Dal-Pra I, Rossi F, et al. Role of p75 neurotrophin receptor in the neurotoxicity by beta-amyloid peptides and synergistic effect of inflammatory cytokines. *J Exp Med*. 2002;195(7):907-18.
247. Nykjaer A, Willnow TE. Sortilin: a receptor to regulate neuronal viability and function. *Trends Neurosci*. 2012;35(4):261-70.
248. Nykjaer A, Lee R, Teng KK, Jansen P, Madsen P, Nielsen MS, et al. Sortilin is essential for proNGF-induced neuronal cell death. *Nature*. 2004;427(6977):843-8.
249. Mi S, Lee X, Shao Z, Thill G, Ji B, Relton J, et al. LINGO-1 is a component of the Nogo-66 receptor/p75 signaling complex. *Nat Neurosci*. 2004;7(3):221-8.
250. Liepinsh E, Ilag LL, Otting G, Ibanez CF. NMR structure of the death domain of the p75 neurotrophin receptor. *EMBO J*. 1997;16(16):4999-5005.
251. Feinstein E, Kimchi A, Wallach D, Boldin M, Varfolomeev E. The death domain: a module shared by proteins with diverse cellular functions. *Trends Biochem Sci*. 1995;20(9):342-4.
252. Ferrao R, Wu H. Helical assembly in the death domain (DD) superfamily. *Curr Opin Struct Biol*. 2012;22(2):241-7.
253. Vilar M, Charalampopoulos I, Kenchappa RS, Simi A, Karaca E, Reversi A, et al. Activation of the p75 neurotrophin receptor through conformational rearrangement of disulphide-linked receptor dimers. *Neuron*. 2009;62(1):72-83.
254. Lin Z, Tann JY, Goh ET, Kelly C, Lim KB, Gao JF, et al. Structural basis of death domain signaling in the p75 neurotrophin receptor. *Elife*. 2015;4:e11692.
255. Park KJ, Grosso CA, Aubert I, Kaplan DR, Miller FD. p75NTR-dependent, myelin-mediated axonal degeneration regulates neural connectivity in the adult brain. *Nat Neurosci*. 2010;13(5):559-66.

256. Yamashita T, Tucker KL, Barde YA. Neurotrophin binding to the p75 receptor modulates Rho activity and axonal outgrowth. *Neuron*. 1999;24(3):585-93.
257. Yamashita T, Tohyama M. The p75 receptor acts as a displacement factor that releases Rho from Rho-GDI. *Nat Neurosci*. 2003;6(5):461-7.
258. Carter BD, Kaltschmidt C, Kaltschmidt B, Offenhauser N, Bohm-Matthaei R, Baeuerle PA, et al. Selective activation of NF-kappa B by nerve growth factor through the neurotrophin receptor p75. *Science (New York, NY)*. 1996;272(5261):542-5.
259. Khursigara G, Bertin J, Yano H, Moffett H, DiStefano PS, Chao MV. A prosurvival function for the p75 receptor death domain mediated via the caspase recruitment domain receptor-interacting protein 2. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2001;21(16):5854-63.
260. Vicario A, Kisiswa L, Tann JY, Kelly CE, Ibanez CF. Neuron-type-specific signaling by the p75NTR death receptor is regulated by differential proteolytic cleavage. *J Cell Sci*. 2015;128(8):1507-17.
261. Friedman WJ. Neurotrophins induce death of hippocampal neurons via the p75 receptor. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2000;20(17):6340-6.
262. Yoon SO, Casaccia-Bonnet P, Carter B, Chao MV. Competitive signaling between TrkA and p75 nerve growth factor receptors determines cell survival. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 1998;18(9):3273-81.
263. Charalampopoulos I, Vicario A, Padiaditakis I, Gravanis A, Simi A, Ibanez CF. Genetic dissection of neurotrophin signaling through the p75 neurotrophin receptor. *Cell Rep*. 2012;2(6):1563-70.

264. Hempstead BL. The many faces of p75NTR. *Curr Opin Neurobiol.* 2002;12(3):260-7.
265. Davies AM. Nerve growth factor synthesis and nerve growth factor receptor expression in neural development. *Int Rev Cytol.* 1991;128:109-38.
266. Lazarovici P, Cohen G, Arien-Zakay H, Chen J, Zhang C, Chopp M, et al. Multimodal neuroprotection induced by PACAP38 in oxygen-glucose deprivation and middle cerebral artery occlusion stroke models. *J Mol Neurosci.* 2012;48(3):526-40.
267. Liu L, Zhu L, Zou Y, Liu W, Zhang X, Wei X, et al. Panax notoginseng saponins promotes stroke recovery by influencing expression of Nogo-A, NgR and p75NGF, in vitro and in vivo. *Biol Pharm Bull.* 2014;37(4):560-8.
268. Holm MM, Nieto-Gonzalez JL, Vardya I, Vaegter CB, Nykjaer A, Jensen K. Mature BDNF, but not proBDNF, reduces excitability of fast-spiking interneurons in mouse dentate gyrus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience.* 2009;29(40):12412-8.
269. Woo NH, Teng HK, Siao CJ, Chiaruttini C, Pang PT, Milner TA, et al. Activation of p75NTR by proBDNF facilitates hippocampal long-term depression. *Nat Neurosci.* 2005;8(8):1069-77.
270. Cowansage KK, LeDoux JE, Monfils MH. Brain-derived neurotrophic factor: a dynamic gatekeeper of neural plasticity. *Curr Mol Pharmacol.* 2010;3(1):12-29.
271. Teng KK, Felice S, Kim T, Hempstead BL. Understanding proneurotrophin actions: Recent advances and challenges. *Dev Neurobiol.* 2010;70(5):350-9.
272. Yang J, Harte-Hargrove LC, Siao CJ, Marinic T, Clarke R, Ma Q, et al. proBDNF negatively regulates neuronal remodeling, synaptic transmission, and synaptic plasticity in hippocampus. *Cell Rep.* 2014;7(3):796-806.

273. Rosch H, Schweigreiter R, Bonhoeffer T, Barde YA, Korte M. The neurotrophin receptor p75NTR modulates long-term depression and regulates the expression of AMPA receptor subunits in the hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005;102(20):7362-7.
274. Glerup S, Bolcho U, Molgaard S, Boggild S, Vaegter CB, Smith AH, et al. SorCS2 is required for BDNF-dependent plasticity in the hippocampus. *Mol Psychiatry*. 2016;21(12):1740-51.
275. Gibon J, Barker PA, Seguela P. Opposing presynaptic roles of BDNF and ProBDNF in the regulation of persistent activity in the entorhinal cortex. *Mol Brain*. 2016;9:23.
276. Gibon J, Buckley SM, Unsain N, Kaartinen V, Seguela P, Barker PA. proBDNF and p75NTR Control Excitability and Persistent Firing of Cortical Pyramidal Neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2015;35(26):9741-53.
277. Barrett GL, Reid CA, Tsafoulis C, Zhu W, Williams DA, Paolini AG, et al. Enhanced spatial memory and hippocampal long-term potentiation in p75 neurotrophin receptor knockout mice. *Hippocampus*. 2010;20(1):145-52.
278. Chen J, Li CR, Yang H, Liu J, Zhang T, Jiao SS, et al. proBDNF Attenuates Hippocampal Neurogenesis and Induces Learning and Memory Deficits in Aged Mice. *Neurotox Res*. 2016;29(1):47-53.
279. Je HS, Yang F, Ji Y, Nagappan G, Hempstead BL, Lu B. Role of pro-brain-derived neurotrophic factor (proBDNF) to mature BDNF conversion in activity-dependent competition at developing neuromuscular synapses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012;109(39):15924-9.

280. Je HS, Yang F, Ji Y, Potluri S, Fu XQ, Luo ZG, et al. ProBDNF and mature BDNF as punishment and reward signals for synapse elimination at mouse neuromuscular junctions. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2013;33(24):9957-62.
281. Winnubst J, Cheyne JE, Niculescu D, Lohmann C. Spontaneous Activity Drives Local Synaptic Plasticity In Vivo. *Neuron*. 2015;87(2):399-410.
282. Yap EL, Greenberg ME. Activity-Regulated Transcription: Bridging the Gap between Neural Activity and Behavior. *Neuron*. 2018;100(2):330-48.
283. Tessarz P, Kouzarides T. Histone core modifications regulating nucleosome structure and dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014;15(11):703-8.
284. Ridsdale JA, Hendzel MJ, Delcuve GP, Davie JR. Histone acetylation alters the capacity of the H1 histones to condense transcriptionally active/competent chromatin. *J Biol Chem*. 1990;265(9):5150-6.
285. Shahbazian MD, Grunstein M. Functions of site-specific histone acetylation and deacetylation. *Annual review of biochemistry*. 2007;76:75-100.
286. Kouzarides T. Acetylation: a regulatory modification to rival phosphorylation? *EMBO J*. 2000;19(6):1176-9.
287. Lattal KM, Barrett RM, Wood MA. Systemic or intrahippocampal delivery of histone deacetylase inhibitors facilitates fear extinction. *Behav Neurosci*. 2007;121(5):1125-31.
288. Bredy TW, Wu H, Crego C, Zellhoefer J, Sun YE, Barad M. Histone modifications around individual BDNF gene promoters in prefrontal cortex are associated with extinction of conditioned fear. *Learn Mem*. 2007;14(4):268-76.

289. Clayton AL, Hazzalin CA, Mahadevan LC. Enhanced histone acetylation and transcription: a dynamic perspective. *Mol Cell*. 2006;23(3):289-96.
290. Haberland M, Montgomery RL, Olson EN. The many roles of histone deacetylases in development and physiology: implications for disease and therapy. *Nat Rev Genet*. 2009;10(1):32-42.
291. Verdin E, Dequiedt F, Kasler HG. Class II histone deacetylases: versatile regulators. *Trends in genetics : TIG*. 2003;19(5):286-93.
292. Houtkooper RH, Pirinen E, Auwerx J. Sirtuins as regulators of metabolism and healthspan. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2012;13(4):225-38.
293. Grunstein M. Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature*. 1997;389(6649):349-52.
294. Rundlett SE, Carmen AA, Kobayashi R, Bavykin S, Turner BM, Grunstein M. HDA1 and RPD3 are members of distinct yeast histone deacetylase complexes that regulate silencing and transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996;93(25):14503-8.
295. Wang A, Kurdistani SK, Grunstein M. Requirement of Hos2 histone deacetylase for gene activity in yeast. *Science (New York, NY)*. 2002;298(5597):1412-4.
296. De Nadal E, Zapater M, Alepuz PM, Sumoy L, Mas G, Posas F. The MAPK Hog1 recruits Rpd3 histone deacetylase to activate osmoresponsive genes. *Nature*. 2004;427(6972):370-4.
297. Nusinzon I, Horvath CM. Histone deacetylases as transcriptional activators? Role reversal in inducible gene regulation. *Sci STKE*. 2005;2005(296):re11.
298. Glaser KB, Staver MJ, Waring JF, Stender J, Ulrich RG, Davidsen SK. Gene expression profiling of multiple histone deacetylase (HDAC) inhibitors: defining a

common gene set produced by HDAC inhibition in T24 and MDA carcinoma cell lines. *Mol Cancer Ther.* 2003;2(2):151-63.

299. Montgomery RL, Davis CA, Potthoff MJ, Haberland M, Fielitz J, Qi X, et al. Histone deacetylases 1 and 2 redundantly regulate cardiac morphogenesis, growth, and contractility. *Genes Dev.* 2007;21(14):1790-802.

300. Begum MR, Sng JCG. Molecular mechanisms of experience-dependent maturation in cortical GABAergic inhibition. *J Neurochem.* 2017;142(5):649-61.

301. Lager G, O'Carroll D, Rembold M, Khier H, Tischler J, Weitzer G, et al. Essential function of histone deacetylase 1 in proliferation control and CDK inhibitor repression. *EMBO J.* 2002;21(11):2672-81.

302. Trivedi CM, Luo Y, Yin Z, Zhang M, Zhu W, Wang T, et al. Hdac2 regulates the cardiac hypertrophic response by modulating Gsk3 beta activity. *Nat Med.* 2007;13(3):324-31.

303. Montgomery RL, Hsieh J, Barbosa AC, Richardson JA, Olson EN. Histone deacetylases 1 and 2 control the progression of neural precursors to neurons during brain development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2009;106(19):7876-81.

304. MacDonald JL, Roskams AJ. Histone deacetylases 1 and 2 are expressed at distinct stages of neuro-glial development. *Dev Dyn.* 2008;237(8):2256-67.

305. Baltan S. Histone deacetylase inhibitors preserve function in aging axons. *J Neurochem.* 2012;123 Suppl 2:108-15.

306. Bahari-Javan S, Maddalena A, Kerimoglu C, Wittnam J, Held T, Bahr M, et al. HDAC1 regulates fear extinction in mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience.* 2012;32(15):5062-73.



307. Koh DX, Sng JC. HDAC1 negatively regulates Bdnf and Pvalb required for parvalbumin interneuron maturation in an experience-dependent manner. *J Neurochem.* 2016;139(3):369-80.
308. Graff J, Rei D, Guan JS, Wang WY, Seo J, Hennig KM, et al. An epigenetic blockade of cognitive functions in the neurodegenerating brain. *Nature.* 2012;483(7388):222-6.
309. Guan JS, Haggarty SJ, Giacometti E, Dannenberg JH, Joseph N, Gao J, et al. HDAC2 negatively regulates memory formation and synaptic plasticity. *Nature.* 2009;459(7243):55-60.
310. Morris MJ, Mahgoub M, Na ES, Pranav H, Monteggia LM. Loss of histone deacetylase 2 improves working memory and accelerates extinction learning. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience.* 2013;33(15):6401-11.
311. Hippenmeyer S, Vrieseling E, Sigrist M, Portmann T, Laengle C, Ladle DR, et al. A developmental switch in the response of DRG neurons to ETS transcription factor signaling. *PLoS Biol.* 2005;3(5):e159.
312. Wagner FF, Zhang YL, Fass DM, Joseph N, Gale JP, Weiwer M, et al. Kinetically Selective Inhibitors of Histone Deacetylase 2 (HDAC2) as Cognition Enhancers. *Chem Sci.* 2015;6(1):804-15.
313. Soliman F, Glatt CE, Bath KG, Levita L, Jones RM, Pattwell SS, et al. A genetic variant BDNF polymorphism alters extinction learning in both mouse and human. *Science (New York, NY).* 2010;327(5967):863-6.

314. Felmingham KL, Dobson-Stone C, Schofield PR, Quirk GJ, Bryant RA. The brain-derived neurotrophic factor Val66Met polymorphism predicts response to exposure therapy in posttraumatic stress disorder. *Biol Psychiatry*. 2013;73(11):1059-63.
315. Zhang L, Benedek DM, Fullerton CS, Forsten RD, Naifeh JA, Li XX, et al. PTSD risk is associated with BDNF Val66Met and BDNF overexpression. *Mol Psychiatry*. 2014;19(1):8-10.
316. Chen ZY, Ieraci A, Teng H, Dall H, Meng CX, Herrera DG, et al. Sortilin controls intracellular sorting of brain-derived neurotrophic factor to the regulated secretory pathway. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2005;25(26):6156-66.
317. Chen ZY, Jing D, Bath KG, Ieraci A, Khan T, Siao CJ, et al. Genetic variant BDNF (Val66Met) polymorphism alters anxiety-related behavior. *Science (New York, NY)*. 2006;314(5796):140-3.
318. Chen ZY, Patel PD, Sant G, Meng CX, Teng KK, Hempstead BL, et al. Variant brain-derived neurotrophic factor (BDNF) (Met66) alters the intracellular trafficking and activity-dependent secretion of wild-type BDNF in neurosecretory cells and cortical neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2004;24(18):4401-11.
319. Anastasia A, Deinhardt K, Chao MV, Will NE, Irmady K, Lee FS, et al. Val66Met polymorphism of BDNF alters prodomain structure to induce neuronal growth cone retraction. *Nat Commun*. 2013;4:2490.
320. Giza JL, Kim J, Meyer HC, Anastasia A, Dincheva I, Zheng CI, et al. The BDNF Val66Met Prodomain Disassembles Dendritic Spines Altering Fear Extinction Circuitry and Behavior. *Neuron*. 2018;99(6):1356.

321. Naska S, Lin DC, Miller FD, Kaplan DR. p75NTR is an obligate signaling receptor required for cues that cause sympathetic neuron growth cone collapse. *Mol Cell Neurosci.* 2010;45(2):108-20.
322. Sun Y, Lim Y, Li F, Liu S, Lu JJ, Haberberger R, et al. ProBDNF collapses neurite outgrowth of primary neurons by activating RhoA. *PLoS One.* 2012;7(4):e35883.
323. Deinhardt K, Kim T, Spellman DS, Mains RE, Eipper BA, Neubert TA, et al. Neuronal growth cone retraction relies on proneurotrophin receptor signaling through Rac. *Sci Signal.* 2011;4(202):ra82.
324. Yamashita T, Fujitani M, Yamagishi S, Hata K, Mimura F. Multiple signals regulate axon regeneration through the Nogo receptor complex. *Mol Neurobiol.* 2005;32(2):105-11.
325. Lim YS, McLaughlin T, Sung TC, Santiago A, Lee KF, O'Leary DD. p75(NTR) mediates ephrin-A reverse signaling required for axon repulsion and mapping. *Neuron.* 2008;59(5):746-58.
326. Carceller H, Guirado R, Ripolles-Campos E, Teruel-Marti V, Nacher J. Perineuronal Nets Regulate the Inhibitory Perisomatic Input onto Parvalbumin Interneurons and gamma Activity in the Prefrontal Cortex. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience.* 2020;40(26):5008-18.
327. Graff J, Joseph NF, Horn ME, Samiei A, Meng J, Seo J, et al. Epigenetic priming of memory updating during reconsolidation to attenuate remote fear memories. *Cell.* 2014;156(1-2):261-76.
328. Nott A, Watson PM, Robinson JD, Crepaldi L, Riccio A. S-Nitrosylation of histone deacetylase 2 induces chromatin remodelling in neurons. *Nature.* 2008;455(7211):411-5.

329. Laricchiuta D, Sciamanna G, Gimenez J, Termine A, Fabrizio C, Caioli S, et al. Optogenetic Stimulation of Prelimbic Pyramidal Neurons Maintains Fear Memories and Modulates Amygdala Pyramidal Neuron Transcriptome. *Int J Mol Sci.* 2021;22(2).
330. Kessler RC, Sonnega A, Bromet E, Hughes M, Nelson CB. Posttraumatic stress disorder in the National Comorbidity Survey. *Arch Gen Psychiatry.* 1995;52(12):1048-60.
331. Kilpatrick DG, Resnick HS, Milanak ME, Miller MW, Keyes KM, Friedman MJ. National estimates of exposure to traumatic events and PTSD prevalence using DSM-IV and DSM-5 criteria. *J Trauma Stress.* 2013;26(5):537-47.
332. Tang S, Graham BM. The Role of Hormonal and Reproductive Status in the Treatment of Anxiety Disorders in Women. *Adv Exp Med Biol.* 2020;1191:523-41.
333. Tang S, Graham BM. Hormonal, reproductive, and behavioural predictors of fear extinction recall in female rats. *Horm Behav.* 2020;121:104693.
334. Cazares VA, Rodriguez G, Parent R, Ouillette L, Glanowska KM, Moore SJ, et al. Environmental variables that ameliorate extinction learning deficits in the 129S1/SvImJ mouse strain. *Genes Brain Behav.* 2019;18(7):e12575.
335. Holmes A, Fitzgerald PJ, MacPherson KP, DeBrouse L, Colacicco G, Flynn SM, et al. Chronic alcohol remodels prefrontal neurons and disrupts NMDAR-mediated fear extinction encoding. *Nat Neurosci.* 2012;15(10):1359-61.
336. Muench C, Charlet K, Balderston NL, Grillon C, Heilig M, Cortes CR, et al. Fear conditioning and extinction in alcohol dependence: Evidence for abnormal amygdala reactivity. *Addict Biol.* 2021;26(1):e12835.