

**UNIVERSITE TOULOUSE III PAUL SABATIER
FACULTE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES**

ANNEE : 2015-2016

THESES 2016 TOU3 2000

**Mémoire de DES
Innovation Pharmaceutique et Recherche**

POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement
par

BEZZINA Charlotte
Interne en pharmacie (IPR)

**L'HYPERSYNCHRONIE NEURONALE CHEZ LES SOURIS TG2576 MODELES DE
LA MALADIE D'ALZHEIMER ET SA MODULATION PAR L'ENRICHISSEMENT
ENVIRONNEMENTAL**

26 janvier 2016

Directeur de thèse : Dahan Lionel

JURY

Président : Roussin Anne, PU-PH, Toulouse
1^{er} assesseur : Goze Catherine, MCU-PH, Montpellier
2^{ème} assesseur : Dahan Lionel, MCU, Toulouse
3^{ème} assesseur : Tafani Mathieu, MCU-PH, Toulouse
4^{ème} assesseur : Dorier Sammut Paul, Docteur en pharmacie

**UNIVERSITE TOULOUSE III PAUL SABATIER
FACULTE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES**

ANNEE : 2015-2016

THESES 2016 TOU3 2000

**Mémoire de DES
Innovation Pharmaceutique et Recherche**

POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement
par

BEZZINA Charlotte
Interne en pharmacie (IPR)

**L'HYPERSYNCHRONIE NEURONALE CHEZ LES SOURIS TG2576 MODELES DE
LA MALADIE D'ALZHEIMER ET SA MODULATION PAR L'ENRICHISSEMENT
ENVIRONNEMENTAL**

26 janvier 2016

Directeur de thèse : Dahan Lionel

JURY

Président : Roussin Anne, PU-PH, Toulouse
1^{er} assesseur : Goze Catherine, MCU-PH, Montpellier
2^{ème} assesseur : Dahan Lionel, MCU, Toulouse
3^{ème} assesseur : Tafani Mathieu, MCU-PH, Toulouse
4^{ème} assesseur : Dorier Sammut Paul, Docteur en pharmacie

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury pour avoir accepté de juger ce travail, et en particulier mon ami Paul Dorier-Sammut qui a été mon fidèle binôme de travaux pratiques dans mes premières années d'études, qui m'a suivi toutes ces années et qui est aujourd'hui là pour assister à ma graduation.

Même si aujourd'hui je change d'orientation professionnelle, je suis contente d'avoir passé 3 ans de ma vie au CRCA pour toutes les personnes passionnées et généreuses que j'y ai rencontré. Et parmi elles, Lionel Dahan, mon directeur de thèse, qui a su me donner l'envie de rester et qui n'a pas compté ses heures pour me former, pour m'apprendre une quantité de choses, en passant par la dopamine et les stats.

J'ai beaucoup aimé travaillé dans l'équipe MPV où l'on se sent comme dans une grande famille. Je remercie tous les chercheurs de l'équipe mais tout particulièrement Laure Verret, qui m'a beaucoup appris techniquement et enrichi scientifiquement. Je remercie le personnel en charge de l'animalerie et en particulier Hélène Halley pour m'avoir toujours écoutée et supportée face à certains problèmes personnels.

Je remercie tous mes co-thésards d'avoir créé une si bonne ambiance de travail et tout particulièrement : Alice KREZYMON, pour m'avoir formé au tout début de ma thèse, en me laissant sa méthode de quantification du NPY foireuse ! Kevin RICHETIN, pour son dynamisme et sa passion de vivre, son envie de parler (toujours), son intérêt pour les débats scientifiques internes à notre petit bureau, pour son aide pour tous les problèmes techniques possibles et imaginables et j'en oublie sûrement. Jessica REMAUD, pour avoir été mon bras droit de l'électrophysiologie au début, au milieu et à la fin de ma thèse et Petnoi PETSOPHONSAKUL, pour sa gentillesse, son calme et son sourire inaltérables (vive la culture thaïlandaise !), pour avoir considérablement augmenté mon niveau d'anglais et pour son soutien en toutes situations.

Je voudrais remercier tout particulièrement Julien CARPONCY du CNL de Lyon pour son aide en analyse du signal EEG et pour avoir bataillé à m'apprendre à utiliser Matlab tout en gardant sa bonne humeur.

L'équipe est toujours plus triste sans les stagiaires qui l'ont peuplé et pour tous ces bons moments passés avec eux je les remercie infiniment. Je voudrais d'abord remercier mes propres stagiaires Marie Lods et Emmeline Di Donato pour leur aide précieuse mais surtout Cécile Juan pour son dynamisme et sa rigueur qui ont joué un rôle si important quand il a fallu calibrer l'appareillage EEG et mettre au

point les méthodes d'analyse du signal. Je remercie aussi les autres étudiants en License/ Master ou autre de l'équipe, qui sont passé par là, le temps de ma thèse et en particulier Vanessa CATTAUD, Christophe REY, Céline DERREUMAUX, Adel BEN-KRAIEM, Emilie DIA, Jean Arnaud BASILE, Antoine LEGOFF, Marie RIEUX, Fanny ROUMIER, Magali ALONZO, Falek ZAIDI.

Je remercie les personnels techniques et administratifs pour leur aide et leur grande sympathie et en particulier Stéphane FERRERE pour avoir construit une grande partie de mon matériel d'enregistrement EEG, Patrick ARRUFAT pour avoir construit mes câbles d'enregistrement EEG et pour tous ses conseils théoriques sur le courant électrique auxquels je ne pige toujours rien.

Je remercie aussi tous les membres (actuels ou anciens) des autres équipes du CRCA et en particulier Martin GIURFA et les étudiants Daniel CALOVI, Sarah ARGANDA-CARRERAS, Sofia BOUCHEBTI, Fabien DEMARES et Sepideh BAZAZI.

Je remercie aussi très fort les amis du CBD pour les parenthèses hors-labo : Aurélie MILLET, Manon MOULIS, Camille TEMPESTA, Isabelle LOURADOUR, Thomas DELERUE, Frédéric BONNET, Dorian FARACHE, Marion MILLER et les autres que j'oublie.

Je remercie ma famille et surtout Julien d'être entré dans ma vie et de m'avoir soutenu tout au long de cette thèse.

Merci à tous !

PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

DES Innovation Pharmaceutique et Recherche

Travail de thèse publié :

Charlotte Bezzina, Laure Verret, Hélène Halley, Lionel Dahan* and Claire Rampon*. Environmental enrichment does not influence hypersynchronous network activity in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *Front Aging Neurosci.* 2015 Sep 23;7:178. doi: 10.3389/fnagi.2015.00178. eCollection 2015.

Charlotte Bezzina, Laure Verret, Cécile Juan, Jessica Remaud, Hélène Halley, Claire Rampon* and Lionel Dahan*. Early onset of hypersynchronous network activity and expression of a marker of chronic seizures in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *Plos One*, 2015 Mar 13;10(3):e0119910

Charlotte Bezzina et Claire Rampon, Réserve cérébrale et réserve cognitive dans la maladie d'Alzheimer : l'apport des modèles murins. *La Revue de Neuropsychologie*, 2013 ; 5 (4) : 293-7

Travaux de thèse présentés lors de congrès scientifiques nationaux

Charlotte Bezzina, Cécile Juan, Alice Krezymon, Hélène Halley, Jean-Michel Lassalle, Laure Verret, Claire Rampon and Lionel Dahan "Impact of early environmental enrichment on epileptic phenotype in Tg2576 (APPswe) mice, a mouse model of Alzheimer's disease. " présenté au 11° colloque de la Société des Neurosciences, Lyon 21-24 mai 2013

Charlotte Bezzina, Laure Verret, Cécile Juan, Jessica Remaud, Hélène Halley, Claire Rampon and Lionel Dahan. "Early onset of epileptic phenotype in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease", présentation orale courte au congrès GDR NeuroMem à Grasse le 15/05/2014

Financement:

Agence Régionale de Santé d'Aquitaine- Salaire d'interne en pharmacie

Encadrements de stages

Janvier –mai 2013 : Cécile Juan (M2, 5 mois). Sujet : Activité épileptique et effet de l'environnement enrichi chez des souris Tg2576 (APP^{Swe}), modèles de la maladie d'Alzheimer (Mise en place des enregistrements EEG et détection des pointes interictales)

Juillet-Aout 2013 : Emmeline Di Donato (M1 médecine, 3 semaines).

Juillet 2013 : Marie Lods (M1, 1 mois) : Etude préliminaire électro-encéphalographique in vivo chez la souris saine et Tg2576 du rythme thêta hippocampique et de l'effet de l'enrichissement sur ce rythme

Résumé

La maladie d'Alzheimer (MA) se caractérise par une accumulation de peptide amyloïde et par un déclin progressif des capacités mnésiques, qui peuvent être modélisés par des lignées de souris transgéniques qui surexpriment une forme mutée du précurseur du peptide amyloïde. Un environnement cognitivement stimulant peut retarder le déclin mnésique chez les patients atteints de la MA. Notre équipe a montré qu'un enrichissement environnemental (EE) précoce améliore durablement les capacités mnésiques des souris Tg2576, modèle progressif de la MA. Cependant, les bases neurobiologiques sous-tendant le maintien des capacités mnésiques chez ces souris sont inconnues. Il est possible que l'EE prévienne certains événements pathologiques contribuant au déclin mnésique chez les souris Tg2576. Or, l'hypersynchronie neuronale est un événement précoce dans le décours de la MA qui pourrait jouer un rôle dans la dysfonction mnésique. En effet, les patients atteints de la MA et des souris modèles de la MA, autres que les souris Tg2576, présentent des crises d'épilepsie et l'administration d'antiépileptiques permet d'améliorer leurs performances mnésiques. Dans ce contexte, les objectifs principaux de ma thèse ont été : 1) de mettre en évidence une hypersynchronie neuronale chez les souris Tg2576, et d'en déterminer l'âge d'apparition par rapport aux premiers déficits mnésiques connus dans cette lignée 2) de déterminer si un enrichissement environnemental qui améliore durablement les performances mnésiques de ces souris réduit également cette hypersynchronie neuronale. Pour répondre à ces deux objectifs, nous avons évalué l'hypersynchronie neuronale de souris Tg2576 mâles à différents âges ainsi que celle de souris Tg2576 femelles ayant ou non été exposées à un enrichissement environnemental. Pour cela, nous avons mesuré la susceptibilité aux crises d'épilepsie induites par un agent proconvulsivant ainsi que la fréquence des pointes interictales sur l'électroencéphalogramme (EEG). Nous avons également recherché systématiquement la présence d'un marqueur de crises d'épilepsie : l'expression du neuropeptide Y dans les fibres moussues. Ce travail a permis de montrer qu'une hypersynchronie neuronale apparaît dès l'âge de 1,5 mois chez les souris Tg2576, avant leurs premiers déficits mnésiques, mais que l'enrichissement environnemental ne l'influence pas. En conclusion, mon travail de thèse a montré que l'hypersynchronie neuronale peut précéder le déclin mnésique chez les souris Tg2576 et que l'enrichissement environnemental permettrait plutôt de développer des stratégies cognitives alternatives que d'agir sur une altération de l'activité cérébrale telle que l'hypersynchronie neuronale.

Abstract

Alzheimer's disease (AD) is characterized by an accumulation of amyloid peptides and by a progressive memory loss. These AD features can be modeled in transgenic mouse lines that overexpress mutant forms of the amyloid precursor protein. Environmental cognitive stimulations can delay memory decline in AD patients. Our team showed that an early environmental enrichment (EE) durably improves memory performances in Tg2576 mice, a progressive model of AD. Nevertheless, the neurobiological processes underlying the maintenance of memory performances in these mice remain unknown. EE might prevent some pathological events that contribute to memory deficits in Tg2576 mice. Among them, we focused on neuronal hypersynchrony. Indeed, AD patients and related mouse models exhibit seizures and some antiepileptic treatments can improve their memory performances. In this context, the two principal aims of this work were: 1) to evidence neuronal hypersynchrony in Tg2576 mice and precise its onset relative to the onset of memory deficits in this mouse line, 2) to determine if an environmental enrichment protocol that durably improves memory performances in these mice is able to reduce neuronal hypersynchrony. To this purpose, we assessed neuronal hypersynchrony at different ages in Tg2576 males as well as in Tg2576 females housed in enriched or standard conditions. To this end, we measured seizure susceptibility to a proconvulsant agent and the frequency of spontaneous interictal spikes on electroencephalographic recordings (EEG). We also looked for a marker of chronic seizures: the expression of neuropeptide Y in mossy fibers. In this thesis, we evidenced that neuronal hypersynchrony appears as soon as 1.5 months of age in Tg2576 mice, before their first memory deficits but that environmental enrichment does not influence it. In conclusion, my thesis work showed that neuronal hypersynchrony precedes memory decline in Tg2576 mice and that environmental enrichment would rather promote the establishment of alternative cognitive strategies than preventing some alterations of brain neuronal activity such as neuronal hypersynchrony.

TABLES DES MATIERES

TABLES DES MATIERES

ABBREVIATIONS.....	15
INTRODUCTION GENERALE	19
I) La maladie d'Alzheimer	19
I.1) La mémoire.....	19
I.1.1) Définition et types de mémoire	19
I.1.2) Mesure des capacités mnésiques chez la souris.....	19
I.1.3) L'hippocampe, structure clé des processus mnésiques.....	20
I.1.3.1) Structure de l'hippocampe.....	20
I.1.3.2) Fonction mnésique de l'hippocampe.....	21
I. 2) La maladie d'Alzheimer	23
I.2.1) Historique et épidémiologie.....	23
I.2.2) Les symptômes cliniques de la MA	23
I.2.3) Les altérations structurales dans la MA	26
I.2.3.1) L'atrophie cérébrale	26
I.2.3.2) Les plaques séniles	26
I.2.3.3) Les dégénérescences neurofibrillaires	27
I.2.4) Bases moléculaires de la maladie d'Alzheimer: les hypothèses alternatives amyloïde et tau.....	28
I.2.4.1) Hypothèse amyloïde.....	28
I.2.4.2) La protéine Tau dans la MA.....	32
I.2.5) Les différents modèles de la MA.....	32
I.2.5.1) Vue d'ensemble des différents modèles animaux de la MA.....	32
I.2.5.2) Le modèle murin de la MA utilisé dans cette thèse : les souris Tg2576	34
II) L'épilepsie, trouble de la synchronie neuronale	37
II.1) Définition.....	37
II.2) Etiologie de l'épilepsie.....	37
II.3) Expression électroencéphalographique et clinique des hypersynchronies neuronales.....	38
II.4) Les hypersynchronies neuronales : bases neurobiologiques.....	39
II.5) Modifications structurales et moléculaires de l'hippocampe au cours de l'épileptogénèse.....	40
II.5.1) Vue d'ensemble des modifications hippocampiques dans un contexte d'épilepsie	40
II.5.2) Modifications de l'expression du neuropeptide Y et autres modifications cellulaires liées	41

II.5.3) Modification d'expression de la calbindine dans l'épilepsie.....	42
II.6) Impact mnésique de l'épilepsie.....	43
III) L'épilepsie dans la MA.....	44
III.1) Données épidémiologiques sur les crises d'épilepsie dans la MA	45
III.1.1) Prévalence des crises d'épilepsie dans les formes sporadique et familiale.....	45
III.1.2) Type de crises et prévalence des anomalies épileptiformes interictales	46
III.1.3) Problèmes méthodologiques des études sur l'épilepsie dans la MA.....	46
III.2) Le phénotype épileptique décrit chez les souris modèles de la MA	47
III.2.1) Susceptibilité aux crises induites.....	47
III.2.2) Fréquence des crises d'épilepsie chez les souris modèles de la MA.....	47
III.2.3) Type de crises	48
III.2.4) Anomalies épileptiformes	48
III.2.5) Marqueurs protéiques d'épilepsie	49
III.3) Mécanismes cellulaires de l'hypersynchronie neuronale dans la MA	51
III.3.1) Altération de l'excitabilité neuronale chez les souris modèles de la MA.....	51
III.3.2) Altération des interneurons	52
III.3.3) Réponse aux antiépileptiques	54
III.3.4) Quels acteurs de la physiopathologie de la MA pourraient être en cause dans l'altération de l'activité neuronale ?	55
III.4) Lien entre l'hypersynchronie neuronale et troubles cognitifs dans la MA	57
IV) Le concept de réserve cognitive et l'enrichissement environnemental.....	59
IV.1) Historique et études épidémiologiques.....	59
IV.2) Concepts de réserve cérébrale et de réserve cognitive.....	60
IV.3) Modélisation de la réserve cognitive chez l'animal	61
IV.4) Effets cellulaires et moléculaires de l'EE.....	62
IV.5) Effets de l'EE sur la mémoire chez les modèles murins de la MA.....	63
IV.6) Effets de l'EE sur les crises d'épilepsie	64
OBJECTIFS	69
MATERIELS ET METHODES	73
I) Animaux.....	73
II) Enrichissement environnemental	74
III) Evaluation comportementale de la susceptibilité aux crises d'épilepsie induites par le pentylentétrazole	75
IV) Immunohistochimie du neuropeptide Y dans l'hippocampe	76
IV.1) Perfusion intracardiaque.....	76

IV.2) Obtention et conservation des coupes histologiques.....	76
IV.3) Immunohistochimie	77
IV.4) Interprétation de l'immunohistochimie NPY	78
V) Enregistrements électro-encéphalographiques (EEG) <i>in vivo</i>	79
V.1) Fabrication des électrodes	79
V.2) Anesthésie / Chirurgie.....	80
V.2.1) Anesthésie à l'hydrate de chloral.....	80
V.2.2) Anesthésie gazeuse	80
V.3) Enregistrements EEG.....	82
V.4) Détection des pointes interictales	84
VI) Analyses statistiques	85
RESULTATS.....	87
CHAPITRE I : Apparition précoce de l'hypersynchronie neuronale chez les souris Tg2576.....	91
I.1) Introduction.....	91
I.2) Manuscrit publié	91
CHAPITRE II : Effet de l'enrichissement environnemental sur l'hypersynchronie neuronale chez les souris Tg2576	109
II.1) Introduction.....	109
II.2) Manuscrit publié	110
II.3) Résultats complémentaires.....	119
DISCUSSION GENERALE	125
I) L'hypersynchronie neuronale dans les modèles murins de la MA : mise en perspective du modèle Tg2576.....	126
II) Que nous apprend le modèle Tg2576 sur le rôle de l'hypersynchronie neuronale dans les troubles mnésiques ?	129
III) L'effet de l'enrichissement environnemental sur l'hypersynchronie neuronale des souris Tg2576131	
IV) Que nous apprennent ces modèles murins sur l'hypersynchronie neuronale dans la MA chez l'homme ?.....	132
V) Le lévétiracétam, perspective thérapeutique de la maladie d'Alzheimer ?	134
VI) Conclusion générale de cette thèse.....	135
BIBLIOGRAPHIE.....	137
ANNEXES.....	155
Bezzina et Rampon, 2014 : Réserve cérébrale et réserve cognitive dans la maladie d'Alzheimer : l'apport des modèles murins.....	157

ABBREVIATIONS

A β : Peptide β amyloïde

APP : Protéine Précurseur du peptide amyloïde

Arc : Activity Regulated Cytoskeletal –associated protein

CA1/2/3: Cornes d'Ammon 1/2/3

CB: calbindine

DG: Gyrus denté

EE : Enrichissement environnemental

EEG : Electroencéphalographie

GCL ou CG : couche granulaire du gyrus denté

IP: intra-péritonéal

IRMf: Imagerie par Résonance Magnétique fonctionnelle

LTP : Potentialisation à long terme

MA : Maladie d'Alzheimer

MCI : Mild Cognitive Impairment

ML ou CML : Couche moléculaire du gyrus denté

NPY : Neuropeptide Y

NTg : Non transgénique

PIB : Pittsburgh Compound B

PS: Préséniline

PV: Parvalbumine

SE: *Status Epilepticus*

SOM: somatostatine

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

I) La maladie d'Alzheimer

I.1) La mémoire

J'exposerai tout d'abord des notions de base sur la fonction mnésique et l'hippocampe, l'un des principaux sièges des processus mnésiques, tous deux perturbés dans la maladie d'Alzheimer.

I.1.1) Définition et types de mémoire

D'après l'encyclopédie Larousse, les facultés cognitives correspondent à l'ensemble des processus mentaux impliqués dans la connaissance, tels que la mémoire, le langage, le raisonnement, l'apprentissage, l'intelligence, la résolution de problèmes, la prise de décision, la perception ou l'attention.

La fonction de mémoire regroupe différentes capacités. La mémoire déclarative, ou mémoire explicite, fait référence au stockage et la récupération d'informations qui peuvent être restituées par le langage. Elle s'oppose à la mémoire procédurale qui permet l'acquisition et l'utilisation de compétences motrices, comme savoir coudre ou faire ses lacets. Il existe deux types de mémoire déclarative : la mémoire sémantique, mémoire des faits et des concepts théoriques qui n'a pas de lien avec le temps et l'espace (exemple: savoir qu'un abricot est un "fruit") et la mémoire épisodique, grâce à laquelle on se souvient des événements vécus avec leur contexte (date, lieu, état émotionnel).

I.1.2) Mesure des capacités mnésiques chez la souris

Chez la souris, les performances de mémoire peuvent être testées à l'aide de différents dispositifs expérimentaux adaptés au type de mémoire à évaluer (mémoire sémantique/épisodique, mémoire à court terme/long-terme). Le but, ici, n'est pas de décrire le protocole de tous les tests existants mais plutôt d'évoquer les tests dont je reparlerai souvent dans ce mémoire. Par exemple, le test de la piscine de Morris évalue la mémoire spatiale, hippocampo-dépendante. Placée dans une piscine dont l'eau est opaque, la souris doit nager pour trouver une plateforme cachée (immergée) qui lui permettra de sortir de l'eau. Cet exercice est répété plusieurs fois, sur plusieurs jours. La souris apprend à se repérer dans la piscine grâce à des indices distaux (par exemple des indices visuels disposés autour de la piscine) et au fur et à mesure des essais, sa latence à trouver la plateforme diminue (signe d'un apprentissage correct). A la fin de la période d'apprentissage, la souris est replacée dans la piscine où la plateforme a été retirée et le temps passé dans chacun des 4 quadrants virtuels de la piscine est mesuré. Dans cette phase de rappel mnésique (récupération d'informations apprises), si la souris passe

plus de temps dans le quadrant où se trouvait la plateforme, cela signifie qu'elle a appris l'emplacement de la plateforme et a formé une mémoire à long terme. D'autres types de tests de mémoire sont classiquement utilisés: test de reconnaissance d'objets (apprendre à discriminer 2 objets distincts), test de conditionnement de peur au contexte (apprendre à associer un environnement à la survenue de choc électrique sur les pattes) etc.

1.1.3) L'hippocampe, structure clé des processus mnésiques

1.1.3.1) Structure de l'hippocampe

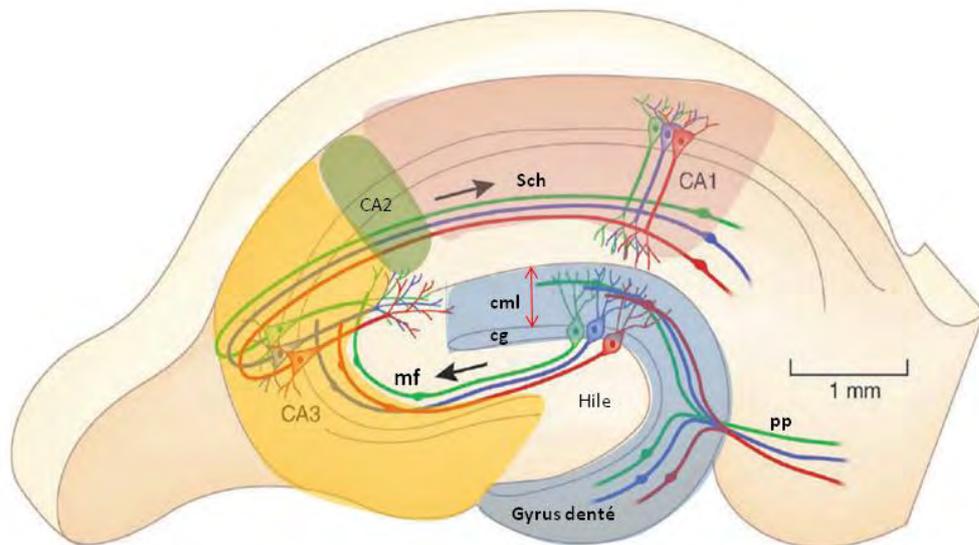


Figure 1: Structure interne de l'hippocampe

Schéma d'un hippocampe de souris (la structure est la même chez l'homme). Abréviations : CA : Corne d'Ammon; pp : voie perforante; Sch: collatérales de Schaffer; mf : fibres moussues; cml : couche moléculaire; cg : couche granulaire. En bleu : gyrus denté; en jaune : CA3; en vert : CA2; en rouge : CA1. (Adapted from [1])

L'hippocampe est une région située dans le lobe temporal médian chez l'homme et il est situé juste sous le cortex pariétal chez la souris. Il est constitué d'un circuit trisynaptique, initialement décrit par Ramon y Cajal [2] (Figure 1). Trois principales régions interconnectées entre elles le composent : le gyrus denté, la Corne d'Ammon 1 (CA1) et la Corne d'Ammon 3 (CA3). Il existe aussi, entre CA1 et CA3, une région CA2, dont le rôle est encore mal connu. Le gyrus denté reçoit des afférences sensorielles du cortex entorhinal, rassemblées sous le nom de « voie perforante ». Le gyrus denté se compose de trois couches anatomiques : la « couche granulaire » composée des noyaux des cellules granulaires, la « couche moléculaire » composée des dendrites des cellules granulaires et des axones des

interneurones qui projettent sur ces dernières et la couche sous-grulaire composée des corps cellulaires de certains types d'interneurones et des cellules souches en prolifération, précurseurs de neurones ou de cellules gliales. Le hile est la région située entre les deux lames du gyrus denté (inférieure et supérieure) et se compose de diverses classes d'interneurones et des cellules moussues. Les cellules granulaires du gyrus denté se projettent sur les cellules pyramidales de CA3 par leurs axones appelés fibres moussues. Puis, les cellules pyramidales de CA3 projettent à leur tour sur les cellules pyramidales de CA1, via les collatérales de Schaffer. D'autres connexions avec ces trois régions existent mais elles sont minoritaires et sortent du cadre de mon travail.

Dans chaque région de l'hippocampe, l'activité des neurones excitateurs est finement régulée par des interneurones GABAergiques inhibiteurs. Il existe une grande diversité d'interneurones GABAergiques dans l'hippocampe, comme dans le cortex, qui se différencient notamment par le type de cellule qu'ils contactent (neurone exciteur ou neurone GABAergique), la zone de projection sur le neurone cible (dendrite ou corps cellulaire) et par leurs propriétés fonctionnelles (fréquence de leurs potentiels d'action par exemple) qui dépendent notamment des peptides (somatostatine, Peptide Vasoactif Intestinal, cholécystokinine, neuropeptide Y) et tampons calciques (calbindine, parvalbumine) qu'ils expriment [3]. Ces différentes caractéristiques confèrent des fonctions différentes à chaque type d'interneurones. Les interneurones permettent la coordination et la synchronisation de l'activité d'ensembles neuronaux, donnant naissance aux oscillations cérébrales importantes dans de nombreux processus cognitifs. Par exemple, les interneurones en panier exprimant la parvalbumine (senseur calcique) déchargent des potentiels d'action à haute fréquence ce qui permet l'émergence d'oscillations rapides, les oscillations gamma (fréquence comprise entre 30 et 100 Hz) impliquées dans les processus mnésiques hippocampiques [4].

I.1.3.2) Fonction mnésique de l'hippocampe

L'hippocampe joue un rôle central dans la mémoire épisodique. Les informations sensorielles qui se rapportent à l'évènement et son contexte arrivent au niveau du gyrus denté par les afférences du cortex entorhinal. La fonction du gyrus denté serait de coder cet évènement de façon unique, par l'activation d'un groupe spécifique de cellules granulaires, pour permettre de le distinguer de tout autre évènement même similaire [5]. Les régions CA3 et CA1 seraient ensuite impliquées dans le codage de la chronologie des positions spatiales du sujet au cours de l'évènement (à tel moment je suis à tel endroit : dimension temporelle et spatiale de l'évènement) [6]. A chaque évènement de notre vie, l'hippocampe crée donc une trace mnésique de l'évènement : activation de populations cellulaires spécifiques dans chaque région de l'hippocampe (code). Mais comment l'hippocampe permet-il la persistance à plus ou moins long-terme de cette trace mnésique ? Le maintien de la trace mnésique

repose sur la faculté des neurones à se modifier en fonction de l'expérience du sujet : c'est ce qu'on appelle la plasticité. Il existe différents types de plasticité, comme la plasticité synaptique ou la neurogenèse hippocampique adulte.

La synapse est constituée de l'élément pré-synaptique qui libère le neurotransmetteur et de l'élément post-synaptique qui répond à l'action du neurotransmetteur sur ses récepteurs, ce qui génère des potentiels excitateurs post-synaptiques (entrées et sorties d'ions qui modifient localement le potentiel membranaire au niveau dendritique et se propagent). Lorsqu'une synapse glutamatergique a été activée une première fois, le neurone post-synaptique recrute davantage de récepteurs glutamatergiques (AMPA et NMDA) au niveau de l'élément post-synaptique afin d'augmenter la transmission synaptique au cas où la synapse serait de nouveau sollicitée. Si cette synapse est de nouveau activée, des modifications géniques vont favoriser la transcription protéique des récepteurs glutamatergiques et de protéines structurantes pour la synapse. Cette plasticité synaptique qui augmente la transmission synaptique peut perdurer dans le temps, se traduisant parfois par un élargissement des bourgeons dendritiques qui isolent chaque synapse (épine dendritique). C'est ce qu'on appelle la potentialisation à long-terme (LTP, long-term potentiation) et qui serait l'une des bases neurobiologiques de la mémoire à long-terme. Le phénomène inverse s'appelle dépression à long-terme (LTD, long-term depression).

La neurogenèse (production de nouveaux neurones) se produit essentiellement pendant le développement embryonnaire mais persiste dans des zones cérébrales spécifiques à l'âge adulte, principalement dans l'hippocampe. Sous la couche granulaire du gyrus denté (zone sous-granulaire), des cellules souches proliférantes vont donner naissance à des progéniteurs astrocytaires ou neuronaux. Les progéniteurs neuronaux vont se différencier en neurone immature. Au cours de la maturation du neurone, son arborisation dendritique se développe [7] et la taille de l'axone augmente [8]. D'autre part, le neurone est fonctionnellement intégré au réseau neuronal local, ce qui assure sa survie, par formation de contacts synaptiques avec les afférences du cortex entorhinal et les interneurons locaux [9]. La neurogenèse permettrait d'actualiser et renforcer une mémoire spatiale [10] et serait également impliquée dans la formation de traces mnésiques distinctes de deux événements similaires mais différents (séparation de patrons) [11, 12].

I. 2) La maladie d'Alzheimer

1.2.1) Historique et épidémiologie

La maladie d'Alzheimer a été décrite pour la première fois par Alois Alzheimer en 1906 lors d'une conférence à Tübingen en Allemagne, puis nommée Maladie d'Alzheimer en 1910 par Kraepelin. Alois y décrit le cas de sa défunte patiente, Auguste D. qui présente à 51 ans, diverses perturbations cognitives, une désorientation, une aphasie, des idées délirantes et un comportement imprévisible. A.D mourut 4.5 ans après le début de ses symptômes, montrant à l'examen histopathologique *post mortem* une atrophie diffuse du cerveau, la présence d'agrégats diffus (plaques amyloïdes) entre les neurones et de faisceaux denses de neurofibrilles qui sont aujourd'hui encore les marqueurs typiques de cette maladie [13].

Parmi les différentes maladies neurodégénératives, la MA est une des premières causes de démence chez l'adulte dans les pays industrialisés. En France, la MA touche actuellement 850 000 personnes et on dénombre environ 220 000 nouveaux cas par an (d'après des données épidémiologiques françaises issues de l'étude PAQUID et de l'association France Alzheimer). Le pourcentage de la population malade augmente régulièrement avec l'âge qui est un facteur de risque majeur : 0,6% entre 65-69 ans jusqu'à 22,2% après 90 ans. Selon l'INSEE, la prévalence de la maladie d'Alzheimer sera de 1,3 millions de français en 2020. La prévalence et la charge économique et sociale que la MA fait peser sur la société en font un enjeu majeur de santé publique. On distingue actuellement deux formes de MA, la forme sporadique et la forme familiale. La forme familiale est une forme génétique le plus souvent due à des mutations du précurseur du peptide amyloïde (APP) ou des présénilines (PS1 ou PS2), enzymes impliquées dans le clivage de l'APP [14-17]. Dans ces formes familiales, l'altération des fonctions cognitives apparaît plus précocement (avant l'âge de 60 ans) et progresse plus rapidement. La forme sporadique, d'origine multifactorielle, concerne plus de 99 % des cas. L'âge est considéré comme le principal facteur de risque de cette forme sporadique. En effet, le risque de déclarer la MA double par tranche d'âge de 5 ans, au-delà de 65 ans [18]. Les autres facteurs de risque de la MA sont le déficit oestrogénique post-ménopausique [19], les antécédents de traumatisme cérébral [20] et les maladies vasculaires comme l'hypercholestérolémie, l'hypertension, l'athérosclérose, les maladies coronaires, la consommation de tabac, l'obésité et le diabète [21].

1.2.2) Les symptômes cliniques de la MA

La MA se caractérise par une diminution progressive des capacités cognitives (démence) associée à des troubles psycho-comportementaux. La maladie conduit les patients à la dépendance puis à la mort. La durée moyenne de survie est de 8 à 15 ans à partir du diagnostic.

Symptôme central de la maladie d'Alzheimer, les atteintes cognitives sont difficiles à diagnostiquer au début car elles se développent à bas bruit et évoluent progressivement [22]. Un déficit de la mémoire épisodique est l'un des premiers troubles, pouvant même être détecté avant le diagnostic de la MA [23]. La détermination de la nature spécifique du trouble de la mémoire (capacité d'apprentissage (antérograde) ou de se rappeler une information (rétrograde)) est nécessaire pour poser un diagnostic de MA, et se fait notamment grâce à des questionnaires neuropsychologiques et à l'examen clinique. Parmi ces tests neuropsychologiques, le test MMSE (Mini Mental State Examination) est l'un des tests de « screening » cognitif le plus utilisé, aussi bien en clinique qu'en recherche [24]. Il permet d'évaluer les capacités d'orientation du patient dans le temps et l'espace, l'apprentissage, l'attention, le langage, la mémoire à court terme et la praxie constructive [25]. Comme l'illustre la Figure 2, les résultats obtenus au MMSE, en parallèle d'un examen clinique du patient, mettent en évidence :

☒☒ une désorientation spatio-temporelle précoce. Le patient perd le sens de l'orientation et se perd de plus en plus souvent, même dans l'environnement familial [22].

☒☒ des troubles du langage (aphasie) qui se caractérisent par une difficulté à trouver les bons mots, et par conséquent, qui induisent un manque de précision dans les propos [22].

Les différents types de troubles qui vont s'aggraver progressivement sont:

☒☒ des troubles du geste (apraxie), caractérisés par l'incapacité d'exécuter les tâches bi-manuelles les plus simples. L'apraxie est handicapante puisqu'elle touche l'exécution des tâches de la vie quotidienne [22].

☒☒ des atteintes des fonctions exécutives, en particulier le patient va présenter une altération de son raisonnement, de son jugement, de ses capacités à résoudre des problèmes [22].

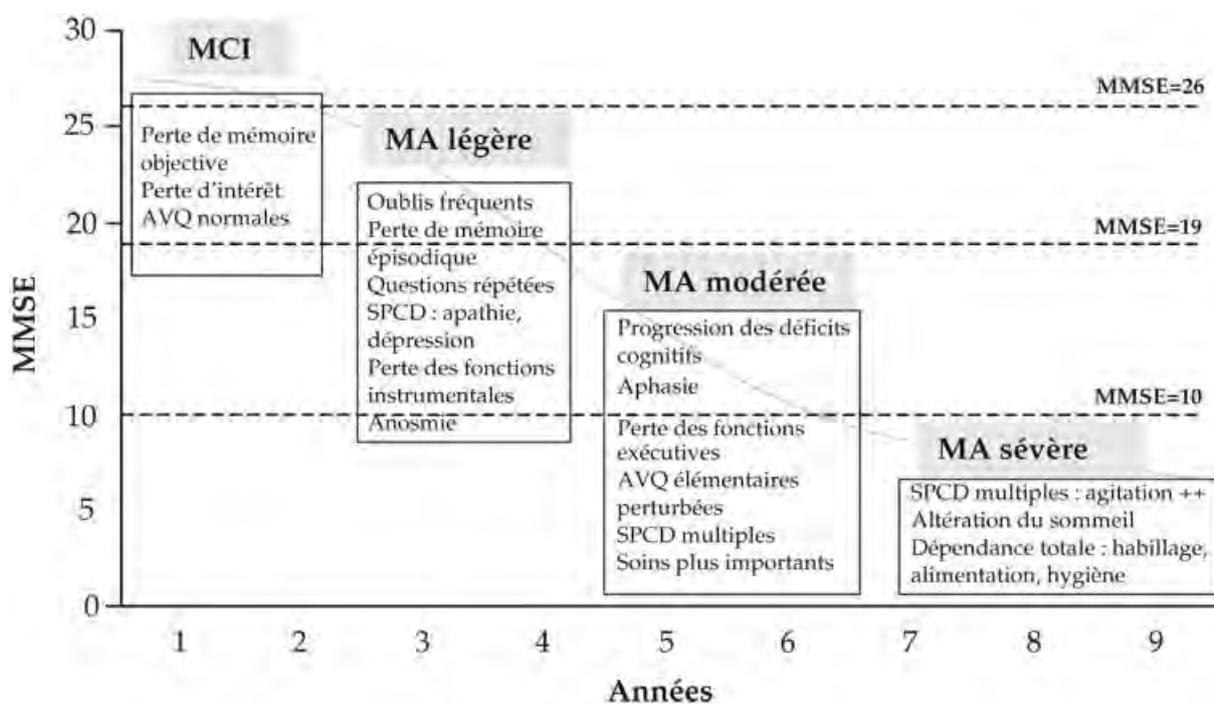


Figure 2: Progression des symptômes de la maladie d'Alzheimer.

MMSE : Mini Mental State Examination ; MCI: Mild Cognitive Impairment ; MA: Maladie d'Alzheimer ; AVQ: Activités de la vie quotidienne ; SPCD: Symptômes psychologiques et comportementaux de démences. [26].

Apparaissent ensuite des atteintes neuropsychiatriques diverses comme une agressivité, une agitation, des troubles dépressifs, des troubles du sommeil et l'utilisation d'un langage parfois ordurier. Ceci est ensuite accompagné d'hallucinations, de paranoïa, d'une désinhibition comportementale et d'une altération profonde de la personnalité [26]. Ce tableau clinique de la MA est très hétérogène au sein de la population. Par exemple, certains patients présentent pendant longtemps des troubles mnésiques isolés tandis que d'autres, présentent préférentiellement des troubles marqués du langage, de la perception ou de la préhension avec des troubles mnésiques très discrets. Ces hétérogénéités pourraient avoir diverses origines comme l'histoire familiale, l'âge d'apparition des troubles, et le polymorphisme génétique de l'apolipoprotéine E [27]. Face à la diversité des troubles cognitifs observés dans les premiers stades de la MA, l'utilisation de batterie de tests neuropsychologiques a permis de définir un stade intermédiaire entre le vieillissement normal et pathologique, celui des atteintes cognitives légères (ou MCI- Mild Cognitive Impairment). Au sein de la population MCI, le taux de progression vers le stade démentiel de la maladie d'Alzheimer est de 10 à 15 % par an [28]. Aussi, ces sujets MCI constituent une population intéressante pour comprendre les processus physiopathologiques de la MA et pour tenter d'en identifier les marqueurs précoces. Devant l'échec des traitements actuels utilisés dans la MA, la nécessité de disposer d'un traitement précoce de la maladie a accru l'intérêt de la communauté scientifique pour l'étude des phases précoces de la MA.

1.2.3) Les altérations structurales dans la MA

La maladie d'Alzheimer se caractérise par trois lésions histologiques cérébrales caractéristiques, visibles à l'examen *post-mortem*: l'atrophie cérébrale, les dégénérescences neurofibrillaires et les plaques séniles [29]. Initialement observées par Alois Alzheimer en 1907, ces lésions sont toujours considérées comme les principales signatures histo-pathologiques de la MA utilisées pour confirmer le diagnostic clinique. Cependant, la distribution de ces lésions peut varier en fonction des individus et être associée à différentes présentations cliniques suggérant qu'il existerait plusieurs sous-types de maladie d'Alzheimer [30].

1.2.3.1) L'atrophie cérébrale

Chez les patients atteints de la MA, l'atrophie cérébrale observée en *post mortem* se traduit par un amincissement du cortex entraînant un élargissement des ventricules [29] et des sillons corticaux. Si l'atrophie cérébrale peut être observée chez les sujets âgés sains, le taux annuel d'atrophie cérébrale de 2 à 3 % dans la MA est supérieur à celui du vieillissement cérébral normal [31]. Aujourd'hui, l'atrophie cérébrale peut être mise en évidence et suivie dans le temps par imagerie *in vivo* [31]. La mesure de l'épaisseur corticale en IRM permet de détecter une atrophie corticale dès le stade de MCI et prédire la progression du stade MCI vers la MA [32].

Cette atrophie provient d'une neurodégénérescence et touche particulièrement l'hippocampe [29] et le cortex associatif temporo-pariéto-occipital, des régions respectivement impliquées dans la mémoire et le langage (Figure 3). Cette neurodégénérescence entraîne un dysfonctionnement de ces structures et participe donc aux troubles cognitifs observés dans la MA. Ces pertes neuronales touchent particulièrement les neurones cholinergiques [33]. Ainsi, les traitements actuels de la MA, symptomatiques mais non curatifs, ont pour mécanisme d'action l'inhibition de l'enzyme de dégradation de l'acétylcholine, l'acétylcholinestérase, ce sont les anti-cholinestérasiques. Ils entraînent donc une augmentation des concentrations extracellulaires d'acétylcholine mais leur efficacité est limitée dans le temps [34], compte tenu de la mort inexorable des neurones cholinergiques.

1.2.3.2) Les plaques séniles

Historiquement, les plaques séniles ont été l'un des premiers marqueurs caractéristiques de la MA. Ces plaques séniles sont formées de dépôts extracellulaires compacts et sphériques de peptide β -amyloïde (ou peptide A β) [34] qui forme des fibrilles longues et insolubles [35] (Figure 4). Le peptide amyloïde retrouvé au niveau des plaques est principalement constitué de 40 acides aminés (A β 40) ou de 42 acides aminés (A β 42). Des axones en dégénérescence chargés de protéines Tau ainsi qu'une réaction inflammatoire locale sont visibles à la périphérie des plaques [34]. Les plaques amyloïdes

apparaissent d'abord dans le cortex frontal puis s'étendent aux différentes régions corticales [36]. Bien que l'étiologie de la MA reste incomprise, pendant de nombreuses années, l'agrégation du peptide amyloïde en plaques séniles a été considéré comme l'une des principales causes des atteintes cérébrales et des déficits cognitifs de la MA (hypothèse de la cascade amyloïde ; [37]). Toutefois, on pense aujourd'hui qu'un rôle crucial dans l'étiologie de la MA est joué par les formes circulantes du peptide amyloïde, qui sont les précurseurs des plaques [38].



Figure 3: Dessins de coupes coronales de cerveau humain sain (gauche) et atteint de la MA (droite) illustrant l'atrophie cérébrale caractéristique de la pathologie. (<http://media.clinicaladvisor.com>)

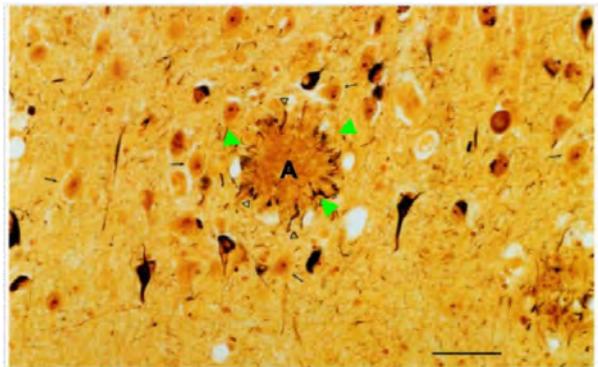


Figure 4: Photographie d'une plaque sénile

(au centre), marqueur histopathologique de la MA, révélée ici par marquage au nitrate d'argent (barre d'échelle 50 μm) sur une coupe de cerveau d'un patient atteint de la MA. Le marquage noir révèle la présence de neurofibrilles dans le cytoplasme des neurones pyramidaux. Au centre de l'image, la plaque sénile est composée d'un dépôt compact d'amyloïde extracellulaire (A) entouré d'un halo de neurites dystrophiques (têtes de flèches vertes) [34].

1.2.3.3) Les dégénérescences neurofibrillaires

Les dégénérescences neurofibrillaires (ou DNF) sont des lésions cérébrales caractéristiques de la MA (Figure 5). Ce sont des filaments protéiques appariés en hélice, qui s'accumulent dans le corps cellulaire des neurones [34, 39]. Les filaments sont composés de protéines Tau anormalement phosphorylées [40, 41]. Au cours de la maladie, les dégénérescences neurofibrillaires sont initialement observées dans le cortex entorhinal puis dans l'hippocampe et enfin les régions corticales associatives

[42]. Selon l'hypothèse de Wang et al, les agressions cellulaires telles que le stress oxydant déclenche normalement un processus d'apoptose dans le neurone endommagé, qui dans la MA, serait compromis par l'hyperphosphorylation de Tau, entraînant la dégénérescence progressive de ce neurone [43].

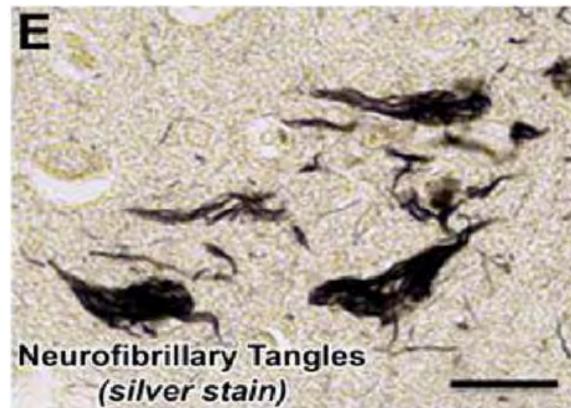


Figure 5: Illustration d'un marqueur histopathologique de la MA : les dégénérescences neurofibrillaires révélées ici avec un marquage à l'imprégnation argentique sur une coupe de cerveau d'une personne atteinte de la MA. [44].

1.2.4) Bases moléculaires de la maladie d'Alzheimer: les hypothèses alternatives amyloïde et tau

1.2.4.1) Hypothèse amyloïde

L'APP est une glycoprotéine transmembranaire composée d'une large partie extracellulaire et d'un petit domaine intra-cytoplasmique. Son gène est localisé sur le chromosome 21, et l'épissage alternatif de son pré-ARNm produit différentes isoformes de l'APP. L'isoforme de 695 acides aminés, appelée APP695, est prédominante dans le cerveau [45] et reste la forme la plus étudiée dans la MA.

a) Le clivage protéolytique de l'APP

L'APP serait impliqué dans des fonctions physiologiques telles que la migration neuronale, la croissance des dendrites ou la synaptogenèse [46]. Le rôle de l'APP est encore mal connu dans la MA et il reste à déterminer la contribution respective de sa forme entière et de ses fragments sécrétés, issus de son métabolisme, dans les perturbations cellulaires de la MA. La protéine APP mature est métabolisée par deux voies distinctes : une voie majoritaire (ou non-amyloïdogène), considérée comme bénéfique car ne produisant pas de peptide A β , et une voie minoritaire (ou amyloïdogène) produisant de l'A β et impliquée dans la pathologie (Figure 6). Ces deux voies se distinguent principalement par les enzymes impliquées dans le clivage de l'APP et par les métabolites produits. La voie constitutive (ou non-

amyloïdogène) est caractérisée par deux clivages : par l'α-sécrétase (Figure 6, à gauche) puis par la γ-sécrétase. La voie alternative (ou amyloïdogène) génère le peptide amyloïde par le clivage de l'APP par la β-sécrétase (enzyme aussi appelée BACE-1 pour β-site APP Cleaving Enzyme 1) et la γ-sécrétase (Figure 6, à droite). Dans cette voie, le clivage de l'APP par la β-sécrétase libère la partie APP soluble β (sAPPβ), et le fragment transmembranaire C99. Ce dernier est clivé par la γ-sécrétase qui libère le fragment intracellulaire AICD et le peptide Aβ [47, 48].

Le peptide Aβ est présent majoritairement sous la forme de 40 acides aminés (Aβ1-40 ou Aβ40) chez l'individu sain et atteint de la MA, et une forme minoritaire de 42 acides aminés (Aβ1-42 ou Aβ42) servirait d'amorce pour la polymérisation du peptide amyloïde. Le peptide amyloïde d'abord isolé va donc se polymériser en formant des assemblages de plus en plus longs (des dimères, trimères jusqu'aux polymères à n unités). In fine, les polymères vont s'organiser en fibrilles insolubles qui vont s'agréger pour former les plaques amyloïdes [38]. Autour des plaques amyloïdes, du peptide amyloïde circulant « soluble » reste en équilibre avec les formes insolubles de la plaque. J'appellerai « amyloïdopathie », l'ensemble des événements liés à l'accumulation du peptide amyloïde, de la production du peptide amyloïde monomérique à sa polymérisation et son agrégation sous forme de plaques.

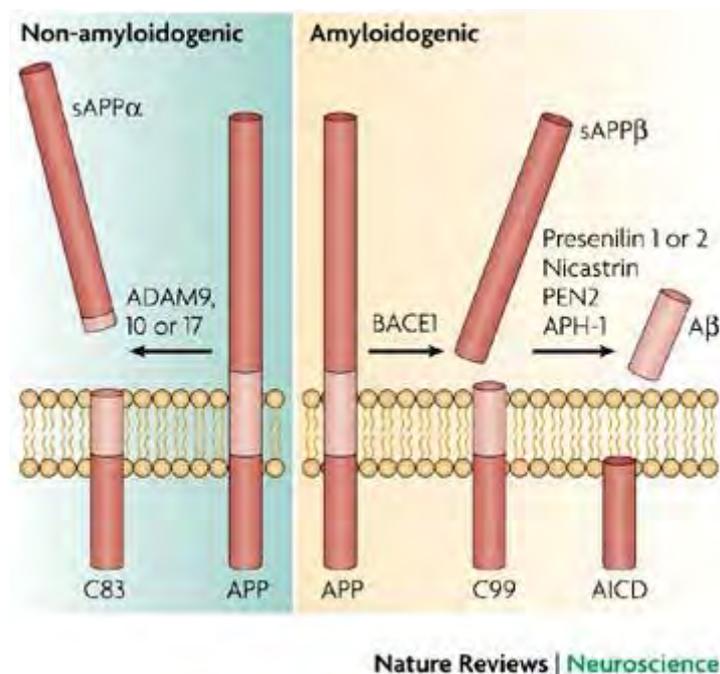


Figure 6: Schéma des voies amyloïdogènes et non amyloïdogènes.

Dans la voie non-amyloïdogène neuroprotectrice, le clivage de l'APP par l'α-sécrétase (ADAM10 ou 17) libère l'APPα. Dans la voie amyloïdogène, le clivage de l'APP par la β-sécrétase (BACE1) et la γ-sécrétase (composée de la nicastrine, l'APH1, la PEN2 et la préséniline 1 ou 2) libère l'APPβ soluble puis le peptide amyloïde qui

s'oligomérisent et s'accumulent pour former les plaques amyloïdes. AICD : domaine intracellulaire de l'APP, sAPP : fragments solubles de l'APP ; C83, 99 : fragments C-terminaux [49]

b) Les présénilines et l'activité γ -sécrétase

La γ -sécrétase est un complexe protéique multimérique. De multiples protéines membranaires, telles que la Nicastrine, l'Aph-1, la Pen-2 et les présénilines 1 et 2 participent à la formation et semblent nécessaires à l'activité du complexe γ -sécrétase [50, 51]. Les présénilines 1 et 2 (PS1, PS2), peuvent présenter des mutations qui sont impliquées dans les différentes formes familiales précoces de la MA [14]. Les mutations sur les gènes des présénilines 1 et 2 conduisent à une surproduction du peptide A β -42 [52]. Il a été mis en évidence que la mutation de PS1 peut fortement potentialiser les effets d'une mutation de l'APP, en accélérant la formation des plaques [53].

c) Historique de la cascade amyloïde

Depuis une vingtaine d'années, de nombreuses hypothèses ont été proposées pour tenter d'expliquer les mécanismes cellulaires et moléculaires liés au développement de la MA. Initialement, Hardy et Higgins proposèrent l'hypothèse de la cascade amyloïde, selon laquelle l'accumulation du peptide amyloïde sous forme de plaques serait à l'origine des dégénérescences neurofibrillaires, de la dysfonction des neurones et des synapses, de la perte neuronale, et enfin des symptômes démentiels [37, 54]. Cette accumulation proviendrait de la surproduction ou bien d'un défaut d'élimination du peptide A β ₄₂. Cependant, l'idée selon laquelle la MA serait causée par les plaques séniles a été rapidement critiquée. En effet, le nombre de plaques séniles et le degré de sévérité de la démence chez l'Homme ne sont pas corrélés [55]. Plus récemment, l'étude *in vivo* des plaques amyloïdes, mises en évidence en TEP (Tomographie par Emission de Positrons) par le composé B de Pittsburgh (PIB), suggère qu'à partir d'un certain stade, le déclin mnésique et la neurodégénérescence évoluent en parallèle, mais indépendamment de la surface du cerveau occupée par les plaques amyloïdes (charge amyloïde) [56].

En revanche, la forme oligomérique du peptide amyloïde a de nombreux effets neurotoxiques chez les modèles murins de la MA [38] et pourrait être *in fine* l'acteur central de la cascade amyloïde. De manière générale, les souris transgéniques pour le gène de l'APP montrent des anomalies neuroanatomiques et comportementales avant l'apparition des plaques amyloïdes [57-60]. Les oligomères du peptide amyloïde altèrent les propriétés électriques des neurones et causent la mort cellulaire *in vivo* et *in vitro* [61, 62] notamment par la formation de pores membranaires, qui perturbent l'homéostasie ionique [63]. Les formes amyloïdes oligomériques causent aussi une synaptotoxicité qui pourrait être le substrat des déficits mnésiques. Au niveau des épines dendritiques,

les oligomères du peptide amyloïde stimulent les récepteurs glutamatergiques NMDA postsynaptiques de façon excessive [64], entraînant une augmentation des concentrations intracellulaires de calcium et des radicaux libres dans le neurone postsynaptique. Cette stimulation provoquerait l'activation de différentes voies de signalisation, conduisant à une dysfonction mitochondriale, une déficience du métabolisme énergétique, une altération de la potentialisation à long terme et des dégénérescences synaptiques [65] (Figure 7).

Au vu du rôle central du peptide amyloïde β dans la progression de la MA, de nombreux essais cliniques ont testé chez les patients des thérapeutiques visant à réduire la production de peptide amyloïde (ex : inhibiteurs de gamma-sécrétase), son agrégation ou à augmenter sa clairance (immunisation active et passive anti-A β). Ces essais ont souvent échoué à cause des effets secondaires générés. Par exemple, les inhibiteurs de gamma-sécrétase (comme le Semagacestat) ont entraîné des symptômes gastrointestinaux et des cancers de la peau du fait de l'inhibition du rôle de la gamma sécrétase dans la voie Notch. L'immunisation active anti-A β a entraîné des réactions immunitaires délétères induisant des lésions de la matière blanche associées ou non à des oedèmes cérébraux [66].

Comme les concentrations du peptide amyloïde A β 42 commenceraient à augmenter des dizaines d'années (environ 30 ans) avant le diagnostic du stade MCI, l'initiation trop tardive des thérapies anti-A β , à partir d'un stade symptomatique, pourrait aussi expliquer l'échec de ces thérapeutiques [66].

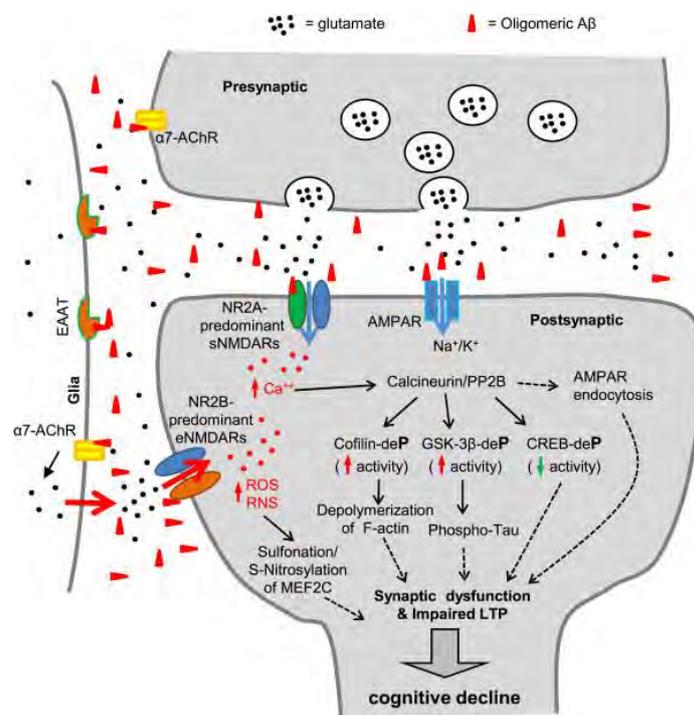


Figure 7: Schéma illustrant les effets synaptotoxiques des oligomères d'A β

« Aux concentrations pathologiques, les oligomères du peptide amyloïde pourraient interagir avec de nombreuses protéines astrocytaires, microgliales et neuronales synaptiques, dont les récepteurs nicotiques α 7

et les récepteurs NMDA, et vont déclencher une série d'évènements délétères à la synapse. Parmi ces évènements, on trouve l'activation aberrante des récepteurs au NMDA (en particulier les récepteurs extra-synaptiques qui expriment la sous-unité NR2B), l'augmentation de l'influx calcique dans le neurone, l'activation dépendante du calcium du complexe calcineurine/PP2B et les voies de signalisation qui en découlent. Ces voies impliquent la cofiline, la GSK-3 β , CREB, et MEF2. Il en résulte des réactions d'oxydoréduction aberrantes, la dépolymérisation de l'actine F, l'hyperphosphorylation de tau, l'endocytose des récepteurs AMPA, ce qui *in fine* conduit à la dysfonction synaptique et aux troubles mnésiques » [65].

1.2.4.2) La protéine Tau dans la MA

Au même titre que le peptide β -amyloïde, la protéine Tau est soupçonnée d'être un des facteurs conduisant aux modifications pathologiques dans la MA. La protéine Tau appartient à la famille des protéines associées aux microtubules (MAP) et est fortement exprimée dans les neurones [67]. En conditions physiologiques, Tau est une protéine soluble qui participe à l'assemblage des microtubules et à leur stabilisation [68, 69] et dont l'activité est régulée en fonction de son degré de phosphorylation [70]. En conditions pathologiques, la protéine est hyperphosphorylée, perd sa solubilité et forme des structures filamenteuses. Tau n'est alors plus capable de se lier aux microtubules, ce qui génère une instabilité microtubulaire [71, 72]. Les formes agrégées de la protéine Tau sont cytotoxiques [73] et pourraient participer aux altérations des performances cognitives chez la souris [74, 75]. Chez le patient, les concentrations de la protéine Tau phosphorylée dans le fluide cérébrospinal sont corrélées avec les altérations cognitives [76]. Toutefois, aucune mutation de la protéine Tau n'a été observée dans les cas de MA familiale (pour revue [18]).

1.2.5) Les différents modèles de la MA

1.2.5.1) Vue d'ensemble des différents modèles animaux de la MA

La MA n'existe pas sous forme sporadique chez les animaux, sauf chez certains primates non humains tels que le microcèbe âgé (*microcebus murinus*) pour lesquels déclin cognitif, plaques amyloïdes et neurodégénérescence sont associés (pour revue [77]). L'étude des mécanismes de la MA a donc reposé sur des approches interventionnistes : l'injection de mélanges de peptide amyloïde soluble dans le cerveau de rongeur (pour revue [78]) ou l'utilisation de modèles animaux divers comme la drosophile [79] mais surtout sur l'utilisation de souris transgéniques [80]. La construction de la plupart des modèles murins transgéniques est basée sur l'hypothèse amyloïde, et donc sur l'expression des gènes APP, préséniline 1 ou 2 (PS1 ou PS2) humains sauvages ou portant les mutations retrouvées dans les formes familiales humaines. Ces gènes peuvent être exprimés seuls ou combinés, sous le contrôle de divers promoteurs. Il existe des modèles transgéniques « simples » exprimant une APP humaine mutée

(mutations *Swedish, London, Indiana...*) comme les souris des lignées Tg2576 [81], PDAPP [82] APP23 [83] ou hAPPJ20 [60]. Ces souris présentent une production accrue de peptide amyloïde s'accumulant en plaques et présentent avec l'âge des troubles du comportement, de l'apprentissage, de la mémoire et de la plasticité synaptique [84]. Ces souris présentent également une mortalité prématurée (espérance de vie médiane de moins d'un an [85], la vie d'une souris saine étant comprise entre 2 et 3 ans. En revanche parmi ces souris, aucune ne montre la présence de dégénérescences neurofibrillaires. Des modèles transgéniques « doubles » exprimant la protéine APP mutée ainsi qu'une préséniline mutée présentent un phénotype similaire à celui des modèles simples, mutés uniquement sur l'APP, mais avec un décours plus rapide et plus précoce de la pathologie amyloïde. Parmi ces modèles, nous pouvons citer les souris APP_{Swe} x PS1_{A246E} [53] ou les souris APP_{Swe} x PS1_{dE9} (déletion de l'exon 9) [86]. Des souris surexprimant des formes mutées de la protéine Tau ont aussi été générées comme le modèle Thy-Tau 22 [87] et montrent une agrégation des protéines Tau et des dégénérescences neuronales [80]. Certaines souris portent trois transgènes comme les souris 3xTgAD, exprimant une mutation des gènes humains APP, PS1 et Tau [88]. Récemment, un modèle de rat transgénique a été développé portant les mutations APP_{Swe} et PS1_{dE9} [89]. Ce modèle de rat et les souris 3xTgAD développent une pathologie amyloïde et des dégénérescences neurofibrillaires dues à l'hyperphosphorylation de Tau, associées à des troubles de la mémoire et de la plasticité synaptique dans l'hippocampe [88, 89]. Le modèle rat présente en plus une neurodégénérescence dans le cortex et l'hippocampe, constituant à ce jour le modèle rongeur récapitulant le plus grand nombre de lésions histologiques observées chez les patients atteints de la MA [89]. Le tableau 1 récapitule les principales lignées de souris transgéniques qui seront évoquées dans ce manuscrit (Tableau 1).

Ces modèles murins sont intéressants car ils développent les symptômes de la MA plus ou moins progressivement et présentent des atteintes neuropathologiques, comportementales et cognitives bien caractérisées [90-92]. De plus, chez l'Homme, les formes familiales à transmission autosomique dominante ne se distinguent pas des formes sporadiques sur le plan clinique ou neuropathologique, si ce n'est par un début plus précoce de la maladie. A l'heure actuelle, de nombreuses études chez l'homme s'intéressent à l'évolution de la pathologie amyloïde et des symptômes dans les formes génétiques de la MA [93, 94]. Ces études menées chez l'homme et la souris porteurs des mutations génétiques de la MA permettront d'identifier les premières atteintes physiopathologiques de la MA, avec l'idée que la connaissance des mécanismes impliqués dans les formes génétiques de la MA contribuera aussi significativement à la compréhension de la maladie des cas sporadiques.

En revanche, une des limitations majeures de ces modèles est qu'aucun d'entre eux ne présente l'ensemble des signes neuroanatomiques et comportementaux observés chez le patient. Et malgré plusieurs décennies de recherches, l'existence ou non d'un lien de causalité entre les plaques séniles, la neurodégénérescence et les déficits mnésiques associés à la MA reste à préciser. Bien que ces

modèles rongeurs soient imparfaits, ils restent néanmoins aujourd’hui les meilleurs outils disponibles pour la compréhension des atteintes cellulaires *in vivo* et la réalisation de tests pharmacologiques à objectif thérapeutique [95]. Pour certains auteurs, ces modèles incomplets sont à l’origine de l’inefficacité de nombreux traitements médicamenteux testés chez l’Homme.

Nom de la lignée	Mutations	Promoteur / fond génétique	Age au début des troubles mnésiques	Age d’apparition des plaques amyloïdes
hAPPJ20	APP695 mutations Swedish et Indiana V717F	Promoteur facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF) / fond C57BL/6 x DBA/2	3 mois [96]	5-7 mois [60]
TgCRND8	APP mutations Swedish et Indiana V717F	Promoteur protéine prion de hamster syrien/ fond C57BL/6/C3H	2 mois [97]	3 mois [98]
APP/TTA	APP murine avec un domaine Aβ humanisé avec mutations Swedish et Indiana	Kinase Ca2+/calmoduline dépendante-tétracycline / fond C57BL/6J/FVN	8 mois [99]	2 mois [100]
APP_{swe}XPS1_{dE9}	APP mutation Swedish PS1 délétion exon 9	Promoteur protéine prion de hamster/ fond C57BL6	3 mois [101]	4 mois [86]
Tg2576	APP695 mutation Swedish	Promoteur protéine prion de hamster / fond C57BL6 /SJL	3 mois [102 , 103]	9 mois [104]

Tableau 1: Caractéristiques des principales lignées de souris transgéniques modèles de la MA évoquées dans ce manuscrit.

Le tableau représente le nom commun de la lignée, les mutations de l’APP, des présénilines ou de tau sur lesquelles sont construits les modèles, les promoteurs dirigeant l’expression de ces mutations, le fond génétique de la lignée, l’âge le plus précoce auquel des troubles mnésiques ont été décrits, et l’âge d’apparition des plaques amyloïdes, même peu étendues.

I.2.5.2) Le modèle murin de la MA utilisé dans cette thèse : les souris Tg2576

Parmi les modèles transgéniques murins de la MA, l’un des plus étudiés est la lignée murine Tg2576 [81]. Ces souris surexpriment le gène humain de la protéine précurseur du peptide amyloïde (APP) portant une mutation identifiée dans une famille suédoise (APP_{swe}, Lys670->Asn, Met671->Leu, double mutation) sous contrôle du promoteur de la protéine du prion de hamster. Cette mutation induit chez l’Homme une forme familiale précoce de la MA avec des symptômes comparables à ceux d’une MA sporadique. L’intérêt principal de ce modèle est l’évolution progressive, liée à l’âge de la pathologie

amyloïde, qui permet d'étudier la phase précoce de la MA, notamment pour rechercher des marqueurs biologiques prédictifs de la pathologie. Cette progression lente permet aussi de comparer les atteintes provoquées par la pathologie à celles d'un vieillissement physiologique. Les principales étapes de la pathologie amyloïde, des atteintes neuronales et des troubles cognitifs chez les souris Tg2576 sont bien caractérisées dans la littérature, permettant ainsi de visualiser plus clairement la chronologie de différentes atteintes et d'émettre des hypothèses sur leur enchaînement causal. Ces raisons nous ont poussé à travailler sur ce modèle, plutôt que sur d'autres développant une forme « agressive » et précoce de la pathologie amyloïde, comme les souris APP_{swex}PS1_{dE9} ou les 3xTgAD.

Il existe de nombreuses données publiées sur les capacités cognitives et mnésiques, les niveaux d'accumulation du peptide amyloïde et les atteintes synaptiques et cellulaires des souris Tg2576. Les principaux résultats consensuels sont présentés dans le Tableau 2. Les premières altérations de la plasticité cérébrale apparaîtraient entre 1 mois ½ et 4 mois, alors que les premiers troubles mnésiques sont évoqués dans quelques études seulement à 3 mois [102, 103, 105, 106, 107]. Ces souris présentent une altération de la neurogenèse adulte (production de nouveaux neurones) et des altérations synaptiques structurales (nombre d'épines dendritiques) et fonctionnelles (dépression à long-terme ou diminution de la potentialisation à long-terme) dans l'hippocampe (voir Tableau 2). A l'âge de 7-9 mois, l'augmentation dramatique des taux d'Aβ₄₂ soluble coïncide avec l'apparition des premières plaques amyloïdes dans le cortex. Au-delà de 8 mois, la majorité des études montre un déficit de la mémoire spatiale chez les souris Tg2576 [57]. Il a été montré que la forme dodécamérique de l'Aβ soluble (Aβ₅₆) des souris Tg2576 pourrait être impliquée dans les troubles mnésiques [59]. Cependant, l'équivalent moléculaire n'a pas été retrouvé dans des extraits cérébraux de patients atteints de la MA [108]. Dès l'âge de 12 mois, les plaques amyloïdes sont nombreuses et diffuses dans le néocortex des souris Tg2576, et sont entourées d'une réaction astro- et microgliale (Tableau 2). A 18 mois, les souris Tg2576 présentent une mort des cellules granulaires hippocampiques et une présence de Tau hyperphosphorylé autour des plaques amyloïdes [109].

Age	Amyloïdopathie	Capacités mnésiques (tâche)	Altérations cellulaires et moléculaires	Références
1,5 mois	↗ Aβ1-42 (ng/mg) dans le DG par rapport au reste de l'hippocampe et au cortex	NM	<ul style="list-style-type: none"> ↘ de la recapture calcique par la mitochondrie, production de ROS (DG) Altération de la plasticité synaptique à court terme des cellules granulaires 	[110]
3-4 mois	Aβ 1-40, Aβ 1-42 solubles détectés (EC)	↘ (localisation d'objet)	Hyperexcitabilité neuronale (EC)	[103]
	NM	↘ (conditionnement de peur au contexte)	LTD dans CA1 ↘ densité des épines dendritiques (CA1)	[102]
	Pas d'↗ Aβ 1-42 (en % de l'Aβ total du cerveau) entre 2 et 5 mois		↘ densité des épines dendritiques (DG) ↘ LTP (DG)	[105]
	NM	NM	<i>Nouveaux neurones (3 mois) :</i> ↘ survie ↘ densité d'épines ↘ longueur axonale et dendritique	[58]
	NM	↔ (piscine de Morris) ↘ (plateforme circulaire) ↘ (labyrinthe en Y)	NM	[81] [106] [107]
7-9 mois	Apparition de l'espèce Aβ dodécamérique	NM	NM	[59]
	↗ Aβ1-42 (en % de la quantité totale d'Aβ du cerveau) soluble et insoluble	NM	NM	[105] [104]
	Apparition des premières plaques amyloïdes (9 mois)	NM	NM	[104]
	NM	↘ Piscine de Morris	NM	[81]
	NM	↘ mémoire spatiale	NM	[57]
12-13 mois	NM	NM	↘ quantité de calbindine dans le DG	[58]
	Nombreuses plaques diffuses Astro et microglie autour des plaques ↗ facteurs inflammatoires (IL1, TGFβ)	NM	NM	[104 , 111]
18 mois	Mort des cellules granulaires (DG), présence de tau hyperphosphorylé autour des plaques	NM	NM	[109]

Tableau 2 : Chronologie des principales altérations amyloïdes, mnésiques, cellulaires et moléculaires des souris Tg2576.

LTD / LTP : dépression/potentialisation à long-terme ; DG : gyrus denté ; CA1 : Corne d'Ammon 1 ; EC : cortex entorhinal ; ROS : espèces réactives de l'oxygène ; NM : non mesuré

II) L'épilepsie, trouble de la synchronie neuronale

II.1) Définition

D'après la Ligue Internationale contre l'Épilepsie (ILAE), une crise d'épilepsie ou « ictus » est « la survenue transitoire de signes et/ou symptômes due à une activité neuronale excessive anormale ou synchrone dans le cerveau » [112]. Et l'épilepsie est définie comme « un désordre cérébral caractérisé par une prédisposition à générer des crises d'épilepsie et par les conséquences neurobiologiques, cognitives, psychologiques et sociales de cette condition. La définition d'épilepsie requiert l'occurrence d'au moins une crise d'épilepsie » [112]. Sont exclues de la définition les crises d'épilepsie survenant en phase aigüe de certaines affections cérébrales telles que les traumatismes crâniens, les crises d'épilepsie fébriles chez des enfants sans antécédents de crises fébriles et les crises d'épilepsie néonatales.

II.2) Étiologie de l'épilepsie

Les étiologies de l'épilepsie sont diverses et se divisent globalement en deux catégories : les causes génétiques et les causes structurelles ou métaboliques. L'étiologie peut être aussi inconnue. « Génétique » implique qu'un défaut génétique connu ou présumé a été mis en évidence par des études familiales ou génétiques [113]. Par exemple, le syndrome de Dravet est une épilepsie infantile causée par une mutation ou une délétion du gène SCN1A [114, 115] codant pour le canal sodique Nav1.1. « Structurelles ou métaboliques » implique qu'« une maladie structurelle ou métabolique a été démontrée comme étant associée à un risque accru de développer une épilepsie dans des études conçues de manière appropriée » [113]. Ce type d'épilepsie est causé, par exemple, par des traumatismes crâniens ou des tumeurs cérébrales. Par exemple, l'épilepsie du lobe temporal est un type d'épilepsie dont l'origine des crises est principalement située dans les aires limbiques comme l'hippocampe, l'amygdale et le gyrus parahippocampique. La sclérose de l'hippocampe en est le principal marqueur anatomopathologique. Cette épilepsie se déclencherait, après une longue période de latence, à partir d'une affection initiale survenant dans les premières années de la vie [116].

Les différentes étiologies de l'épilepsie peuvent être modélisées chez l'animal, le plus souvent chez le rat ou la souris. Les modèles de l'épilepsie du lobe temporal (TLE) sont les plus nombreux. Ces modèles peuvent être génétiques, par exemple, la lignée Q54 présentant une mutation du canal Nav1.2 [117]. Il existe des modèles à forte susceptibilité génétique d'épilepsie comme la souris EI, dont le développement de l'épilepsie dépend de facteurs génétiques et environnementaux [118]. Les modèles les plus fréquemment utilisés sont des modèles d'épilepsie du lobe temporal induits, qui consistent en l'induction initiale d'une ou plusieurs crises paroxystiques pharmacologiquement (lithium, pilocarpine,

kainate) ou électriquement (« kindling ») (de type *status epilepticus*, voir paragraphe suivant). Globalement, dans ces modèles d'épilepsie du lobe temporal, les mutations génétiques ou les lésions cérébrales vont engager un processus d'épileptogenèse basé sur des remodelages cellulaires et moléculaires de l'hippocampe, qui conduira *in fine*, après une période de latence, à l'apparition de crises d'épilepsie spontanées et leur récurrence [119 , 120].

II.3) Expression électroencéphalographique et clinique des hypersynchronies neuronales

La synchronie neuronale correspond à l'activité simultanée (potentiels d'action) d'un ensemble de neurones. L'électroencéphalographie (EEG), technique qui permet de capter et d'enregistrer l'activité électrique cérébrale, est la technique de choix pour détecter les hypersynchronies neuronales telles que les crises d'épilepsie, sporadiques, et les pointes interictales qui surviennent de façon régulière entre les crises. Sur l'électroencéphalogramme, les crises épileptiques se traduisent par des fluctuations électriques (oscillations EEG) de grande amplitude et de haute fréquence durant plusieurs secondes (Figure 8). Les décharges interictales sont aussi des événements rythmiques de grande amplitude mais de plus courte durée (1 à 5 s) [121] (Figure 8). Les pointes interictales ou anomalies épileptiformes « paroxystiques » sont des déflexions positives ou négatives du signal EEG durant moins de 50 ms chez la souris et d'amplitude supérieure à celle des oscillations EEG physiologiques [122] (Figure 8).

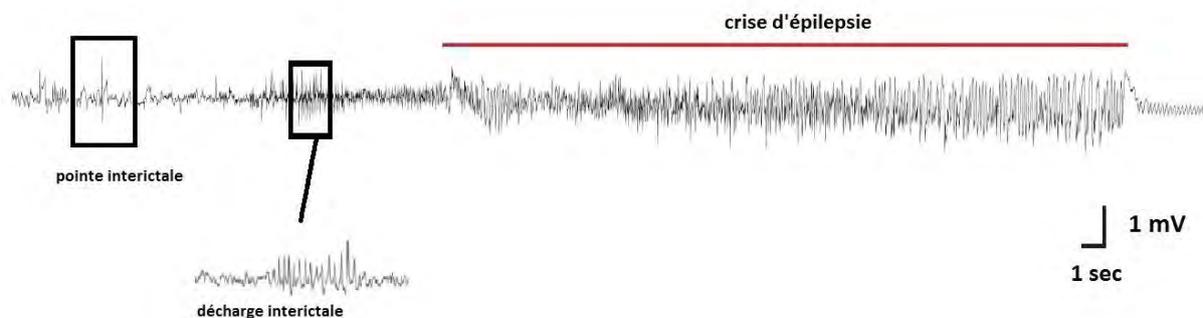


Figure 8: Tracé électroencéphalographique des différents types d'hypersynchronie neuronale
Pointe et décharge interictales suivies d'une crise d'épilepsie sur un tracé EEG cortical de souris. (adapté de [121]).

Les crises d'épilepsie se manifestent toujours sur l'électroencéphalogramme : soit de façon isolée (crise infraclinique) soit associée à des symptômes objectifs (crise clinique). Les crises d'épilepsie peuvent être généralisées ou partielles. Dans les deux cas, la crise est initiée dans une région cérébrale spécifique (foyer) mais la crise évolue soit dans le même hémisphère (partielle), soit mobilise les

réseaux neuronaux des deux hémisphères, mais sans atteindre systématiquement le cerveau entier (généralisée) [113].

Il existe différents types de symptômes dans les crises d'épilepsie généralisées et partielles. Les crises partielles dites simples font référence à des crises avec des symptômes moteurs ou du système nerveux autonome sans altération de la conscience ou de l'attention. Les crises partielles complexes supposent qu'il y ait une perturbation de la conscience ou de l'attention comme des épisodes d'amnésie ou de confusion [113]. Parmi les crises d'épilepsie généralisées, il existe les crises tonico-clonique, myoclonique, clonique, tonique et les absences. Par exemple, les crises tonico-cloniques sont des crises où le patient perd connaissance puis présente un raidissement des membres (tonique) suivi d'une phase de contractions ou tremblements rythmiques des membres (clonique), s'achevant par un coma puis le réveil de la personne épileptique [123]. Le *status epilepticus* est défini soit par "un épisode d'au moins 30 minutes d'activité épileptique continue" soit par l'occurrence de "deux ou plusieurs crises d'épilepsie séquentielles couvrant cette même période sans rétablissement complet entre les crises" [123]. Enfin, les crises d'absences sont des épisodes courts de 3 à 20 secondes pendant lesquels le regard de l'individu devient fixe, accompagné ou non de clignements oculaires ou de mouvements automatiques brefs de la bouche ou des mains. Une altération de la conscience et de la réceptivité sensorielle est constatée [123].

II.4) Les hypersynchronies neuronales : bases neurobiologiques

Sur le plan neuronal, pendant la décharge interictale, une large population de neurones dans le foyer initiateur subit une large dépolarisation membranaire appelée « paroxysmal depolarization shift » ou PDS [124] sur laquelle se superposent des bouffées de potentiels d'action à très haute fréquence. Puis, les cellules s'hyperpolarisent (hyperpolarisation post-DS) dû à une augmentation des conductances potassiques [125] et subissent une inhibition neuronale. Au fur et à mesure des décharges interictales, l'hyperpolarisation suivant la décharge diminue progressivement puis disparaît pour être remplacée par une petite dépolarisation après la décharge qu'on appelle l'« after-discharge » [126]. Tous ces phénomènes surviennent de façon synchrone dans la population neuronale du foyer épileptique. Les « after-discharges » s'allongent à chaque décharge interictale et se transforment progressivement en crises d'épilepsie. Au cours de la crise, les activités neuronales anormales se répandent aux régions proches et plus distantes. Avant et pendant le développement de la crise, les concentrations extracellulaires de K^+ augmentent et de Ca^{++} diminuent jusqu'à un plateau. Puis la crise se termine et la membrane neuronale s'hyperpolarise à un niveau bien en deçà du niveau normal [127].

D'un point de vue mécanistique, l'apparition d'une décharge interictale nécessite à la fois une hyperexcitabilité des neurones, c'est-à-dire une aptitude anormale à la dépolarisation membranaire et au déclenchement des potentiels d'action, et une augmentation de la synchronie des neurones (un plus grand nombre de neurones vont décharger un potentiel d'action simultanément). L'excitabilité neuronale peut être augmentée du fait de la nature ou la densité en canaux ioniques [127]. L'hypersynchronie neuronale peut notamment être favorisée par la connectivité neuronale particulière de certaines régions cérébrales comme l'hippocampe qui présente des synapses excitatrices récurrentes normales, comme dans le réseau CA2-CA3, ou pathologiques comme les récurrentes des fibres mossues observées chez les patients et les modèles animaux de l'épilepsie du lobe temporal [128] (Figure 9).

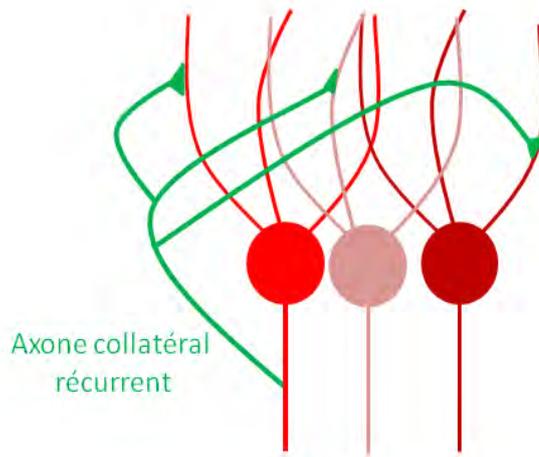


Figure 9: Représentation schématique de synapses récurrentes.

Couche de neurones excitateurs (ici le même type cellulaire est représenté avec des couleurs différentes pour aider à discriminer à quel neurone les dendrites appartiennent) où l'un des neurones (rouge) forme un axone collatéral (en vert) en plus de l'axone principal (trait vertical) qui vient se projeter sur une de ses dendrites et celle des autres neurones de cette couche cellulaire. Donc quand un neurone est excité, il provoque sa propre excitation dite "récurrente" et celle des autres neurones simultanément, créant une synchronie neuronale.

II.5) Modifications structurales et moléculaires de l'hippocampe au cours de l'épileptogénèse

II.5.1) Vue d'ensemble des modifications hippocampiques dans un contexte d'épilepsie

Pendant la crise d'épilepsie, l'hyperactivité neuronale entraîne un emballement métabolique qui va épuiser les ressources énergétiques [129] et entraîner une mort neuronale qui se produit dans différentes régions corticales comme le cortex entorhinal ou périrhinal et l'hippocampe. On note une perte importante des différentes classes d'interneurones hippocampiques au niveau du hile (>50%), qu'ils expriment la somatostatine, la cholécystokinine et/ou le neuropeptide Y. Plus minoritairement,

les cellules moussues et les cellules pyramidales de CA1 et CA3 peuvent subir une mort neuronale [130 , 131 , 132]. Il existe aussi une altération de la neurogenèse, une activation accrue de la microglie et des astrocytes, des dommages axonaux et modifications dendritiques et une néovascularisation [130]. Cette mortalité neuronale, en particulier des interneurons inhibiteurs, va déclencher de façon homéostatique, des modifications protéiques et des remodelages cellulaires structuraux afin de réguler l'excitation neuronale. Les remodelages dont je vais parler à présent ont été mis en évidence dans des modèles d'épilepsie du lobe temporal.

II.5.2) Modifications de l'expression du neuropeptide Y et autres modifications cellulaires liées

Outre son rôle orexigénique lorsqu'il est produit par l'hypothalamus, le neuropeptide Y (NPY) est un neuromodulateur exprimé en conditions basales dans l'hippocampe exclusivement dans certaines classes d'interneurones GABAergiques : les interneurons exprimant la somatostatine ou la cholécystokinine, dont une sous-population exprime le NPY [133]. Ces neurones GABAergiques se situent dans le hile et la couche granulaire. Ils innervent très localement les dendrites des cellules granulaires au niveau de la couche moléculaire externe ainsi que certaines cellules hilaires.

L'expression du NPY dans ces interneurons augmente fortement dans le gyrus denté à la suite des crises d'épilepsie et la reproductibilité de ce résultat dans différents laboratoires en a fait un marqueur reconnu d'activité épileptique [131 , 132]. Après une crise d'épilepsie aigüe, l'expression protéique du NPY augmente dans les interneurons GABAergiques du hile et de la couche granulaire [132], et la présence de cette protéine au niveau axonal est visible par immunohistochimie dans la couche moléculaire externe du gyrus denté. D'autre part, si une crise d'épilepsie de type *status epilepticus* est provoquée chez le rat, elle va déclencher un processus d'épileptogenèse qui va permettre l'émergence spontanée de crises d'épilepsie chroniques dans le mois suivant la crise initiatrice. Un mois après le *status epilepticus* chez ces rats, l'augmentation de l'expression du NPY dans les interneurons est accompagnée d'une expression de novo de ce peptide dans les cellules granulaires, particulièrement visible dans les fibres moussues [132]. L'expression du NPY dans les fibres moussues est donc reconnue comme un marqueur de crises d'épilepsie chroniques. D'autre part, les interneurons qui survivent aux crises et notamment ceux exprimant le NPY vont montrer un développement axonal accru [134], compensant les pertes interneuronales. Enfin, les cellules granulaires vont développer des fibres moussues collatérales qui expriment aussi le NPY (Figure 10). Elles vont innervier les cellules granulaires elles-mêmes [135], entraînant une excitation récurrente de ces cellules mais aussi des neurones GABAergiques, jouant un rôle inhibiteur (Figure 10).

Le NPY exerce son action via 5 types de récepteurs dont les récepteurs Y2 qui sont principalement exprimé dans l'hippocampe [133]. Ce récepteur Y2 se situe au niveau des synapses formées par les fibres moussues. En conditions d'épilepsie, l'expression du récepteur Y2 augmente au niveau des fibres moussues [136]. Lorsque le NPY est exprimé par les cellules granulaires, le neuropeptide se fixe sur ces auto-récepteurs Y2 pour limiter la libération de glutamate par les fibres moussues et ainsi limiter l'excitation des cellules de CA3 [137].

Toutes ces modifications d'expression du NPY et de ses récepteurs semblent participer à un mécanisme homéostatique permettant de limiter l'hyperexcitation et la propagation des crises dans un contexte d'épilepsie.

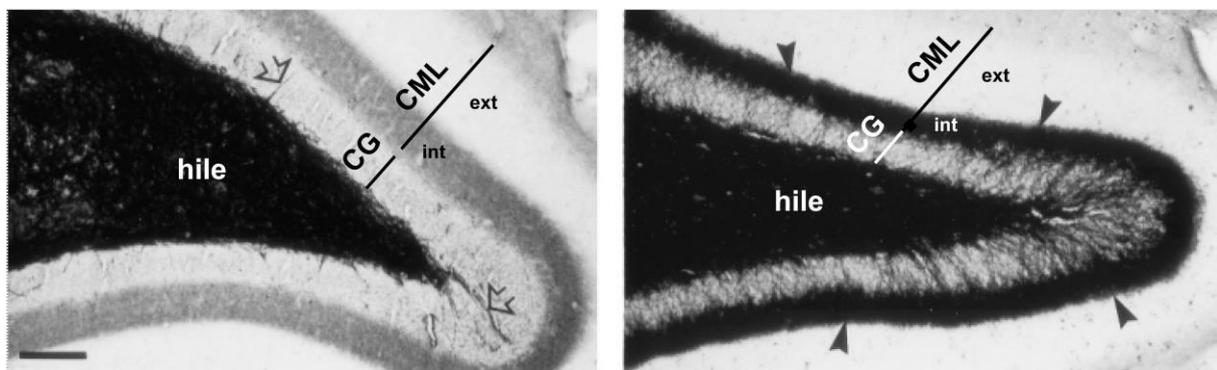


Figure 10: Photographies du gyrus denté et du hile de l'hippocampe de rats contrôle (gauche) et traité avec du kainate (droite).

Immunohistochimie Timm, marquant spécifiquement les fibres moussues. Dans le gyrus denté du rat contrôle (gauche), les fibres moussues sont restreintes au hile. Seules quelques fibres moussues collatérales peuvent être observées dans la couche des cellules granulaires (pointes de flèches ouvertes). En revanche, chez le rat traité au kainate proconvulsivant (droite), de très nombreuses fibres moussues traversent la couche granulaire et forment une large bande de terminaisons synaptiques au niveau de la couche moléculaire interne (tête de pointes larges). *Gyrus denté* : CG : couche granulaire, CML : couche moléculaire (ext : externe/int : interne). Echelle gauche: 50 µm ; droite : 100 µm [135]

II.5.3) Modification d'expression de la calbindine dans l'épilepsie

La calbindine est une protéine tampon du calcium qui est exprimée notamment dans les cellules granulaires du gyrus denté [138]. Son rôle physiologique est mal connu mais cette protéine pourrait réguler la durée et le niveau de l'augmentation des concentrations calciques liées à l'activité neuronale [138]. Il existe une diminution de l'expression de la calbindine dans les cellules granulaires des patients atteints d'épilepsie du lobe temporal [139] et dans les modèles animaux de cette pathologie [140, 141]. Pour Nagerl, cette diminution pourrait être neuroprotectrice en diminuant l'entrée de calcium lors des trains de potentiels d'action survenant pendant les crises d'épilepsie [142].

II.6) Impact mnésique de l'épilepsie

Les déficits mnésiques dans l'épilepsie sont fréquents. 70 % à 80 % d'un groupe de plus de 1000 patients suivis à Bonn depuis 1988 et présentant une épilepsie du lobe temporal pharmacorésistante, présentent un déficit de mémoire épisodique (ici, se souvenir de mots ou d'images précédemment présentés) [143]. Ces déficits mnésiques dans un contexte d'épilepsie peuvent être dus à un effet direct sur la fonction mnésique des crises, des pointes interictales ou des modifications structurales et moléculaires de l'hippocampe induits par l'épilepsie. Enfin, ces troubles mnésiques pourraient aussi provenir de la cause de l'épilepsie elle-même sans être reliés directement aux crises. Dans le cas où les crises ou les pointes interictales perturbent directement les fonctions mnésiques, l'effet peut être durable ou transitoire. En ce qui concerne l'effet transitoire des crises d'épilepsie ou des pointes interictales sur la mémoire, le traitement antiépileptique symptomatique permet de restaurer des performances mnésiques normales dans certaines épilepsies (encéphalopathies épileptiques de l'enfant), preuve que les crises ou les pointes elles-mêmes peuvent participer aux troubles mnésiques [144]. De plus, plusieurs études menées chez l'homme et le rat ont montré l'action transitoire des pointes interictales sur les performances cognitives. Des déficits cognitifs transitoires ont été mis en évidence pendant des tâches cognitives ou visuelles pendant lesquelles les patients étaient enregistrés. Dans ces expériences, la survenue de pointes interictales pendant la présentation de l'item (verbal ou visuel) à mémoriser ou se rappeler a été associée à de mauvaises performances mnésiques [145, 146]. Chez des rats modèles d'épilepsie, les animaux qui présentaient des pointes interictales chroniques sur les enregistrements EEG hippocampiques avaient de mauvaises performances dans une tâche mnésique hippocampo-dépendante. Les déficits mnésiques étaient observés si les pointes interictales apparaissaient pendant la phase où l'animal devait se rappeler les informations apprises pour réaliser la tâche (phase de rappel) et non pendant l'apprentissage [147]. Cet impact mnésique négatif des pointes pendant le rappel fut également mis en évidence sur une cohorte de 10 patients implantés avec des électrodes intracrânielles pour localisation du foyer épileptique avant opération [148].

D'autre part, l'impact direct des pointes interictales sur les fonctions mnésiques peut être durable. Notamment, les enfants atteints du syndrome « pointes ondes continues pendant le sommeil » (continuous spike and wave of sleep CSWS) vont présenter, pour certains, des séquelles cognitives même après la disparition des décharges interictales à la puberté [144]. De plus, des rats soumis à un traitement de 10 jours (entre le 12^e et le 23^e jour de vie) de flurothyl, agent provoquant à faible dose des pointes interictales mais pas de crises d'épilepsie, ont montré de moins bonnes performances mnésiques dans un test de mémoire spatiale (piscine de Morris), un peu plus d'un mois après la fin du traitement alors qu'ils ne présentaient plus de pointes. Cette étude montre que les pointes

interictales chez les rats survenant pendant le développement cérébral peuvent avoir des conséquences mnésiques délétères à long terme [149].

Les mécanismes possibles de cette dysfonction cognitive induite par les pointes interictales pourraient être de plusieurs ordres. Tout d'abord, il est possible que les activités d'hypersynchronie neuronale comme les pointes perturbent les synchronies neuronales physiologiques (oscillations cérébrales) et les processus mnésiques qui en dépendent. D'autre part, les remodelages cellulaires et protéiques de l'hippocampe induits par les crises d'épilepsie peuvent aussi altérer les processus mnésiques se déroulant dans cette structure. Par exemple, l'expression anormale du NPY dans les fibres mossues en cas d'épilepsie va limiter la libération du glutamate [150], ce qui diminue la transmission synaptique normale au niveau des synapses mossues. Nous pouvons faire l'hypothèse que l'altération de cette transmission synaptique pourrait limiter la mise en place d'une potentialisation à long-terme dans la région CA3, et donc l'établissement de mémoire à long-terme.

Enfin, il est possible que la cause de l'épilepsie et non pas les crises d'épilepsie soit à l'origine des troubles mnésiques ou du moins y participe, chez les patients épileptiques. Par exemple, le syndrome de Dravet est une épilepsie infantile causée par une mutation du gène codant pour le canal Nav1.1 qui a pour tableau clinique l'association de crises d'épilepsie à des troubles mnésiques. Bender et al. (2013) ont montré que des souris présentant un KO des canaux Nav1.1 uniquement dans le septum, région cérébrale impliquée dans la mémoire spatiale, ne présentent plus de crises d'épilepsie mais présentent toujours des troubles de la mémoire spatiale [151].

En conclusion, la cause de l'épilepsie ou les événements d'hypersynchronie neuronale et les modifications hippocampiques qu'elle entraîne contribueraient aux troubles mnésiques dans les épilepsies.

III) L'épilepsie dans la MA

Depuis les années 1950, de nombreuses études se sont intéressées à l'incidence des crises d'épilepsie dans la MA et aux facteurs associés à la survenue de ces crises. Face à la variabilité des résultats récoltés et les problèmes méthodologiques liés à l'anamnèse des crises, la mise en évidence de crises d'épilepsie chez les modèles murins de la MA a vraiment permis d'asseoir le lien entre l'épilepsie et la MA, grâce notamment aux travaux de Palop et Mucke à la fin des années 2000. A l'heure actuelle, les

études cliniques montrent un regain d'intérêt pour les pistes de recherches sur le lien entre l'épilepsie et la MA, et cherchent même à vérifier chez l'homme les hypothèses échafaudées chez l'animal.

III.1) Données épidémiologiques sur les crises d'épilepsie dans la MA

Comment en est-on arrivé à soupçonner un lien entre l'épilepsie et la maladie d'Alzheimer ? L'épilepsie et la maladie d'Alzheimer sont toutes deux des maladies dont l'incidence augmente avec l'âge [152] et il n'est donc pas rare de les voir associées dans la population âgée. D'autre part, l'épilepsie peut apparaître secondairement à diverses affections cérébrales comme les traumatismes crâniens ou les tumeurs cérébrales. Les maladies neurodégénératives dont la maladie d'Alzheimer sont la cause présumée de 3,5 à 6,5% des cas prévalents d'épilepsie [153, 154]. Dans ce contexte, les crises d'épilepsie sont supposées être la résultante de la perte neuronale observée dans ces maladies [155].

III.1.1) Prévalence des crises d'épilepsie dans les formes sporadique et familiale

Dans les formes sporadiques de la MA, l'étude de Mendez et al. rapporte l'occurrence d'une crise d'épilepsie spontanée chez 10 à 22% des patients atteints de la MA [156]. Cette proportion devient plutôt inférieure à 5% si l'on considère des cohortes plus larges [157, 158]. De façon intéressante, cette incidence des crises d'épilepsie chez les patients atteints de la MA est significativement supérieure à celle d'une population saine appariée pour l'âge [159]. Les crises d'épilepsie peuvent survenir à n'importe quel stade de la MA [160, 161, 162, 163, 164]. Elles peuvent notamment apparaître très précocement, dès le stade de Mild Cognitive Impairment [164]. Dans l'étude rétrospective de Vossel sur les patients d'un centre Mémoire et Vieillesse de San Francisco, 5 % des patients ayant un MCI amnésique ont présenté des crises d'épilepsie non imputables à d'autres maladies neurologiques [164]. Ainsi, bien que les crises d'épilepsie restent un événement rare, elles sont plus fréquentes chez les patients atteints de la forme sporadique de la MA que dans la population générale.

Dans les formes familiales de la MA, la prévalence des crises d'épilepsie spontanées est bien plus élevée que dans les formes sporadiques. Par exemple, 37 à 58 % des patients ayant la mutation E280A de la préséniline 1 ont présenté une crise d'épilepsie [165] et c'est le cas de 30% des patients porteurs de mutations de la préséniline 2 [166]. Des crises d'épilepsie ont été décrites chez 57% des individus appartenant à 5 familles porteuses de duplications de l'APP [167]. Une étude prospective réalisée sur des patients atteints du syndrome de Down a révélé que 84 % d'entre eux ont présenté des crises d'épilepsie [168]. Cette maladie plus connue sous le nom de trisomie 21 est caractérisée par la présence de trois chromosomes 21 portant chacun une copie du gène de l'APP. Ces études suggèrent donc que la survenue de crises d'épilepsie serait fortement reliée à la physiopathologie amyloïde de la

maladie d'Alzheimer, car les crises sont plus fréquentes dans les cas familiaux de la MA où les mutations génétiques jouent un rôle incontestable dans l'amyloïdopathie.

III.1.2) Type de crises et prévalence des anomalies épileptiformes interictales

Les crises d'épilepsie chez les patients atteints de la MA peuvent être partielles simples ou complexes, ressemblant parfois à des symptômes de la MA comme les épisodes d'amnésie ou les troubles du langage [164] ou elles peuvent être généralisées et dans ce cas, elles sont le plus souvent tonico-cloniques [169]. Elles sont bien traitées par le lévétiracétam et la lamotrigine (40 à 50 % de guérison et de répondeurs partiels) [164].

Dans une moindre mesure, des études se sont intéressées à l'occurrence des anomalies épileptiformes interictales chez les patients atteints de la MA. D'après Amatniek et al., la présence de pointes interictales est associée à un risque 73 fois plus élevé de présenter une crise d'épilepsie [159]. L'étude de Rao et al. rapporte des anomalies épileptiformes chez 16 à 38 % des patients atteints de la MA ayant présenté au moins une crise d'épilepsie et pour lesquels un EEG a été réalisé [157]. Dans l'étude de Vossel et al. où un EEG a été réalisé de façon systématique, 20% des patients atteints de la MA ou de MCI ont présenté des anomalies épileptiformes [164]. Cette proportion atteint 40% des patients dans les formes précoces de la MA (Keith Vossel, communication personnelle). Cependant, des limitations techniques rendent difficile la détection des anomalies épileptiformes. Un EEG de routine de 30 minutes est trop court et détecte des anomalies épileptiformes chez seulement 29 à 55% des patients consultant pour une épilepsie [170]. De plus, si la source des pointes interictales est profonde, elles ne seront que faiblement ou pas détectées sur l'EEG de surface. Donc contrairement aux modèles murins de la MA où les anomalies épileptiformes sont très facilement détectées, elles sont difficilement et variablement détectées chez l'homme par l'EEG de routine.

III.1.3) Problèmes méthodologiques des études sur l'épilepsie dans la MA

Outre la faiblesse des effectifs, certaines études présentent des biais de sélection des patients : diagnostic de MA incertain, présence d'autres causes d'épilepsie, prise de médicaments augmentant la susceptibilité aux crises d'épilepsie ou hétérogénéité de la sévérité/stade de la MA. D'autre part, le diagnostic de crise d'épilepsie spontanée, souvent basé sur des données cliniques parfois lacunaires provenant de questionnaires, peut être erroné, en l'absence d'EEG de confirmation qui est rarement obtenu dans ces études. La prévalence des types de crises peut aussi avoir été biaisée car certaines crises d'épilepsie partielles complexes telles que le délire, l'agressivité, les troubles de l'attention ou de la mémoire peuvent être confondues avec des symptômes de la MA. En revanche, la forte prévalence des crises convulsives pourrait tenir au simple fait qu'elles soient plus visibles et spécifiques symptomatologiquement [169].

Dans leur ensemble, ces études révèlent donc que les crises d'épilepsie sont un symptôme peu fréquent de la MA mais dont l'incidence est significativement supérieure à celle de la population saine. L'épilepsie peut s'observer dès les premiers stades de la MA mais est difficile à détecter.

III.2) Le phénotype épileptique décrit chez les souris modèles de la MA

III.2.1) Susceptibilité aux crises induites

L'administration d'agents pharmacologiques qui bloquent l'inhibition neuronale, comme les antagonistes des récepteurs GABA_A tels que le pentylentetrazole (PTZ), ou exacerbent l'excitation neuronale, comme les agonistes des récepteurs glutamatergiques au kaïnate, a permis de mettre en évidence de façon indirecte un déséquilibre entre inhibition et excitation neuronale dans les modèles murins de la MA. Ces agents pharmacologiques ont provoqué des crises d'épilepsie chez les souris non transgéniques (NTg) et modèles de la MA, dont la sévérité était plus élevée chez les souris transgéniques (TgCRND8, hAPPJ20, hAPPJ9, APP inducible, Tg2576 sur un fond C57Bl6 pur) [171, 172, 173, 174, 175]. Il est aussi possible de déclencher des crises d'épilepsie (« kindling ») en appliquant un certain nombre de stimulations électriques dans l'amygdale, région cérébrale épileptogène. Les souris Tg2576 ont nécessité moins de stimulations électriques dans l'amygdale pour déclencher des crises tonico-cloniques que chez les souris NTg [176] et présentent donc une susceptibilité accrue aux crises d'épilepsie.

III.2.2) Fréquence des crises d'épilepsie chez les souris modèles de la MA

Les crises d'épilepsie chez les souris modèles de la MA ont initialement été observées comportementalement de façon fortuite, lors de batteries de tests destinées à évaluer les caractéristiques comportementales des lignées de souris transgéniques : anxiété, activité motrice, mémoire et apprentissage, sociabilité etc. [175, 177, 178, 179]. Par exemple, sur une cohorte de 17 souris APP23 femelles âgées (24 mois), 7 souris ont présenté une crise tonico-clonique et 4 un myoclonus (la même souris ayant pu présenter les deux symptômes), lors d'une batterie de tests phénotypiques [177]. Sur un ensemble de lignées porteuses de différentes mutations de l'APP exprimées sur un fond génétique FVB/N, Hsiao et al. rapportent que 6 souris transgéniques sur 181 ont présenté des crises tonico-cloniques pendant un test comportemental évaluant la peur de la nouveauté « corner test » [179]. Des crises d'épilepsie spontanées ont également été observées chez environ 3% des souris Tg2576 présentant un fond génétique C57Bl6 pur dont la mortalité atteint les 40 % à l'âge de 2 mois [175]. En résumé, la probabilité d'observer des crises d'épilepsie comportementales est faible chez les souris modèles de la MA, ce qui explique la variabilité apparente de leur incidence dans ces différents modèles. Ces crises apparaissent généralement chez les souris âgées, sauf dans les modèles présentant une mortalité élevée [179].

Un phénotype épileptique a été mis en évidence chez de nombreux modèles murins de la MA, par l'utilisation d'enregistrements électroencéphalographiques. Les crises d'épilepsie ont été enregistrées par EEG *in vivo* chez l'animal vigile chez les souris hAPPJ20, hAPPJ9, APP_{swe}XPS1_{dE9} et APP/TTA mais sont généralement rares chez ces souris modèles de la MA. Des enregistrements EEG de 24 heures ont permis de mettre en évidence des crises d'épilepsie chez 5 à 10 % des souris hAPPJ20 âgées de 5 à 7 mois [180] et chez 6 % des souris APP_{swe}XPS1_{dE9} mâles de 4 mois [181]. Des enregistrements EEG continus de deux semaines de souris APP_{swe}XPS1_{dE9} âgées de 3 mois ont permis de détecter des crises d'épilepsie chez 25% des souris [122]. Il semble donc que les crises d'épilepsie surviennent chez une proportion importante de souris mais à une faible fréquence, nécessitant des enregistrements EEG prolongés pour en détecter chez une proportion substantielle de souris.

III.2.3) Type de crises

En associant la capture vidéo aux enregistrements EEG, Palop a rapporté la survenue de crises électroencéphalographiques non convulsives chez les souris hAPPJ20 pendant lesquelles les souris restaient immobiles [172]. Cette observation suggère que de nombreuses crises d'épilepsie pourraient passer inaperçues au niveau comportemental chez les souris modèles de la MA, d'où le faible nombre de crises relevées lors des phénotypages comportementaux de lignées transgéniques. Des crises tonico-cloniques généralisées et des myoclonus ont aussi été décrits chez la plupart des souris modèles de la MA [177, 179]. De plus, Minkeviciene et son équipe a enregistré par couplage vidéo-EEG des crises d'épilepsie généralisées chez 38 % des souris APP_{swe}XPS1_{dE9} âgées de 3 mois [122].

III.2.4) Anomalies épileptiformes

Des anomalies épileptiformes de type pointes interictales ont été détectées chez la totalité des souris hAPPJ20 [172], APP_{swe}XPS1_{dE9} [181], APP/TTA [174] sur des enregistrements EEG de 24h. Chez les souris APP23, APP/TTA et hAPPJ20, les pointes interictales surviennent quand l'activité locomotrice de l'animal est faible, c'est-à-dire en dehors des périodes d'exploration [174, 180, 182]. Les pointes interictales ont été enregistrées au niveau de divers cortex et dans l'hippocampe chez les souris hAPPJ20, n'étant parfois observées que dans l'hippocampe. De même, les souris APP23 montrent des pointes interictales en bouffées dans l'hippocampe.

En conclusion, les pointes interictales sont le témoin le plus évident de l'hypersynchronie neuronale chez les modèles murins de la MA. Leur localisation et la variation de leur fréquence en fonction de l'état physiologique de l'animal pourraient nous permettre de déterminer les mécanismes de cette hypersynchronie. Le rôle de l'hippocampe pourrait être primordial dans l'apparition de

l'hypersynchronie neuronale, notamment via les remodelages cellulaires et moléculaires que nous allons présenter au paragraphe suivant.

III.2.5) Marqueurs protéiques d'épilepsie

Plusieurs modifications cellulaires et protéiques semblables à celles observées dans les modèles d'épilepsie du lobe temporal ont pu être observées chez les souris modèles de la MA.

Tout d'abord, on observe chez les souris modèles de la MA la présence d'un marqueur anatomique caractéristique des crises d'épilepsie chroniques : l'expression du neuropeptide Y dans les fibres moussues de l'hippocampe (en orange sur la Figure 12). Une telle expression a été décrite dans les modèles hAPPJ20, Tg2576 et APP_{swe}XPS1_{dE9}, [58, 122, 172, 183, 184, 185] (Figure 11).

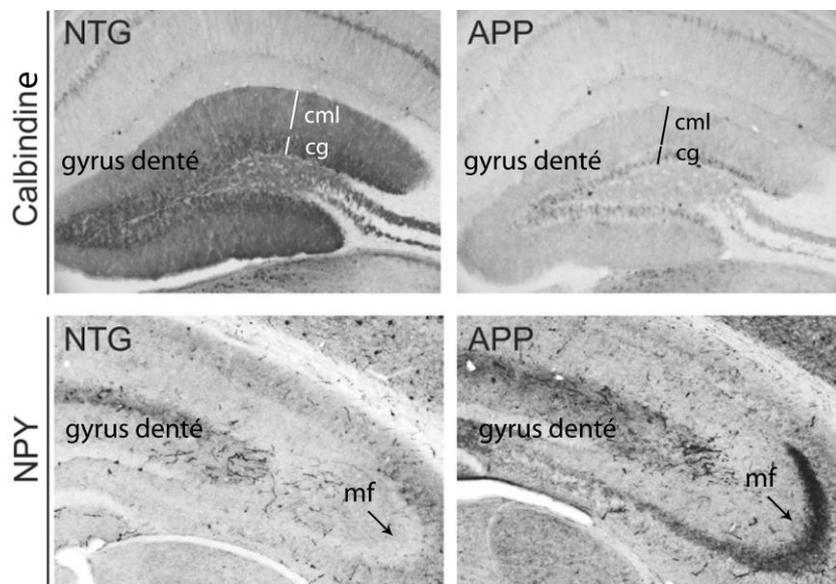


Figure 11 : Altérations de l'expression du NPY et de la calbindine chez les souris modèles de la MA

Dans le gyrus denté, expression de la calbindine dans les cellules granulaires (haut) et du NPY dans les fibres moussues (mf) (bas) chez une souris NTg (gauche) et une souris modèle de la MA (APP, droite). cg : couche granulaire (soma des cellules granulaires), cml : couche moléculaire (dendrites des cellules granulaires). [183]

La calbindine est une protéine qui régule l'influx calcique et l'excitabilité neuronale, notamment dans les cellules granulaires du gyrus denté. Une baisse d'expression de la calbindine dans ces cellules a été rapportée chez les souris Tg2576 à partir de l'âge de 6 mois [58, 183], les hAPPJ20 à l'âge de 5 à 7 mois [172, 184, 186] et les APP_{swe}XPS1_{dE9} de 4 mois [122] (Figure 11). Chez les patients atteints de la MA, des modifications d'expression du NPY dans l'hippocampe n'ont pas été rapportées mais une diminution de l'expression de la calbindine a été décrite au niveau du cortex temporal [187, 188].

D'autre part, des fibres moussues collatérales se forment à partir des fibres principales et se projettent juste au dessus de la couche granulaire du gyrus denté chez les souris APP_{swe}XPS1_{dE9} de 4 mois [122], les souris hAPPJ20 de 5-7 mois et les souris Tg2576 femelles de 12 à 14 mois [176]. Chez les hAPPJ20,

il a été montré que ces fibres moussues collatérales projettent sur les interneurones GABAergiques en panier exprimant la parvalbumine (Figure 12 centrale, en bleu), favorisant l'inhibition des cellules granulaires par ces interneurones. Chez les souris hAPPJ20 (Figure 12, au centre) contrairement aux souris NTg (Figure 12, gauche), l'axone des interneurones hilaires exprimant la somatostatine et le neuropeptide Y se ramifie et se projette sur un plus grand nombre de cellules granulaires pour inhiber leur activité (Figure 12 centrale, en vert) [172].

Ces altérations peuvent représenter des mécanismes compensateurs inhibiteurs déclenchés par une augmentation anormale de l'activité neuronale dans les régions corticales projetant sur le gyrus denté ou du gyrus denté lui-même. Les modèles d'épilepsie montrent des altérations similaires et mais surtout possèdent des altérations épiléptogéniques qui favorisent l'excitation des cellules granulaires (Figure 12, à droite), comme la perte des interneurones hilaires SOM/NPY + (vert clair) et la formation de fibres moussues récurrentes (orange) projetant sur les dendrites des cellules granulaires.

En conclusion, les modifications protéiques et cellulaires de l'hippocampe diffèrent entre les modèles d'épilepsie et les modèles de la MA, suggérant que le phénomène d'hypersynchronie neuronale auquel contribuent ces remodelages n'est pas le même dans ces deux conditions pathologiques.

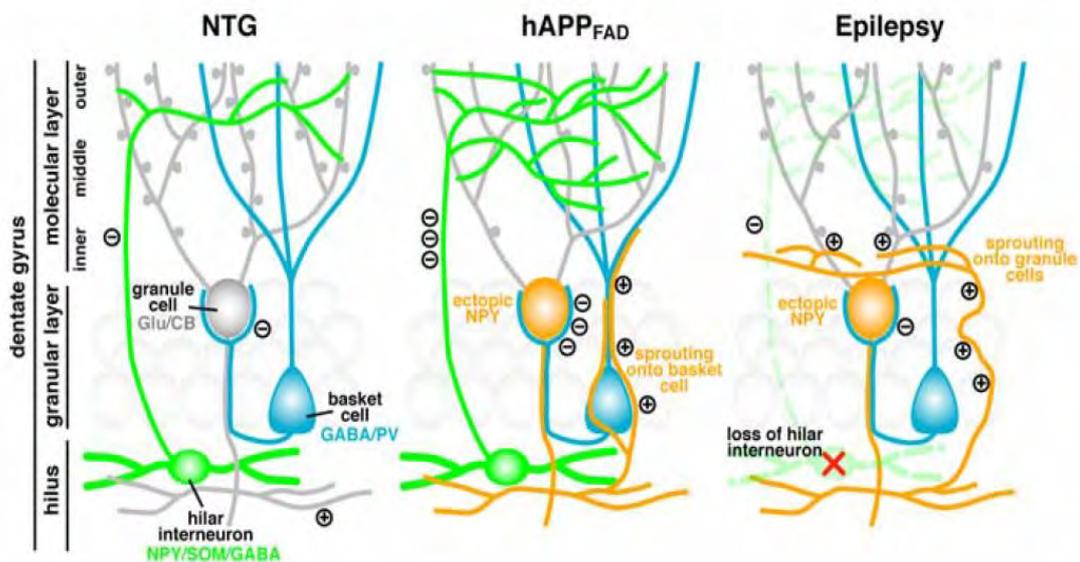


Figure 12. Altérations cellulaires et moléculaires au niveau du gyrus denté hippocampique chez les souris hAPPJ20 et les modèles d'épilepsie

[172]. CB : calbindine, PV : parvalbumine, SOM : somatostatine, NPY : neuropeptide Y. FAD : modèle murin de la forme familiale de la maladie d'Alzheimer. Orange : expression du NPY dans les cellules granulaires, bleu : interneurone en panier exprimant la parvalbumine, Vert : interneurone hilaire.

III.3) Mécanismes cellulaires de l'hypersynchronie neuronale dans la MA

La présence de crises d'épilepsie et de pointes interictales peut avoir pour origine deux composantes indépendantes : une altération de l'excitabilité des cellules excitatrices et une altération de la fonction des interneurons qui synchronisent les cellules excitatrices entre elles.

III.3.1) Altération de l'excitabilité neuronale chez les souris modèles de la MA

L'excitabilité neuronale regroupe l'ensemble des propriétés d'un neurone qui participent à l'émission des potentiels d'action et leur propagation. Elle dépend notamment du potentiel membranaire de repos, c'est-à-dire la différence de charges positives et négatives entre le milieu intra et extracellulaire lorsque le neurone n'est pas stimulé. Elle peut aussi dépendre du fonctionnement de certains canaux ioniques impliqués dans la genèse et la propagation des potentiels excitateurs ou inhibiteurs post-synaptiques, au niveau dendritique, ou du potentiel d'action au niveau de l'axone.

Divers travaux rapportent une altération de l'excitabilité neuronale dans différents modèles de la MA. Les cellules pyramidales du cortex et les cellules granulaires du gyrus denté présentent un potentiel membranaire de repos plus élevé, favorisant le déclenchement des potentiels d'action, chez les souris APP_{swe}XPS1_{dE9} (Figure 13) [121, 122]. Chez les souris PDAPP, il a été montré que les cellules pyramidales de CA1, une fois dépolarisées, émettent des potentiels d'action plus rapides et plus courts [189]. Chez les souris Tg2576 âgées de 2 à 4 mois, les cellules du cortex entorhinal répondent de façon répétée à une stimulation unique de la matière blanche contrairement aux souris NTg dont les cellules ne s'activent qu'une fois, ce qui suggère une hyperexcitabilité neuronale chez les souris Tg2576 dans cette région cérébrale [103].

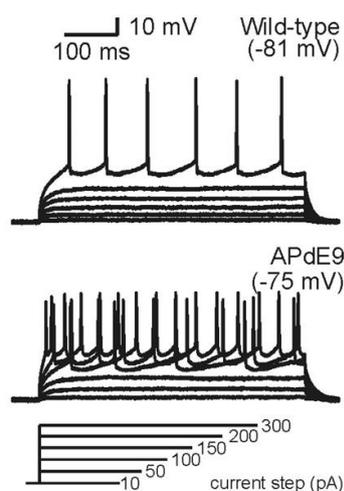


Figure 13 : Hyperexcitabilité des cellules pyramidales du cortex chez les souris APP_{swe}XPS1_{dE9}

Une injection de courant par palier dans le corps cellulaire des cellules pyramidales des couches 2/3 corticales conduit à la génération prématurée de potentiels d'action chez les souris APP_{swe}XPS1_{dE9} pour un palier de courant inférieur à celui nécessaire à la décharge des neurones chez les souris sauvages. Les différents traits

correspondent aux réponses électriques mesurées pour les différents paliers de courant injecté (en bas de la figure) [122]

Chez les souris hAPPJ20, une hyperexcitabilité dendritique a été mesurée au niveau des cellules pyramidales de CA1 et serait due à une déplétion des canaux Kv4.2 dendritiques. Tau pourrait jouer un rôle dans cette déplétion [190]. De façon intéressante, une étude réalisée chez des souris APP/PS1 (APP_{swe} et mutation M146V de la PS1) a montré grâce à des outils computationnels que la dégénérescence dendritique observée dans les cellules pyramidales de la région CA1 chez ces souris (notamment une diminution de la longueur des dendrites et du nombre de ramifications) pouvait être responsable de l'augmentation de l'excitabilité neuronale [191].

D'autre part, cette altération de l'excitabilité neuronale des souris APP_{swe}xPS1_{dE9} pourrait être due, du moins en partie, à une perturbation du métabolisme énergétique des neurones. Zilberter et son équipe ont montré que les propriétés membranaires des cellules granulaires du gyrus denté se normalisent chez les souris APP_{swe}xPS1_{dE9} lorsque la production énergétique est restaurée par une supplémentation en substrats énergétiques directement oxydables par la mitochondrie [121]. *In vivo*, cette supplémentation a aussi supprimé les pointes interictales observées sur l'EEG. En effet, ces substrats permettent d'éviter l'utilisation du glucose dont le transport est perturbé par le peptide amyloïde [192, 193]. Cette étude montre donc que l'hyperexcitabilité neuronale et les pointes interictales qui en résulteraient chez les souris APP_{swe}xPS1_{dE9} pourraient être dues à un déficit cellulaire énergétique. Actuellement, de nombreuses pistes de recherche suggèrent que dans la forme tardive de la MA, il existerait une perturbation du métabolisme neuronal du glucose, qui serait due à une insulino-résistance comme dans le diabète de type II pour les tissus non neuronaux (pour revue [194]).

III.3.2) Altération des interneurones

Une pathologie interneuronale (mortalité ou dystrophie des axones ou dendrites) a été mise en évidence dans différents modèles de la MA. Une diminution du nombre des interneurones exprimant la calrétinine a été observée chez les souris PS1/APP dans les régions CA1, CA2 et CA3 dès l'âge de 4 mois (35 à 45 %) [195] et chez les souris APP(SL)/PS1 KI dans le gyrus denté et le hile (37-52%) [196]. Une diminution du nombre des interneurones à somatostatine dans l'hippocampe a aussi été observée dans le stratum oriens chez les souris Tg2576 à 5,5 mois [197], les souris PS1/APP à 6 mois (Ramos) et dans la région CA1 à l'âge de 4 mois chez les souris β APP751SwedLondon /PS1M146L [198]. Une perte des interneurons à parvalbumine a été décrite chez les souris APP(SL)/PS1 KI (40-50%) dans la région CA1-2 [196]. Dans le modèle hAPPJ20, une diminution du nombre d'axones et des contacts synaptiques des interneurones du septum projetant sur les interneurones hippocampiques, sans perte neuronale

septale, a été observée à l'âge de 8 mois. Ces altérations ont été associée à une diminution de l'amplitude des oscillations thêta et gamma [199]. D'autre part, chez des souris exprimant l'allèle E4 de l'ApoE, qui est un allèle de susceptibilité pour la MA, il existe une perte des interneurones hilaires reliée aux déficits de mémoire spatiale [200, 201]. En conclusion, d'un point de vue neuroanatomique, plusieurs modèles murins de la MA présentent une mortalité ou une dystrophie des interneurones qui engendreraient une hypoinhibition et favoriserait l'emballement de l'activité neuronale excitatrice et l'apparition des crises d'épilepsie dans ces modèles de la MA.

L'un des premiers travaux évoquant une altération fonctionnelle des interneurones dans un modèle murin de la MA, fut le travail de Busche qui enregistra les courants calciques intracellulaires de cellules corticales (couche L2/3), reflet de leurs potentiels d'action, chez la souris APP_{Swe} x PS45 [202]. Par rapport aux souris contrôles, 50 % des cellules corticales enregistrées chez les souris transgéniques présentaient une altération de leur activité spontanée, étant soit silencieuses soit hyperactives. Cette hyperactivité était due à un déficit de l'inhibition car l'administration d'un agoniste des récepteurs GABA faisait disparaître l'hyperactivité neuronale [202].

Plus tard, une dysfonction des interneurones à parvalbumine fut mise en évidence chez les souris hAPP20 [180]. Chez ces souris, l'amplitude des oscillations gamma (de fréquence comprise entre 20 et 80 Hz) était plus basse que celle des souris NTg et les pointes interictales survenaient uniquement pendant les périodes de faible amplitude des oscillations gamma [180]. Les oscillations gamma sont générées par une classe particulière d'interneurones que sont les cellules en panier exprimant la parvalbumine (PV). Or, l'amplitude des potentiels d'action (PA) initiés par ces interneurones était diminuée. De façon intéressante, la quantité des canaux sodiques Nav1.1, présents majoritairement sur ces interneurones à parvalbumine et impliqués dans la propagation des PA [203], était diminuée dans le cortex pariétal des souris hAPPJ20. Verret et al. ont démontré que le déficit en canaux Nav1.1 serait à l'origine de l'altération des oscillations gamma et de la survenue des pointes interictales. En effet, l'inhibition des canaux sodiques voltage dépendant a aggravé l'activité épileptique des souris hAPPJ20. En revanche, la surexpression de ces canaux Nav1.1 a normalisé l'amplitude des oscillations gamma, diminué le nombre de pointes interictales et amélioré les performances mnésiques des souris hAPPJ20. L'étude de Verret et al. est la première à mettre en cause la dysfonction des interneurones à parvalbumine dans les altérations oscillatoires, épileptiformes et mnésiques dans des souris modèles de la MA, ouvrant ainsi des perspectives thérapeutiques, telles que la greffe d'interneurones dans le cortex pour traiter les troubles de mémoire dans la MA [204]. D'une façon similaire, une diminution de la quantité de canaux Nav1.1 a aussi été décrite chez les patients atteints de la MA [180]. En revanche, un déficit global de ces canaux n'a pas été montré au niveau du cortex pariétal des souris Tg2576 à l'âge de 5-7 mois [183].

Chez les souris APP_{swe}XPS1_{dE9} âgées de 12 à 16 mois, l'imagerie par fluorochrome sensible au voltage a montré qu'une stimulation à 40 Hz des afférences vers le gyrus denté entraînait l'activation d'un plus grand nombre de cellules granulaires [205] que chez les souris contrôles. Cette hypersynchronie des cellules du gyrus denté était associée à une altération des interneurons inhibiteurs qui ne parvenaient pas à produire de bouffées de potentiels d'action en réponse à une injection de courant. L'étude de Hazra (2013) comme celle de Verret [180] montre que l'hypersynchronie neuronale peut être due à une altération de l'inhibition interneuronale.

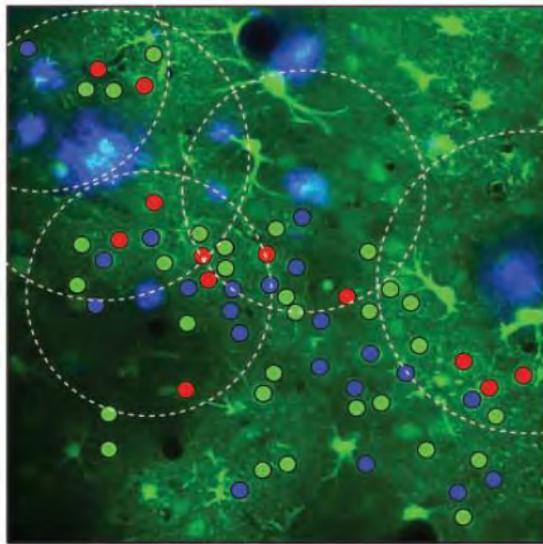
D'autres mécanismes pourraient expliquer l'hypersynchronie neuronale. Chez les souris APP/PS1 de 6-8 mois, une hyperactivité des astrocytes a été observée [206]. Or, les astrocytes libèrent du glutamate ou des cytokines pro-inflammatoires, qui peuvent influencer la synchronie ou l'excitabilité neuronale [207].

III.3.3) Réponse aux antiépileptiques

La réponse de différents modèles murins de la MA à l'administration d'antiépileptiques peut apporter un éclairage sur les mécanismes de l'hypersynchronie neuronale dans ces modèles. Chez les souris hAPPJ20, l'effet aigu de différents traitements antiépileptiques a été évalué sur la fréquence des pointes interictales [184]. La phénytoïne (100 mg/ kg en injection aiguë, intra-péritonéale), un bloqueur de canaux sodiques, et le pregabalin, un bloqueur de canaux calciques dépendants du voltage, ont entraîné tous les deux une augmentation de la fréquence des pointes [184]. Le vigabatrin, gabapentin, acide valproïque et ethosuccimide n'ont pas eu d'effet sur cette fréquence [184]. Seul le lévétiracétam a diminué la fréquence des pointes interictales [184]. Cette molécule est un inhibiteur de la protéine SV2A [208] qui facilite l'exocytose des vésicules à la membrane [209, 210] et donc la libération de glutamate dans la fente synaptique. Chez les souris hAPPJ20, la diminution de la quantité de canaux sodiques Nav1.1 dans le cortex pariétal est associée à l'apparition des pointes interictales [180], qui pourrait expliquer l'augmentation de leur fréquence avec la phénytoïne, bloqueur de canaux sodiques [180]. Chez le patient atteint de la MA, un déficit en canaux sodiques Nav1.1 a aussi été observé et pourrait expliquer l'efficacité antiépileptique très limitée de la phénytoïne et la mauvaise tolérance chez les patients (20% des patients sans crises) [164].

En revanche, dans le modèle murin APP_{swe}XPS1_{dE9} de la MA, la phénytoïne (10 mg/kg, deux fois par jour) a diminué la fréquence des décharges interictales chez ces souris. Or, aucune diminution de la quantité des canaux sodiques Nav1.1 n'a été mise en évidence dans le cortex et l'hippocampe chez ces souris [181]. En conclusion, les différences de réponse aux antiépileptiques des modèles murins de la MA suggèrent des origines physiopathologiques différentes de l'hypersynchronie neuronale chez ces souris.

III.3.4) Quels acteurs de la physiopathologie de la MA pourraient être en cause dans l'altération de l'activité neuronale ?



● - Silent, ● - Normal, ● - Hyperactive cells

Figure 14 : Activité des neurones et leur localisation par rapport aux plaques amyloïdes dans le cortex frontal des souris APP23xPS45

Photographie au microscope biphotonique (objectif x10) de la couche 2/3 du cortex frontal d'une souris APP23xPS45. Les aires bleues diffuses représentent les plaques amyloïdes. Chaque point représente une cellule dont les courants calciques sont enregistrés (le code couleur est sous la photographie). Les cercles en pointillés représentent l'aire à proximité des plaques (<60 μm). On voit nettement que les cellules rouges, hyperactives, ne sont retrouvées qu'à proximité des plaques. [202]

Les premiers travaux mettant en évidence un lien entre l'amyloïdopathie et l'hyperactivité neuronale furent les travaux de Busche. Les

cellules hyperactives dans le cortex des souris APP_{Swe} x PS45 n'étaient retrouvées qu'à proximité des plaques amyloïdes (<60μm) et les autres cellules étaient distribuées dans tout le cortex (Figure 14). De plus, chez des souris jeunes d'1 mois ½ à 2 mois sans dépôts amyloïdes, de telles cellules hyperactives n'étaient pas observées [202]. Donc, les plaques amyloïdes semblaient être à l'origine de l'hyperactivité neuronale. Plus tard, Busche et son équipe montrèrent, également par imagerie calcique *in vivo*, la présence de neurones pyramidaux hyperactifs dans la région CA1 de l'hippocampe chez des souris APP_{Swe}xPS1_{G384A} avant l'apparition des plaques. Comme l'application locale de formes solubles du peptide amyloïde à des souris saines provoque une hyperactivité neuronale de ces cellules de CA1 [211], cela suggère que ce ne sont pas les plaques amyloïdes mais le peptide amyloïde soluble, qui est aussi retrouvé en grandes quantités autour des plaques amyloïdes, qui est à l'origine de l'hyperactivité neuronale. En accord avec ces données, Minkeviciene et al. (2009) montrèrent que l'incubation de coupes d'hippocampe de souris APP_{Swe}xPS1_{dE9} dans un milieu contenant du peptide amyloïde protofibrillaire (forme précédant la forme fibrillaire) augmentait le potentiel de membrane de repos des cellules pyramidales corticales, les rapprochant donc du potentiel à atteindre pour déclencher un potentiel d'action [122]. D'autre part, Liu et al. ont rapporté que l'exposition de cultures de neurones hippocampiques à des concentrations pathologiques de peptide amyloïde augmente l'expression de récepteurs nicotiques α7 qui seraient impliqués dans l'hyperexcitabilité neuronale de ces neurones [212]. Or, le peptide amyloïde est sécrété en fonction de l'activité neuronale [213]. En fonction de sa concentration au niveau de la fente synaptique, il facilite la transmission synaptique par son action présynaptique (faible concentration) ou freine cette transmission par son action postsynaptique (forte concentration). Ainsi, l'effet du peptide amyloïde soluble pourrait varier en

fonction de sa concentration synaptique et le type de synapse (excitatrice ou inhibitrice), conduisant à une activité aberrante des réseaux neuronaux dans un contexte d'amyloïdopathie [214].

Mais le peptide amyloïde ne serait pas le seul agent causal de l'hyperexcitabilité neuronale chez les souris modèles de la MA. La mutation de l'APP ou des présénilines dans ces modèles dérégule de nombreux paramètres du métabolisme de l'APP, entraînant une surproduction du peptide amyloïde mais aussi des métabolites de l'APP tels que le fragment intracellulaire de l'APP (AICD) ou les longs fragments solubles de l'APP. L'activité enzymatique des sécrétases peut aussi être perturbée. Il est donc difficile chez ces souris modèles de connaître la contribution de chacune de ces modifications sur la physiopathologie de la MA et sur celle de l'hypersynchronie neuronale dans la MA.

Notamment, des souris qui surexpriment le domaine intracellulaire de l'APP présentent des pointes interictales et des crises d'épilepsie et développent avec l'âge une expression ectopique du NPY dans les fibres moussues [215, 216]. Ces observations ne sont pas retrouvées chez des souris produisant de grandes quantités de peptide amyloïde mais ayant une mutation de l'AICD [215].

D'autre part, la beta et la gamma sécrétases sont impliquées dans la formation de canaux Nav1.1 fonctionnels qui participent à la genèse des potentiels d'action des interneurons à parvalbumine [217]. La fonction ou la quantité de ces deux enzymes étant altérées dans la MA [14, 15, 16, 17, 183, 218], il pourrait en résulter une diminution du nombre de canaux Nav1.1 fonctionnels présents à la membrane et donc une altération de l'inhibition interneuronale comme le montre l'étude de Verret [180].

L'APP elle-même pourrait jouer un rôle dans l'hypersynchronie neuronale. Chez les souris APP/TTA, l'expression d'une forme mutée d'APP est sous le contrôle d'un promoteur sensible à la doxycycline. Born et al. (2014) ont montré que l'administration de doxycycline pendant 4 semaines chez des souris âgées de 8 mois supprime l'expression de l'APP et entraîne une diminution progressive de la fréquence des pointes interictales chez ces souris [174]. En revanche, l'administration d'un inhibiteur de γ -sécrétase pendant 4 semaines, qui diminue les taux des peptides $A\beta_{1-42}$ et $A\beta_{1-40}$ solubles sans empêcher la synthèse d'APP, n'a eu aucun effet sur le taux de pointes interictales quand les souris sont âgées de 9 mois [174]. D'autre part, il semble que l'expression de la forme mutée de l'APP pendant le développement cérébral (avant l'âge de 1,5 mois chez la souris) accélère l'apparition d'une hypersynchronie neuronale par rapport à des souris qui exprimeraient l'APP mutée après l'âge de 1,5 mois [174]. En effet, l'APP est fortement exprimée et joue un rôle important pendant le développement cérébral (particulièrement entre la 2^e et la 6^e semaine de vie) où elle est impliquée dans la neurogenèse, le développement neuritique ou la formation des synapses [46]. L'expression de

l'APP mutée pendant la corticogénèse pourrait donc perturber la mise en place des réseaux neuronaux prédisposant ceux-ci à l'hypersynchronie neuronale.

Quant à la protéine tau, son KO diminue la susceptibilité aux crises d'épilepsie induites par un antagoniste des récepteurs GABA_A (PTZ) chez les souris hAPPJ20 et réduit le phénotype épileptique des souris modèles du syndrome épileptique de Dravet, en améliorant dans les deux cas les performances mnésiques des souris [75, 219]. De plus, un modèle murin de démence frontotemporale qui surexprime une forme mutée de la protéine Tau présente des crises d'épilepsie spontanées [220]. La protéine tau pourrait donc contribuer à l'hypersynchronie neuronale dans les modèles murins de la MA, bien qu'il n'existe à ce jour aucune étude témoignant d'une hypersynchronie neuronale chez les modèles de la MA présentant des mutations de Tau isolées.

III.4) Lien entre l'hypersynchronie neuronale et troubles cognitifs dans la MA

Chez l'homme, certaines études mettent en relation la survenue de crises d'épilepsie et les caractéristiques de la démence. Selon la méta-analyse de Friedman, la proportion de patients épileptiques est plus élevée chez les patients atteints de la MA institutionnalisés, supposant une démence sévère (de 9 à 64%) [162, 221, 222] que chez les patients présentant une démence modérée (1,6 à 16%) [158, 159, 163]. Friedman fait alors l'hypothèse que la survenue de crises d'épilepsie pourrait être associée à un stade plus tardif de la MA [169]. De plus, il semble qu'une démence plus précoce soit associée à un risque accru de crises d'épilepsie [158, 159, 164]. Par exemple, dans l'étude de Vossel, les patients MCI ou Alzheimer qui étaient aussi épileptiques ont présenté un déclin cognitif plus précoce, respectivement 6,8 et 5,5 ans avant les patients non épileptiques [164]. Enfin, des études indiquent que les crises d'épilepsie chez les patients atteints de la MA pourraient précéder la détérioration des fonctions cognitives [163, 223]. Plus récemment, Bakker a montré que le lévétiracétam, un antiépileptique atypique, améliore les performances mnésiques de patients atteints d'un MCI amnésique (aMCI), associé à une diminution de l'hyperactivité hippocampique [224]. Dans cette étude, les patients aMCI devaient différencier des objets déjà vus vis-à-vis d'objets nouveaux et d'objets ressemblant aux objets connus. Cette aptitude à construire des traces mnésiques distinctes d'objets différents mais similaires (séparation de patrons), requiert la fonction de la région gyrus denté-CA3 de l'hippocampe. Or, les mauvaises performances obtenues dans cette tâche ont été associées à une hyperactivité BOLD (blood-oxygen-level dependent) de cette région hippocampique en IRM fonctionnelle. Les auteurs ont montré qu'un traitement par lévétiracétam permet de prévenir l'hyperactivité de cette région gyrus denté-CA3 et d'améliorer les performances mnésiques dans cette même tâche de mémoire [224]. Cette étude souligne que l'activité anormalement élevée d'une structure mnésique peut empêcher son fonctionnement normal et entraîner des troubles de mémoire.

Cette étude fait écho à l'hypothèse de Palop et al. (2007) selon laquelle l'activité hippocampique aberrante et/ou les remodelages cellulaires qu'elle entraîne pourraient participer aux troubles mnésiques des souris modèles de la MA (ici hAPPJ20) [172].

Chez les souris modèles de la MA, un petit nombre de travaux suggèrent la participation de l'hypersynchronie neuronale dans les troubles mnésiques liés à la MA. Initialement, une diminution de l'expression de la calbindine dans les cellules granulaires du gyrus denté a été observée chez les souris hAPPJ20, altération moléculaire également retrouvée dans les modèles d'épilepsie. De façon surprenante, la diminution de cette protéine a été corrélée positivement à de mauvaises performances mnésiques dans le test de la piscine de Morris, reflétées par la latence à atteindre la plateforme dont les souris devaient apprendre la localisation [186]. Avec la découverte du phénotype épileptique des souris hAPPJ20 quelques années plus tard [172], Palop et Mucke ont posé l'hypothèse que les remodelages du réseau hippocampique liés à l'épilepsie, tels que la baisse de la calbindine (CB) ou l'expression du NPY dans les fibres moussues, pouvaient altérer le fonctionnement normal de cette structure chez ces souris, favorisant *in fine* l'apparition de troubles mnésiques [214].

Puis, une étude des effets du lévétiracétam sur les performances mnésiques des souris hAPPJ20 a été menée [184], faisant écho à l'étude de Bakker, à la même période. Des souris hAPPJ20 et leurs congénères NTg ont été traités pendant un mois par lévétiracétam. Les souris transgéniques traitées ont présenté une diminution de 50 % de la fréquence des pointes interictales par rapport aux enregistrements antérieurs au traitement et les modifications d'expression du NPY, de la calbindine et de c-fos liées aux crises d'épilepsie ont disparu. De façon intéressante, les souris hAPPJ20 traitées ont présenté de meilleures performances mnésiques dans le test de la piscine de Morris, dans un test de reconnaissance d'objet et de familiarisation au contexte que les souris transgéniques traitées par du NaCl. De plus, ce traitement a supprimé les anomalies comportementales telles que l'hyperactivité et la désinhibition comportementale. Ces effets du lévétiracétam étaient dépendants de la dose et transitoires car 35 jours après la fin du traitement, les anomalies comportementales et les altérations moléculaires liées à l'épilepsie sont réapparues [184].

Cette amélioration des performances mnésiques suite à la suppression de l'hypersynchronie neuronale peut suggérer une contribution des pointes interictales ou des remodelages hippocampiques aux troubles mnésiques de la MA. Cependant, on ne peut exclure que d'autres effets du lévétiracétam sur la synapse ne soient à l'origine de l'amélioration mnésique constatée.

Enfin, des données non publiées semblent indiquer le rôle des crises d'épilepsie dans l'apparition des troubles mnésiques chez de jeunes souris Tg2576 [225]. Les souris Tg2576 et leurs congénères NTg âgées de 2 mois ont subi 4 protocoles de stimulations électriques cérébrales pro-convulsivantes

s'étendant sur 14 jours. A cet âge, les souris Tg2576 ne présentent pas encore de déficits mnésiques. Un jour après la fin de ces protocoles, les souris NTg et Tg2576 devaient apprendre à associer un environnement précis au fait de recevoir un choc électrique sur les pattes dans ce contexte (test de conditionnement de peur au contexte). De façon intéressante, seules les souris Tg2576 n'ont pas réussi à associer le choc au contexte contrairement aux souris NTg soumis à ces mêmes protocoles proconvulsivants. Ces expériences montrent donc que les crises d'épilepsie induites dans un contexte de pathologie amyloïde peuvent entraîner des déficits mnésiques et suggèrent fortement que les crises d'épilepsie survenant naturellement chez les souris modèles de la MA peuvent contribuer à la dysfonction mnésique.

IV) Le concept de réserve cognitive et l'enrichissement environnemental

IV.1) Historique et études épidémiologiques

Les effets bénéfiques des stimulations environnementales sur le fonctionnement cérébral ont été fortuitement mis en évidence par Donald Hebb en 1947, lorsqu'il observa que les rats domestiques qui jouaient avec ses enfants résolvaient mieux les tâches comportementales que les rats hébergés en cage de laboratoire [226]. Plus tard, ces effets cognitifs vont être expliqués par des modifications anatomiques telles qu'une augmentation du poids du cortex cérébral [227], notamment due au développement accru de l'arborisation dendritique et à une augmentation de la densité d'épines dendritiques [228] ainsi qu'à l'augmentation du nombre de cellules gliales [229]. En montrant l'impact négatif de la privation maternelle sur le développement émotionnel, sexuel et social des macaques isolés, Harry Harlow montra que, outre les stimulations cognitives, les stimulations sociales sont nécessaires au bon développement cérébral du jeune individu [230]. L'effet bénéfique de la socialité est en dehors du champ d'investigation de ma thèse et ne sera pas abordé davantage.

Ces stimulations environnementales chez l'homme ont également un effet protecteur sur les fonctions cognitives dans les pathologies neurodégénératives (la MA en particulier). Initialement, l'étude de Katzman réalisée sur 137 examens *post-mortem* a révélé la présence de plaques amyloïdes chez des patients non déments, montrant l'inadéquation entre le niveau d'atteinte cérébrale (plaques) et les performances cognitives de l'individu [231]. Quels facteurs peuvent donc moduler le lien entre atteinte cérébrale et fonction cognitive ? En 1994, sur une cohorte de 593 d'individus non déments, Stern a montré que le risque de développer la maladie d'Alzheimer est diminué par 2 chez les personnes ayant fait plus de huit ans d'études supérieures [232]. La pratique d'activités de loisirs et la réussite professionnelle ont aussi été associées à un plus faible risque de développer la MA [232, 233], comme

l'ont aussi montré les études de la cohorte PAQUID [234]. De plus, la corrélation inverse entre le niveau de performances cognitives et la surface totale occupée par les plaques amyloïdes est très faible chez les individus ayant un niveau d'éducation et une intelligence verbale supérieure [235]. Ces études montrent qu'un mode de vie cognitivement stimulant peut conférer une protection contre la détérioration cognitive liée à l'atteinte neuropathologique de la MA (plaques amyloïdes), expliquant ainsi l'inadéquation entre atteintes cérébrale et cognitive. Mais quels sont les substrats cérébraux responsables de cette résilience à l'expression clinique de l'atteinte cérébrale ?

IV.2) Concepts de réserve cérébrale et de réserve cognitive

A la fin des années 1980, les différences interindividuelles de résistance à la pathologie étaient expliquées par la composante passive de la réserve, souvent appelée réserve cérébrale. L'existence d'une réserve cérébrale implique que l'atteinte cérébrale deviendrait symptomatique au-delà d'une certaine quantité de détérioration cérébrale, identique pour tous les individus. Ainsi, la taille du cerveau, le nombre de neurones et de synapses seraient des facteurs cruciaux permettant d'expliquer que certains individus maintiennent de bonnes performances cognitives malgré les atteintes neuropathologiques [231, 236]. Plus récemment, la notion de réserve cognitive, composante active, est venue compléter ce concept en suggérant qu'au cours de la vie adulte, il est possible de développer des ressources cérébrales qui vont réduire le risque d'atteinte cognitive. Ainsi, un individu avec une forte réserve cognitive serait capable d'endurer un niveau élevé d'atteinte cérébrale avant d'atteindre le seuil au-delà duquel l'expression clinique de cette atteinte devient mesurable (Figure 15). Notamment, les sujets ayant un niveau d'éducation plus élevé présentent un amincissement cortical supérieur à celui des sujets moins éduqués, à même niveau de performances cognitives. Chez ces sujets très éduqués, la mesure de l'épaisseur corticale en IRM s'avère être un meilleur outil pour diagnostiquer la MA que les batteries de tests cognitifs [32].

Ce maintien des performances mnésiques malgré l'atteinte cérébrale résulterait à la fois d'un fonctionnement cérébral plus efficace et de meilleures capacités cognitives mais également de l'utilisation de réseaux cérébraux alternatifs compensatoires. Ceci est illustré dans le cadre de la maladie d'Alzheimer par de récentes études d'imagerie fonctionnelle réalisées chez l'homme montrant que, lors de la réalisation d'une tâche mnésique, le recrutement des réseaux cérébraux est modulé par la réserve cognitive des individus. Ainsi, les personnes à forte réserve cognitive recruteraient davantage les réseaux cérébraux normalement impliqués et solliciteraient également des réseaux alternatifs, afin d'assurer des performances cognitives normales [237].

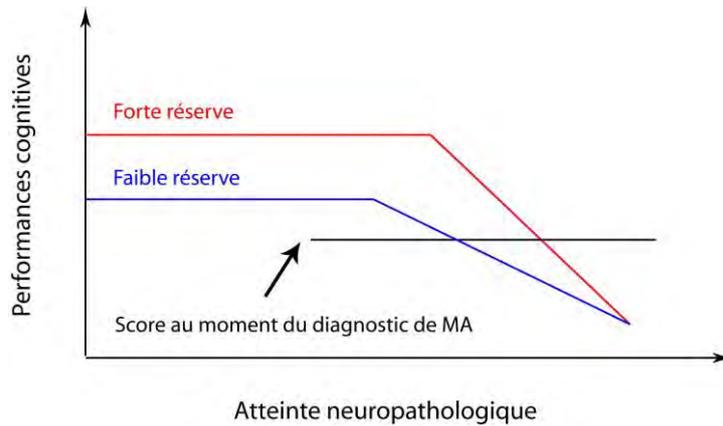


Figure 15 : Illustration théorique de la façon dont la réserve cognitive pourrait agir sur le déclin cognitif associé à la progression de la MA.

D'après cette hypothèse, les personnes ayant développé une plus grande réserve cognitive (ligne rouge) maintiennent des performances mnésiques plus longtemps et leur démence est diagnostiquée à un stade plus avancé de la pathologie cérébrale. Une fois diagnostiquées, les personnes à forte réserve cognitive présentent un déclin cognitif plus rapide, considérant que la détérioration cognitive maximale est atteinte pour un même niveau d'atteinte cérébrale, quelle que soit la réserve de l'individu. D'après [238].

IV.3) Modélisation de la réserve cognitive chez l'animal

Dans l'objectif d'identifier le(s) substrat(s) neurobiologique(s) de la réserve cognitive, l'expérimentation animale a tenté de reproduire l'équivalent de cette réserve, grâce à des protocoles d'enrichissement environnemental (EE). Ceci consiste à héberger des groupes d'animaux dans un large espace contenant une multitude d'objets fréquemment renouvelés et que les animaux sont libres d'explorer (Figure 16,17). Ce protocole a été appliqué à différentes espèces animales (souris, rat, chien) mais nous nous concentrerons sur les études dédiées aux rongeurs. Dans la plupart de ces études, les protocoles d'enrichissement environnemental ne sont pas standardisés et diffèrent notamment sur le nombre d'animaux des groupes d'enrichissement, la nature des objets, la durée quotidienne et totale de l'enrichissement. Ces variations peuvent expliquer les différences entre les effets cognitifs observés, par exemple, la présence de roue d'exercice augmente l'exercice physique dont l'effet sur la neurogenèse a été montré [239 , 240]. Récemment, des cages d'enrichissement environnemental standardisées ou cages Marlau® (Viewpoint, Lyon) ont été commercialisées afin de répondre au besoin d'uniformiser les protocoles pour pouvoir comparer les études entre elles [241]. Les effets directs de l'enrichissement environnemental sont expliqués dans la Figure 16.

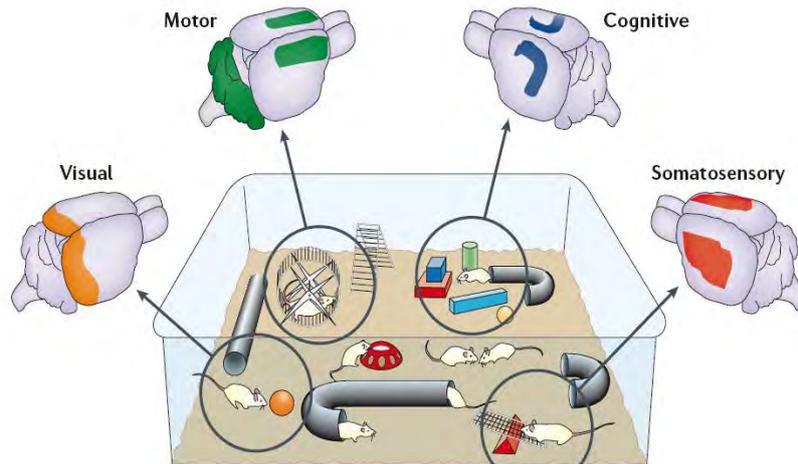


Figure 16. L'environnement enrichi et les zones cérébrales sollicitées par ses différentes composantes.

Cet environnement induit une activation neuronale et une plasticité dans diverses régions cérébrales. Les stimulations visuelles et somatosensorielles favorisent la plasticité des cortex sensoriels concernés (orange et rouge). L'exploration de l'environnement, la reconnaissance des objets et la modulation de l'attention par la nouveauté constituent des stimulations cognitives qui vont activer notamment l'hippocampe (bleu) et le cortex entorhinal. De plus, l'exploration implique une activité motrice accrue qui sollicite le cortex moteur et le cervelet (vert). Il s'agit d'un enrichissement en stimulations multi-sensorielles en comparaison avec les conditions d'élevage standard des animaux [242].

IV.4) Effets cellulaires et moléculaires de l'EE

Il a été rapporté que l'EE conduisait à une augmentation de la taille et du poids du cerveau, un épaississement du cortex et de l'hippocampe, un élargissement des corps cellulaires corticaux, une augmentation de la quantité d'ADN, d'ARN, et de protéines [227 , 243]. Ces modifications induites par l'EE proviennent d'une stimulation de la plasticité cérébrale. En effet, l'EE augmente la neurogenèse hippocampique adulte [244 , 245] et favorise la création de nouvelles synapses [246, 247]. Cet effet sur la synaptogenèse pourrait provenir d'une expression accrue de protéines synaptiques induite par l'EE, comme la synaptophysine (protéine des vésicules présynaptiques) et la PSD-95 (postsynaptic density-95 protein), protéine structurante de l'élément postsynaptique [248]. Enfin, l'EE augmente la potentialisation à long terme [249, 250]. Cet effet pourrait être lié à une augmentation des taux extracellulaires de BDNF (facteur neurotrophique dérivé du cerveau) [251 , 252] ou de l'expression de récepteurs au glutamate, tel que le récepteur AMPA, observée chez les animaux enrichis [253]. Récemment, un autre mécanisme de plasticité également influencé par l'enrichissement environnemental a été mis en évidence. Il a été montré que le niveau de différenciation des interneurons exprimant la parvalbumine influence la plasticité neuronale des neurones cibles qu'ils inhibent. Notamment, la différenciation des interneurons à parvalbumine se traduit par l'expression accrue de la parvalbumine et la formation d'une matrice extracellulaire périsonomatique. Cette matrice

périsomatique des interneurons favorise la stabilisation des synapses des neurones excitateurs et favorise l'établissement d'une mémoire à long-terme. En revanche, chez les animaux soumis à un enrichissement environnemental, les interneurons à parvalbumine déstabilisent les synapses, permettant leur modification sous l'influence des nouveaux apprentissages que fait l'animal [254].

Dans leur ensemble, les processus de plasticité induits par l'enrichissement environnemental expliquent d'une part l'augmentation du volume neuronal qui sous-tend la réserve cérébrale et d'autre part, l'adaptabilité et l'efficacité accrues des réseaux neuronaux à l'origine de la réserve cognitive.

IV.5) Effets de l'EE sur la mémoire chez les modèles murins de la MA

Chez les souris saines, l'enrichissement améliore l'apprentissage et la mémoire [247, 255], réduit le déclin mnésique des animaux âgés (Morse 2015), diminue l'anxiété et augmente l'activité exploratoire [256, 257]. Cette amélioration de l'apprentissage et de la mémoire induite par l'EE pourrait être la conséquence de ses effets cellulaires sur la plasticité synaptique, notamment la restructuration des réseaux, la modification des connexions synaptiques et la neurogenèse hippocampique, abordés au paragraphe précédent.

Dans le contexte de la MA, l'enrichissement environnemental permet aussi d'atténuer les déficits mnésiques des souris modèles [258-263]. Cependant, certaines études n'ont pas rapporté d'amélioration des performances mnésiques après un enrichissement environnemental [264, 265]. Dans l'étude de Cotel, l'absence d'effet est expliquée par l'agressivité du modèle APP/PS1 KI qui présente une mort neuronale dans l'hippocampe que les souris aient été hébergées en conditions standards ou enrichies [265], alors que la neurodégénérescence est rarement observée dans la plupart des autres modèles de la MA [266]. Si toutefois un effet pro-mnésique de l'EE est observé, il semble dépendre de la durée de l'enrichissement et de l'âge auquel il est débuté. En effet, dans la plupart des études, les protocoles d'EE ayant un effet mnésique bénéfique durent plusieurs mois (> 4 mois) [258-263]. D'une façon similaire, il a été montré qu'un EE de 6 mois débuté avant l'âge médian (14 mois) améliore les performances mnésiques des souris NMRI (Naval Medical Research Institute) âgées (>17 mois), effet non observé si l'EE est deux fois plus court et qu'il est débuté chez des souris déjà âgées (17 mois)[267]. D'autre part, une amélioration mnésique durable a été observée chez les souris Tg2576 après un enrichissement court (<2 mois) et transitoire, mais qui était débuté à l'âge de 3 mois [185, 218], âge auquel les souris ne présentent pas encore de troubles mnésiques ou d'altérations cellulaires majeures [102, 103, 105]. Ces études montrent donc l'importance de la précocité ou de la durée de l'EE pour obtenir des effets cognitifs bénéfiques.

Outre l'amélioration mnésique observée après l'EE chez les souris modèles de la MA, des effets variables de l'EE sur l'amyloïdopathie (surface des plaques amyloïdes, taux solubles des peptides amyloïdes) ont été décrits, suggérant que les effets bénéfiques de l'EE sur la mémoire ne sont pas soutenus par une perturbation des processus amyloïdogéniques [258]. Une étude récente semble corroborer cette hypothèse, montrant que l'incubation de coupes d'hippocampe en présence d'oligomères du peptide amyloïde entraîne un déficit de potentialisation à long-terme (LTP) des cellules pyramidales de CA1 chez les animaux élevés en conditions standards, déficit non observé si les animaux avaient préalablement été enrichis [268]. Ce maintien d'une LTP hippocampique normale en présence d'oligomères amyloïdes chez les animaux enrichis reposerait sur l'activation des récepteurs β_2 adrénergiques [268]. Dans leur ensemble, ces études suggèrent que les effets mnésiques bénéfiques de l'enrichissement environnemental chez les modèles murins de la MA ne reposent pas sur la perturbation de l'amyloïdogénèse mais sur la mise en place de mécanismes compensateurs, contournant les effets délétères du peptide amyloïde.

IV.6) Effets de l'EE sur les crises d'épilepsie

L'enrichissement environnemental a aussi des effets bénéfiques sur de nombreux modèles animaux de pathologies comme la maladie de Huntington, la maladie de Parkinson, la sclérose amyotrophique latérale, le syndrome de Down ou de l'X fragile ou d'autres formes d'atteintes cérébrales dont l'épilepsie [242, 269]. Pour rappel, dans les modèles animaux d'épilepsie « induite », une crise d'épilepsie inaugurale de forte intensité/durée est provoquée chez le rat et va induire des remodelages cellulaires hippocampiques (processus d'épileptogénèse) qui in fine, après une période de latence, vont entraîner l'apparition spontanée de crises d'épilepsie et leur récurrence. Dans ces modèles d'épilepsie, les rats hébergés en milieu enrichi avant de subir des crises pharmacologiquement ou électriquement induites ont développé par la suite moins de crises spontanées que les rats ayant été hébergés en conditions standards [252, 270]. Dans un modèle d'épilepsie génétique, il a été montré que l'enrichissement environnemental réalisé dès la naissance supprime les crises d'épilepsie après 2 mois d'EE [271]. L'EE entraîne aussi une augmentation de la survie des nouveaux neurones issus de la neurogenèse hippocampique [270] ou une diminution de la mortalité neuronale induite par les crises notamment dans les régions CA3 et CA1 hippocampiques [252] ou des interneurons hilaires [271]. L'EE augmente également l'expression des neurotrophines telles que BDNF et GDNF dans l'hippocampe [252]. Young et al. suggère que la suppression des crises et la neuroprotection induites par l'EE pourraient provenir de l'influence des neurotrophines sur l'expression de récepteurs glutamatergiques donc sur l'excitabilité neuronale [272] et de leur rôle dans la survie cellulaire [273].

En revanche, les rats déjà épileptiques ou expérimentant un *status epilepticus* préalablement à l'enrichissement vont présenter des pointes interictales à une fréquence similaire à celle des animaux non enrichis [274, 275]. Ces études semblent montrer qu'un enrichissement environnemental débuté avant le début de l'épileptogénèse pourrait réduire le phénotype épileptique davantage qu'un EE débuté pendant ou après le développement de l'épilepsie. D'autre part, les effets d'un enrichissement environnemental sur deux souches différentes de rats épileptiques ont été évalués. Ces deux souches présentent des anomalies interictales de nature différente, sous-tendant des origines physiopathologiques distinctes. Or, le même protocole d'EE réalisé sur ces deux souches de rats a induit des effets différents sur le nombre et la durée de ces anomalies interictales [276]. Cette étude suggère que les effets de l'EE pourraient également dépendre de l'origine physiopathologique du phénotype épileptique.

OBJECTIFS

L'incidence des crises d'épilepsie est accrue chez les patients atteints de la MA, en particulier dans la forme génétique. Les modèles murins de la MA, exprimant les mutations identifiées dans les formes génétiques humaines, présentent également une susceptibilité aux crises d'épilepsie induites pharmacologiquement ainsi que des crises d'épilepsie spontanées et des pointes interictales sur les enregistrements EEG. L'activité neuronale aberrante induit des modifications protéiques dans l'hippocampe chez ces souris, telles que l'expression du NPY dans les fibres moussues. Or, un traitement antiépileptique supprime l'hypersynchronie neuronale et les remodelages hippocampiques qu'elle induit tout en améliorant les performances mnésiques des souris hAPPJ20, suggérant fortement l'existence d'un lien causal entre l'hypersynchronie neuronale et les troubles mnésiques chez ces souris.

Cependant, l'hypersynchronie neuronale a toujours été évaluée à un âge où les souris modèles de la MA présentaient déjà des troubles mnésiques, en particulier dans des modèles présentant une progression très rapide de l'amyloïdogenèse et du déclin mnésique. Au début de cette thèse, nous ne savions donc pas si l'hypersynchronie neuronale apparaissait avant ou après les premiers troubles mnésiques et donc sa contribution potentielle au déclin mnésique chez les souris modèles de la MA. Nous possédons au laboratoire un modèle murin de la MA, les souris Tg2576, qui développe progressivement des atteintes neuroanatomiques et des troubles mnésiques, mais pour lequel la présence d'une hypersynchronie neuronale n'avait jamais été montrée. Nous nous attendions à ce qu'une hypersynchronie neuronale existe également dans ce modèle. Nous avons fait l'hypothèse que si ce phénotype survenait avant ou en même temps que les premiers troubles mnésiques, cette hypersynchronie neuronale pourrait contribuer à l'initiation du déclin mnésique chez les souris Tg2576. Mais si cette hypersynchronie apparaissait à un âge où les déficits mnésiques deviennent robustes, dans ce cas, elle pourrait participer à leur aggravation.

De plus, notre équipe a montré qu'un enrichissement environnemental précoce, réalisé entre l'âge de 3 et 5,5 mois, améliore les performances mnésiques des souris Tg2576 plusieurs mois après la fin de l'enrichissement. D'autre part, l'enrichissement environnemental permet de réduire le phénotype épileptique des animaux modèles d'épilepsie. Nous avons donc fait l'hypothèse que si l'hypersynchronie neuronale des souris Tg2576 contribuait aux troubles mnésiques dans ce modèle, l'amélioration mnésique conférée par cet enrichissement pouvait provenir d'une réduction ou d'une suppression de l'hypersynchronie neuronale de ces souris.

Ainsi, les deux objectifs de cette thèse ont été :

- 1) De mettre en évidence une hypersynchronie neuronale chez les souris Tg2576 et de situer son apparition par rapport aux premiers troubles mnésiques chez ces souris (Chapitre I).
- 2) De déterminer si un protocole d'enrichissement environnemental ayant amélioré les performances mnésiques des souris Tg2576, pouvait réduire l'hypersynchronie neuronale chez ces souris (Chapitre II).

MATERIELS ET METHODES

MATERIELS ET METHODES

Certaines parties de ce chapitre « Matériels et Méthodes » sont volontairement très détaillées et vulgarisées pour servir de support à tout nouvel expérimentateur, novice dans les domaines abordés, et expliquent l'intérêt de certaines étapes pour en comprendre l'importance et permettre d'éviter certains problèmes.

I) Animaux

Les souris modèles de la maladie d'Alzheimer utilisées dans cette étude proviennent de la lignée Tg2576 décrite initialement par Karen Hsiao [81]. Ces souris ont un fond génétique C57B6/SJL et présentent une forme mutée de la protéine précurseur du peptide amyloïde (APP) retrouvée dans une famille suédoise (mutation Swedish) qui porte sur deux acides aminés : Lys670-Asn, Met671-Leu. Cette protéine mutée s'exprime sous le contrôle du promoteur de la protéine prion de hamster. La protéine prion s'exprime dès la naissance de façon tissu-spécifique avec une expression maximale dans le cerveau, intermédiaire dans le cœur et les poumons et basse dans la rate [277 , 278]. Cette lignée est entretenue dans le laboratoire depuis plusieurs années par Hélène Halley par croisement de souris Tg2576 mâles avec des souris C57B6/SJL F1 femelles provenant de l'élevage de Charles River. Dans notre étude, des souris Tg2576 et leurs congénères non-transgéniques mâles âgées de 1,5, 3 et 6 mois et femelles âgées de 3 à 6 mois sont utilisés. Les animaux sont hébergés par cage de 3 à 6 dans une animalerie dont la température est maintenue constante (environ 23°C). Les conditions d'éclairage sont programmées en cycles jour/nuit de 12 h/12 h (éclairage de 8 h à 20 h). Toutes les expériences sont menées en stricte conformité avec les recommandations du Conseil Européen des Communautés (86/609/CEE), du Comité National Français (87/848) et des recommandations du comité local (C 31-555-11, Direction départementale de la protection des populations). Une autorisation visant à minimiser les souffrances des animaux a été obtenue pour réaliser l'ensemble de ces travaux (FRBT-01).

II) Enrichissement environnemental

L'enrichissement environnemental dure 10 semaines et commence à partir de l'âge de 3 mois. L'hébergement est réalisé dans une cage de grande dimension (150 x 80 x 80 cm) par groupes de 7 à 12 souris femelles NTg et Tg2576 en essayant d'équilibrer la proportion de souris des deux génotypes. Le sol est tapissé de sciure standard puis divers objets sont disposés dans la cage: les objets doivent être de taille, texture (bois, plastique, métal, verre), couleur et forme différentes (Figure 17). L'environnement créé doit être tridimensionnel par l'emploi de tubes ou de ponts entre différentes plateformes pour favoriser l'exploration. L'alimentation est identique à celle de l'élevage standard à la différence que la nourriture est placée dans un ou plusieurs récipients disposés dans différents endroits de la cage. Enfin, des petits morceaux de papier essuie-tout hygiénique sont éparpillés dans la cage. Deux fois par semaine (lundi et mercredi par exemple), deux nouveaux objets de petite taille sont placés dans la cage, et deux objets préexistants sont déplacés, la nourriture ou le biberon d'eau sont déplacés. Une fois par semaine (vendredi par exemple), l'intégralité des objets est changée, l'eau et la nourriture renouvelées et la sciure est remplacée aux deux tiers. Le maintien de sciure sale permet d'éviter un excès d'agressivité chez les animaux Tg2576 probablement grâce à la conservation de repères olfactifs territoriaux importants pour le maintien d'une hiérarchie sociale. D'une semaine à l'autre, les objets, la configuration tridimensionnelle globale de l'environnement et l'emplacement de la nourriture et de la boisson sont modifiés le plus possible afin de favoriser la nouveauté. En fin d'utilisation, les objets sont lavés à l'eau. La sécurité de l'environnement est vérifiée régulièrement (stabilité des objets, absence d'objets contondants ou coupants). Cet EE ne comprend pas de roue d'exercice pour éviter d'induire une disparité d'activité entre les animaux.



Figure 17: Conditions d'hébergement (Chapitre II)

Gauche : Hébergement standard de laboratoire, Droit : Environnement enrichi

III) Evaluation comportementale de la susceptibilité aux crises d'épilepsie induites par le pentylenetetrazole

Pour mettre en évidence la présence d'une excitation neuronale excessive chez les souris Tg2576, nous utilisons le pentylenetetrazole (PTZ), un antagoniste des récepteurs GABA_A qui va provoquer une levée des contrôles inhibiteurs. Cet agent pharmacologique est classiquement utilisé pour induire de façon aiguë des crises d'épilepsie chez le rongeur et tester l'effet de certaines drogues sur ces crises [279] ou pour générer un modèle d'épilepsie [280].

Le PTZ est injecté par voie intra-péritonéale, à une dose de 40 mg/kg (IP 0,1ml pour 10g). Cette dose a été éprouvée dans de précédentes études et n'entraîne pas de crises d'épilepsie létales chez les animaux non transgéniques (contrôles) [172]. Après injection de l'agent proconvulsivant, les souris sont placées dans une cage en Plexiglas de 21x15x18 cm et filmées individuellement pendant 20 minutes. La sévérité de leurs crises d'épilepsie est évaluée selon une échelle comportementale [172]:

0 = comportement normal (la souris explore la cage, pas de problème de locomotion)

1 = immobilité (la souris est immobile pendant plus de 10 secondes, souvent elle s'abaisse à ras du sol)

2 = spasmes (contractions isolées ou répétées très brèves du corps entier)

3 = extension de la queue (la queue se raidit et s'élève plus ou moins pour se courber au-dessus du dos de l'animal dans les cas les plus sévères)

4 = clonus des pattes avant (la souris est généralement sur les pattes arrières et ses pattes avant font des rotations autour d'un axe horizontal, attention à ne pas confondre avec le toilettage du museau)

5 = clonus généralisé (la souris perd l'équilibre et les pattes avant et arrière réalisent le mouvement rotatoire décrit ci-dessus)

6 = la souris court et fait des bonds de façon anarchique dans la cage

7 = extension tonique: les pattes arrières et avant se contractent et se déploient intégralement de sorte que le tronc et les membres de la souris suivent le même axe horizontal.

8 = mort.

Après les 20 minutes d'observation, les animaux sont anesthésiés et perfusés comme décrit ci-dessous. Le score d'épilepsie déterminé *in fine* correspond au score de la crise la plus sévère observée pendant les 20 minutes. Ces scores sont déterminés en aveugle pour le génotype ou les conditions d'hébergement par deux observateurs expérimentés et indépendants.

IV) Immunohistochimie du neuropeptide Y dans l'hippocampe

IV.1) Perfusion intracardiaque

Afin de procéder à la détection par immunohistochimie d'antigènes cibles, les tissus cérébraux sont fixés au paraformaldéhyde (PFA) afin d'arrêter l'action des enzymes de dégradation protéique en cas de mort cellulaire. Pour cela, les animaux sont profondément anesthésiés par une injection intrapéritonéale de pentobarbital sodique (150mg/kg). Ils sont ensuite perfusés par voie intracardiaque avec 20 ml de solution de rinçage (chlorure de sodium 0,9% conservée à 4°C mais maintenue à température ambiante avant la perfusion). Les cerveaux sont prélevés et post-fixés dans une solution de PFA 4 % pendant 48h à 4°C, puis transférés dans une solution de tampon phosphate (PB) 0,1M contenant 30 % de saccharose et 0,1 % d'azide de sodium pendant au moins deux jours à 4°C (jusqu'à ce que le cerveau tombe au fond du tube), afin de déshydrater les tissus grâce à la forte osmolarité de la solution sucrée. L'azide de sodium permet d'éviter la contamination microbienne et donc de conserver quelques mois les cerveaux dans la solution de sucrose. Cette déshydratation est essentielle pour éviter, lors de la congélation des cerveaux, le changement de volume de l'eau résiduelle ce qui endommagerait les tissus.

IV.2) Obtention et conservation des coupes histologiques

Pour la congélation, les cerveaux fixés sont plongés 3 minutes dans un tube contenant de l'isopentane liquide dont la température est stabilisée entre -30 et -40°C. Les cerveaux congelés sont ensuite entièrement sectionnés au cryostat (Leica®) dans une enceinte maintenue à -21°C, en coupes frontales sériées de 30 µm d'épaisseur, depuis le cortex frontal jusqu'à la fin de l'hippocampe. Les coupes flottantes sont recueillies dans une solution de PB 0,1M à pH =7,4 contenant 0,9 % de NaCl (PBS) et rincées deux fois pendant 15 min à température ambiante sur agitateur. Elles sont ensuite conservées à -20°C dans une solution cryoprotectrice à base d'éthylène glycol (30 %) et de glycérol (30 %) dans du PB 0.1M.

IV.3) Immunohistochimie

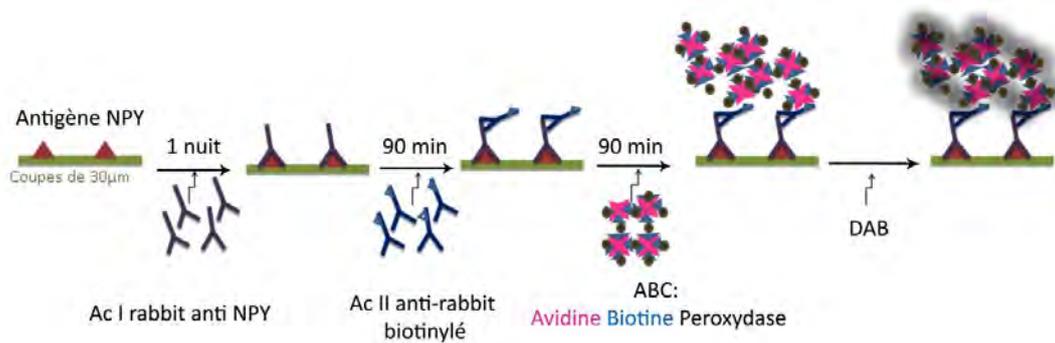


Figure 18: Principe général de l’immunohistochimie en visible.

L’antigène est reconnu par l’anticorps primaire qui se fixe sur lui. L’anticorps secondaire biotinylé dirigé contre l’espèce dans laquelle les anticorps primaires ont été conçus se fixe sur le primaire. Le complexe Avidine Biotine (ABC) portant la Peroxydase du Raifort (HRP) se lie alors aux molécules de biotine pour amplifier le signal. Le peroxyde d’hydrogène, au contact de la HRP, induit la formation d’un précipité foncé de diaminobenzidine (DAB), marquant ainsi l’emplacement de l’antigène (cellule entière, dendrites ou noyaux).

Avant le premier traitement et entre deux incubations, les coupes sont rincées avec une solution de PB 0,1M à pH =7,4 contenant 0,9 % de NaCl (PBS) et 0,25 % de Triton X-100 (PBST). Puis les coupes sont incubées avec une solution de PBS contenant 10 % de méthanol et 3 % d’H₂O₂ afin d’inactiver les peroxydases endogènes. Puis les coupes sont incubées dans une solution bloquante de PBST contenant 0,1 % d’azide de sodium et 5 % de sérum de chèvre (Normal Goat Serum ou NGS) (l’espèce servant à fabriquer l’anticorps secondaire). Cette solution vise à bloquer les sites antigéniques aspécifiques et donc à diminuer le bruit de fond au moment de la révélation. Puis, les coupes sont incubées pendant une nuit dans une solution d’anticorps monoclonaux de lapin anti-NPY (dilution 1/5000, Sigma Aldrich) dilués dans une solution de PBST-azide-NGS5% (Figure 18). Le lendemain, les coupes sont incubées pendant 90 min en présence de l’anticorps secondaire polyclonal biotinylé de chèvre dirigé contre les IgG de lapin (dilution 1/250 dans le PBST, Vector®), puis 90 min dans une solution d’avidine-biotine (ABC dilution 1/400 dans du PBST, Vector®). L’immunomarquage de la protéine NPY est enfin révélé grâce à l’utilisation de la 3,3 diaminobenzidine tétrahydrochloride (DAB, Sigma Aldrich, à 0,025% dans une solution de Tris-HCl 0.05M ; pH=7,6) en présence d’H₂O₂ (0,003%) colorant ainsi les cellules immunoréactives en marron.

Le signal coloré de cette réaction n’évolue pas de façon linéaire avec le temps. La cinétique de la réaction doit donc être contrôlée sous microscope pour déterminer la durée pour laquelle la coloration de sites aspécifiques reste faible par rapport à celles des sites spécifiques (rapport signal / bruit). Les sites spécifiques sont les neurones du noyau arqué alors que les dendrites des cellules pyramidales de la région CA1 peuvent être considérées comme zone de marquage aspécifique. Afin d’uniformiser

entre les animaux le S/B, la réaction est arrêtée à niveau de marquage cortical similaire pour tous les animaux (Fig 24, voir encadré sur les photos). La réaction est arrêtée par deux rinçages dans une solution de PBST-azide (0,1%) qui inactive la réaction enzymatique. Après plusieurs rinçages, les coupes sont montées sur des lames gélatinées suivant l'axe rostrocaudal, puis séchées à température ambiante pendant 48h. Les coupes sont alors immergées dans des bains contenant les solutions suivantes : éthanol 100 % (2x10min) pour déshydrater les tissus, toluène (2x10min), le solvant de la colle de montage (résine Eukitt®). Les lames sont finalement recouvertes d'une lamelle à l'aide d'une colle Eukitt® en faisant attention de n'introduire aucune bulle dans les zones d'intérêt car elles véhiculent des micro-organismes qui peuvent se développer sous la forme d'un mouchetage noir visible sur les coupes. Pour cette même raison, il faut mettre à plat des lames pendant le séchage complet de la colle (1 à 2 semaines) pour éviter d'introduire des bulles.

IV.4) Interprétation de l'immunohistochimie NPY

Des exemples d'immunomarquages du NPY (en marron) dans l'hippocampe dorsal (coupes coronales) obtenus au cours de cette thèse sont représentés à la Figure 19. Sur ces photos, la zone des fibres moussues est indiquée par une flèche noire. La photo A représente une expression du NPY normale, c'est-à-dire uniquement présente dans les interneurons du hile, la région CA3 et CA1 de l'hippocampe. Dans la photo A, le statut de l'expression du NPY dans les fibres moussues est qualifié de NPY négatif. Dans les photos B à D, en plus d'une expression interneuronale, le NPY apparaît dans les fibres moussues et le marquage forme un croissant caractéristique s'étendant du hile au stratum lucidum situé sous la région CA3. Comme le montre le marquage des photos B à D, l'intensité du marquage dans les fibres moussues est variable et peut être parfois très faible comme sur la photo B voire encore moins prononcé. En dépit de cette variabilité du marquage NPY dans les fibres moussues, le statut d'expression du NPY dans les fibres moussues est qualifié de NPY positif sur les photos B à D. Dans nos études, ce statut positif ou négatif du NPY dans les fibres moussues est déterminé par observation sous microscope à l'objectif X4 et ce, par deux investigateurs expérimentés et indépendants ne connaissant ni le génotype ni les conditions d'hébergement. La proportion d'animaux avec un statut NPY positif dans les fibres moussues est déterminée pour chaque groupe expérimental.

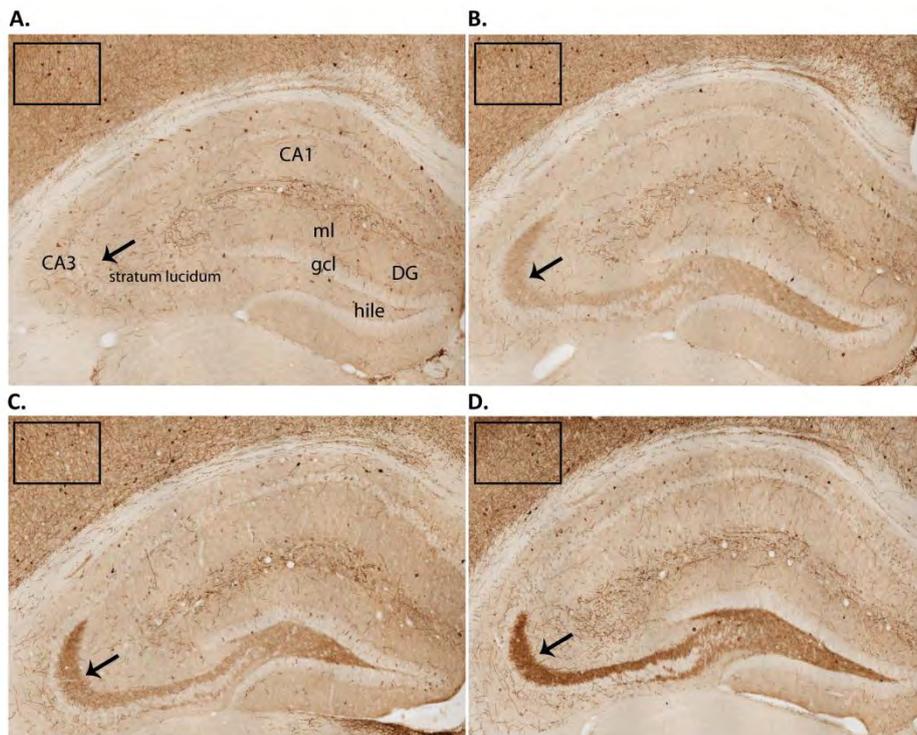


Figure 19: Les différentes expressions du NPY dans l'hippocampe : interneuronale et dans les fibres moussues.

Photographies de coupes coronales d'hippocampe immunomarquées pour le NPY. Les encadrés noirs indiquent la zone corticale prise comme contrôle du bruit de fond et permettent d'uniformiser l'intensité de la réaction immunohistochimique entre les différents animaux. Les flèches noires montrent la zone des fibres moussues. Photo A : Expression interneuronale exclusive du NPY. Photo B à D : expression du NPY interneuronale et dans les fibres moussues. DG : gyrus denté, CA1 et CA3 : Corne d'Ammon 1 et 3, gcl : couche des cellules granulaires (corps cellulaires), ml : couche moléculaire (dendrites des cellules granulaires)

V) Enregistrements électro-encéphalographiques (EEG) *in vivo*

V.1) Fabrication des électrodes

Les électrodes utilisées dans l'ensemble de ces études sont constituées de deux électrodes EEG, une vis de référence et une électrode musculaire. Les électrodes d'EEG sont constituées d'un fil d'argent 99.99% de pureté de 0,125 mm de diamètre recouvert d'une gaine isolante de téflon de 0,026 mm d'épaisseur. Le fil mesure entre 1 et 2 cm, dont la gaine est enlevée (dénudée) sur 0,5 cm pour la soudure et sur 0,5 mm pour la partie affleurant le cerveau (la longueur finale de l'électrode est ajustée au dernier moment pendant l'implantation pour éviter de tordre les électrodes si elles sont trop longues ou de faire mal à la souris si elles sont trop courtes). L'électrode de référence est un fil d'argent de 0,5 mm de diamètre sans gaine (un diamètre inférieur à celui-ci est cependant préférable pour éviter une trop grande rigidité de l'électrode) soudée à une vis (diamètre: 0,75 mm). L'électrode musculaire est un fil de tungstène de 0,05 mm de diamètre, avec une gaine de téflon de 0,075 mm d'épaisseur. Elle mesure 2,5 cm et est dénudée sur 0,5 cm. Toutes ces électrodes sont soudées à un

contact en acier inoxydable cylindrique, plaqué or, de 1 mm de diamètre et 7 mm de longueur (PlasticsOne®). L'impédance des électrodes, mesure de l'opposition d'un circuit (ici l'ensemble électrode + contact) au passage d'un courant, est vérifiée avant l'implantation. Plus l'impédance est basse, plus l'électrode est conductrice. Les électrodes EEG et EMG fabriquées comme décrit ci-dessus ont une impédance comprise environ entre 10 et 4 kOhm, l'électrode de référence entre 1 et 3 kOhm (plus conductrice).

V.2) Anesthésie / Chirurgie

V.2.1) Anesthésie à l'hydrate de chloral

Au cours d'expériences préliminaires visant à calibrer et optimiser l'enregistrement EEG *in vivo*, nous avons anesthésié les souris Tg2576 et NTg avec un mélange d'hydrate de chloral (Prolabo®, 400mg/kg) et de xylazine (Rompun®, 15mg/kg). Les souris ont été anesthésiées avec la dose habituellement utilisée au laboratoire pour anesthésier les souris C57BL6 (ci-dessus) mais souvent avec un supplément de 10 à 20 % de la dose normale car l'anesthésie n'était pas efficace (sensibilité au pincement de la queue ou de la patte). Sur une cohorte de 53 souris anesthésiées avec une dose normale plus 10 à 20% de la dose, entre fin janvier et mi-mars 2013, 21 souris dont 14 souris Tg2576 et 7 souris NTg sont mortes dans les jours suivants l'opération. 7 d'entre elles ont montré clairement des problèmes respiratoires pendant la chirurgie ou ont présenté des poumons sanglants à l'autopsie, signe de détresse respiratoire. Ce mode d'anesthésie a donc été abandonné sur cette lignée de souris.

V.2.2) Anesthésie gazeuse

Les souris présentées dans cette étude sont toutes anesthésiées par anesthésie gazeuse au vetoflurane (Virbac®, Carros, France).

Lors de l'induction de l'anesthésie gazeuse puis de son maintien tout au long de la chirurgie, la profondeur de celle-ci est contrôlée selon les critères d'immobilité, d'inconscience, de régularité de la respiration et de relaxation musculaire. L'absence de réponse réflexe est vérifiée toutes les 5-10 minutes. Le débit du gaz anesthésique est augmenté ou diminué en fonction de la profondeur de l'anesthésie, tout au long de la chirurgie ce qui permet d'adapter à l'individu, en temps réel, la force de l'anesthésie, contrairement aux anesthésies par injection IP. Du fait de cette adaptabilité, moins de 5% de l'ensemble des animaux utilisés dans mes études sont décédés des suites d'une anesthésie gazeuse.

Les souris sont d'abord placées 3 minutes dans la chambre d'induction sans gaz anesthésiant avec un débit d'air et d'oxygène de 1ml/min chacun, afin d'habituer l'animal à la cage et diminuer son stress au moment d'induire l'anesthésie. L'induction est réalisée avec une concentration en gaz anesthésiant de 4 % jusqu'à ce que l'animal soit immobile et respire régulièrement (environ 3 minutes). Puis la souris est transférée de la chambre d'induction au masque de l'appareil stéréotaxique Stoelting®. Le débit des gaz air et oxygène est baissé à 0,2ml/min. La concentration de vétoflurane a été maintenue à 3% dans les premières minutes pour aider le maintien de l'anesthésie au moment du placement dans le cadre stéréotaxique. Puis lorsque l'anesthésie de l'animal est stabilisée, la concentration est baissée à 1,5%. Une couverture chauffante est positionnée sous l'animal pour éviter l'hypothermie et dès lors, la température corporelle est régulièrement surveillée. Pour éviter le dessèchement des yeux, un gel oculaire (Ocrygel®) est appliqué. Avant de pratiquer l'incision de la peau du crâne, l'absence de réflexe (pincement d'un orteil) est vérifiée. Une injection de lidocaïne (7mg/Kg) en sous-cutané est faite avant d'inciser la peau.

Après incision de la peau, des poids ont servi à écarter les chairs autour du crâne. Afin d'augmenter l'adhérence au crâne du cimentage des électrodes, le périoste est retiré par grattage et de fines entailles sont faites dans l'os, à l'aide d'une lame de scalpel. Puis deux petites perforations du crâne sont réalisées avec des fraises de 0,5 mm au niveau de l'os pariétal droit et gauche et une perforation osseuse de 0,75 mm de diamètre au niveau du cervelet pour la vis de référence (plus petite que le diamètre de la vis). En effet, la vis doit s'imbriquer fermement dans l'os pour assurer la solidité du montage mais aussi éviter les artefacts de mouvement. Ces perforations sont situées dans des zones éloignées des principaux vaisseaux de la surface du cerveau pour éviter les saignements excessifs.

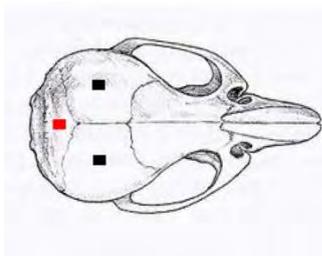


Figure 20: Emplacement des électrodes EEG (noir) et vis de référence (rouge)

Les électrodes d'enregistrement sont placées en miroir par rapport à la suture centrale, au niveau du cortex pariétal. La vis de référence est placée au centre de l'os occipital.

Les deux électrodes d'EEG sont donc placées dans la zone subdurale au niveau des cortex pariétaux droit et gauche (voir Figure 20), la vis de référence est positionnée au niveau de l'os occipital et une électrode musculaire est insérée entre les muscles du cou. Chacune de ces quatre électrodes est insérée par son contact plaqué or dans un connecteur multicanaux (cylindre de 6mm de diamètre et 7mm de haut). Du ciment dentaire Superbond® est appliqué à la base des électrodes subdurales et sur les $\frac{3}{4}$ de la surface du crâne afin de créer un ancrage solide des électrodes. Puis un cimentage à base

de méthylméthacrylate Duralay® a permis de recouvrir l'ensemble des électrodes et de solidariser le connecteur multicanaux au crâne formant une sorte de casque (Figure 21).



Figure 21. Photographie d'une souris après la chirurgie
La partie rouge correspond à la partie cimentée du casque et la partie blanche au connecteur à 6 canaux.

Un casque doit idéalement être le moins haut et le plus droit possible pour diminuer au maximum les forces exercées par le câble d'enregistrement sur le casque (effet de levier) ce qui pourrait participer aux artefacts de mouvement. Ce casque doit également être le plus lisse possible pour éviter que l'animal ne se blesse sur d'éventuelles arêtes. Une fois le ciment sec, les sutures sont réalisées avec un fil résorbable aseptique pour refermer le site.

Après l'opération, l'animal est isolé dans une cage propre avec du papier et maintenu au chaud en faisant attention à sa déshydratation. Les animaux sont surveillés jusqu'à leur réveil complet (déplacements spontanés dans la cage, prise d'eau et de nourriture). Lorsque l'animal présente un comportement moteur et exploratoire normal, il est immédiatement remis avec ses congénères pour éviter un isolement trop prolongé. Le jour de la chirurgie puis une fois par jour durant la semaine suivant la chirurgie, les critères physiques, comportementaux et physiologiques permettant d'estimer la souffrance de l'animal sont relevés ainsi que les tremblements et pertes d'équilibre qui pourraient être induits par l'opération. Si l'animal montre des signes de souffrances quels qu'ils soient, il est immédiatement sacrifié.

V.3) Enregistrements EEG

Les souris sont enregistrées dans des cages en Plexiglas transparent de dimension 21x20x25cm dont le sol est recouvert de sciure, avec un accès à l'eau (biberon) et à la nourriture (3 à 4 croquettes) (Figure 22). Chaque cage a été placée dans une cage de Faraday de 40,5x40,5x50,5 cm connectée à la terre pour éviter la pollution du signal EEG par le bruit électrique de 50 Hz, c'est-à-dire le courant alternatif qui alimente nos appareils électriques. Chaque souris est connectée par un câble souple à un commutateur (PlasticsOne®) c'est-à-dire un connecteur tournant fixé en haut à l'intérieur d'une cage de Faraday (Figure 22) maintenant l'intégrité du circuit électrique

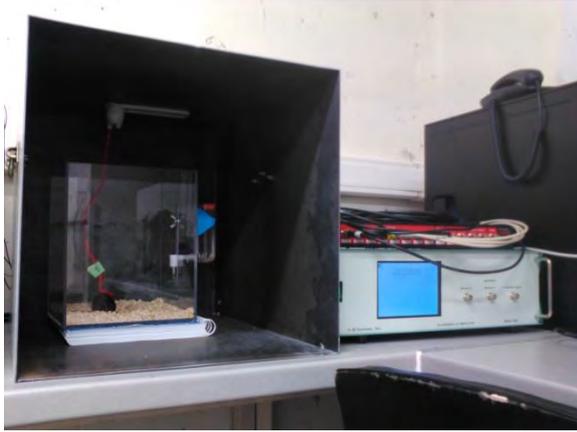


Figure 22. Photographie du dispositif d'enregistrement EEG.

La cage d'enregistrement est placée dans une cage de Faraday. La souris est connectée par un câble souple (rouge), relié au commutateur (blanc, fixé en haut à l'intérieur de la cage de Faraday). A côté de la cage de Faraday, sont disposés l'amplificateur (dessous) et la carte d'acquisition (au-dessus). 5 souris placées chacune dans un dispositif d'enregistrement avec cage de Faraday comme ci-contre peuvent être enregistrées en même temps.

malgré la rotation du câble accompagnant les déplacements de l'animal. Puis un câble relie le commutateur (à l'extérieur de la cage de Faraday) à l'amplificateur AM system 3600. L'amplificateur (Figure 22, avec un écran bleu), qui amplifie le voltage du signal physiologique de la souris, est lui-même connecté par des câbles BNC à la carte d'acquisition CED Power 1401 mk II. La carte d'acquisition (rouge sur la Figure 22) est reliée par câble USB à l'ordinateur, transformant ainsi le signal analogique en signal numérique.

L'extrémité du câble souple connecté à la souris est munie d'un amplificateur opérationnel d'un gain de 1 (suiveur de tension) dont le but est d'augmenter le courant en tout début de chaîne afin de minimiser l'impact des charges électriques externes liées au mouvement du câble et donc limiter les artefacts sur le tracé EEG.

De l'amplificateur opérationnel partent 6 fils de cuivre gainés respectivement connectés aux 4 électrodes de la souris (2 EEG, 1 vis de référence et 1 EMG) et aux deux bornes de l'alimentation de l'amplificateur opérationnel (piles montées en série et placées sur le dessus de chaque cage de Faraday).

Au niveau de chaque cage de Faraday, le câble reliant le commutateur à l'amplificateur AM system est sous-divisé en trois câbles : chacun des 3 câbles se compose d'un fil conducteur du signal d'une électrode (2 EEG et une EMG) entouré d'un tressage métallique qui est relié à la sortie du commutateur correspondant à la vis de référence. Au niveau de l'amplificateur, pour chacun des trois câbles donc, le signal de la référence est soustrait à celui de l'électrode et filtré entre 0,3 et 100 Hz pour les EEG et entre 3 Hz et 20 kHz pour l'EMG. Le gain de l'amplificateur est de 1000. Le signal EEG est échantillonné à 1KHz si 4 souris (12 électrodes) sont traitées simultanément, et 200 Hz pour 5 souris, limitation due à la carte d'acquisition. Le logiciel Spike II a servi d'interface pour visualiser les tracés EEG mais aussi pour réaliser les analyses du signal présentées dans ce travail de thèse.

V.4) Détection des pointes interictales

Une pointe interictale est une déflexion positive ou négative du signal EEG, qui dure moins de 50 ms et dont l'amplitude est supérieure à deux fois la ligne de base du signal EEG [122]. Pour détecter les pointes interictales, nous déterminons un seuil correspondant à deux fois la ligne de base, et détectons toutes les déflexions qui dépassent ce seuil. Sur nos tracés électroencéphalographiques, il est arrivé que nous observions des artefacts de deux types : des artefacts de basse fréquence (<1Hz) de très grande amplitude (jusqu'à +5mV) et des artefacts musculaires pour lesquels le signal de l'électrode musculaire (EMG) est visible sur le tracé de l'EEG. Les déflexions détectées par la méthode de seuillage peuvent donc être des pointes interictales ou des artefacts de mouvements. Dans ce contexte, l'expérimentateur sélectionne les déflexions qui possèdent la forme caractéristique d'une pointe et durent moins de 50 ms. Les artefacts de mouvements durent plus longtemps que les pointes et coïncident, le plus souvent, avec la présence d'une forte activité électromyographique (EMG) sont facilement détectés et éliminés. Voici l'exemple d'une pointe interictale et d'un artefact de mouvement pouvant ressembler aux pointes (Figure 23).

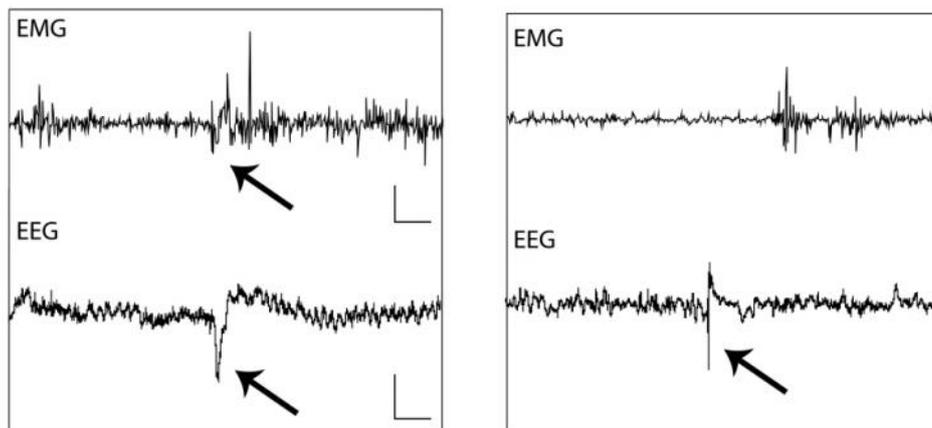


Figure 23. Les différents types de déflexions de l'EEG : artefact ou pointe interictale

A gauche : un artefact de mouvement de durée plus longue qu'une pointe interictale, pas très aigu, pendant une période d'éveil, l'activité EMG s'accroît juste au moment de l'artefact (flèche noire). A droite : pointe interictale durant moins de 50 ms de forme typique (flèche noire). Echelle (barres) : 0,5 s, 1mV.

D'un point de vue technique, nous avons mesuré l'amplitude de la ligne de base sur 3 périodes de 5 secondes de sommeil lent (quand les oscillations sont les plus amples). La différence entre l'amplitude maximale (positive) et minimale (négative) du signal est mesurée pour chacune des 3 périodes puis la moyenne des trois différences est calculée. La valeur négative de cette moyenne est utilisée comme seuil de détection des pointes. La fonction Memory buffer de Spike II permet ensuite sur une nouvelle voie de marquer par des traits l'emplacement des événements dépassant la valeur seuil précédemment calculée. Puis, tous les événements détectés sont passés en revue, grâce à une

méthode automatisée créée à ma demande par l'équipe de Spike, et sont éliminés ou conservés sur la voie « marqueur », sur la base des critères de la pointe interictale. Le nombre total de pointes par minute est *in fine* déterminé.

VI) Analyses statistiques

L'analyse statistique des résultats est réalisée à l'aide du logiciel PrismR 5.0 (GraphPad Software).

Pour les comparaisons de proportions, un test de Fischer exact (Chi 2) a été utilisé. Dans le cas où le tableau de contingence contient deux colonnes (ici deux génotypes différents) et plusieurs lignes (différents âges), un test Chi 2 de tendance est réalisé. Pour comparer des données ordinales (PTZ), nous avons utilisé le test de Kruskal-Wallis suivi de tests post-hoc de Dunn. En ce qui concerne les comparaisons de variables continues, nous avons utilisé le test de Student ou l'ANOVA lorsque les valeurs suivaient une distribution normale (vérifiée à l'aide du test de D'Agostino & Pearson) ou des tests non paramétriques appropriés (tests de Mann et Whitney ou de Wilcoxon) lorsque ce n'était pas le cas.

En cas de variable ordinaire discrète, une représentation en boîte à moustache est utilisée comprenant la médiane, le premier et le troisième interquartiles, ainsi que les valeurs minimale et maximale (score d'épilepsie après injection de PTZ). En cas de variable continue, les résultats sont représentés en moyenne +/- l'erreur type de la moyenne (SEM). Sur les représentations graphiques, les différences significatives sont notées *, **, ou *** lorsque le niveau de confiance correspond à des p-values de $p < 0,05$, $p < 0,01$, ou $p < 0,001$ respectivement.

RESULTATS

**CHAPITRE I : Apparition précoce de l'hypersynchronie neuronale
chez les souris Tg2576**

CHAPITRE I : Apparition précoce de l'hypersynchronie neuronale chez les souris Tg2576

I.1) Introduction

L'hyperactivité des réseaux neuronaux corticaux et hippocampiques semblent être un évènement précoce dans la physiopathologie de la MA. De nombreux modèles murins de la MA présentent une hypersynchronie neuronale qui se traduit par une susceptibilité accrue aux crises d'épilepsie induites pharmacologiquement, par la présence de crises d'épilepsie électroencéphalographiques associées à l'occurrence de pointes interictales et par l'expression anormale du neuropeptide Y dans les fibres moussues, un marqueur de crises d'épilepsie chroniques. Cette activité neuronale aberrante contribuerait aux troubles mnésiques, mais son antériorité par rapport aux troubles mnésiques n'a jamais été démontrée dans les modèles murins de la MA. Les premiers troubles mnésiques visibles chez la souris Tg2576, modèle de la MA ont été décrits à l'âge de 3 mois. Nous avons donc cherché à mettre en évidence une hypersynchronie neuronale chez les souris Tg2576 mâles et leurs congénères non transgéniques à l'âge de 1,5, 3 et 6 mois, soit avant, au moment et après l'apparition des troubles mnésiques. Dès l'âge de 1 mois $\frac{1}{2}$, les souris Tg2576 possèdent une susceptibilité accrue aux crises d'épilepsie induites par l'injection systémique d'un antagoniste des récepteurs GABA_A. Les enregistrements EEG révèlent la présence de pointes interictales chez les souris Tg2576. Et certaines de ces souris présentent une expression ectopique du neuropeptide Y dans les fibres moussues, dont l'incidence semble augmenter avec l'âge dans la population des souris Tg2576. Nos données indiquent que l'hypersynchronie neuronale apparait très tôt chez les souris Tg2576, avant les premiers déficits mnésiques documentés.

I.2) Manuscrit publié

RESEARCH ARTICLE

Early Onset of Hypersynchronous Network Activity and Expression of a Marker of Chronic Seizures in the Tg2576 Mouse Model of Alzheimer's Disease

Charlotte Bezzina^{1,2}, Laure Verret^{1,2}, Cécile Juan^{1,2}, Jessica Remaud^{1,2}, Hélène Halley^{1,2}, Claire Rampon^{1,2}, Lionel Dahan^{1,2}*

1 Université de Toulouse; UPS; Centre de Recherches sur la Cognition Animale; 118 route de Narbonne, F-31062, Toulouse, Cedex 09, France, **2** CNRS, Centre de Recherches sur la Cognition Animale, F-31062, Toulouse, France

* These authors contributed equally to this work.

* lionel.dahan@univ-tlse3.fr



OPEN ACCESS

Citation: Bezzina C, Verret L, Juan C, Remaud J, Halley H, Rampon C, et al. (2015) Early Onset of Hypersynchronous Network Activity and Expression of a Marker of Chronic Seizures in the Tg2576 Mouse Model of Alzheimer's Disease. PLoS ONE 10(3): e0119910. doi:10.1371/journal.pone.0119910

Academic Editor: Yann Herault, IGBMC/ICS, FRANCE

Received: August 19, 2014

Accepted: January 17, 2015

Published: March 13, 2015

Copyright: © 2015 Bezzina et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper.

Funding: The authors acknowledge the support of the Agence Nationale pour la Recherche (ANR-10-05-MALZ to CR); the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS, PEPS to LD), the University of Toulouse. C.Bezzina was supported by the Agence Régionale de Santé and J. Remaud was supported by the French Ministry of Research. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Abstract

Cortical and hippocampal hypersynchrony of neuronal networks seems to be an early event in Alzheimer's disease pathogenesis. Many mouse models of the disease also present neuronal network hypersynchrony, as evidenced by higher susceptibility to pharmacologically-induced seizures, electroencephalographic seizures accompanied by spontaneous interictal spikes and expression of markers of chronic seizures such as neuropeptide Y ectopic expression in mossy fibers. This network hypersynchrony is thought to contribute to memory deficits, but whether it precedes the onset of memory deficits or not in mouse models remains unknown. The earliest memory impairments in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease have been observed at 3 months of age. We thus assessed network hypersynchrony in Tg2576 and non-transgenic male mice at 1.5, 3 and 6 months of age. As soon as 1.5 months of age, Tg2576 mice presented higher seizure susceptibility to systemic injection of a GABA_A receptor antagonist. They also displayed spontaneous interictal spikes on EEG recordings. Some Tg2576 mice presented hippocampal ectopic expression of neuropeptide Y which incidence seems to increase with age among the Tg2576 population. Our data reveal that network hypersynchrony appears very early in Tg2576 mice, before any demonstrated memory impairments.

Introduction

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disease characterized by several cognitive and behavioral troubles attacking particularly memory functions. Most of AD patients develop detectable symptoms after 65 year-old (sporadic cases). However, in familial forms of the disease representing less than 1% of AD cases, severe cognitive and memory deficits develop earlier,

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

due to the presence of mutated forms of the Amyloid Precursor Protein (APP) or Presenilin (PS-1 or PS-2) genes [1,2,3,4]. Transgenic mouse models of AD, that overexpress at least one of these human mutated genes, reproduce the amyloidopathy and some anatomical and behavioral abnormalities found in AD patients [5], and thereby help to provide insights into the mechanisms underlying memory deficits.

Recently, new hypothesis have emerged about the contribution of network hypersynchrony in memory dysfunction in AD. Multiple lines of evidence point out an increased incidence of spontaneous seizures in patients with AD. In sporadic AD, an estimated 10 to 22% of patients exhibit unprovoked seizures [6,7,8]. In familial forms of AD or diseases in which APP gene is duplicated, 30 to 60% of patients develop seizures [9,10,11]. In patients diagnosed for both epilepsy and AD (or amnesic Mild Cognitively Impairment, aMCI), seizure onset preceded or coincided with the diagnosis of the disease in 83% of patients, suggesting an early onset of epilepsy in AD [12]. Using fMRI during a task involving the hippocampus, Bakker and colleagues showed that aMCI subjects displayed hippocampal hyperactivity [13]. Interestingly, in the same study, the antiepileptic drug levetiracetam reduced hippocampal hyperactivity and improved memory performances, suggesting a causal link between network hyperactivity and memory deficits [13].

Similar to human pathology, several mouse models of AD present a combination of features revealing network hypersynchrony and epilepsy. Initially, sporadic spontaneous seizures or behavioral stereotypies were fortuitously observed during behavioral phenotyping of AD transgenic lines [14,15]. Pro-convulsant agents that exacerbate neuronal excitation (kainate) or suppress inhibitory control (GABA_A receptor antagonist pentylenetetrazole, PTZ) trigger more severe seizures in several AD transgenic mice (TgCRND8, hAPPJ20, hAPPJ9) than in their respective non-transgenic (NTg) littermates [16,17,18,19]. Although very infrequent, spontaneous seizures in AD mice have also been objectively evidenced by using electroencephalographic (EEG) recordings [17,20,21,22]. Typically, chronic EEG recordings over very long period of time are required for observing a significant occurrence of seizures. For instance, 25% of APP_{swe}xPS1_{ΔE9} mice present seizures when recorded for 2 weeks [20], and about 10% of hAPPJ20 mice display seizures when recorded for 24 hours [23]. However, the vast majority—if not all—of the recorded hAPPJ20 and APP_{swe}xPS1_{ΔE9} mice show interictal spikes consisting of frequent high-voltage sharp events [17,20].

Aside from electroencephalographic markers of neuronal network hypersynchrony, neuropeptide Y (NPY) expression pattern has been proposed as a marker for chronic seizures. NPY is an inhibitory neuromodulator normally expressed by a subset of hippocampal interneurons, which can be expressed ectopically in mossy fibers after chronic seizures in animal models of epilepsy [24]. Such ectopic expression of NPY has been reported in Tg2576 [25,26,27], hAPPJ20 [17,28], and APP_{swe}xPS1_{ΔE9} mice [20], arguing for the existence of epilepsy in these AD models. Interestingly, chronic administration of the antiepileptic drug levetiracetam suppresses epileptiform activity and improves memory performances in hAPPJ20 mice, but also normalizes the expression of NPY in the mossy fibers [28].

In AD mouse models, neuropathological processes and memory deficits progress with age. So far, the presence of network hypersynchrony has been assessed when mice were old enough to exhibit memory deficits. We thus do not know if this abnormal brain activity occurs before, concomitantly or after the onset of memory dysfunction in AD mouse models. Learning and memory deficits have been extensively described at different ages in Tg2576 mice, which express a human APP (hAPP) gene carrying the double Swedish mutation (HuAPP696swe) [29]. No memory disorder has been reported at 1.5–2 months [30,31,32], while a few studies have evidenced impairments at 3 months [30,33,34,35], and most of authors agree on clear memory deficits after 6 months [32,36,37,38,39]. Interestingly, network hypersynchrony has not been

evaluated before 6 months of age in Tg2576 mice. We thus gauged network hypersynchrony of Tg2576 mice at different ages (1.5, 3 and 6 months old) by assessing their seizure susceptibility to PTZ, and evaluating their spontaneous epileptiform activity through EEG recordings and hippocampal expression pattern of NPY. We show that Tg2576 mice display aberrant network activity as early as 1.5 month-old, that is to say before the onset of memory deficits.

Methods

Ethics statement

All experiments were performed in strict accordance with the policies of the European Union (86/609/EEC), the French National Committee of Ethics (87/848), and the local committee's recommendations (C 31–555–11, Direction départementale de la protection des populations) for the care and use of laboratory animals. Animal facility of the CRCA is fully accredited by the French Direction of Veterinary Services (C 31–555–11, Feb 9, 2011) and animal surgery and experimentation conducted in this study were authorized by the French Direction of Veterinary Services (#31–1155521, 2002). All efforts were made to improve animals' welfare and minimize animals' suffering.

Mouse Line

Experiments were performed on male mice from the transgenic line Tg2576 [15,29] from our in-house colony [25,26,40], at 1.5, 3 and 6 months of age. Tg2576 mice overexpress a double mutant form of human APP695 (Lys670-Asn, Met671-Leu [K670N, M671L]), driven by a hamster prion protein promoter. Tg2576 males were bred with C57B6/SJL F1 females (Charles River, L'Arbresle, France) and the offspring was genotyped for the hAPP transgene using DNA obtained from postweaning tail biopsies. Polymerase chain reaction products were analyzed to confirm the presence of hAPP DNA sequence in offspring. Mice were maintained on a 12 hours light/12 hours dark cycle with free access to food and water.

PTZ injection

Seizure susceptibility was assessed by behavioral scoring of the severity of seizures induced pharmacologically (NTg 1.5 month-old (*mo*): $n = 16$, 3 *mo*: $n = 15$ and 6 *mo*: $n = 16$; Tg2576 1.5 *mo*: $n = 15$, 3 *mo*: $n = 16$ and 6 *mo*: $n = 11$). Mice received a single i.p injection of PTZ at 40 mg/kg (PTZ, Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA). Some mice accidentally received a lower PTZ dose and thus were excluded of the study (Tg2576 3 *mo*: $n = 1$ and 6 *mo*: $n = 1$). After drug administration, each mouse was placed in a new cage and its behavior was videotaped for 20 minutes. Mice were sacrificed immediately after (as described below) in order to minimize suffering. Two mice were excluded because they presented a liver hypertrophy at autopsy that might have resulted in modifications of the drug pharmacokinetics (NTg 6 *mo*: $n = 2$).

Seizure severity scoring

Two investigators blind to the experimental conditions quantified the maximal seizure severity during the 20 minutes recording session, according to a published scale [17]. Seizure severity scores were as follows: 0 = normal exploratory behavior, 1 = immobility, 2 = generalized spasm, tremble, or twitch, 3 = tail extension, 4 = forelimb clonus, 5 = generalized clonic activity, 6 = bouncing or running seizures, 7 = full tonic extension, 8 = death. If seizure severity was not clear-cut, an intermediate score was given. Given the ordinal nature of the seizure severity scale, we performed non-parametric statistical tests. Kruskal-Wallis test was used, followed by Dunn's post-hoc tests to assess genotype effect in each group of age.

Implantation of EEG electrodes

Tg2576 mice and non-transgenic littermates free from any pharmacological treatment were used for EEG recordings (NTg 1.5 mo: $n = 12$, 3 mo: $n = 10$ and 6 mo: $n = 8$; Tg2576 1.5 mo: $n = 10$, 3 mo: $n = 13$ and 6 mo: $n = 7$). Mice were anesthetized with isoflurane (2%), an incision was performed on the scalp and a local anesthetic (lidocaine 5%) was applied on it. Body temperature was maintained throughout the surgery using a mouse heating pad (Ugo Basile, Gemonio, Italy). A veterinary ophthalmic gel (Ocrygel, Laboratoire TVM, Lempdes, France) was applied on the eyes to avoid dryness. Then, the skull was drilled and two silver electrodes were placed bilaterally over the parietal cortices, and one screw was positioned through the occipital bone over the cerebellum to serve as reference and ground electrode. One EMG electrode was placed in neck muscles. Electrodes were fixed to the skull with dental cement and plugged into a miniature connector (PlasticsOne, Roanoke, NC, USA). Then, lidocaine was applied on the flesh before suturing the skin. The animals were then allowed to recover for at least 1 week during which their health status was checked every day.

EEG recordings

One to 5 days before the recording session, mice were habituated to the recording chamber which consisted of a Plexiglas chamber (21x20x25cm) with available food and water, placed in a Faraday cage. They were first placed in the recording chamber for 15 minutes without being connected to the EEG recording system through the cable and brought back to their home cage for at least 15 minutes. They were then placed again in the recording chamber and connected with the EEG cable for 2.5 hours under the supervision of an experimenter. On the recording day, mice EEG were monitored during 2.5 hours. For this purpose, they were connected with a six-channel cable (PlasticsOne) and head-staged with a home-made tension follower. This cable was connected to a multichannel commutator (PlasticsOne) that allows mice to freely move. EEG and EMG signals were amplified and band-pass filtered (for EEG: 0.3–100 Hz; for EMG: 3 Hz–20 kHz) using a AM system 3500 amplifier (A-M system, Sequim, WA, USA) and sampled at 1kHz (Power 1401 mk-II, CED, Cambridge, UK). EEG recordings were analyzed using Spike 2 V7.11 software. After EEG recordings, mice were sacrificed as described below.

Detection of epileptiform abnormalities on EEG traces

Each digitized EEG file was screened for epileptiform activity by an investigator blind to experimental conditions. Epileptiform activity is described as the occurrence of interictal spikes, defined as sharp (2 to 50 ms) positive and/or negative deflections with amplitudes exceeding twice the baseline EEG recording [20]. Specifically, all EEG deflections that reached a two-fold baseline threshold were automatically detected using Spike 2 software. Were considered as interictal spikes only the events matching both morphological and temporal criteria (2 to 50 ms). Then, for each mouse, an average of the spike waveform was calculated and the spike duration was measured between the start of the negative deflection and the peak of the positive deflection. Epileptiform activity quantification consisted in counting the number of interictal spikes per minute during the last hour of recordings, when mice have become habituated to the recording setup. We excluded four animals because of movements artifacts on EEG traces (NTg 1.5 mo: $n = 2$, 3 mo: $n = 1$ and 6 mo: $n = 1$). Statistical analysis of the frequency of interictal spikes (spikes/minute) was performed using a two-way ANOVA, followed by a Bonferroni post-hoc test.

Tissue processing and NPY immunohistochemistry

Mice that underwent PTZ or EEG experiments were deeply anesthetized using pentobarbital and transcardially perfused with 0.9% saline solution (NTg 1.5 mo: n = 20, 3 mo: n = 25 and 6 mo: n = 24; Tg2576 1.5 mo: n = 19, 3 mo: n = 29 and 6 mo: n = 18). The brains were post-fixed for 2 days in 4% paraformaldehyde and transferred into 30% sucrose in 0.1 M phosphate buffer containing 0.1% sodium azide before being cut into 30 μ m thick cryostat coronal sections. The sections were then stored at -20°C in a cryoprotectant solution until use. Free-floating brain sections were rinsed in phosphate-buffered saline containing 0.25% Triton X-100 (PBST). Sections were quenched 15 minutes for endogenous peroxidases with 3% H₂O₂ in 10% methanol/phosphate-buffered saline, then they were incubated overnight in primary antibody rabbit anti-NPY (1:5,000; Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA) in PBST containing 0.1% sodium azide with 5% normal goat serum. The next day, the sections were incubated for 90 minutes in biotinylated goat anti-rabbit antiserum (1:250; Vector Labs, Burlingame, CA, USA) in PBST, followed by 90 minutes in avidin-biotin-peroxidase complex (1:400; ABC kit, Vector Labs) in PBST. The peroxidase immunolabeling was developed in 0.05 M Tris-HCl buffer (pH 7.6) containing 0.025% 3,3'-diaminobenzidine-4 HCl (DAB; Sigma Aldrich), 0.003% H₂O₂ and 0.06% nickel ammonium sulfate. The reaction was stopped by extensive rinses in PBST containing 0.1% sodium azide. The sections were mounted onto subbed slides, dehydrated through alcohols, and coverslipped.

Qualitative assessment of NPY ectopic expression and statistical analysis

NPY ectopic expression was visually assessed by two independent observers blinded to the mouse genotype. The presence of ectopic expression was revealed by a strong immunoreactivity in the hilus and stratum lucidum regions, where mossy fibers extend their axonal processes. Twenty four out of 135 mice were excluded for the following reasons: 2 had hypertrophied liver (NTg, 6 mo: n = 2), 13 for cryostat cutting problems (Tg2576: 1.5 mo: n = 1, 3 mo: n = 4, 6mo: n = 3; NTg: 3 mo: n = 2, 6mo: n = 3), 7 for sample conservation issues (Tg2576: 1.5 mo: n = 1, 3 mo: n = 2, 6mo: n = 3; NTg: 6mo: n = 1), 2 mice died prior to sacrifice (Tg2576, 3 mo: n = 2). The proportion of animals showing NPY ectopic expression was compared between non-transgenic and transgenic animals, at each age using the Fisher exact test. The proportion of Tg2576 mice showing NPY ectopic expression at different ages was compared using the Chi square test for trend.

All statistical analysis were performed using the Prism 5 software (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA).

Results

Tg2576 mice show higher susceptibility to pharmacologically-induced seizures from early age on

First, we determined seizure susceptibility of Tg2576 mice and their NTg littermates at ages of 1.5, 3 and 6 months. Injection of the GABA_A receptor antagonist PTZ, at the dose of 40 mg/kg, induced more severe seizures in Tg2576 mice than in NTg littermates at 1.5 and 6 months of age (Fig. 1A, Kruskal-Wallis: $p < 0.0001$, Dunn's post hoc tests: $p < 0.05$ for NTg vs Tg2576 at 1.5 and 6 month-old). At 3 months of age, the difference in seizure severity between NTg and Tg2576 mice did not reach statistical significance as NTg mice showed higher seizure susceptibility than at 1.5 months of age (Dunn's post hoc test: $p < 0.01$; Fig. 1A). Some Tg2576 animals showed lethal seizures, whilst this was never observed among NTg animals (Fig. 1B). In

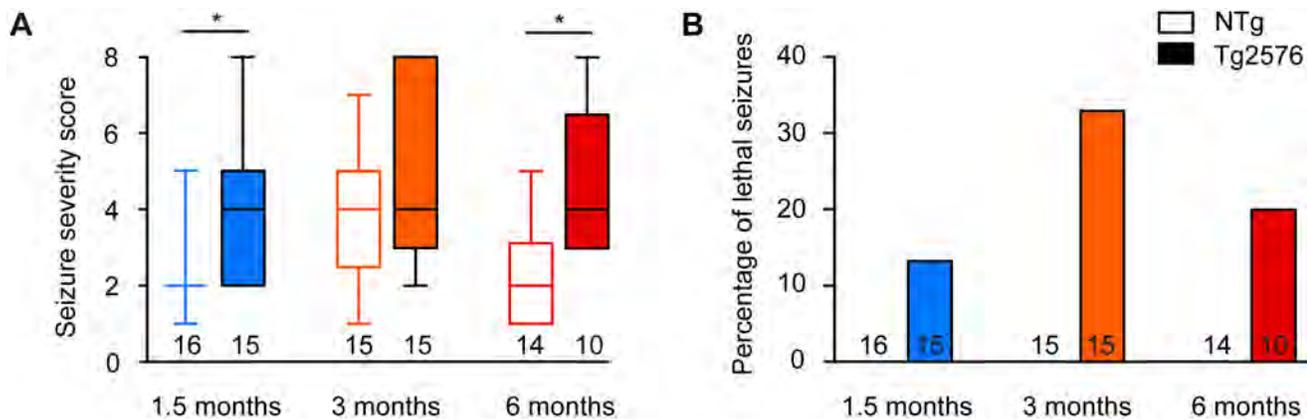


Fig 1. Tg2576 mice show high susceptibility to pharmacologically-induced seizures from early age on. (A) Seizure severity score of 1.5, 3 and 6 month-old Tg2576 male mice and non-transgenic (NTg) age-matched littermates. Whiskers boxes represent the interquartile distribution. Number of mice in each group is indicated below the boxes. Tg2576 mice exhibit more severe seizures than NTg at 1.5 and 6 months of age (Dunn's tests: $p < 0.05$ for Tg2576 vs NTg at 1.5 and 6 month-old). (B) Proportion of animals that died during PTZ-induced seizures in 1.5, 3 and 6 month-old Tg2576 and NTg mice. Note that only transgenic animals exhibit lethal seizures. Numbers over the horizontal axis indicate the number of mice used in each experimental group.

doi:10.1371/journal.pone.0119910.g001

summary, as early as 1.5 months of age, Tg2576 mice exhibit a higher susceptibility to pharmacological seizures than NTg littermates.

Tg2576 mice exhibit spontaneous epileptiform activity as young as 1.5 months of age

Then, we examined to which extent such susceptibility might be associated to spontaneous electroencephalographic (EEG) abnormalities in Tg2576 mice. We recorded cortical EEG in Tg2576 and NTg mice at 1.5, 3 and 6 months of age. During the recording session, we did not observe any electroencephalographic seizures in NTg nor in Tg2576 mice. Since spontaneous seizures are relatively rare events in other mouse models of Alzheimer's disease [20, 23] and given our recording time window, this was highly expected. Nevertheless, interictal spikes were observed in most of Tg2576 mice (63% of mice, regardless of their age). These events lasted 21.2 ± 2.6 ms and displayed the characteristic shape of interictal spikes [20] (Fig. 2A). In NTg mice, only 1 mouse out of 26 displayed spikes at a very low frequency (0.01 spike/minute) (Fig. 2B). Spike frequency was significantly influenced by the genotype but not by the age of the animals (Fig. 2B, two-way ANOVA; transgene effect: $p = 0.013$; age effect: $p = 0.4091$; interaction: $p = 0.3865$). These results clearly show that spontaneous epileptiform activity is already present in Tg2576 mice as early as 1.5 months of age.

Ectopic expression of NPY in the mossy fibers of young Tg2576 mice

To assess the occurrence of chronic seizures in Tg2576 mice, we looked for NPY ectopic expression in mossy fibers of the dentate gyrus by using NPY immunohistochemistry (Fig. 3). While never observed in the mossy fibers of NTg animals, NPY ectopic expression was found in a significant proportion of Tg2576 animals (Table 1, Chi square test for genotypes, regardless of the age: $p = 0.0002$). NPY ectopic expression was observed as young as 1.5 month of age. The proportion of mice showing NPY ectopic expression was significantly higher in Tg2576 than in NTg littermates at 3 and 6 months of age but not at 1.5 months of age (Table 1). Although not statistically significant in this sample, the proportion of Tg2576 mice showing NPY ectopic expression seemed to increase with age (Table 1, Chi square test for trend: $p = 0.16$).

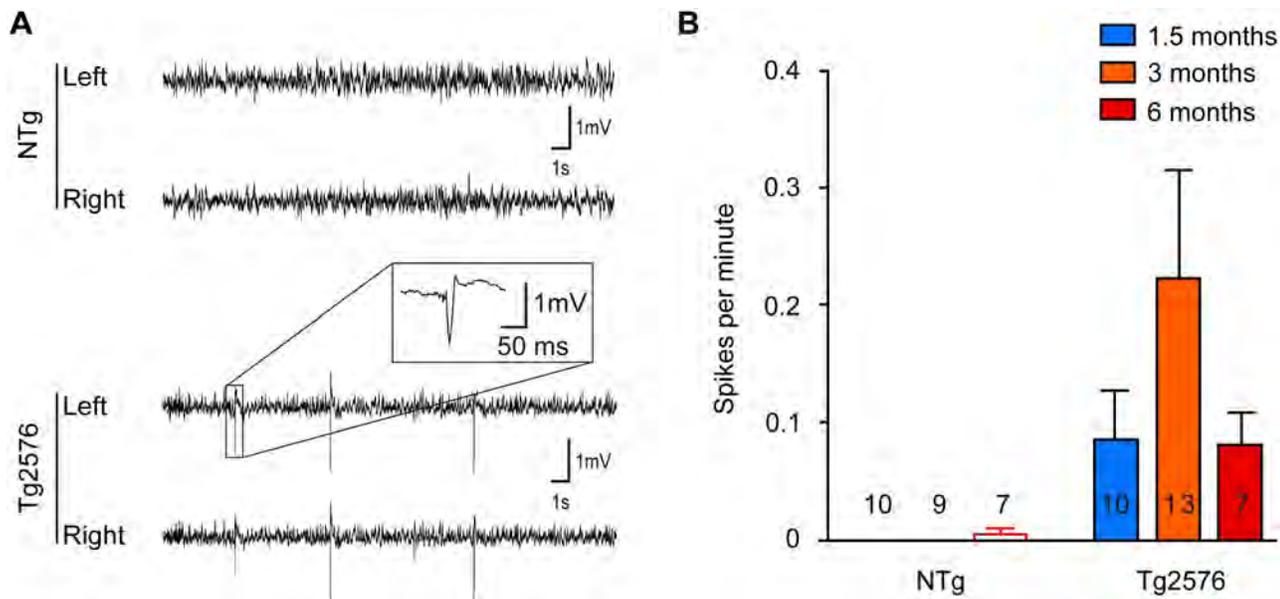


Fig 2. Tg2576 mice exhibit spontaneous epileptiform activity as young as 1.5 months of age. (A) Representative electroencephalographic (EEG) traces from non-transgenic (NTg) (top) and Tg2576 (bottom) mice from left and right parietal cortices. Note that only transgenic animals displayed sharp, high-voltage spikes that characterize epileptiform activity (inset). (B) Quantitative analysis of the frequency of interictal spikes (mean ± SEM). Two-way ANOVA shows a significant genotype effect ($p = 0.013$) but no age effect ($p = 0.4091$) and no interaction ($p = 0.3865$). Numbers over the horizontal axis indicate the number of mice used in each experimental group.

doi:10.1371/journal.pone.0119910.g002

These results suggest that chronic seizures occur at very early stages in the course of the disease, and that their incidence likely increases with age among the Tg2576 population.

Discussion

This study reports that at 1.5, 3 and 6 months of age, Tg2576 mice exhibit high susceptibility to pharmacologically-induced seizures, EEG epileptiform activity and NPY ectopic expression in mossy fibers, this later marker of chronic seizures showing an increased incidence with age. Our work provides the first evidence that such network dysfunction precedes the onset of memory deficits.

A few studies have previously assessed network hypersynchrony in the Tg2576 mouse line. To date, there is no data concerning the sensitivity of Tg2576 mice to convulsive agents, except a study showing an increased sensitivity to PTZ in Tg2576 mice bred on a pure C57bl/6 background, which exhibit an unusually high mortality rate (40% died before they reached 2 months of age) and thus cannot be considered as a typical Tg2576 line [41]. In the original Tg2576 line, EEG abnormalities were reported at 5–7 months of age but were not clearly described. The authors related longer durations of “higher frequency brain activity” (6 to 10 Hz), which they interpret as an increased synchrony, but did not report any obvious spike or seizure [27]. Thus, our data constitute the first clear demonstration of higher sensitivity to convulsive agents and occurrence of spontaneous interictal spikes in this mouse line. Ectopic expression of NPY in the mossy fibers has often been associated with epileptic activity in the hippocampus or with the occurrence of a generalized seizure in the days before sacrifice and can thus be used as a marker for chronic seizures [24,42]. Ectopic expression of NPY in the Tg2576 mice was evidenced at 5–7 months of age [27] and previous data from our group showed that the proportion of mice presenting this marker of chronic seizures increases with age (11% at 3 months, 60% at 18 months) [25]. Our present data confirm this observation and further point out that

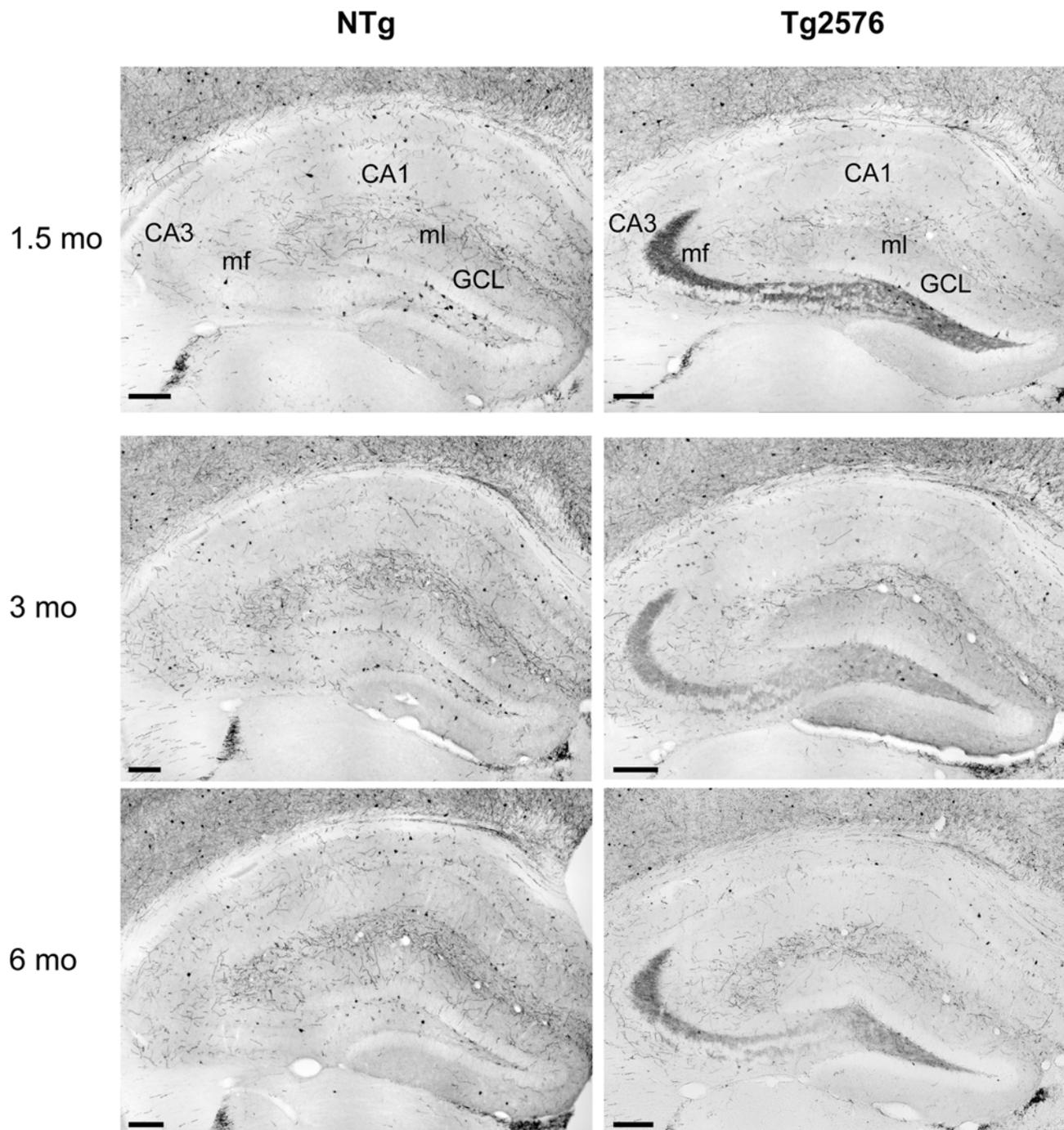


Fig 3. Ectopic expression of NPY in the mossy fibers of young Tg2576 mice. Photographs of the dorsal hippocampus immunostained for NPY in 1.5, 3 and 6 month-old non-transgenic (NTg) and Tg2576 mice. Left: In NTg animals, NPY staining is visible in the soma of hilar interneurons. Their axons display a faint staining visible in the molecular layer (ml), where these axons form synapses onto the dendrites of granular cells. Right: Typical ectopic NPY expression in the mossy fibers (in *hilus* and *stratum lucidum*) of a Tg2576 mouse. CA1 and 3, *Cornu Ammonis* 1 and 3, GCL: Granular Cell Layer, mf: mossy fibers, ml: molecular layer. Scale bar: 200 μ m.

doi:10.1371/journal.pone.0119910.g003

Table 1. Proportion of mice with NPY ectopic expression among Tg2576 mice and NTg littermates.

Age (months)	NTg	Tg2576	Fisher exact test for NTg vs Tg2576
1.5	0/20 (0%)	2/17 (11.7%)	p = 0.204
3	0/23 (0%)	4/21 (19.0%)	p = 0.044
6	0/18 (0%)	4/12 (33.3%)	p = 0.018

Data represent the number of animals with NPY ectopic expression in mossy fibers compared to the total number of animals in each group. Note that only Tg2576 mice present aberrant NPY expression.

doi:10.1371/journal.pone.0119910.t001

this marker can already be observed as soon as 1.5 months of age. Altogether, our data strongly suggest that Tg2576 mice present a precocious epileptic phenotype. Interestingly, previous work showed that Tg2576 exhibit normal memory performances at 1.5–2 months of age [30,31], memory deficits appearing in this mouse line between 3 and 6 months of age [30,31,32]. Thus, network hypersynchrony and expression of markers of chronic seizures occur before the onset of memory deficits in Tg2576 mice.

Network hypersynchrony and hyperexcitability have been described in other mouse models of AD. In the TgCRND8 line, seizure susceptibility to PTZ was evidenced at 6–8 weeks of age [16] when these mice already present memory deficits [43]. In APP_{Swe}xPS1_{ΔE9} mice, electroencephalographic seizures and epileptiform activity were found at 3–4 months of age [20], corresponding to the earliest description of memory deficits in this mouse line [44]. In hAPPJ20 mice, susceptibility to pharmacological seizures, spontaneous seizures, interictal spikes and NPY ectopic expression were described at 4–7 months of age [17,18,23,28], when mice already exhibit memory deficits from 2–3 months of age [45]. Thus, although it has never been assessed, network hypersynchrony might also happen before the onset of memory deficits in these models. Interestingly, this is also supported by data from human cases suggesting that epileptic events can precede the onset of memory impairments in AD and aMCI [12].

Several hypotheses can be proposed to explain the precocity of epileptic activity in Tg2576 mice. The Tg2576 mouse model expresses a mutated form of hAPP inducing an excessive production of Aβ_{1–42} peptide and its accumulation into amyloid plaques [46]. In the APP_{Swe}xPS1_{G384A} mice model, neurons located in the vicinity of amyloid plaques were reported to be hyperactive [47]. However, Tg2576 mice are completely devoid of amyloid plaques at 1.5 months of age [46], ruling out the possibility that plaques could be responsible for the early onset of network hyperactivity nor hypersynchrony in these mice. Nevertheless, the brains of new born Tg2576 mice, but not of NTg mice, already contain soluble Aβ_{1–42} [48]. At the cellular level, soluble Aβ_{1–42} species were suggested to play a role in neuronal hyperexcitability of AD mice. For instance, bath application of soluble Aβ decreases depolarization threshold and thus increases excitability of pyramidal cortical neurons or granule cells of the dentate gyrus [20,21] and intra-hippocampal injection of Aβ oligomers was found to increase population spikes evoked by perforant path stimulation in rats [49]. However, the molecular and cellular mechanisms underlying the effects of Aβ on neuronal hyperexcitability are still unclear. Recently, Lee et al. reported that Aβ disturb mitochondrial function in 1.5 month-old Tg2576 mice, leading to a slower decay of Ca²⁺ transients in granule cells of the dentate gyrus [50]. Further work is needed to determine if this increase in intracellular Ca²⁺ signal in granule cells could participate to network hypersynchrony in 1.5 month-old Tg2576 mice.

Interestingly, the role of Aβ in network hypersynchrony has been recently challenged. The APP_{Swe/Lon}xPS1_{M146V} mouse line, which produces high amounts of Aβ, does not exhibit any epileptiform activity even as late as 23 months of age [22]. Born and colleagues proposed that

mutant APP itself could be involved in network hypersynchrony. Indeed, APP is a transmembrane protein cleaved by secretases as the β -site APP cleaving enzyme 1 (BACE1). In transgenic models of AD that overexpress mutant APP, excessive levels of this full-length APP may hijack a significant portion of BACE1, thus reducing its ability to process other substrates such as sodium channels subunits. Indeed, BACE1 cleaves the Nav β 2 subunit of Nav1.1 channels, which regulates the expression of the functional α -subunits of these channels [51] that control excitability of parvalbumin-expressing interneurons [52]. Reduced levels of Nav1.1 channels were reported in association with impaired function of interneurons leading to network hypersynchrony and memory deficits in hAPPJ20 [23] and 5- to 7-month-old Tg2576 mice [27]. To which extent high levels of mutant APP reduce Nav1.1 levels in parvalbumin-expressing interneurons in young Tg2576 mice remains to be determined.

Recent studies clearly suggest a role of network hypersynchrony in memory deficits. In aMCI subjects, the antiepileptic drug levetiracetam improves memory performances [13]. In hAPPJ20 mice, one month of chronic levetiracetam treatment suppresses epileptiform activity, normalizes hippocampal NPY expression and improves memory performances [28]. The beneficial effect of levetiracetam on memory performances in hAPPJ20 mice may result from the suppression of epileptiform activity or the normalization of NPY expression in the hippocampus or both. In a rat model of epilepsy and epileptic patients, hippocampal interictal spikes occurring during memory retrieval impair memory performances [53,54]. Here we report epileptiform activity in 1.5 month-old Tg2576 mice, an age when these mice present normal memory performances [30,31]. Thus, memory deficits may not result from hypersynchrony and epileptiform activity themselves, but rather from the consequences of their chronicity. Chronic hypersynchrony triggers seizures which incidence increases with age as reported in the APP_{swe}xPS1_{dE9} model of AD (15% of mice had seizures at 3 months vs 50% at 4 months of age) [20]. Consistent with these results, the present study and previous data from our laboratory [25] report an age-related increase in the incidence of NPY ectopic expression which is significant from NTg mice at 3 months and clearly rises around 6 months of age. This parallels the progression of memory deficits, which begin at 3 months, and progressively worsen with age [30,31,32]. Expression of NPY in granule cells decreases glutamatergic synaptic transmission [55,56]. If it prevents a spread of neuronal overexcitation in a context of chronic seizures, it could also impair hippocampal function required for learning and memory processes. Thus, early network hypersynchrony induces seizures which in turn trigger neuroadaptations in the hippocampus, including NPY ectopic expression, which might cause a progressive degradation of hippocampal function explaining the age-dependent decline in memory performances in AD mice [57].

Network hypersynchrony could also cause memory impairment by altering neurogenesis. Adult hippocampal neurogenesis, a process by which new granule cells of the dentate gyrus are generated throughout life, contributes to learning and memory [58,59]. In AD mice, altered neurogenesis seems to be an early event in the course of the disease [25,60]. We recently described an impairment of adult hippocampal neurogenesis at 3 months of age in Tg2576 mice [25]. At this specific age, adult-generated neurons of Tg2576 mice exhibit impaired neuronal maturation and reduced dendritic spine density and dendritic length. Similar observations were made in hAPPJ20 mice [61]. In Tg2576 mice and hAPPJ20, altered neurogenesis has been described at the onset of memory deficits at 3 months of age, but it cannot be excluded that such alterations may begin earlier. In hAPPJ20 mice, Sun and colleagues showed that the excitation/inhibition imbalance contributes to adult neurogenesis impairments [61]. Whether alteration of hippocampal neurogenesis is present before memory deficits and whether it relates to hypersynchrony in Tg2576 mice remains to be established.

Conclusion

Here we evidence network hypersynchrony before the onset of memory deficits in Tg2576 mice and an age-related increase of the incidence of ectopic NPY in the mossy fibers of Tg2576 mice revealing an increasing frequency of seizures with age. This early network dysfunction could initiate progressive modifications of hippocampal network leading *in fine* to overt memory dysfunction. In human, network hypersynchrony would thus potentially represent an early diagnosis marker to predict memory decline. However, extrapolations of these findings to sporadic forms of the disease still remain to be investigated.

Acknowledgments

We thank A. Krezymon and E. DiDonato for their help and technical support. We also thank the ABC facility and ANEXPLO for housing mice.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: CB CR LD. Performed the experiments: CB CJ HH LD. Analyzed the data: CB LV JR CR LD. Wrote the paper: CB LV CR LD.

References

1. Levy-Lahad E, Wasco W, Poorkaj P, Romano DM, Oshima J, Pettingell WH, et al. Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science*. 1995; 269: 973–977. PMID: [7638622](#)
2. Sherrington R, Rogaev EI, Liang Y, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, et al. Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature*. 1995; 375: 754–760. PMID: [7596406](#)
3. Mullan M, Crawford F, Axelman K, Houlden H, Lilius L, Winblad B, et al. A pathogenic mutation for probable Alzheimer's disease in the APP gene at the N-terminus of beta-amyloid. *Nat Genet*. 1992; 1: 345–347. PMID: [1302033](#)
4. Goate A, Chartier-Harlin MC, Mullan M, Brown J, Crawford F, Fidani L, et al. Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature*. 1991; 349: 704–706. PMID: [1671712](#)
5. Higgins GA, Jacobsen H. Transgenic mouse models of Alzheimer's disease: phenotype and application. *Behav Pharmacol*. 2003; 14: 419–438. PMID: [14501255](#)
6. Mendez MF, Catanzaro P, Doss RC, R AR, Frey WH, 2nd. Seizures in Alzheimer's disease: clinico-pathologic study. *J Geriatr Psychiatry Neurol*. 1994; 7: 230–233. PMID: [7826492](#)
7. Forstl H, Burns A, Levy R, Cairns N, Luthert P, Lantos P. Neurologic signs in Alzheimer's disease. Results of a prospective clinical and neuropathologic study. *Arch Neurol*. 1992; 49: 1038–1042. PMID: [1417511](#)
8. Sjogren T, Sjogren H, Lindgren AG. Morbus Alzheimer and morbus Pick; a genetic, clinical and patho-anatomical study. *Acta Psychiatr Neurol Scand Suppl*. 1952; 82: 1–152. PMID: [13171126](#)
9. Mann DM, Pickering-Brown SM, Takeuchi A, Iwatsubo T. Amyloid angiopathy and variability in amyloid beta deposition is determined by mutation position in presenilin-1-linked Alzheimer's disease. *Am J Pathol*. 2001; 158: 2165–2175. PMID: [11395394](#)
10. Jayadev S, Leverenz JB, Steinbart E, Stahl J, Klunk W, Yu CE, et al. Alzheimer's disease phenotypes and genotypes associated with mutations in presenilin 2. *Brain*. 2010; 133: 1143–1154. doi: [10.1093/brain/awq033](#) PMID: [20375137](#)
11. Cabrejo L, Guyant-Marechal L, Laquerriere A, Vercelletto M, De la Fourniere F, Thomas-Anterion C, et al. Phenotype associated with APP duplication in five families. *Brain*. 2006; 129: 2966–2976. PMID: [16959815](#)
12. Vossel KA, Beagle AJ, Rabinovici GD, Shu H, Lee SE, Naasan G, et al. Seizures and epileptiform activity in the early stages of Alzheimer disease. *JAMA Neurol*. 2013; 70: 1158–1166. doi: [10.1001/jamaneurol.2013.136](#) PMID: [23835471](#)
13. Bakker A, Krauss GL, Albert MS, Speck CL, Jones LR, Stark CE, et al. Reduction of hippocampal hyperactivity improves cognition in amnesic mild cognitive impairment. *Neuron*. 2012; 74: 467–474. doi: [10.1016/j.neuron.2012.03.023](#) PMID: [22578498](#)

14. Lalonde R, Dumont M, Staufenbiel M, Strazielle C. Neurobehavioral characterization of APP23 transgenic mice with the SHIRPA primary screen. *Behav Brain Res.* 2005; 157: 91–98. PMID: [15617775](#)
15. Hsiao KK, Borchelt DR, Olson K, Johannsdottir R, Kitt C, Yunis W, et al. Age-related CNS disorder and early death in transgenic FVB/N mice overexpressing Alzheimer amyloid precursor proteins. *Neuron.* 1995; 15: 1203–1218. PMID: [7576662](#)
16. Del Vecchio RA, Gold LH, Novick SJ, Wong G, Hyde LA. Increased seizure threshold and severity in young transgenic CRND8 mice. *Neurosci Lett.* 2004; 367: 164–167. PMID: [15331144](#)
17. Palop JJ, Chin J, Roberson ED, Wang J, Thwin MT, Bien-Ly N, et al. Aberrant excitatory neuronal activity and compensatory remodeling of inhibitory hippocampal circuits in mouse models of Alzheimer's disease. *Neuron.* 2007; 55: 697–711. PMID: [17785178](#)
18. Roberson ED, Scarce-Levie K, Palop JJ, Yan F, Cheng IH, Wu T, et al. Reducing endogenous tau ameliorates amyloid beta-induced deficits in an Alzheimer's disease mouse model. *Science.* 2007; 316: 750–754. PMID: [17478722](#)
19. Roberson ED, Halabisky B, Yoo JW, Yao J, Chin J, Yan F, et al. Amyloid-beta/Fyn-induced synaptic, network, and cognitive impairments depend on tau levels in multiple mouse models of Alzheimer's disease. *J Neurosci.* 2011; 31: 700–711. doi: [10.1523/JNEUROSCI.4152-10.2011](#) PMID: [21228179](#)
20. Minkeviciene R, Rheims S, Dobszay MB, Zilberter M, Hartikainen J, Fulop L, et al. Amyloid beta-induced neuronal hyperexcitability triggers progressive epilepsy. *J Neurosci.* 2009; 29: 3453–3462. doi: [10.1523/JNEUROSCI.5215-08.2009](#) PMID: [19295151](#)
21. Zilberter M, Ivanov A, Ziyatdinova S, Mukhtarov M, Malkov A, Alpar A, et al. Dietary energy substrates reverse early neuronal hyperactivity in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurochem.* 2013; 125: 157–171. doi: [10.1111/jnc.12127](#) PMID: [23241062](#)
22. Born HA, Kim JY, Savjani RR, Das P, Dabaghian YA, Guo Q, et al. Genetic Suppression of Transgenic APP Rescues Hypersynchronous Network Activity in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *J Neurosci.* 2014; 34: 3826–3840. doi: [10.1523/JNEUROSCI.5171-13.2014](#) PMID: [24623762](#)
23. Verret L, Mann EO, Hang GB, Barth AM, Cobos I, Ho K, et al. Inhibitory interneuron deficit links altered network activity and cognitive dysfunction in Alzheimer model. *Cell.* 2012; 149: 708–721. doi: [10.1016/j.cell.2012.02.046](#) PMID: [22541439](#)
24. Vezzani A, Schwarz C, Lothman EW, Williamson J, Sperk G. Functional changes in somatostatin and neuropeptide Y containing neurons in the rat hippocampus in chronic models of limbic seizures. *Epilepsy Res.* 1996; 26: 267–279. PMID: [8985706](#)
25. Krezymon A, Richetin K, Halley H, Roybon L, Lassalle JM, Frances B, et al. Modifications of hippocampal circuits and early disruption of adult neurogenesis in the tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *PLoS One.* 2013; 8: e76497. doi: [10.1371/journal.pone.0076497](#) PMID: [24086745](#)
26. Verret L, Krezymon A, Halley H, Trouche S, Zerwas M, Lazouret M, et al. Transient enriched housing before amyloidosis onset sustains cognitive improvement in Tg2576 mice. *Neurobiol Aging.* 2013; 34: 211–225. doi: [10.1016/j.neurobiolaging.2012.05.013](#) PMID: [22727275](#)
27. Corbett BF, Leiser SC, Ling HP, Nagy R, Breyse N, Zhang X, et al. Sodium channel cleavage is associated with aberrant neuronal activity and cognitive deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci.* 2013; 33: 7020–7026. doi: [10.1523/JNEUROSCI.2325-12.2013](#) PMID: [23595759](#)
28. Sanchez PE, Zhu L, Verret L, Vessel KA, Orr AG, Cirrito JR, et al. Levetiracetam suppresses neuronal network dysfunction and reverses synaptic and cognitive deficits in an Alzheimer's disease model. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012; 109: E2895–2903. doi: [10.1073/pnas.1121081109](#) PMID: [22869752](#)
29. Hsiao K, Chapman P, Nilsen S, Eckman C, Harigaya Y, Younkin S, et al. Correlative memory deficits, Aβ elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science.* 1996; 274: 99–102. PMID: [8810256](#)
30. D'Amelio M, Cavallucci V, Middei S, Marchetti C, Pacioni S, Ferri A, et al. Caspase-3 triggers early synaptic dysfunction in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nat Neurosci.* 2011; 14: 69–76. doi: [10.1038/nn.2709](#) PMID: [21151119](#)
31. Jacobsen JS, Wu CC, Redwine JM, Comery TA, Arias R, Bowlby M, et al. Early-onset behavioral and synaptic deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006; 103: 5161–5166. PMID: [16549764](#)
32. Stewart S, Cacucci F, Lever C. Which memory task for my mouse? A systematic review of spatial memory performance in the Tg2576 Alzheimer's mouse model. *J Alzheimers Dis.* 2011; 26: 105–126. doi: [10.3233/JAD-2011-0066](#) PMID: [21971455](#)
33. Duffy AM, Morales-Corraliza J, Bermudes-Hernandez KM, Schaner MJ, Magagna-Poveda A, Mathews PM, et al. Entorhinal cortical defects in Tg2576 mice are present as early as 2–4 months of age. *Neurobiol Aging.* 2015; 36: 134–148. doi: [10.1016/j.neurobiolaging.2014.07.001](#) PMID: [25109765](#)

34. King DL, Arendash GW, Crawford F, Sterk T, Menendez J, Mullan MJ. Progressive and gender-dependent cognitive impairment in the APP(SW) transgenic mouse model for Alzheimer's disease. *Behav Brain Res.* 1999; 103: 145–162. PMID: [10513583](#)
35. Holcomb L, Gordon MN, McGowan E, Yu X, Benkovic S, Jantzen P, et al. Accelerated Alzheimer-type phenotype in transgenic mice carrying both mutant amyloid precursor protein and presenilin 1 transgenes. *Nat Med.* 1998; 4: 97–100. PMID: [9427614](#)
36. Perez-Cruz C, Nolte MW, van Gaalen MM, Rustay NR, Termont A, Tanghe A, et al. Reduced spine density in specific regions of CA1 pyramidal neurons in two transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *J Neurosci.* 2011; 31: 3926–3934. doi: [10.1523/JNEUROSCI.6142-10.2011](#) PMID: [21389247](#)
37. Westerman MA, Cooper-Blacketer D, Mariash A, Kotilinek L, Kawarabayashi T, Younkin LH, et al. The relationship between Abeta and memory in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci.* 2002; 22: 1858–1867. PMID: [11880515](#)
38. Lesne S, Koh MT, Kotilinek L, Kaye R, Glabe CG, Yang A, et al. A specific amyloid-beta protein assembly in the brain impairs memory. *Nature.* 2006; 440: 352–357. PMID: [16541076](#)
39. Mouri A, Noda Y, Hara H, Mizoguchi H, Tabira T, Nabeshima T. Oral vaccination with a viral vector containing Abeta cDNA attenuates age-related Abeta accumulation and memory deficits without causing inflammation in a mouse Alzheimer model. *FASEB J.* 2007; 21: 2135–2148. PMID: [17341681](#)
40. Lassalle JM, Halley H, Dumas S, Verret L, Frances B. Effects of the genetic background on cognitive performances of TG2576 mice. *Behav Brain Res.* 2008; 191: 104–110. doi: [10.1016/j.bbr.2008.03.017](#) PMID: [18433892](#)
41. Westmark CJ, Westmark PR, Beard AM, Hildebrandt SM, Malter JS. Seizure susceptibility and mortality in mice that over-express amyloid precursor protein. *Int J Clin Exp Pathol.* 2008; 1: 157–168. PMID: [18784809](#)
42. Sperk G, Marksteiner J, Gruber B, Bellmann R, Mahata M, Ortler M. Functional changes in neuropeptide Y- and somatostatin-containing neurons induced by limbic seizures in the rat. *Neuroscience.* 1992; 50: 831–846. PMID: [1360155](#)
43. Francis BM, Kim J, Barakat ME, Fraenkl S, Yucel YH, Peng S, et al. Object recognition memory and BDNF expression are reduced in young TgCRND8 mice. *Neurobiol Aging.* 2012; 33: 555–563. doi: [10.1016/j.neurobiolaging.2010.04.003](#) PMID: [20447730](#)
44. Vegh MJ, Heldring CM, Kamphuis W, Hijazi S, Timmerman AJ, Li K, et al. Reducing hippocampal extracellular matrix reverses early memory deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol Commun.* 2014; 2: 76. doi: [10.1186/s40478-014-0076-z](#) PMID: [24974208](#)
45. Harris JA, Devidze N, Halabisky B, Lo I, Thwin MT, Yu GQ, et al. Many neuronal and behavioral impairments in transgenic mouse models of Alzheimer's disease are independent of caspase cleavage of the amyloid precursor protein. *J Neurosci.* 2010; 30: 372–381. doi: [10.1523/JNEUROSCI.5341-09.2010](#) PMID: [20053918](#)
46. Kawarabayashi T, Younkin LH, Saido TC, Shoji M, Ashe KH, Younkin SG. Age-dependent changes in brain, CSF, and plasma amyloid (beta) protein in the Tg2576 transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci.* 2001; 21: 372–381. PMID: [11160418](#)
47. Busche MA, Eichhoff G, Adelsberger H, Abramowski D, Wiederhold KH, Haass C, et al. Clusters of hyperactive neurons near amyloid plaques in a mouse model of Alzheimer's disease. *Science.* 2008; 321: 1686–1689. doi: [10.1126/science.1162844](#) PMID: [18802001](#)
48. Trushina E, Nemutlu E, Zhang S, Christensen T, Camp J, Mesa J, et al. Defects in mitochondrial dynamics and metabolomic signatures of evolving energetic stress in mouse models of familial Alzheimer's disease. *PLoS One.* 2012; 7: e32737. doi: [10.1371/journal.pone.0032737](#) PMID: [22393443](#)
49. Orban G, Volgyi K, Juhasz G, Penke B, Kekesi KA, Kardos J, et al. Different electrophysiological actions of 24- and 72-hour aggregated amyloid-beta oligomers on hippocampal field population spike in both anesthetized and awake rats. *Brain Res.* 2010; 1354: 227–235. doi: [10.1016/j.brainres.2010.07.061](#) PMID: [20659435](#)
50. Lee SH, Kim KR, Ryu SY, Son S, Hong HS, Mook-Jung I, et al. Impaired short-term plasticity in mossy fiber synapses caused by mitochondrial dysfunction of dentate granule cells is the earliest synaptic deficit in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci.* 2012; 32: 5953–5963. doi: [10.1523/JNEUROSCI.0465-12.2012](#) PMID: [22539855](#)
51. Kim DY, Carey BW, Wang H, Ingano LA, Binshtok AM, Wertz MH, et al. BACE1 regulates voltage-gated sodium channels and neuronal activity. *Nat Cell Biol.* 2007; 9: 755–764. PMID: [17576410](#)
52. Ogiwara I, Miyamoto H, Morita N, Atapour N, Mazaki E, Inoue I, et al. Nav1.1 localizes to axons of parvalbumin-positive inhibitory interneurons: a circuit basis for epileptic seizures in mice carrying an Scn1a gene mutation. *J Neurosci.* 2007; 27: 5903–5914. PMID: [17537961](#)

53. Kleen JK, Scott RC, Holmes GL, Lenck-Santini PP. Hippocampal interictal spikes disrupt cognition in rats. *Ann Neurol*. 2010; 67: 250–257. doi: [10.1002/ana.21896](https://doi.org/10.1002/ana.21896) PMID: [20225290](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20225290/)
54. Kleen JK, Scott RC, Holmes GL, Roberts DW, Rundle MM, Testorf M, et al. Hippocampal interictal epileptiform activity disrupts cognition in humans. *Neurology*. 2013; 81: 18–24. doi: [10.1212/WNL.0b013e318297ee50](https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e318297ee50) PMID: [23685931](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23685931/)
55. Klapstein GJ, Colmers WF. On the sites of presynaptic inhibition by neuropeptide Y in rat hippocampus in vitro. *Hippocampus*. 1993; 3: 103–111. PMID: [8395947](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8395947/)
56. Colmers WF, Bleakman D. Effects of neuropeptide Y on the electrical properties of neurons. *Trends Neurosci*. 1994; 17: 373–379. PMID: [7529442](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7529442/)
57. Palop JJ, Mucke L. Epilepsy and cognitive impairments in Alzheimer disease. *Arch Neurol*. 2009; 66: 435–440. doi: [10.1001/archneurol.2009.15](https://doi.org/10.1001/archneurol.2009.15) PMID: [19204149](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19204149/)
58. Goodman T, Trouche S, Massou I, Verret L, Zerwas M, Roulet P, et al. Young hippocampal neurons are critical for recent and remote spatial memory in adult mice. *Neuroscience*. 2010; 171: 769–778. doi: [10.1016/j.neuroscience.2010.09.047](https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.09.047) PMID: [20883747](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20883747/)
59. Trouche S, Bontempi B, Roulet P, Rampon C. Recruitment of adult-generated neurons into functional hippocampal networks contributes to updating and strengthening of spatial memory. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009; 106: 5919–5924. doi: [10.1073/pnas.0811054106](https://doi.org/10.1073/pnas.0811054106) PMID: [19321751](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19321751/)
60. Demars M, Hu YS, Gadadhar A, Lazarov O. Impaired neurogenesis is an early event in the etiology of familial Alzheimer's disease in transgenic mice. *J Neurosci Res*. 2010; 88: 2103–2117. doi: [10.1002/jnr.22387](https://doi.org/10.1002/jnr.22387) PMID: [20209626](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20209626/)
61. Sun B, Halabisky B, Zhou Y, Palop JJ, Yu G, Mucke L, et al. Imbalance between GABAergic and Glutamatergic Transmission Impairs Adult Neurogenesis in an Animal Model of Alzheimer's Disease. *Cell Stem Cell*. 2009; 5: 624–633. doi: [10.1016/j.stem.2009.10.003](https://doi.org/10.1016/j.stem.2009.10.003) PMID: [19951690](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19951690/)

CHAPITRE II : Effet de l'enrichissement environnemental sur l'hypersynchronie neuronale chez les souris Tg2576

CHAPITRE II : Effet de l'enrichissement environnemental sur l'hypersynchronie neuronale chez les souris Tg2576

II.1) Introduction

La réserve cognitive repose sur l'hypothèse qu'il est possible pour les individus atteints d'une pathologie cérébrale de maintenir de bonnes performances cognitives grâce à une adaptation de leur fonctionnement cérébral, notamment basé sur le recrutement accru des réseaux normalement impliqués ou sur le développement de stratégies cognitives alternatives. Les études épidémiologiques ont révélé que cette réserve s'élabore tout au long de la vie par le biais d'expériences cognitivement stimulantes telles que l'éducation ou la pratique de loisirs. L'équipe a montré précédemment que l'exposition transitoire à un environnement enrichi, survenant tôt au cours de la vie adulte, peut durablement améliorer les performances mnésiques des souris Tg2576 modèles de la maladie d'Alzheimer. Cependant, les mécanismes sous-jacents à la formation d'une telle réserve cognitive restent inconnus. Dans la première partie de mon travail, nous avons mis en évidence une hypersynchronie neuronale chez les souris Tg2576, associée à une modification de l'expression hippocampique du NPY. L'hypersynchronie neuronale pouvant participer aux troubles mnésiques de la MA, nous nous sommes demandés si l'amélioration durable des performances mnésiques des souris Tg2576 après un enrichissement environnemental pouvait être associée à une réduction de cette hypersynchronie neuronale. Dans ce but, nous avons hébergé des souris non transgéniques et Tg2576 dans des conditions standards ou enrichies pendant 10 semaines, à partir de l'âge de 3 mois. L'enrichissement environnemental n'a pas influencé la susceptibilité aux crises d'épilepsie induites par le PTZ ni la fréquence des pointes interictales. D'autre part, l'enrichissement environnemental n'a pas non plus affecté l'expression du NPY dans les fibres moussues chez les souris Tg2576, donc a priori l'occurrence des crises d'épilepsie. De façon inattendue, nous avons aussi observé une expression du NPY dans les fibres moussues chez un petit nombre de souris NTg. En conclusion, l'effet durable de l'enrichissement environnemental sur les capacités mnésiques des souris Tg2576 n'est pas attribuable à une prévention de l'hypersynchronie neuronale et des crises d'épilepsie chez ces souris.

Je vais donc ici dans une première partie présenter l'article publié concernant les effets de l'enrichissement environnemental sur la susceptibilité aux crises d'épilepsie induites par le PTZ et la fréquence des pointes interictales chez les souris Tg2576. L'effet de l'EE sur l'expression du NPY dans les fibres moussues est présenté dans une deuxième partie, les résultats n'ayant pas été intégrés à l'article car ils sont délicats à interpréter et n'apportent pas de réponse complémentaire à la question posée.



Environmental enrichment does not influence hypersynchronous network activity in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease

Charlotte Bezzina^{1,2}, Laure Verret^{1,2}, Hélène Halley^{1,2}, Lionel Dahan^{1,2†} and Claire Rampon^{1,2*†}

¹ UMR5169 CNRS, Centre de Recherches sur la Cognition Animale, Université de Toulouse, Université Paul Sabatier, Toulouse, France, ² CNRS, Centre de Recherches sur la Cognition Animale, Toulouse, France

The cognitive reserve hypothesis claims that the brain can overcome pathology by reinforcing preexistent processes or by developing alternative cognitive strategies. Epidemiological studies have revealed that this reserve can be built throughout life experiences as education or leisure activities. We previously showed that an early transient environmental enrichment (EE) durably improves memory performances in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease (AD). Recently, we evidenced a hypersynchronous brain network activity in young adult Tg2576 mice. As aberrant oscillatory activity can contribute to memory deficits, we wondered whether the long-lasting memory improvements observed after EE were associated with a reduction of neuronal network hypersynchrony. Thus, we exposed non-transgenic (NTg) and Tg2576 mice to standard or enriched housing conditions for 10 weeks, starting at 3 months of age. Two weeks after EE period, Tg2576 mice presented similar seizure susceptibility to a GABA receptor antagonist. Immediately after and 2 weeks after this enrichment period, standard and enriched-housed Tg2576 mice did not differ with regards to the frequency of interictal spikes on their electroencephalographic (EEG) recordings. Thus, the long-lasting effect of this EE protocol on memory capacities in Tg2576 mice is not mediated by a reduction of their cerebral aberrant neuronal activity at early ages.

Keywords: amyloid precursor protein, EEG, epileptiform activity, pentylentetrazole, seizure susceptibility, Alzheimer's disease, environmental enrichment

OPEN ACCESS

Edited by:

Rodrigo Orlando Kulji s,
University of Miami School
of Medicine, USA

Reviewed by:

Filippo Tempia,
University of Turin, Italy
Koteswara Rao Valasani,
The University of Kansas, USA

*Correspondence:

Claire Rampon,
UMR5169 CNRS, Centre de
Recherches sur la Cognition Animale,
Université Paul Sabatier,
118 Route de Narbonne,
F-31062 Toulouse Cedex 09,
France
claire.rampon@univ-tlse3.fr

[†]These authors have contributed
equally to this work.

Received: 17 July 2015

Accepted: 03 September 2015

Published: 23 September 2015

Citation:

Bezzina C, Verret L, Halley H,
Dahan L and Rampon C (2015)
Environmental enrichment does not
influence hypersynchronous network
activity in the Tg2576 mouse model
of Alzheimer's disease.
Front. Aging Neurosci. 7:178.
doi: 10.3389/fnagi.2015.00178

Introduction

Alzheimer's disease (AD) is the first cause of dementia worldwide. AD patients present a progressive decline of memory performances which amplitude and speed are highly variable between individuals. Notably, environmental factors can modulate the risk of dementia in AD and a high educational level or the practice of various leisure activities has been associated with a decreased risk of AD-related dementia (Stern et al., 1994; Scarmeas et al., 2001).

Abbreviations: AD, Alzheimer's disease; APP, Amyloid precursor protein; EE, environmental enrichment; NTg, non transgenic; PTZ, pentylentetrazole; SH, standard housing(ed).

The concept of cognitive reserve hypothesizes that brain adapts to overcome pathology by reinforcing the efficiency of usual cognitive strategies and the development of alternative ones. Given the poor efficiency of current therapeutic strategies against AD, it has become a major issue to better understand memory decline during the course of the pathology and to decipher the neurobiological basis of cognitive reserve.

Environmental enrichment (EE) is an experimental paradigm providing social, sensorial and cognitive stimulations for animals that mimics the beneficial human lifestyle. It thus constitutes a unique tool to investigate the biological processes involved in the establishment of the cognitive reserve. EE consists in housing large groups of animals in a wide cage filled with objects of different size, shape, color and material that are regularly renewed (Sztainberg and Chen, 2010). Exposure to EE has extensively been reported to improve cognitive performances in wild-type mice (Rampon et al., 2000; Tang et al., 2001; Frick and Fernandez, 2003; Jankowsky et al., 2005; Berardi et al., 2007; Costa et al., 2007; Cracchiolo et al., 2007; Dong et al., 2007; Gerenu et al., 2013). In mouse models of AD, memory performances were found to be improved immediately after long-lasting exposure to EE (more than 4 months; Jankowsky et al., 2005; Berardi et al., 2007; Costa et al., 2007; Cracchiolo et al., 2007; Dong et al., 2007). More recently, we reported that an early and transient exposure to EE leads to a long-lasting effect on memory function in the Tg2576 mouse model of AD (Verret et al., 2013). Tg2576 mice, which express the Swedish double mutant form of the human Amyloid Precursor Protein (APP), progressively develop AD-related behavioral and neuroanatomical troubles (Hsiao et al., 1996). In this mouse line, memory deficits appear around 3 months of age (Jacobsen et al., 2006; D'Amelio et al., 2011; Duffy et al., 2015) and progress slowly while amyloid plaques form later, around 10 months of age (Kawarabayashi et al., 2001). We showed that exposure to EE that occurs between 3 and 5.5 months of age, improved memory performances of 13 month-old Tg2576 mice, while Tg2576 mice housed in standard cages displayed robust memory deficits (Verret et al., 2013). These results corroborate data in human revealing that education, an early-life cognitive stimulation, delays the onset of AD-type dementia in the elderly (Stern et al., 1994). Our EE protocol is thus a suitable paradigm to study the neural mechanisms underlying the formation of cognitive reserve during young adulthood in mice. Interestingly, if Tg2576 mice underwent EE after 5 months of age, we observed that the beneficial effects on memory function were less robust across memory tasks (Verret et al., 2013). We thus hypothesized that EE taking place at 3 months of age could disrupt one or several early pathogenic events of amyloidopathy, before their deleterious effects on brain function and memory processing become permanent, thereby durably limiting memory alterations. This hypothesis would explain why an EE exposure later during the disease time-course was not or less efficient to rescue memory performances in Tg2576 mice (Verret et al., 2013).

Amongst early events linked to AD pathogenesis that can contribute to memory decline, we focused here on neuronal network hypersynchrony (Bakker et al., 2012; Vossel et al., 2013). Indeed, seizures are more frequent in AD patients than in age-matched individuals and seizures can precede the onset of memory deficits (Amatniek et al., 2006; Sanchez et al., 2012). Different lines of evidence also indicate the occurrence of hypersynchronous network activity such as seizures amongst mouse models of AD (Palop et al., 2007; Minkeviciene et al., 2009; Born et al., 2014; Ittner et al., 2014). Interestingly, preventing neuronal hyperactivity with the anti-epileptic drug levetiracetam was associated with an improvement of memory performances in subjects with Mild Cognitive Impairments and in the hAPPJ20 mouse model of AD (Bakker et al., 2012; Sanchez et al., 2012). Altogether these data strongly suggest that aberrant neuronal activity can contribute to memory dysfunction in AD. Recently, we evidenced that network hypersynchrony occurs at very early age in Tg2576 mice (Bezzina et al., 2015). Tg2576 mice present a higher susceptibility to pharmacologically-induced seizures than their non-transgenic (NTg) littermates. They also display an epileptiform activity in the form of frequent interictal spikes on their electroencephalograms (EEG), high-amplitude events that typically occur between seizures in epileptic patients and rodents, even if no seizure was recorded over the recording time. This network hypersynchrony was observed in Tg2576 mice as soon as 1.5 months of age that is to say before the onset of memory decline in this mouse line. Therefore, hypersynchronous network activity could be part of the earliest pathogenic events leading to memory decline in Tg2576 mice, which may be prevented by EE.

Yet, EE can suppress seizures or reduce seizure susceptibility in rat models of epilepsy (Young et al., 1999; Auvergne et al., 2002; Korbey et al., 2008; Fares et al., 2013). For instance, housing rats in enriched environment before pharmacological or electrical induction of seizures reduced the severity of subsequent seizures (Young et al., 1999; Auvergne et al., 2002). In a genetic mouse model of epilepsy, enriched housing starting at birth totally suppressed seizures (Manno et al., 2011).

In the present work, we examined whether an EE protocol taking place between 3 and 5.5 months of age, that has proven long-lasting effect on memory function in Tg2576 mice, could reduce network hypersynchrony in these mice. To address this question, we performed *in vivo* EEG recordings to detect interictal spikes and assessed seizure susceptibility to a GABA receptor antagonist in Tg2576 females and their NTg littermates housed under standard or enriched conditions.

Materials and Methods

Ethics Statement

As previously described (Bezzina et al., 2015), all experiments were performed in strict accordance with the policies of the European Union (86/609/EEC), the French National Committee of Ethics (87/848), and the local committee's recommendations (C 31-555-11, Direction départementale de la protection des populations) for the care and use of laboratory animals. Animal facility of the Centre de Recherches sur la

Cognition Animale (CRCA) is fully accredited by the French Direction of Veterinary Services (C 31-555-11, February 9, 2011) and animal surgery and experimentation conducted in this study were authorized by the French Direction of Veterinary Services (#31-11555521, 2002). All efforts were made to improve the mice welfare and minimize their suffering.

Mouse Line

As described in Bezzina et al. (2015), experiments were performed on female mice from our in-house colony of the transgenic line Tg2576 (Hsiao et al., 1995, 1996). Tg2576 mice overexpress a double mutant form of human APP695 (Lys670-Asn, Met671-Leu [K670N, M671L]), driven by a hamster prion protein promoter. Tg2576 males were bred with C57B6/SJL F1 females (Charles River, L'Arbresle, France) and the offspring was genotyped for the hAPP transgene using DNA obtained from post-weaning tail biopsies. Polymerase chain reaction products were analyzed to confirm the presence of hAPP DNA sequence in offspring. Mice were maintained on a 12 h light/12 h dark cycle with free access to food and water.

Environmental Enrichment

At 3 months of age, Tg2576 and NTg mice were arbitrarily divided in two groups. One group (SH) was housed in standard laboratory cages, by lots of 2–5 mice, until the age of 6 months (Figure 1A, left). The other group was housed in an enriched environment (EE; Figure 1A, right), as previously described (Verret et al., 2013) until mice reached the age of 5.5 months after which they were returned to their standard cages until the age of 6 months (Figure 1B). Whatever the housing conditions, mice

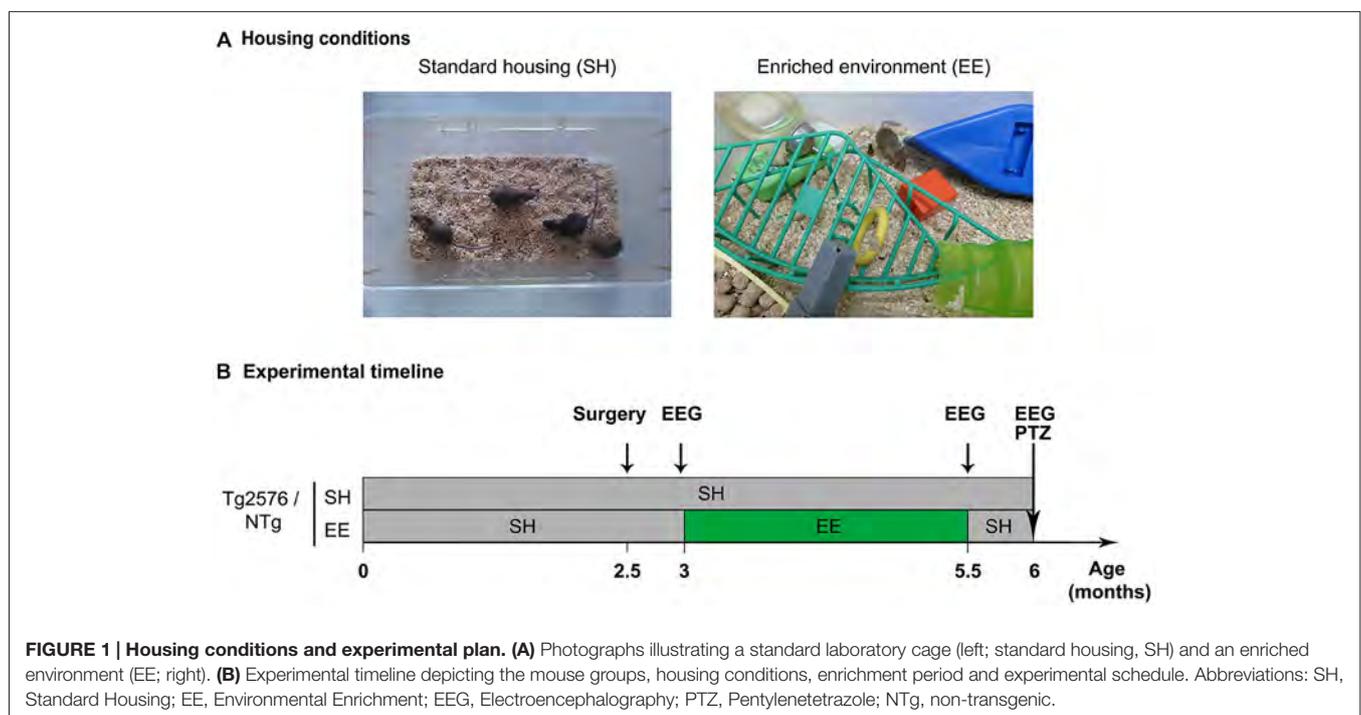
were given ad libitum access to food and water. As previously described (Verret et al., 2013), EE was composed of a large box (150 × 80 × 80 cm) containing various objects of different size, shape, color and material (wood, plastic, glass, metal), excluding running wheels. The configuration of the objects was modified and new objects were introduced every other day in order to stimulate mice exploratory behavior. Mice were exposed to the enriched environment by groups of 7–12 individuals (Figure 1A, right).

Implantation of EEG Electrodes

Tg2576 mice and NTg littermates were implanted with electrodes for EEG recordings at the age of 2.5 months (Figure 1B; NTg EE: $n = 10$, Tg2576 EE: $n = 11$, NTg SH: $n = 13$, Tg2576 SH: $n = 11$) as previously described in details (Bezzina et al., 2015).

EEG Recordings

Mice performed EEG recordings at three time-points: 3, 5.5 and 6 months of age, i.e., respectively 1–5 days before, immediately after, or 2 weeks after the EE period (Figure 1B). Mice were habituated to the recording system 1–5 days before the first recording session (at 3 months of age). Each recording session lasted 24 h. Protocols and device used for habituation and EEG recordings were the same as previously detailed (Bezzina et al., 2015). EEG and EMG signals were amplified and band-pass filtered (for EEG: 0.3–1 KHz; for EMG: 3 Hz–20 kHz) using a AM system 3500 amplifier (A-M system, Sequim, WA, USA) and sampled at 200 Hz (Power 1401 mk-II, CED, Cambridge, UK). EEG recordings were analyzed using Spike 2 V7 software.



Detection of Epileptiform Activity on EEG Traces

Interictal spikes were visually detected on EEG traces based on metrical, morphological and temporal criteria (Bezzina et al., 2015). The number of interictal spikes per minute was quantified over the 24 h of recordings. One mouse died between 3 and 5.5 months and was removed from the analysis for all ages (Tg2576 SH: $n = 1$) and we excluded another animal because of movements artifacts on EEG traces (NTg SH: $n = 1$). Statistical analysis of the frequency of interictal spikes (number of spikes/minute) was performed using a two-way ANOVA for repeated measures, followed by a Bonferroni *post hoc* test.

PTZ Injection

Seizure susceptibility was evaluated by behavioral scoring of the severity of seizures induced by the injection of a GABA_A receptor antagonist: pentylenetetrazole (PTZ, Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA). Mice were administered with a single i.p. injection of PTZ at 40 mg/kg (NTg EE: $n = 23$, Tg2576 EE: $n = 23$, NTg SH: $n = 29$, Tg2576 SH: $n = 24$). Two mice were excluded from the analysis because they received a lower PTZ dose by accident (Tg2576 EE: $n = 1$, NTg EE: $n = 1$). After drug injection, each mouse was placed in a new cage and its behavior was videotaped for 20 min. Mice were sacrificed immediately after to limit suffering.

Seizure Severity Scoring

As previously explained (Bezzina et al., 2015), the maximal seizure severity reached along the 20 min session was scored using an ordinal behavioral scale (Palop et al., 2007; Bezzina et al., 2015) as follows: “0 = normal exploratory behavior, 1 = immobility, 2 = generalized spasm, tremble, or twitch, 3 = tail extension, 4 = forelimb clonus, 5 = generalized clonic activity, 6 = bouncing or running seizures, 7 = full tonic extension, 8 = death”. Severity scores were validated by two independent observers blind to the experimental conditions and compared among all groups using Kruskal-Wallis test, followed by Dunn’s *post hoc* tests for side by side comparisons.

Statistical Analysis

All statistical analysis was performed using the Prism 5 software (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA).

Results

Environmental Enrichment does not Affect Epileptiform Activity in Tg2576 Mice

To measure the acute and durable effect of EE on the epileptiform activity in Tg2576 mice, we performed three EEG recording sessions of 24 h each on Tg2576 mice and their NTg littermates. For each mouse, these recordings took place: (i) 1–5 days before EE (at the age of 3 months); (ii) immediately after EE (at the age of 5.5 months); and (iii) 2 weeks after EE (at the age of 6 months; **Figure 1B**). As previously described (Bezzina et al., 2015), we did not observe any spike in NTg mice whatever their age or housing conditions. In Tg2576

mice, we recorded three seizures over the 22 animals. One seizure was recorded at 3 months of age in a Tg2576 mouse (**Figure 2A**) that died 2 weeks after. This Tg2576 mouse was housed in standard conditions. The two other seizures were both recorded in one Tg2576 mouse housed under standard conditions. One seizure occurred during the recording session at 5.5 months of age, the other one during the recording session that took place 2 weeks after. All Tg2576 mice exhibited interictal spikes (**Figure 2B**) which frequency did not vary across recording sessions nor housing conditions (**Figure 2C**; two-way ANOVA for repeated measures; age effect: $p = 0.99$; housing effect: $p = 0.73$; interaction: $p = 0.43$). Environmental enrichment did not modify EEG oscillations either. Indeed, for both genotypes, power spectra calculated from 1–100 Hz for each vigilance state showed no difference between housing conditions at any frequency (two-way ANOVA, $p > 0.86$ for the effect of housing conditions and for the interaction between frequency and housing conditions). These results reveal that EE at early age does not affect epileptiform activity in Tg2576 mice.

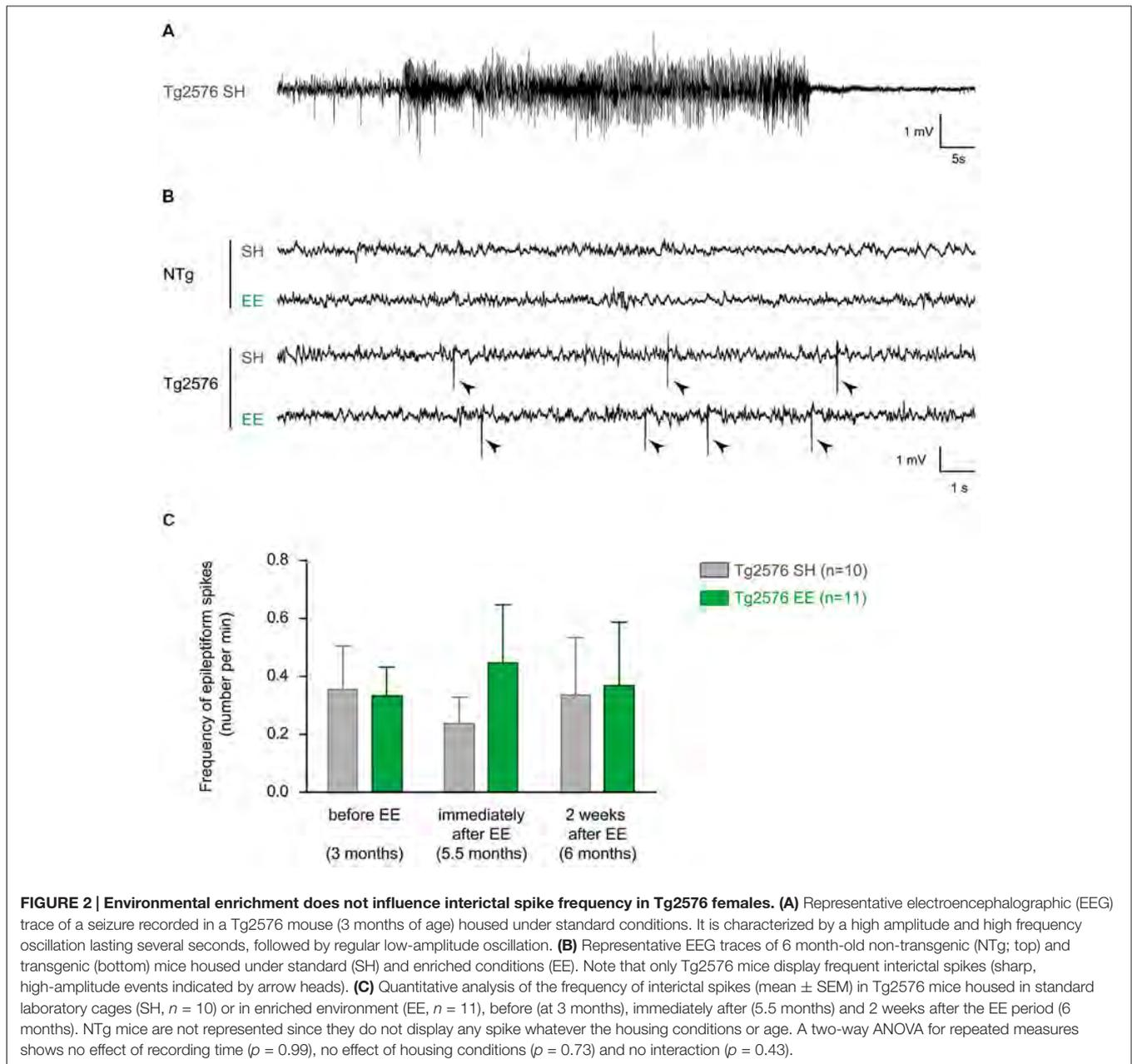
Environmental Enrichment has no Lasting Effect on the Susceptibility to Pharmacologically-Induced Seizures in Tg2576 Mice

Our aim was to determine whether EE has an effect on seizure susceptibility in Tg2576 mice. After the completion of EE, one or 2 days after the last EEG recording, we assessed seizure susceptibility to the GABA_A receptor antagonist PTZ in NTg and Tg2576 mice housed in standard or enriched conditions. Tg2576 females exhibited more severe seizures than NTg females (**Figure 3**; Kruskal-Wallis: $p = 0.0012$, Dunn’s *post hoc* tests: $p < 0.05$ for NTg EE vs Tg2576 EE and for NTg SH vs Tg2576 SH). However, our data indicate that seizure severity did not differ between Tg2576 mice housed under standard and enriched conditions (Dunn’s *post hoc* test: $p > 0.05$ for Tg2576 SH vs Tg2576 EE). In summary, EE does not durably modify seizure susceptibility to PTZ in Tg2576 females.

Discussion

Our work shows that EE performed between 3 and 5.5 months of age does not acutely affect EEG interictal spikes in the Tg2576 mouse model of AD. We also show that, 2 weeks after this EE protocol, Tg2576 mice exhibit a susceptibility to PTZ-induced seizures and a frequency of EEG interictal spikes that were similar to those observed in animals housed in standard conditions. Altogether, these observations show that the prevention of memory impairments by EE in Tg2576 mice is not due to a reduction of neuronal network hypersynchrony at early ages.

In a previous work, we described hypersynchronous network activity in Tg2576 mice at 6 months of age, in males (Bezzina et al., 2015). Spikes were virtually absent in both males and females NTg mice. In 6 month-old NTg mice housed in standard conditions, PTZ-induced seizures reported here in NTg females were significantly more severe than those previously reported in NTg males (1st quartile/ median/3rd quartile for females: 2/3.5/5

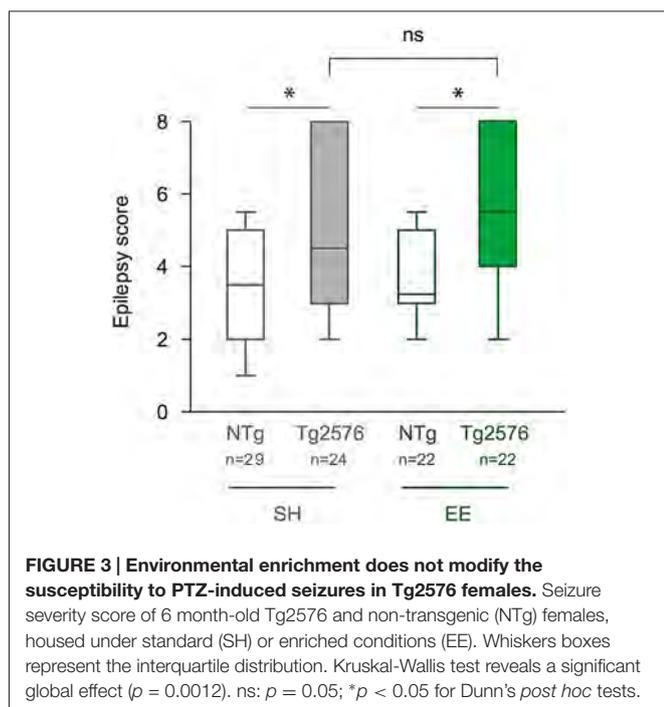


and males: 1/2/3.125, Mann and Whitney test $p = 0.0138$). In 6 month-old Tg2576 mice housed in standard conditions, PTZ-induced seizures and the frequency of interictal spikes were not significantly different between Tg2576 males and females (Mann and Whitney males vs females: PTZ severity score: $p = 0.77$, spike frequency: $p = 0.7693$). The female higher sensitivity to PTZ that we observed in NTg mice could be related to the fluctuations of GABA_A receptors composition along the oestrus cycle and the associated seizure susceptibility (Wu et al., 2013). This gender difference in PTZ sensitivity may be more obvious in NTg than in Tg2576 mice because of a ceiling effect in Tg2576 mice due to the ordinal nature of the severity scale. In summary, we observed a network hypersynchrony in Tg2576

female mice which was very similar to what we previously reported in males.

Our data reveal that there is no effect of EE on epileptiform activity in Tg2576 mice, immediately after the EE. Nevertheless, we could not exclude that EE acutely affects other parameters such as the frequency of seizures or their duration. However, if EE had a robust effect on network hypersynchrony, one would expect that it would have impacted the frequency of interictal spikes, which is not the case in our study.

Two weeks after EE, both the severity of PTZ-induced seizures and the frequency of interictal spikes were comparable between enriched and standard-housed Tg2576 mice. Thus, there is no noticeable lasting effect of EE on network hypersynchrony of



Tg2576 mice. These results confirmed our previous data showing that neuropeptide Y ectopic expression in mossy fibers, a marker of chronic seizures, was present in standard-housed 13 month-old Tg2576 mice even if those mice had previously been housed in enriched environment at 3 months of age (Verret et al., 2013). Studies in rodent models of epilepsy have already assessed the effect of EE on their epileptic phenotype. Rats housed in enriched environment before undergoing an epileptogenic process induced by kainate injections or electrical stimulations developed fewer seizures than standard-housed rats (Young et al., 1999; Auvergne et al., 2002). Conversely, rats that received lithium/pilocarpine injections to trigger epileptogenesis before 1-month exposure to EE, showed similar spike rates than rats housed in standard conditions (Rutten et al., 2002). Moreover, EE carried at very early age (from P21 to P51) in Bassoon mutant mice, which developed seizures before P14, did not suppress seizures (Morelli et al., 2014). Thus, it seems that EE needs to occur before the induction of epileptogenesis in order to prevent it. In Tg2576 mice, hypersynchronous network activity is already observed at 1.5 months of age (Bezzina et al., 2015), i.e., prior the onset of EE in our study (3 months of age). Thus, the EE performed in our study might occur too late to prevent network hypersynchrony in Tg2576 mice.

Interestingly, the same EE protocol can produce different effects according to the origin of the epileptic phenotype. Schridde and Van Luijckelaar (2004) showed that the same protocol of EE increased or had no effect on the number of epileptic discharges in two strains of epileptic rats WAG/Rij and ACI, possibly because these two kinds of epilepsy relied on different physiopathological mechanisms. It is thus plausible that network hypersynchrony in Tg2576 mice is not suppressed by EE as in the aforementioned rodent models of epilepsy (Young

et al., 1999; Auvergne et al., 2002; Manno et al., 2011) because the neurobiological basis of hypersynchronous network activity are different in AD and epilepsy models.

In the study by Verret et al. (2013), the same EE protocol performed between 3 and 5.5 months of age prevented memory impairments of 13 month-old Tg2576 mice whereas standard-housed Tg2576 mice showed clear memory deficits. In the spatial Morris Water Maze test, the Tg2576 mice previously enriched at 3 months of age swam preferentially in the target quadrant, similarly to NTg mice (Verret et al., 2013). Our work thus reveals that the beneficial long-lasting effect of an early EE on memory performances of Tg2576 mice is not mediated by a suppression of hypersynchronous network activity at early ages in this mouse line. Rutten et al. (2002) reported similar results in rats that were enriched after experimenting a *status epilepticus*. *Status epilepticus*-induced memory impairments were less pronounced in enriched rats than in standard-housed rats, while the frequency of interictal spikes was not significantly different between these two groups of rats (Rutten et al., 2002). We can thus hypothesize that EE has no influence on dementia pathogenesis but rather triggers general compensatory mechanisms to maintain memory performances in Tg2576 mice. Indeed, EE stimulates different pathways regulating brain plasticity that contribute to the effect of EE on memory processes in mice. These processes include increased neurogenesis, increased levels of neurotrophins or increased long-term potentiation (for review Nithianantharajah and Hannan, 2006). Gerenu et al. (2013) reported that a transient cognitive stimulation in early life (from 4–6 months of age) improved memory performances of Tg2576 mice at 15 months of age. They also reported an increased level of proteins involved in synaptic plasticity and memory formation such as the PSD95 postsynaptic scaffold protein, the NR1 NMDA receptor subunit and the immediate early gene Arc (Gerenu et al., 2013). Whether an increase of such proteins is responsible for the long-lasting memory improvement provided to Tg2576 mice by EE remains to be investigated.

Conclusion

Environmental enrichment performed between 3 and 5.5 months of age in Tg2576 mice does not have any detectable effect on the mice seizure susceptibility to PTZ nor on interictal spike frequency. The long-lasting effect of EE on memory performances of Tg2576 mice is thus not mediated by a suppression of hypersynchronous network activity at early ages in this mouse line. Such early-life EE might exert its capacity to improve memory by interfering with other processes involved in memory dysfunction or by triggering compensatory mechanisms such as enhanced plasticity.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: CB, LV, LD, CR. Acquired data: CB, HH, LD. Analyzed and interpreted the data: CB, LV, LD, CR. Wrote the manuscript: CB, LV, LD, CR.

Funding

ANR-10-05-MALZ: CR, LD; Agence Régionale de Santé, France: CB, Subvention de recherche Fyssen 2013: LV.

References

- Amatniek, J. C., Hauser, W. A., Delcastillo-Castaneda, C., Jacobs, D. M., Marder, K., Bell, K., et al. (2006). Incidence and predictors of seizures in patients with Alzheimer's disease. *Epilepsia*, 47, 867–872. doi: 10.1111/j.1528-1167.2006.00554.x
- Auvergne, R., Leré, C., El Bahh, B., Arthaud, S., Lespinet, V., Rougier, A., et al. (2002). Delayed kindling epileptogenesis and increased neurogenesis in adult rats housed in an enriched environment. *Brain Res.* 954, 277–285. doi: 10.1016/S0006-8993(02)03355-3
- Bakker, A., Krauss, G. L., Albert, M. S., Speck, C. L., Jones, L. R., Stark, C. E., et al. (2012). Reduction of hippocampal hyperactivity improves cognition in amnesic mild cognitive impairment. *Neuron*, 74, 467–474. doi: 10.1016/j.neuron.2012.03.023
- Berardi, N., Braschi, C., Capsoni, S., Cattaneo, A., and Maffei, L. (2007). Environmental enrichment delays the onset of memory deficits and reduces neuropathological hallmarks in a mouse model of Alzheimer-like neurodegeneration. *J. Alzheimers. Dis.* 11, 359–370.
- Bezzina, C., Verret, L., Juan, C., Remaud, J., Halley, H., Rampon, C., et al. (2015). Early onset of hypersynchronous network activity and expression of a marker of chronic seizures in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *PLoS One*. 10:e0119910. doi: 10.1371/journal.pone.0119910
- Born, H. A., Kim, J. Y., Savjani, R. R., Das, P., Dabaghian, Y. A., Guo, Q., et al. (2014). Genetic Suppression of Transgenic APP Rescues Hypersynchronous Network Activity in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *J. Neurosci.* 34, 3826–3840. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5171-13.2014
- Costa, D. A., Cracchiolo, J. R., Bachstetter, A. D., Hughes, T. F., Bales, K. R., Paul, S. M., et al. (2007). Enrichment improves cognition in AD mice by amyloid-related and unrelated mechanisms. *Neurobiol. Aging*, 28, 831–844. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2006.04.009
- Cracchiolo, J. R., Mori, T., Nazian, S. J., Tan, J., Potter, H., and Arendash, G. W. (2007). Enhanced cognitive activity--over and above social or physical activity--is required to protect Alzheimer's mice against cognitive impairment, reduce A β deposition and increase synaptic immunoreactivity. *Neurobiol. Learn. Mem.* 88, 277–294. doi: 10.1016/j.nlm.2007.07.007
- D'Amelio, M., Cavallucci, V., Middei, S., Marchetti, C., Pacioni, S., Ferri, A., et al. (2011). Caspase-3 triggers early synaptic dysfunction in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nat. Neurosci.* 14, 69–76. doi: 10.1038/nn.2709
- Dong, S., Li, C., Wu, P., Tsien, J. Z., and Hu, Y. (2007). Environment enrichment rescues the neurodegenerative phenotypes in presenilins-deficient mice. *Eur. J. Neurosci.* 26, 101–112. doi: 10.1111/j.1460-9568.2007.05641.x
- Duffy, A. M., Morales-Corraliza, J., Bermudez-Hernandez, K. M., Schaner, M. J., Magagna-Poveda, A., Mathews, P. M., et al. (2015). Entorhinal cortical defects in Tg2576 mice are present as early as 2–4 months of age. *Neurobiol. Aging*, 36, 134–148. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2014.07.001
- Fares, R. P., Belmeguenai, A., Sanchez, P. E., Kouchi, H. Y., Bodenec, J., Morales, A., et al. (2013). Standardized environmental enrichment supports enhanced brain plasticity in healthy rats and prevents cognitive impairment in epileptic rats. *PLoS One*. 8:e53888. doi: 10.1371/journal.pone.0053888
- Frick, K. M., and Fernandez, S. M. (2003). Enrichment enhances spatial memory and increases synaptophysin levels in aged female mice. *Neurobiol. Aging*, 24, 615–626. doi: 10.1016/s0197-4580(02)00138-0
- Gerenu, G., Dobarro, M., Ramirez, M. J., and Gil-Bea, F. J. (2013). Early cognitive stimulation compensates for memory and pathological changes in Tg2576 mice. *Biochim. Biophys. Acta.* 1832, 837–847. doi: 10.1016/j.bbdis.2013.02.018
- Hsiao, K., Chapman, P., Nilsen, S., Eckman, C., Harigaya, Y., Younkin, S., et al. (1996). Correlative memory deficits, A β elevation and amyloid plaques in transgenic mice. *Science*, 274, 99–102. doi: 10.1126/science.274.5284.99
- Hsiao, K. K., Borchelt, D. R., Olson, K., Johannsdottir, R., Kitt, C., Yunis, W., et al. (1995). Age-related CNS disorder and early death in transgenic FVB/N mice overexpressing Alzheimer amyloid precursor proteins. *Neuron*, 15, 1203–1218. doi: 10.1016/0896-6273(95)90107-8
- Ittner, A. A., Gladbach, A., Bertz, J., Suh, L. S., and Ittner, L. M. (2014). p38 MAP kinase-mediated NMDA receptor-dependent suppression of hippocampal hypersynchronicity in a mouse model of Alzheimer's disease. *Acta. Neuropathol. Commun.* 2:149. doi: 10.1186/s40478-014-0149-z
- Jacobsen, J. S., Wu, C. C., Redwine, J. M., Comery, T. A., Arias, R., Bowlby, M., et al. (2006). Early-onset behavioral and synaptic deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 103, 5161–5166. doi: 10.1073/pnas.0600948103
- Jankowsky, J. L., Melnikova, T., Fadale, D. J., Xu, G. M., Slunt, H. H., Gonzales, V., et al. (2005). Environmental enrichment mitigates cognitive deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* 25, 5217–5224. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5080-04.2005
- Kawarabayashi, T., Younkin, L. H., Saido, T. C., Shoji, M., Ashe, K. H., and Younkin, S. G. (2001). Age-dependent changes in brain, CSF and plasma amyloid (beta) protein in the Tg2576 transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* 21, 372–381.
- Korbey, S. M., Heinrichs, S. C., and Leussis, M. P. (2008). Seizure susceptibility and locus ceruleus activation are reduced following environmental enrichment in an animal model of epilepsy. *Epilepsy Behav.* 12, 30–38. doi: 10.1016/j.yebeh.2007.09.013
- Manno, I., Macchi, F., Caleo, M., and Bozzi, Y. (2011). Environmental enrichment reduces spontaneous seizures in the Q54 transgenic mouse model of temporal lobe epilepsy. *Epilepsia*, 52, e113–e117. doi: 10.1111/j.1528-1167.2011.03166.x
- Minkeviciene, R., Rheims, S., Dobszay, M. B., Zilberter, M., Hartikainen, J., Fulop, L., et al. (2009). Amyloid beta-induced neuronal hyperexcitability triggers progressive epilepsy. *J. Neurosci.* 29, 3453–3462. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5215-08.2009
- Morelli, E., Ghiglieri, V., Pendolino, V., Bagetta, V., Pignataro, A., Fejtova, A., et al. (2014). Environmental enrichment restores CA1 hippocampal LTP and reduces severity of seizures in epileptic mice. *Exp. Neurol.* 261, 320–327. doi: 10.1016/j.expneurol.2014.05.010
- Nithianantharajah, J., and Hannan, A. J. (2006). Enriched environments, experience-dependent plasticity and disorders of the nervous system. *Nat. Rev. Neurosci.* 7, 697–709. doi: 10.1038/nrn1970
- Palop, J. J., Chin, J., Roberson, E. D., Wang, J., Thwin, M. T., Bien-Ly, N., et al. (2007). Aberrant excitatory neuronal activity and compensatory remodeling of inhibitory hippocampal circuits in mouse models of Alzheimer's disease. *Neuron*, 55, 697–711. doi: 10.1016/j.neuron.2007.07.025
- Rampon, C., Tang, Y. P., Goodhouse, J., Shimizu, E., Kyin, M., and Tsien, J. Z. (2000). Enrichment induces structural changes and recovery from nonspatial memory deficits in CA1 NMDAR1-knockout mice. *Nat. Neurosci.* 3, 238–244. doi: 10.1038/72945
- Rutten, A., Van Albada, M., Silveira, D. C., Cha, B. H., Liu, X., Hu, Y. N., et al. (2002). Memory impairment following status epilepticus in immature rats: time-course and environmental effects. *Eur. J. Neurosci.* 16, 501–513. doi: 10.1046/j.1460-9568.2002.02103.x
- Sanchez, P. E., Zhu, L., Verret, L., Vossel, K. A., Orr, A. G., Cirrito, J. R., et al. (2012). Levetiracetam suppresses neuronal network dysfunction and reverses synaptic and cognitive deficits in an Alzheimer's disease model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 109, E2895–E2903. doi: 10.1073/pnas.1121081109
- Scarmeas, N., Levy, G., Tang, M. X., Manly, J., and Stern, Y. (2001). Influence of leisure activity on the incidence of Alzheimer's disease. *Neurology*, 57, 2236–2242. doi: 10.1212/wnl.57.12.2236

Acknowledgments

We thank A. Krezymon, C. Juan and E. DiDonato for their help and technical support. We also thank the ABC facility and ANEXPLO Toulouse for housing mice.

- Schridde, U., and Van Luijtelea, G. (2004). The influence of strain and housing on two types of spike-wave discharges in rats. *Genes. Brain. Behav.* 3, 1–7. doi: 10.1111/j.1601-1848.2004.00034.x
- Stern, Y., Gurland, B., Tatemichi, T. K., Tang, M. X., Wilder, D., and Mayeux, R. (1994). Influence of education and occupation on the incidence of Alzheimer's disease. *JAMA.* 271, 1004–1010. doi: 10.1001/jama.1994.03510370056032
- Sztainberg, Y., and Chen, A. (2010). An environmental enrichment model for mice. *Nat. Protoc.* 5, 1535–1539. doi: 10.1038/nprot.2010.114
- Tang, Y. P., Wang, H., Feng, R., Kyin, M., and Tsien, J. Z. (2001). Differential effects of enrichment on learning and memory function in NR2B transgenic mice. *Neuropharmacology.* 41, 779–790. doi: 10.1016/s0028-3908(01)00122-8
- Verret, L., Krezymon, A., Halley, H., Trouche, S., Zerwas, M., Lazouret, M., et al. (2013). Transient enriched housing before amyloidosis onset sustains cognitive improvement in Tg2576 mice. *Neurobiol. Aging.* 34, 211–225. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2012.05.013
- Vossel, K. A., Beagle, A. J., Rabinovici, G. D., Shu, H., Lee, S. E., Naasan, G., et al. (2013). Seizures and epileptiform activity in the early stages of Alzheimer disease. *JAMA. Neurol.* 70, 1158–1166. doi: 10.1001/jamaneurol.2013.136
- Wu, X., Gangisetty, O., Carver, C. M., and Reddy, D. S. (2013). Estrous cycle regulation of extrasynaptic delta-containing GABA(A) receptor-mediated tonic inhibition and limbic epileptogenesis. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 346, 146–160. doi: 10.1124/jpet.113.203653
- Young, D., Lawlor, P. A., Leone, P., Dragunow, M., and During, M. J. (1999). Environmental enrichment inhibits spontaneous apoptosis, prevents seizures and is neuroprotective. *Nat. Med.* 5, 448–453. doi: 10.1038/7449

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2015 Bezzina, Verret, Halley, Dahan and Rampon. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution and reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

II.3) Résultats complémentaires

Afin de caractériser les effets de l'enrichissement environnemental sur l'occurrence des crises d'épilepsie chez les souris Tg2576, nous avons recherché si l'EE avait un effet sur l'expression ectopique du NPY dans les fibres moussues, un marqueur de crises d'épilepsie chronique, chez les souris NTg et Tg2576.

Nous avons recherché l'expression ectopique du NPY chez les souris femelles NTg et Tg2576 âgées de 6 mois, hébergées en conditions standards (SH) depuis la naissance ou transitoirement placées en milieu enrichi (EE) entre 3 et 5,5 mois (*NTg EE*: n= 35, *Tg2576 EE*: n= 38, *NTg SH*: n=34, *Tg2576 SH*: n= 34). Les méthodes d'immunohistochimie et d'analyse des résultats sont identiques à celles utilisées dans l'article Bezzina et al 2015, présenté dans le Chapitre I et détaillées dans la partie Méthodes de cette thèse. Elles ne seront donc pas ré-exposées ici. Notons que 20 souris sur 141 ont été exclues de l'analyse finale (*NTg EE*: n=4, *Tg2576 EE*: n=6, *NTg SH*: n=4, *Tg2576 SH*: n=6) pour les raisons suivantes : 8 souris sont mortes avant la fin des expériences (*NTg EE*: n=2, *Tg2576 EE*: n=5, *Tg2576 SH*: n=1) et 12 souris avaient un tissu cérébral de mauvaise qualité ne permettant pas l'immunohistochimie (*NTg EE*: n=2, *Tg2576 EE*: n=1, *NTg SH*: n=4, *Tg2576 SH*: n=5). La proportion d'animaux exprimant le NPY dans les fibres moussues a été comparée entre les souris hébergées en conditions standards ou enrichies, au sein de chaque groupe génotypique, en utilisant un test de Chi 2 (données catégorielles). Chez les souris NTg, une proportion non négligeable de souris exprime le NPY dans les fibres moussues (voir Tableau 3). Cette proportion n'est pas significativement différente entre les souris EE et SH (voir Tableau 3). Chez les souris Tg2576, la proportion de souris exprimant le NPY dans les fibres moussues est supérieure à celle des souris NTg, mais cette proportion n'est pas significativement différente entre les deux génotypes (NTg vs Tg2576 : SH : p=0,43 ; EE : p=0,68) (voir Tableau 3). De plus, comme chez les souris NTg, la proportion de souris présentant un marquage NPY dans les fibres moussues ne diffère pas en fonction des conditions d'hébergement (voir Tableau 3).

Génotype	SH	EE	Test de χ^2 (SH vs EE)
NTg	5/30 (16,6 %)	4/31 (12,9 %)	0,9820
Tg2576	10/28 (35,7 %)	8/32 (25 %)	0,8456

Tableau 3 : Proportion de souris Tg2576 and NTg exprimant le NPY dans les fibres moussues dans les groupes standard (SH) et enrichi (EE). Les données représentent le nombre d'animaux exprimant le NPY dans les fibres moussues comparé au nombre total d'individus dans chaque groupe.

Discussion

Dans ce travail, nous montrons que l'enrichissement environnemental ne semble pas avoir d'effet sur l'incidence de ce marqueur de crises d'épilepsie chroniques chez les souris NTg et Tg2576 et qu'une sous-population des souris femelles NTg exprime le NPY dans les fibres moussues.

La présence de NPY dans les fibres moussues d'une sous-population de souris NTg, indépendamment des conditions d'hébergement, suggère l'occurrence de crises d'épilepsie chez les souris NTg, qui sont supposées saines. Ce résultat est donc surprenant et une telle expression n'a jamais été observée chez les souris NTg mâles (Résultats-Chapitre I) (femelles: 4/31 vs mâles: 0/18, test de Fisher exact : $p < 0,0001$). La présence de NPY ectopique chez les souris NTg femelles n'est pas un artéfact d'immunohistochimie, il est donc tentant de penser que ce marquage reflète bien l'occurrence de crises. Quelles sont les explications envisageables ? On sait que la quantité de NPY dans les fibres moussues augmente entre 6 et 24h après une injection unique de PTZ ayant donné lieu à des crises tonico-cloniques chez le rat (score 5 de l'échelle utilisée dans les articles du chapitre I et II) [281]. Même s'il s'agit d'une autre espèce et qu'il est donc difficile de comparer les doses, les souris NTg de notre étude n'ont pas présenté de crises d'épilepsie plus graves que des crises tonico-cloniques. Il semble donc peu probable que l'injection de PTZ ait entraîné une expression de NPY dans les fibres moussues chez les souris NTg femelles, car cette injection avait lieu 20 min avant le sacrifice de l'animal. De plus, dans l'étude de Verret qui a mesuré l'intensité de marquage immunohistochimique du NPY dans les fibres moussues des souris NTg et Tg2576 femelles de 13 mois [180], 1 souris NTg sur 20 (5%), toutes conditions d'hébergement confondues, a présenté une intensité de marquage NPY dépassant la moyenne plus 2 fois l'erreur-type. Après vérification au microscope, cet animal présentait en effet une expression ectopique de NPY. L'étude de Verret et al. plaide donc en faveur de l'existence d'une mince proportion de souris NTg femelles exprimant le NPY de façon ectopique. Ainsi, ceci suggère que les souris femelles de fond génétique C57B6/SJL auraient une susceptibilité accrue aux crises d'épilepsie. La littérature sur les souris de fond génétique C57B6/SJL ne mentionne pas la présence de crises

d'épilepsie spontanées [176]. L'influence du genre sur cette susceptibilité épileptique pourrait avoir une explication hormonale. En effet, 40 % des femmes épileptiques présentent une exacerbation cyclique de leurs crises d'épilepsie, appelée épilepsie cataméniale [282]. Scharfman a observé, chez la ratte, des variations en fonction du cycle ovarien de l'expression protéique du BDNF et du NPY dans l'hippocampe [133]. Ces protéines sont respectivement impliquées dans l'augmentation et la diminution de l'excitabilité hippocampique [150 , 283]. De telles variations pourraient expliquer la susceptibilité accrue aux crises d'épilepsie des femelles pendant les phases du cycle où l'expression de BDNF est haute et celle de NPY basse [133].

Chez les souris Tg2576 femelles hébergées en conditions standards, la proportion de souris exprimant le NPY dans les fibres moussues est supérieure à celle des souris NTg, bien que la différence ne soit pas significative (Tg2576 SH: 37 % vs NTg SH : 16,6% souris NPY positives). Ces résultats sont en accord avec l'étude de Verret et al. (2012) montrant une expression du NPY dans les fibres moussues chez 40 % des souris Tg2576 femelles de 13 mois hébergées en conditions standards (4/10) [180]. De plus, cette proportion est similaire à celle observée chez les mâles Tg2576 (Résultats- Chapitre I) (femelles: 10/28 (37%) vs mâles: 4/12 (33%), test de Fisher exact NS, $p=0,34$).

L'enrichissement environnemental n'influence pas l'expression du NPY dans les fibres moussues chez les souris Tg2576. Nos données peuvent être mises en parallèle avec celles de Verret qui a étudié l'expression du NPY dans les fibres moussues des souris Tg2576 âgées de 13 mois une à deux semaines après la sortie d'EE, en utilisant un protocole d'EE identique à celui de notre étude [180]. En contradiction avec nos résultats, aucune de ces souris enrichies n'a présenté d'expression ectopique du NPY alors que c'était le cas de souris de 13 mois hébergées en conditions standards. Cependant, on ne peut pas exclure que l'âge des souris au moment de l'enrichissement influence l'effet de l'EE sur l'expression du NPY. Etant donné la grande variabilité interindividuelle de l'expression ectopique du NPY chez les souris Tg2576, il est possible qu'aucune expression du NPY dans les fibres moussues n'ait été observée dans l'étude de Verret et al, (2012) du fait de la taille de l'échantillon utilisé (6 souris Tg2576 vs environ 30 dans notre étude). L'enrichissement environnemental entraîne une augmentation des taux extracellulaires de BDNF [252], fortement exprimé dans les cellules granulaires du gyrus denté [284]. Le BDNF augmentant les concentrations extracellulaires de NPY [283 , 285 , 286], il est possible que l'élévation des taux de BDNF induite par l'EE favorise l'expression du NPY dans les fibres moussues. Ceci expliquerait au moins le fait que l'enrichissement ne supprime pas l'expression du NPY dans les fibres moussues.

D'autre part, ces résultats confirment l'absence d'effet de l'enrichissement sur les autres signes d'hypersynchronie neuronale décrits dans le Chapitre II.1, c'est-à-dire la susceptibilité aux crises

d'épilepsie induites par le PTZ et la fréquence des pointes interictales sur l'EEG. L'effet bénéfique de cette période d'EE sur les performances mnésiques des souris Tg2576 âgées de 13 mois n'est donc certainement pas attribuable à un effet de l'EE sur l'hypersynchronie neuronale.

DISCUSSION GENERALE

DISCUSSION GENERALE

Depuis la moitié du XX^e siècle, les études épidémiologiques menées sur les patients atteints de la maladie d'Alzheimer ont mis en évidence l'apparition d'un symptôme peu fréquent : les crises d'épilepsie. Dans les formes sporadiques de la MA, la prévalence des crises d'épilepsie varie beaucoup d'une étude à l'autre mais semblerait représenter moins de 5 % des cas [157]. En revanche, dans les formes familiales de la MA, les crises d'épilepsie peuvent toucher 30 à 60 % des patients, suggérant donc un lien fort entre la physiopathologie de la MA et la survenue des crises [165 , 166 , 167]. Ces crises étant rares et parfois difficiles à diagnostiquer, les études épidémiologiques ont peiné à déterminer leur prévalence réelle chez les patients atteints de la MA et à identifier les facteurs de risque de leur survenue [169]. Finalement, les crises d'épilepsie dans la MA n'ont suscité que peu d'intérêt dans la communauté scientifique car elles étaient considérées comme un symptôme aspécifique, conséquence de nombreuses affections cérébrales, en particulier neurodégénératives. Puis dans les années 2000, des crises d'épilepsie et des pointes interictales ont été mises en évidence dans de nombreux modèles murins de la MA surexprimant des formes mutées d'APP et des travaux essentiels menés par l'équipe de Palop et Mucke ont tenté de comprendre l'origine des activités neuronales aberrantes observées dans ces modèles [75 , 172, 180]. Palop et son équipe ont proposé que les modifications protéiques hippocampiques induites par ces hyperactivités neuronales puissent altérer le fonctionnement de cette structure et perturber les processus mnésiques qui s'y déroulent. Cependant, l'hypothèse d'un lien entre l'hypersynchronie neuronale et/ou les remodelages hippocampiques qu'elle induit et les troubles mnésiques dans la MA a réellement été posée par l'étude de Sanchez, montrant que l'administration du lévétiracétam, médicament antiépileptique, supprime l'hypersynchronie neuronale et les modifications protéiques de l'hippocampe qui en résultent, tout en améliorant les performances mnésiques des souris hAPPJ20. Ces études chez l'animal ont permis de relancer le débat en clinique quant à l'importance et au rôle de l'hypersynchronie neuronale dans la MA. Cependant, à l'heure actuelle, la contribution exacte de ces hyperactivités neuronales dans les dysfonctions mnésiques de la MA reste une question ouverte.

Ce travail de thèse avait pour but de rechercher les signes d'une hypersynchronie neuronale dans le modèle Tg2576 de la MA, pour lequel il n'existait aucune donnée sur un tel phénotype au début de ma thèse. Largement décrit dans la littérature, ce modèle présente l'avantage de développer progressivement certaines atteintes neuroanatomiques et comportementales de la MA, modélisant davantage le caractère progressif des troubles tel qu'il est observé chez l'homme, que la plupart des modèles transgéniques. Ainsi, cette lignée nous a permis d'étudier l'hypersynchronie neuronale à des âges clé dans la progression des troubles mnésiques. Nous avons montré que les souris Tg2576

présentent une hypersynchronie neuronale dès l'âge de 1 mois ½, c'est-à-dire avant les premiers troubles mnésiques chez ces souris. Enfin, l'exposition à un enrichissement environnemental de 10 semaines débuté à l'âge de 3 mois, qui améliore durablement les performances mnésiques des souris Tg2576, n'affecte pas l'hypersynchronie neuronale chez les souris Tg2576.

I) L'hypersynchronie neuronale dans les modèles murins de la MA : mise en perspective du modèle Tg2576

L'intérêt de la communauté scientifique pour l'origine et le rôle de l'épilepsie dans la maladie d'Alzheimer a été relancé par la caractérisation de l'hypersynchronie neuronale dans les modèles murins de la MA. Quelles conclusions générales pouvons-nous tirer de l'étude de l'hypersynchronie neuronale dans les modèles murins de la MA ?

Les modèles murins de la MA « amyloïdogéniques » sont très variés. Ils diffèrent entre eux par la nature de la (ou des) protéine(s) mutée(s) (APP et/ou PS), la nature et le nombre des mutations de ces protéines, le promoteur contrôlant l'expression de la (ou des) protéine(s) mutée(s) et le fond génétique de la lignée transgénique. Au sein de cette diversité des modèles, le phénotype d'hypersynchronie neuronale révèle des similitudes et des différences.

Concernant les similitudes, toutes les lignées de souris testées ont révélé une susceptibilité accrue aux crises d'épilepsie induites et/ou des activités EEG interictales et de rares crises d'épilepsie, à l'âge le plus précoce auquel elles aient été testées [75 , 122, 171 , 172 , 174, 176, 177, 182]. De plus, une expression du NPY dans les fibres moussues et une diminution de l'expression de la calbindine dans les cellules granulaires du gyrus denté ont été observées dans le modèle Tg2576 [58 , 183 , 185], APP_{swe}xPS1_{dE9} [122] et hAPPJ20 [172 , 184]. Enfin, le développement de fibres moussues collatérales a été rapporté dans ces mêmes lignées de souris [122 , 172, 176]. Tous ces modèles possèdent au moins une mutation de l'APP, quel que soit le promoteur, ce qui semble souligner l'importance de la mutation de l'APP dans l'apparition de l'hypersynchronie neuronale.

Les différences phénotypiques entre les modèles de la MA sont initialement des différences de cinétique de l'amyloïdopathie et des altérations anatomiques qu'elle induit, comme la dysfonction synaptique. Ces différences résultent des différences de transgènes, de la présence d'une préséniline mutée ou non et des différences de promoteurs. Par exemple, alors que les souris APP_{swe}xPS1_{dE9} présentent leurs premières plaques amyloïdes à l'âge de 4 mois [86], les souris Tg2576 n'en montrent

qu'à partir de l'âge de 9 mois [104]. Concernant l'hypersynchronie neuronale, il est difficile de comparer la fréquence des crises d'épilepsie entre les modèles car ce sont des événements rares et la période sur laquelle les crises sont recensées est très variable d'un modèle à l'autre. En revanche, la fréquence des pointes interictales est plus comparable et il semble que les pointes interictales surviennent moins fréquemment chez les souris Tg2576 (femelles : 0,4 pointe/ min sur 24 h) que chez les souris hAPPJ20 (1,5 pointes/min sur 1 heure) [180]. En revanche, l'expression du NPY dans les fibres muqueuses, présente chez 30 à 40% des animaux, semble aussi fréquente dans ces deux modèles [172].

D'autre part, il existe des différences mécanistiques relatives à l'origine de l'hypersynchronie neuronale dans ces modèles. L'excitabilité intrinsèque des cellules pyramidales du cortex, mesurée notamment par le potentiel membranaire de repos, est normale chez les souris hAPPJ20 à l'âge de 4-7 mois [180] alors qu'elle est augmentée chez les souris APP_{swe}XPS1_{dE9} à l'âge de 4 mois [122]. Par contre, une dysfonction des interneurons corticaux est observée chez les souris hAPPJ20 à l'âge de 4-7 mois [180] alors qu'elle est mise en évidence dans l'hippocampe beaucoup plus tard, à l'âge de 12-16 mois, chez les souris APP_{swe}XPS1_{dE9} [205]. Au vu de ces données, on pourrait penser que l'hypersynchronie neuronale pourrait être associée à la dysfonction interneuronale dans certains modèles (type hAPPJ20) ou à l'hyperexcitabilité des neurones excitateurs dans d'autres (type APP_{swe}XPS1_{dE9}). Cependant, comme la plupart des études n'ont pas recherché les altérations à la fois des neurones excitateurs et inhibiteurs, cela ne nous permet pas de conclure sur l'origine réelle (excitatrice ou inhibitrice) des activités neuronales aberrantes observées chez les modèles murins. Il est donc également possible que l'hyperexcitabilité des neurones excitateurs et la dysfonction des interneurons surviennent dans tous ces modèles murins mais en suivant une cinétique différente.

D'autre part, il existe des modifications protéiques différentes entre les modèles murins de la MA. Les canaux Nav1.1 sont exprimés essentiellement sur les interneurons à parvalbumine dont ils régulent la propagation des potentiels d'action. Leur déficit au niveau du cortex pariétal des souris hAPPJ20 participerait à l'apparition des pointes interictales [180]. Le riluzole, agent bloqueur des canaux sodiques qui augmente la fréquence des pointes interictales chez les souris hAPPJ20, l'augmente également chez les souris APP23 de 4 mois, laissant sous-entendre la présence d'un déficit en canaux sodiques dans ce modèle. En revanche, les souris Tg2576 et APP_{swe}XPS1_{dE9} ne présentent aucune diminution globale de la quantité de ces canaux au niveau du cortex [181, 183], à un âge où ces souris présentent des pointes interictales, si ce n'est une diminution de leur quantité au niveau de la membrane cytoplasmique chez les souris Tg2576 [183]. L'altération de la quantité des canaux Nav1.1 est donc très variable d'un modèle murin à l'autre.

Afin de mieux comprendre les altérations cellulaires à l'origine de l'hypersynchronie neuronale dans les modèles murins de la MA, il faudrait donc dans les différents modèles mesurer l'excitabilité intrinsèque (potentiel membranaire de repos, par exemple) et les courants synaptiques (potentiels excitateurs et inhibiteurs post-synaptiques) des neurones excitateurs et inhibiteurs au niveau du cortex et de l'hippocampe, à un même âge, ainsi qu'à des âges différents dans chaque lignée. Ces mesures seraient faites en parallèle des enregistrements EEG corticaux et hippocampiques pour la détection des pointes interictales, afin de mettre en regard l'expression de l'hypersynchronie neuronale (pointes) et les altérations cellulaires qui pourraient en être la cause.

D'autre part, les structures anatomiques et les réseaux neuronaux à l'origine des crises d'épilepsie ou des pointes interictales demeurent inconnus. Il serait important de déterminer ce(s) « foyers » hyperexcitables notamment par la réalisation d'enregistrement EEG multi-électrodes réparties au niveau de différents cortex et implantées en intra-crânial dans l'hippocampe et dans des structures clé, foyers épileptogéniques retrouvés dans les différents types d'épilepsie chez l'homme, comme le thalamus (épilepsie d'absence) [287]. Une fois la structure « hyperexcitable » identifiée, nous pourrions enregistrer localement les pointes interictales en enregistrant en parallèle l'activité unitaire des interneurons et des cellules excitatrices pour déterminer quel type neuronal est activé en premier au moment où une pointe émerge.

En conclusion, tous les modèles murins de la MA testés jusqu'à présent montrent tous une susceptibilité aux crises d'épilepsie induites. La majorité des souris transgéniques présentent des pointes sur les enregistrements EEG, alors que les crises d'épilepsie restent rares et difficiles à détecter comportementalement, mais aussi par EEG. De plus, des altérations cellulaires de l'hippocampe attestant de la présence de crises d'épilepsie sont observées dans tous les modèles testés. Quant aux mécanismes de l'hypersynchronie neuronale, s'ils peuvent sembler différents en apparence, d'autres travaux sont nécessaires pour explorer les modifications de l'inhibition et de l'excitation neuronale dans chacun des modèles murins de la MA afin de déterminer si les altérations sont distinctes ou si leur déroulement temporel est différent entre les modèles. Enfin, la détermination des structures anatomiques et de la nature précise des neurones impliqués dans la genèse des pointes et des crises est essentielle pour comprendre la physiopathologie de l'hypersynchronie neuronale dans ces modèles de la MA.

II) Que nous apprend le modèle Tg2576 sur le rôle de l'hypersynchronie neuronale dans les troubles mnésiques ?

Jusqu'à présent, les études qui ont tenté d'établir un lien entre les troubles mnésiques et l'hypersynchronie neuronale chez les souris modèles de la MA, n'ont pas donné de preuve irréfutable d'un lien causal. Dans le modèle hAPPJ20, l'administration du lévétiracétam, médicament antiépileptique, a supprimé les pointes interictales et l'expression du NPY dans les fibres moussues et amélioré les performances mnésiques de ces souris [184]. Dans cette étude, l'effet du lévétiracétam sur les performances mnésiques des souris hAPPJ20 peut être dû à la réduction de l'hypersynchronie neuronale et/ou des remodelages cellulaires qui y sont associés mais aussi à d'autres effets bénéfiques sur la fonction cérébrale. En effet, chez les souris APP_{Swe}xPS1_{dE9}, l'amélioration des performances mnésiques par le lévétiracétam est associée à l'induction de modifications épigénétiques au niveau de gènes importants pour l'apprentissage et la mémoire [288, 289]. Afin de déterminer si l'effet du lévétiracétam sur la mémoire ne dépend que de son effet antiépileptique, il faudrait comparer l'effet du lévétiracétam sur les performances mnésiques des souris d'une lignée modèle de la MA présentant une hypersynchronie neuronale (pointes et crises) et d'une lignée modèle de la MA qui n'en présente pas : par exemple la lignée APP_{Swe/Lon}/PS1_{M146V} double knock-in qui, selon Born et al., présente des troubles mnésiques très précoces à l'âge de 2-3 mois et pas d'anomalies EEG épileptiformes à l'âge de 22-24 mois [174].

Dans quelle mesure les crises d'épilepsie, les pointes interictales ou l'expression du NPY dans les fibres moussues pourraient-elles participer aux troubles mnésiques chez les souris Tg2576 ?

Les pointes interictales débutent dès l'âge de 1 mois ½, avant l'apparition des troubles mnésiques à 3 mois, et leur fréquence n'augmente pas avec l'âge (entre 1 et 6 mois). Si elles avaient eu un effet direct sur les processus mnésiques, des troubles mnésiques auraient dû apparaître dès l'âge de 1 mois ½, ce qui n'a pas été rapporté. On peut également exclure qu'une augmentation de la fréquence des pointes ait pu provoquer *in fine* des déficits mnésiques. Donc, ces données ne semblent pas plaider en faveur d'un rôle direct des pointes interictales dans la dysfonction mnésique des souris Tg2576.

D'autre part, les crises d'épilepsie sont rares chez les souris Tg2576, ce qui rend peu probable leur contribution directe aux déficits mnésiques. En revanche, les modifications protéiques qu'elles induisent de façon durable dans l'hippocampe sont des candidats plus sérieux. En effet, le traitement chronique mais pas aigu par lévétiracétam améliore les performances mnésiques chez les souris modèles de la MA [184, 290], laissant supposer que ce n'est pas l'absence d'hypersynchronie neuronale au moment du test mnésique qui permet d'assurer de bonnes performances mais l'absence

des modifications protéiques induites par l'hypersynchronie neuronale chronique. Nous avons remarqué que 30 à 40 % des souris Tg2576 de 6 mois présentent une expression du NPY dans les fibres moussues. Cette expression ectopique du NPY va limiter la libération du glutamate [150], ce qui diminue la transmission synaptique normale au niveau des synapses moussues. Des expériences de surexpression du NPY par vecteur viral, dans la région CA1, montre que chez les rats non épileptiques, cette expression altère la potentialisation à long-terme des cellules pyramidales de CA1 [291]. Donc, il est possible que l'expression du NPY dans les fibres moussues chez les souris Tg2576 altère la potentialisation à long-terme au niveau des synapses moussues et perturbe la mémorisation à long-terme dont elle serait l'un des substrats. De plus, la proportion de souris Tg2576 exprimant le NPY dans les fibres moussues semble augmenter avec l'âge, de pair avec la probabilité d'observer des troubles mnésiques dans cette lignée. Il serait intéressant de tirer parti de la variabilité inter-individuelle de l'expression du NPY dans les fibres moussues chez les souris Tg2576 pour déterminer si cette expression est corrélée avec le niveau de performances mnésiques. Si cette corrélation existait, il faudrait comparer les performances mnésiques de souris Tg2576 normales ou présentant un KO du gène du NPY dans les cellules granulaires pour démontrer que l'expression du NPY dans les axones de ces cellules granulaires participe au trouble mnésique. Il est également probable que d'autres modifications protéiques induites par les crises d'épilepsie jouent un rôle dans la dysfonction mnésique, comme la diminution de l'expression de la calbindine dans les cellules granulaires du gyrus denté. Cette diminution a été observée chez les souris Tg2576 [58] et a été corrélée avec les troubles mnésiques chez les souris hAPPJ20 [186].

D'une manière générale, le lien causal entre l'hypersynchronie neuronale et les troubles mnésiques dans la MA reste difficile à établir, d'autant plus en l'absence d'une connaissance précise de la cause de l'hypersynchronie neuronale dans la MA qui pourrait très bien contribuer aux troubles mnésiques, indépendamment de l'hypersynchronie neuronale elle-même. Mon travail de thèse permet de suggérer que si l'hypersynchronie neuronale jouait un rôle dans l'apparition des troubles mnésiques dans le modèle Tg2576, ce serait plus probablement via les modifications durables de l'expression du NPY dans les fibres moussues, qui pourraient avoir des conséquences à long-terme sur la fonction mnésique, que par l'action directe des pointes interictales ou des crises d'épilepsie sur les processus mnésiques.

III) L'effet de l'enrichissement environnemental sur l'hypersynchronie neuronale des souris Tg2576

Notre équipe a montré qu'un enrichissement environnemental débuté à 3 mois et durant 10 semaines (EE précoce) améliore les performances mnésiques des souris Tg2576 de 13 mois, dans les tests de la piscine de Morris et de la reconnaissance d'objet [185]. Un lien causal entre l'hypersynchronie neuronale et les troubles mnésiques dans les modèles murins de la MA étant possible, nous avons voulu déterminer si l'effet bénéfique de l'EE sur les performances mnésiques pouvait être associé à une réduction de l'hypersynchronie neuronale dans ce modèle.

Nous avons montré que l'EE n'affecte pas la fréquence des pointes interictales mais cela ne veut pas dire que l'EE n'a pas eu d'effet sur les crises d'épilepsie. En effet, des études montrent que la survenue de pointes interictales pourrait être associée avec une diminution de la survenue des crises d'épilepsie [292, 293]. De plus, nous n'avons pas mis en évidence d'effet de l'EE sur l'expression du NPY dans les fibres moussues mais cet effet a été mesuré deux semaines après la sortie de l'EE. On ne peut pas exclure que si l'EE avait eu un effet aigu sur la survenue des crises d'épilepsie, l'expression du NPY aurait disparu dans les fibres moussues pendant l'EE puis serait réapparue avec la réapparition des crises dans les deux semaines suivant la fin de la période d'enrichissement. Il existe donc une mince possibilité que l'EE ait eu un effet aigu sur la survenue des crises d'épilepsie mais que nous n'ayons pu le mettre en évidence. Afin de confirmer l'effet de l'EE sur la survenue des crises pendant l'EE, il aurait fallu réaliser l'immunohistochimie du NPY immédiatement après l'EE ou faire des enregistrements EEG de plusieurs semaines avant la période d'enrichissement et pendant qu'elles évoluent dans l'environnement enrichi par EEG télémétrique (sans fil), assez prolongés pour mettre en évidence un nombre suffisant de crises d'épilepsie.

Nous avons montré que l'enrichissement environnemental réalisé entre 3 et 5,5 mois n'a pas d'effet durable sur l'hypersynchronie neuronale des souris Tg2576, effet mesuré deux semaines après la fin de la période d'enrichissement. Ce résultat est confirmé par la persistance de l'expression ectopique du NPY à l'âge de 13 mois chez les souris Tg2576 soumises à ce même enrichissement [185]. Ce résultat implique tout d'abord que l'amélioration mnésique des souris Tg2576 de 13 mois enrichies précocement provient d'autres effets de l'EE. De nombreuses études ont montré que l'EE favorise le développement dendritique et synaptique, l'expression de protéines impliquées dans la plasticité synaptique telle que la PSD95 ou Arc, mais aussi stimule la neurogenèse hippocampique adulte et augmente le taux extracellulaire des neurotrophines dans différents modèles murins de la MA [242, 258]. Or, toutes ces modifications induites par l'EE peuvent favoriser l'établissement de mémoires à long-terme. Par exemple, l'administration d'un antimitotique pendant l'enrichissement de rats

sauvages diminue la neurogenèse adulte dans l'hippocampe et prévient la formation d'une mémoire à long-terme, normalement associée à une augmentation de la neurogenèse chez ces rats [244]. Or, Jeong et al. ont montré qu'un EE réalisé entre 3 et 6 mois chez des souris Tg2576 augmente la neurogenèse chez ces souris à l'âge de 6 mois [294]. De plus, Gerenu et al. rapportent que les stimulations cognitives précoces, effectuées à la même période que dans notre étude, empêchent la diminution des protéines Arc et PSD95 chez les souris Tg2576 de 15 mois [218]. Il est donc possible que notre protocole d'enrichissement ait stimulé la neurogenèse hippocampique ou la plasticité synaptique, contribuant ainsi au maintien de performances mnésiques normales chez les souris Tg2576, malgré la persistance des dysfonctionnements cérébraux chez ces souris comme l'hypersynchronie neuronale. Il existe donc un décalage entre le niveau d'atteinte cérébrale et l'expression clinique de ses effets sur les fonctions cognitives, ainsi dans notre étude, il nous est impossible de conclure sur une absence de lien causal entre l'hypersynchronie neuronale et les troubles mnésiques chez les souris Tg2576.

En conclusion, l'étude de l'effet de l'enrichissement sur l'hypersynchronie neuronale des souris Tg2576 ne nous permet en aucun cas de conclure sur l'absence de lien entre l'hypersynchronie neuronale et les troubles mnésiques dans ce modèle de la MA. Cette étude confirme que l'EE peut aider à maintenir les performances mnésiques des souris Tg2576 sans agir sur les atteintes cérébrales qui pourraient les perturber, tels que l'hypersynchronie neuronale, ce qui est en accord avec la notion de réserve cognitive.

IV) Que nous apprennent ces modèles murins sur l'hypersynchronie neuronale dans la MA chez l'homme ?

La pertinence d'étudier l'hypersynchronie neuronale chez le rongeur a été largement démontrée sur les modèles animaux d'épilepsie (rat ou souris) qui ont permis de mettre en évidence de nombreux mécanismes neurobiologiques de l'épileptogenèse et l'impact comportemental des crises d'épilepsie [295]. Donc la souris peut être un modèle approprié pour étudier l'hypersynchronie neuronale. Cela étant dit, la modélisation de la MA humaine chez la souris présente ses forces et ses faiblesses. Du point de vue de leur construction, basée sur la surexpression de formes mutées d'APP, ces lignées de souris modélisent davantage la cause des formes familiales que celles des formes sporadiques humaines, qui sont multifactorielles. D'un point de vue phénotypique, ces modèles murins reproduisent la majorité des altérations retrouvées chez les patients atteints de la MA : 1) comportementales, telles que les troubles mnésiques, l'hyperactivité locomotrice, la désinhibition comportementale ou la mortalité prématurée 2) anatomiques, comme les plaques amyloïdes,

l'hyperphosphorylation de tau ou les dégénérescences synaptiques [80 , 296]. Cependant, certaines altérations caractéristiques comme les dégénérescences neurofibrillaires ne sont pas observées dans ces modèles. Vis-à-vis des altérations comportementales et cellulaires, ces lignées de souris transgéniques présentent une grande variabilité inter-individuelle comme chez les patients atteints de la MA. En revanche, de nombreux traitements efficaces sur ces modèles murins de la MA n'ont pas eu l'efficacité escomptée chez le patient [66]. Donc, la modélisation de la MA chez la souris présentant ses limites, l'extrapolation à l'homme des données murines concernant l'hypersynchronie neuronale est donc à considérer avec précaution.

Concernant l'application des données murines aux formes humaines familiales de la MA, les crises d'épilepsie ont été observées dans une proportion similaire chez les patients atteints de forme génétique et chez les modèles murins de la MA (environ 30 à 60 %) [165 , 166 , 167]. En effet, 25 % des souris APP_{swe}XPS1_{dE9} enregistrées en EEG pendant 3 semaines ont présenté des crises d'épilepsie [122]. Environ 40 % des souris hAPPJ20 [172] et environ 30 % des souris Tg2576 de 6 mois étudiées dans ce travail de thèse ont présenté une expression ectopique du NPY dans les fibres moussues, traduisant la survenue de crises d'épilepsie. D'autre part, il existe une grande variabilité inter-individuelle chez les patients atteints de formes génétiques de la MA, due à une grande diversité des mutations de l'APP ou des présénilines retrouvées chez ces patients. Comme chez les souris modèles, on peut supposer que l'origine des activités neuronales aberrantes peut varier en termes de nature ou de cinétique en fonction de la mutation de ces patients. Les patients porteurs d'une mutation isolée de la préséniline 1 ou 2 présentent des crises d'épilepsie en proportion équivalente à celle des patients porteurs d'une APP mutée [165, 166]. Cependant, l'hypersynchronie neuronale n'a, à ce jour, jamais été recherchée dans les modèles murins exprimant de façon isolée une préséniline mutée.

Quelques données obtenues chez l'animal semblent s'appliquer aux formes sporadiques de la MA. En effet, un déficit des canaux Nav1.1 a été mis en évidence dans des cerveaux de patients atteints de la MA dont la nature familiale de la maladie n'a pas été précisée et dont l'âge au moment du décès était compris entre 70 et 90 ans, suggérant plutôt des formes sporadiques de la MA [180]. Le déficit en canaux sodiques contribuerait à l'hypersynchronie neuronale chez les souris hAPPJ20 [180]. Ainsi, les antiépileptiques bloqueurs de canaux sodiques comme la phénytoïne a plutôt tendance à augmenter la fréquence des pointes interictales chez ces souris [184], ce qui explique leur efficacité antiépileptique limitée chez les patients atteints de la MA [164]. Le spectre des antiépileptiques efficaces semble donc être le même chez le patient et la souris modèle de la MA.

Enfin, les pointes interictales peuvent être détectées chez le patient atteint de la MA à un stade très précoce (MCI) et sont associées à un déclin mnésique plus précoce [164]. Cependant, elles restent

difficiles à détecter sur un EEG de surface chez ces patients, ce qui pourrait expliquer les différences de prévalence des pointes observées entre la souris modèle et le patient atteint de la MA. Pour avoir de bonnes chances de les observer, il faudrait réaliser des EEG intra-crâniens, qui ne sont réalisés qu'en prévision d'une chirurgie, ce qui exclut cette possibilité pour améliorer la détection des pointes chez l'Homme. Cette difficulté de détection constitue un obstacle majeur pour diagnostiquer précocement la présence d'une hypersynchronie neuronale chez les patients afin d'instaurer une thérapie anti-épileptique.

V) Le lévétiracétam, perspective thérapeutique de la maladie d'Alzheimer ?

De nombreuses études montrent que le peptide amyloïde entraîne une hyperexcitabilité neuronale dans les modèles murins de la MA [122 , 211, 212]. Or, la production du peptide amyloïde dépend de l'activité neuronale, l'hyperactivité neuronale contribue donc à augmenter cette production. Notamment, certains patients épileptiques présentent des plaques amyloïdes comme les patients atteints de la MA [297]. D'autre part, l'hypersynchronie neuronale semble être un dysfonctionnement neuronal précoce dans le déroulement de la MA. En effet, les crises d'épilepsie ou les pointes interictales peuvent être observées avant les premiers troubles mnésiques chez les patients atteints de MCI ou de MA [164] et chez les souris Tg2576 comme nous l'avons montré dans cette étude. On peut donc penser qu'un cercle vicieux pourrait s'installer tôt dans la MA, où l'excès de peptide amyloïde favorise l'hyperactivité neuronale qui elle-même stimule la production du peptide amyloïde. Il serait donc profitable de traiter à un stade très précoce l'hyperactivité neuronale par des antiépileptiques pour limiter l'accélération de l'amyloïdopathie. D'ailleurs, chez les souris porteuses de mutations de l'APP et de la PS1, le traitement d'un mois par lévétiracétam et de 3 mois par lamotrigine a diminué le nombre de plaques amyloïdes [289 , 298]. Cet effet sur l'amyloïdopathie pourrait être dû à la fois à la suppression de l'hyperactivité neuronale mais aussi à l'augmentation de la clairance du peptide amyloïde [289] et à une diminution du clivage de l'APP par la β -sécrétase, voie de production du peptide amyloïde [298]. De nombreuses études montrent que l'antiépileptique le plus efficace chez les patients atteints de la MA est le lévétiracétam [164, 223 , 299 , 300]. L'efficacité peut atteindre 72% de répondeurs pour des doses comprises entre 1000 à 1500 mg par jour [299]. Pour un traitement de 250 à 3000 mg par jour, le lévétiracétam a pour effets indésirables : l'anxiété, la confusion, les maux de têtes, les troubles de la coordination, l'irritabilité et les nausées. Par rapport aux autres antiépileptiques tels que le phénobarbital ou la phénytoïne, il est considéré comme le mieux toléré.

De plus, le lévétiracétam améliore les performances mnésiques chez les souris modèles de la MA et chez le patient atteint de MCI amnésique (125 mg 2 fois par jour) [184 , 224, 289]. A l'heure actuelle,

un essai clinique de phase 2a recrute des patients atteints du stade modéré de la MA également épileptiques, pour confirmer l'effet du lévétiracétam sur les fonctions mnésiques et évaluer son efficacité dans le contrôle des crises d'épilepsie (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02002819>).

Donc le lévétiracétam pourrait non seulement être un traitement symptomatique du déficit mnésique mais également interférer avec le développement de l'amyloïdopathie. Au vu des nombreux échecs thérapeutiques chez l'homme endurés par des molécules qui semblaient très prometteuses chez la souris modèle de la MA, le constat d'une efficacité antiépileptique et promnésique du lévétiracétam à la fois chez l'animal et le patient MCI apporte l'espoir d'une nouvelle piste thérapeutique dans la maladie d'Alzheimer.

VI) Conclusion générale de cette thèse

A l'issue de cette thèse, nous apprenons que l'hypersynchronie neuronale apparaît très tôt chez les souris Tg2576 et qu'il est fort probable qu'il en soit ainsi dans les autres modèles de la MA. Cette observation semble indiquer un lien très direct entre la mutation de l'APP et/ou l'excès de peptide amyloïde A β ₄₂ et l'apparition de l'hyperexcitabilité et hypersynchronie neuronales. La rareté des crises d'épilepsie dans le modèle Tg2576 et les autres modèles murins ainsi que l'absence de remodelage pro-épileptogène dans l'hippocampe semblent indiquer que ces modèles murins ne présentent pas une épilepsie à proprement parler mais simplement une hyperexcitabilité neuronale. Un lien causal entre l'hypersynchronie neuronale et les troubles mnésiques chez les patients atteints de la MA et chez les souris modèles reste encore à démontrer. Mais, dès lors, les effets bénéfiques du lévétiracétam sur les fonctions mnésiques des patients MCI feront peut-être de cette molécule une alternative thérapeutique intéressante de la MA dans un avenir proche. Face à l'ignorance de l'évènement causal central dans la MA, les stimulations cognitives offrent également une approche « préventive et thérapeutique » efficace qui néglige le traitement de la cause de l'atteinte cérébrale mais permet d'en limiter l'expression clinique par le développement de stratégies cognitives alternatives.

BIBLIOGRAPHIE

1. Moser, E.I., *The multi-laned hippocampus*. Nat Neurosci, 2011. **14**(4): p. 407-8.
2. Andersen, *Organization of hippocampal neurons and their interconnections*. Vol. I. 1975: New York, Plenum Press. 155-175.
3. Hu, H., J. Gan, and P. Jonas, *Interneurons. Fast-spiking, parvalbumin(+) GABAergic interneurons: from cellular design to microcircuit function*. Science, 2014. **345**(6196): p. 1255263.
4. Colgin, L.L. and E.I. Moser, *Gamma oscillations in the hippocampus*. Physiology (Bethesda), 2010. **25**(5): p. 319-29.
5. Leutgeb, J.K., et al., *Pattern separation in the dentate gyrus and CA3 of the hippocampus*. Science, 2007. **315**(5814): p. 961-6.
6. Hoge, J. and R.P. Kesner, *Role of CA3 and CA1 subregions of the dorsal hippocampus on temporal processing of objects*. Neurobiol Learn Mem, 2007. **88**(2): p. 225-31.
7. Zhao, C., W. Deng, and F.H. Gage, *Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis*. Cell, 2008. **132**(4): p. 645-60.
8. Restivo, L., et al., *Development of Adult-Generated Cell Connectivity with Excitatory and Inhibitory Cell Populations in the Hippocampus*. J Neurosci, 2015. **35**(29): p. 10600-12.
9. Esposito, M.S., et al., *Neuronal differentiation in the adult hippocampus recapitulates embryonic development*. J Neurosci, 2005. **25**(44): p. 10074-86.
10. Trouche, S., et al., *Recruitment of adult-generated neurons into functional hippocampal networks contributes to updating and strengthening of spatial memory*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(14): p. 5919-24.
11. Clelland, C.D., et al., *A functional role for adult hippocampal neurogenesis in spatial pattern separation*. Science, 2009. **325**(5937): p. 210-3.
12. Sahay, A., D.A. Wilson, and R. Hen, *Pattern separation: a common function for new neurons in hippocampus and olfactory bulb*. Neuron, 2011. **70**(4): p. 582-8.
13. Moller, H.J. and M.B. Graeber, *The case described by Alois Alzheimer in 1911. Historical and conceptual perspectives based on the clinical record and neurohistological sections*. Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci, 1998. **248**(3): p. 111-22.
14. Levy-Lahad, E., et al., *Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus*. Science, 1995. **269**(5226): p. 973-7.
15. Goate, A., et al., *Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease*. Nature, 1991. **349**(6311): p. 704-6.
16. Mullan, M., et al., *A pathogenic mutation for probable Alzheimer's disease in the APP gene at the N-terminus of beta-amyloid*. Nat Genet, 1992. **1**(5): p. 345-7.
17. Sherrington, R., et al., *Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease*. Nature, 1995. **375**(6534): p. 754-60.
18. Querfurth, H.W. and F.M. LaFerla, *Alzheimer's disease*. N Engl J Med, 2010. **362**(4): p. 329-44.
19. Tang, M.X., et al., *Effect of oestrogen during menopause on risk and age at onset of Alzheimer's disease*. Lancet, 1996. **348**(9025): p. 429-32.
20. Jellinger, K.A., *Head injury and dementia*. Curr Opin Neurol, 2004. **17**(6): p. 719-23.
21. Mayeux, R., *Epidemiology of neurodegeneration*. Annu Rev Neurosci, 2003. **26**: p. 81-104.
22. McKhann, G.M., et al., *The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease*. Alzheimers Dement, 2011. **7**(3): p. 263-9.
23. Backman, L., B.J. Small, and L. Fratiglioni, *Stability of the preclinical episodic memory deficit in Alzheimer's disease*. Brain, 2001. **124**(Pt 1): p. 96-102.
24. Sorbi, S., et al., *EFNS-ENS Guidelines on the diagnosis and management of disorders associated with dementia*. Eur J Neurol, 2012. **19**(9): p. 1159-79.
25. Folstein, M.F., S.E. Folstein, and P.R. McHugh, *"Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician*. J Psychiatr Res, 1975. **12**(3): p. 189-98.

26. Feldman, H.H., et al., *Cognition, function, and caregiving time patterns in patients with mild-to-moderate Alzheimer disease: a 12-month analysis*. *Alzheimer Dis Assoc Disord*, 2005. **19**(1): p. 29-36.
27. Snowden, J.S., et al., *Cognitive phenotypes in Alzheimer's disease and genetic risk*. *Cortex*, 2007. **43**(7): p. 835-45.
28. Blennow, K., M.J. de Leon, and H. Zetterberg, *Alzheimer's disease*. *Lancet*, 2006. **368**(9533): p. 387-403.
29. Perl, D.P., *Neuropathology of Alzheimer's disease*. *Mt Sinai J Med*, 2010. **77**(1): p. 32-42.
30. Lam, B., et al., *Clinical, imaging, and pathological heterogeneity of the Alzheimer's disease syndrome*. *Alzheimers Res Ther*, 2013. **5**(1): p. 1.
31. Fox, N.C. and J.M. Schott, *Imaging cerebral atrophy: normal ageing to Alzheimer's disease*. *Lancet*, 2004. **363**(9406): p. 392-4.
32. Querbes, O., et al., *Early diagnosis of Alzheimer's disease using cortical thickness: impact of cognitive reserve*. *Brain*, 2009. **132**(Pt 8): p. 2036-47.
33. Whitehouse, P.J., et al., *Alzheimer's disease and senile dementia: loss of neurons in the basal forebrain*. *Science*, 1982. **215**(4537): p. 1237-9.
34. Selkoe, D.J., *The molecular pathology of Alzheimer's disease*. *Neuron*, 1991. **6**(4): p. 487-98.
35. Henderson, V.W. and C.E. Finch, *The neurobiology of Alzheimer's disease*. *J Neurosurg*, 1989. **70**(3): p. 335-53.
36. Pimplikar, S.W., *Reassessing the amyloid cascade hypothesis of Alzheimer's disease*. *Int J Biochem Cell Biol*, 2009. **41**(6): p. 1261-8.
37. Hardy, J.A. and G.A. Higgins, *Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis*. *Science*, 1992. **256**(5054): p. 184-5.
38. Benilova, I., E. Karran, and B. De Strooper, *The toxic Abeta oligomer and Alzheimer's disease: an emperor in need of clothes*. *Nat Neurosci*, 2012. **15**(3): p. 349-57.
39. Kidd, M., *Paired helical filaments in electron microscopy of Alzheimer's disease*. *Nature*, 1963. **197**: p. 192-3.
40. Grundke-Iqbal, I., et al., *Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1986. **83**(13): p. 4913-7.
41. Ueda, K., et al., *Alz-50 recognizes a phosphorylated epitope of tau protein*. *J Neurosci*, 1990. **10**(10): p. 3295-304.
42. Braak, H. and E. Braak, *Neuropathological staging of Alzheimer-related changes*. *Acta Neuropathol*, 1991. **82**(4): p. 239-59.
43. Wang, J.Z., Z.H. Wang, and Q. Tian, *Tau hyperphosphorylation induces apoptotic escape and triggers neurodegeneration in Alzheimer's disease*. *Neurosci Bull*, 2014. **30**(2): p. 359-66.
44. Niedowicz, D.M., P.T. Nelson, and M.P. Murphy, *Alzheimer's disease: pathological mechanisms and recent insights*. *Curr Neuropharmacol*, 2011. **9**(4): p. 674-84.
45. Tanaka, S., et al., *Tissue-specific expression of three types of beta-protein precursor mRNA: enhancement of protease inhibitor-harboring types in Alzheimer's disease brain*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1989. **165**(3): p. 1406-14.
46. Hoe, H.S., H.K. Lee, and D.T. Pak, *The upside of APP at synapses*. *CNS Neurosci Ther*, 2012. **18**(1): p. 47-56.
47. Checler, F., *Processing of the beta-amyloid precursor protein and its regulation in Alzheimer's disease*. *J Neurochem*, 1995. **65**(4): p. 1431-44.
48. Chow, V.W., et al., *An overview of APP processing enzymes and products*. *Neuromolecular Med*, 2010. **12**(1): p. 1-12.
49. LaFerla, F.M., K.N. Green, and S. Oddo, *Intracellular amyloid-beta in Alzheimer's disease*. *Nat Rev Neurosci*, 2007. **8**(7): p. 499-509.
50. Kimberly, W.T., et al., *Gamma-secretase is a membrane protein complex comprised of presenilin, nicastrin, Aph-1, and Pen-2*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(11): p. 6382-7.
51. De Strooper, B., *Aph-1, Pen-2, and Nicastrin with Presenilin generate an active gamma-Secretase complex*. *Neuron*, 2003. **38**(1): p. 9-12.

52. Citron, M., et al., *Mutant presenilins of Alzheimer's disease increase production of 42-residue amyloid beta-protein in both transfected cells and transgenic mice*. Nat Med, 1997. **3**(1): p. 67-72.
53. Borchelt, D.R., et al., *Accelerated amyloid deposition in the brains of transgenic mice coexpressing mutant presenilin 1 and amyloid precursor proteins*. Neuron, 1997. **19**(4): p. 939-45.
54. Hardy, J. and D.J. Selkoe, *The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics*. Science, 2002. **297**(5580): p. 353-6.
55. Terry, R.D., et al., *Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment*. Ann Neurol, 1991. **30**(4): p. 572-80.
56. Rabinovici, G.D. and W.J. Jagust, *Amyloid imaging in aging and dementia: testing the amyloid hypothesis in vivo*. Behav Neurol, 2009. **21**(1): p. 117-28.
57. Stewart, S., F. Cacucci, and C. Lever, *Which memory task for my mouse? A systematic review of spatial memory performance in the Tg2576 Alzheimer's mouse model*. J Alzheimers Dis, 2011. **26**(1): p. 105-26.
58. Krezymon, A., et al., *Modifications of hippocampal circuits and early disruption of adult neurogenesis in the tg2576 mouse model of Alzheimer's disease*. PLoS One, 2013. **8**(9): p. e76497.
59. Lesne, S., et al., *A specific amyloid-beta protein assembly in the brain impairs memory*. Nature, 2006. **440**(7082): p. 352-7.
60. Mucke, L., et al., *High-level neuronal expression of abeta 1-42 in wild-type human amyloid protein precursor transgenic mice: synaptotoxicity without plaque formation*. J Neurosci, 2000. **20**(11): p. 4050-8.
61. Brouillette, J., et al., *Neurotoxicity and memory deficits induced by soluble low-molecular-weight amyloid-beta1-42 oligomers are revealed in vivo by using a novel animal model*. J Neurosci, 2012. **32**(23): p. 7852-61.
62. Hartley, D.M., et al., *Protofibrillar intermediates of amyloid beta-protein induce acute electrophysiological changes and progressive neurotoxicity in cortical neurons*. J Neurosci, 1999. **19**(20): p. 8876-84.
63. Inoue, S., *In situ Abeta pores in AD brain are cylindrical assembly of Abeta protofilaments*. Amyloid, 2008. **15**(4): p. 223-33.
64. Li, S., et al., *Soluble Abeta oligomers inhibit long-term potentiation through a mechanism involving excessive activation of extrasynaptic NR2B-containing NMDA receptors*. J Neurosci, 2011. **31**(18): p. 6627-38.
65. Tu, S., et al., *Oligomeric Abeta-induced synaptic dysfunction in Alzheimer's disease*. Mol Neurodegener, 2014. **9**: p. 48.
66. Selkoe, D.J., *Resolving controversies on the path to Alzheimer's therapeutics*. Nat Med, 2011. **17**(9): p. 1060-5.
67. Schoenfeld, T.A. and R.A. Obar, *Diverse distribution and function of fibrous microtubule-associated proteins in the nervous system*. Int Rev Cytol, 1994. **151**: p. 67-137.
68. Bohm, K.J., et al., *Effect of MAP 1, MAP 2, and tau-proteins on structural parameters of tubulin assemblies*. Acta Histochem Suppl, 1990. **39**: p. 357-64.
69. Brandt, R. and G. Lee, *The balance between tau protein's microtubule growth and nucleation activities: implications for the formation of axonal microtubules*. J Neurochem, 1993. **61**(3): p. 997-1005.
70. Biernat, J., et al., *Phosphorylation of Ser262 strongly reduces binding of tau to microtubules: distinction between PHF-like immunoreactivity and microtubule binding*. Neuron, 1993. **11**(1): p. 153-63.
71. Bramblett, G.T., et al., *Abnormal tau phosphorylation at Ser396 in Alzheimer's disease recapitulates development and contributes to reduced microtubule binding*. Neuron, 1993. **10**(6): p. 1089-99.

72. Crespo-Biel, N., C. Theunis, and F. Van Leuven, *Protein tau: prime cause of synaptic and neuronal degeneration in Alzheimer's disease*. *Int J Alzheimers Dis*, 2012. **2012**: p. 251426.
73. Khlistunova, I., et al., *Inducible expression of Tau repeat domain in cell models of tauopathy: aggregation is toxic to cells but can be reversed by inhibitor drugs*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(2): p. 1205-14.
74. Santacruz, K., et al., *Tau suppression in a neurodegenerative mouse model improves memory function*. *Science*, 2005. **309**(5733): p. 476-81.
75. Roberson, E.D., et al., *Reducing endogenous tau ameliorates amyloid beta-induced deficits in an Alzheimer's disease mouse model*. *Science*, 2007. **316**(5825): p. 750-4.
76. Buee, L., et al., *Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders*. *Brain Res Brain Res Rev*, 2000. **33**(1): p. 95-130.
77. Toledano, A., et al., *[Does Alzheimer's disease exist in all primates? Alzheimer pathology in non-human primates and its pathophysiological implications (II)]*. *Neurologia*, 2014. **29**(1): p. 42-55.
78. Chambon, C., et al., *Behavioural and cellular effects of exogenous amyloid-beta peptides in rodents*. *Behav Brain Res*, 2011. **225**(2): p. 623-41.
79. Bouleau, S. and H. Tricoire, *Drosophila models of Alzheimer's disease: advances, limits, and perspectives*. *J Alzheimers Dis*, 2015. **45**(4): p. 1015-38.
80. Duyckaerts, C., M.C. Potier, and B. Delatour, *Alzheimer disease models and human neuropathology: similarities and differences*. *Acta Neuropathol*, 2008. **115**(1): p. 5-38.
81. Hsiao, K., et al., *Correlative memory deficits, Abeta elevation, and amyloid plaques in transgenic mice*. *Science*, 1996. **274**(5284): p. 99-102.
82. Games, D., et al., *Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F beta-amyloid precursor protein*. *Nature*, 1995. **373**(6514): p. 523-7.
83. Sturchler-Pierrat, C., et al., *Two amyloid precursor protein transgenic mouse models with Alzheimer disease-like pathology*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. **94**(24): p. 13287-92.
84. Balducci, C. and G. Forloni, *APP transgenic mice: their use and limitations*. *Neuromolecular Med*, 2011. **13**(2): p. 117-37.
85. Rae, E.A. and R.E. Brown, *The problem of genotype and sex differences in life expectancy in transgenic AD mice*. *Neurosci Biobehav Rev*, 2015.
86. Garcia-Alloza, M., et al., *Characterization of amyloid deposition in the APP^{swe}/PS1^{dE9} mouse model of Alzheimer disease*. *Neurobiol Dis*, 2006. **24**(3): p. 516-24.
87. Van der Jeugd, A., et al., *Progressive age-related cognitive decline in tau mice*. *J Alzheimers Dis*, 2013. **37**(4): p. 777-88.
88. Oddo, S., et al., *Amyloid deposition precedes tangle formation in a triple transgenic model of Alzheimer's disease*. *Neurobiol Aging*, 2003. **24**(8): p. 1063-70.
89. Cohen, R.M., et al., *A transgenic Alzheimer rat with plaques, tau pathology, behavioral impairment, oligomeric abeta, and frank neuronal loss*. *J Neurosci*, 2013. **33**(15): p. 6245-56.
90. Ashe, K.H., *Learning and memory in transgenic mice modeling Alzheimer's disease*. *Learn Mem*, 2001. **8**(6): p. 301-8.
91. Janus, C. and D. Westaway, *Transgenic mouse models of Alzheimer's disease*. *Physiol Behav*, 2001. **73**(5): p. 873-86.
92. Trinchese, F., et al., *Progressive age-related development of Alzheimer-like pathology in APP/PS1 mice*. *Ann Neurol*, 2004. **55**(6): p. 801-14.
93. Reiman, E.M., et al., *Brain imaging and fluid biomarker analysis in young adults at genetic risk for autosomal dominant Alzheimer's disease in the presenilin 1 E280A kindred: a case-control study*. *Lancet Neurol*, 2012. **11**(12): p. 1048-56.
94. Ryman, D.C., et al., *Symptom onset in autosomal dominant Alzheimer disease: a systematic review and meta-analysis*. *Neurology*, 2014. **83**(3): p. 253-60.
95. Karran, E., M. Mercken, and B. De Strooper, *The amyloid cascade hypothesis for Alzheimer's disease: an appraisal for the development of therapeutics*. *Nat Rev Drug Discov*, 2011. **10**(9): p. 698-712.

96. Harris, J.A., et al., *Many neuronal and behavioral impairments in transgenic mouse models of Alzheimer's disease are independent of caspase cleavage of the amyloid precursor protein*. J Neurosci, 2010. **30**(1): p. 372-81.
97. Francis, B.M., et al., *Reduced tissue levels of noradrenaline are associated with behavioral phenotypes of the TgCRND8 mouse model of Alzheimer's disease*. Neuropsychopharmacology, 2012. **37**(8): p. 1934-44.
98. Chishti, M.A., et al., *Early-onset amyloid deposition and cognitive deficits in transgenic mice expressing a double mutant form of amyloid precursor protein 695*. J Biol Chem, 2001. **276**(24): p. 21562-70.
99. Fowler, S.W., et al., *Genetic modulation of soluble Abeta rescues cognitive and synaptic impairment in a mouse model of Alzheimer's disease*. J Neurosci, 2014. **34**(23): p. 7871-85.
100. Jankowsky, J.L., et al., *Persistent amyloidosis following suppression of Abeta production in a transgenic model of Alzheimer disease*. PLoS Med, 2005. **2**(12): p. e355.
101. Vegh, M.J., et al., *Reducing hippocampal extracellular matrix reverses early memory deficits in a mouse model of Alzheimer inverted question marks disease*. Acta Neuropathol Commun, 2014. **2**(1): p. 76.
102. D'Amelio, M., et al., *Caspase-3 triggers early synaptic dysfunction in a mouse model of Alzheimer's disease*. Nat Neurosci, 2011. **14**(1): p. 69-76.
103. Duffy, A.M., et al., *Entorhinal cortical defects in Tg2576 mice are present as early as 2-4 months of age*. Neurobiol Aging, 2014: p. (in press).
104. Kawarabayashi, T., et al., *Age-dependent changes in brain, CSF, and plasma amyloid (beta) protein in the Tg2576 transgenic mouse model of Alzheimer's disease*. J Neurosci, 2001. **21**(2): p. 372-81.
105. Jacobsen, J.S., et al., *Early-onset behavioral and synaptic deficits in a mouse model of Alzheimer's disease*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(13): p. 5161-6.
106. King, D.L., et al., *Progressive and gender-dependent cognitive impairment in the APP(SW) transgenic mouse model for Alzheimer's disease*. Behav Brain Res, 1999. **103**(2): p. 145-62.
107. Holcomb, L., et al., *Accelerated Alzheimer-type phenotype in transgenic mice carrying both mutant amyloid precursor protein and presenilin 1 transgenes*. Nat Med, 1998. **4**(1): p. 97-100.
108. Shankar, G.M., et al., *Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory*. Nat Med, 2008. **14**(8): p. 837-42.
109. Otth, C., et al., *AbetaPP induces cdk5-dependent tau hyperphosphorylation in transgenic mice Tg2576*. J Alzheimers Dis, 2002. **4**(5): p. 417-30.
110. Lee, S.H., et al., *Impaired short-term plasticity in mossy fiber synapses caused by mitochondrial dysfunction of dentate granule cells is the earliest synaptic deficit in a mouse model of Alzheimer's disease*. J Neurosci, 2012. **32**(17): p. 5953-63.
111. Apelt, J. and R. Schliebs, *Beta-amyloid-induced glial expression of both pro- and anti-inflammatory cytokines in cerebral cortex of aged transgenic Tg2576 mice with Alzheimer plaque pathology*. Brain Res, 2001. **894**(1): p. 21-30.
112. Fisher, R.S., et al., *Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE)*. Epilepsia, 2005. **46**(4): p. 470-2.
113. Berg, A.T., et al., *Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009*. Epilepsia, 2010. **51**(4): p. 676-85.
114. Dravet, C., *Dravet syndrome history*. Dev Med Child Neurol, 2011. **53 Suppl 2**: p. 1-6.
115. Marini, C., et al., *The genetics of Dravet syndrome*. Epilepsia, 2011. **52 Suppl 2**: p. 24-9.
116. Cersosimo, R., et al., *Mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis: study of 42 children*. Seizure, 2011. **20**(2): p. 131-7.
117. Kearney, J.A., et al., *A gain-of-function mutation in the sodium channel gene Scn2a results in seizures and behavioral abnormalities*. Neuroscience, 2001. **102**(2): p. 307-17.

118. King, J.T., Jr. and C.C. LaMotte, *El mouse as a model of focal epilepsy: a review*. *Epilepsia*, 1989. **30**(3): p. 257-65.
119. Arida, R.M., et al., *The course of untreated seizures in the pilocarpine model of epilepsy*. *Epilepsy Res*, 1999. **34**(2-3): p. 99-107.
120. Mello, L.E., et al., *Circuit mechanisms of seizures in the pilocarpine model of chronic epilepsy: cell loss and mossy fiber sprouting*. *Epilepsia*, 1993. **34**(6): p. 985-95.
121. Zilberter, M., et al., *Dietary energy substrates reverse early neuronal hyperactivity in a mouse model of Alzheimer's disease*. *J Neurochem*, 2013. **125**(1): p. 157-71.
122. Minkeviciene, R., et al., *Amyloid beta-induced neuronal hyperexcitability triggers progressive epilepsy*. *J Neurosci*, 2009. **29**(11): p. 3453-62.
123. Bromfield EB, C.J., Sirven JI, *An Introduction to Epilepsy*, in *Clinical Epilepsy*, A.E. Society, Editor. 2006: West Hartford
124. Matsumoto, H. and C.A. Marsan, *Cortical Cellular Phenomena in Experimental Epilepsy: Interictal Manifestations*. *Exp Neurol*, 1964. **9**: p. 286-304.
125. Staba, R.J. and A. Bragin, *High-frequency oscillations and other electrophysiological biomarkers of epilepsy: underlying mechanisms*. *Biomark Med*, 2011. **5**(5): p. 545-56.
126. Ayala, G.F., H. Matsumoto, and R.J. Gumnit, *Excitability changes and inhibitory mechanisms in neocortical neurons during seizures*. *J Neurophysiol*, 1970. **33**(1): p. 73-85.
127. Dichter, M.A. and G.F. Ayala, *Cellular mechanisms of epilepsy: a status report*. *Science*, 1987. **237**(4811): p. 157-64.
128. Nadler, J.V., *The recurrent mossy fiber pathway of the epileptic brain*. *Neurochem Res*, 2003. **28**(11): p. 1649-58.
129. Yang, H., et al., *Glycolysis in energy metabolism during seizures*. *Neural Regen Res*, 2013. **8**(14): p. 1316-26.
130. Pitkanen, A., et al., *Epileptogenesis in experimental models*. *Epilepsia*, 2007. **48 Suppl 2**: p. 13-20.
131. Sperk, G., et al., *Functional changes in neuropeptide Y- and somatostatin-containing neurons induced by limbic seizures in the rat*. *Neuroscience*, 1992. **50**(4): p. 831-46.
132. Vezzani, A., et al., *Functional changes in somatostatin and neuropeptide Y containing neurons in the rat hippocampus in chronic models of limbic seizures*. *Epilepsy Res*, 1996. **26**(1): p. 267-79.
133. Scharfman, H.E. and W.P. Gray, *Plasticity of neuropeptide Y in the dentate gyrus after seizures, and its relevance to seizure-induced neurogenesis*. *EXS*, 2006(95): p. 193-211.
134. Davenport, C.J., W.J. Brown, and T.L. Babb, *Sprouting of GABAergic and mossy fiber axons in dentate gyrus following intrahippocampal kainate in the rat*. *Exp Neurol*, 1990. **109**(2): p. 180-90.
135. Kotti, T., P.J. Riekkinen, Sr., and R. Miettinen, *Characterization of target cells for aberrant mossy fiber collaterals in the dentate gyrus of epileptic rat*. *Exp Neurol*, 1997. **146**(2): p. 323-30.
136. Madsen, T.M., et al., *Electroconvulsive stimuli enhance both neuropeptide Y receptor Y1 and Y2 messenger RNA expression and levels of binding in the rat hippocampus*. *Neuroscience*, 2000. **98**(1): p. 33-9.
137. Klapstein, G.J. and W.F. Colmers, *On the sites of presynaptic inhibition by neuropeptide Y in rat hippocampus in vitro*. *Hippocampus*, 1993. **3**(1): p. 103-11.
138. Baimbridge, K.G., M.R. Celio, and J.H. Rogers, *Calcium-binding proteins in the nervous system*. *Trends Neurosci*, 1992. **15**(8): p. 303-8.
139. Magloczky, Z., et al., *Loss of Calbindin-D28K immunoreactivity from dentate granule cells in human temporal lobe epilepsy*. *Neuroscience*, 1997. **76**(2): p. 377-85.
140. Miller, J.J. and K.G. Baimbridge, *Biochemical and immunohistochemical correlates of kindling-induced epilepsy: role of calcium binding protein*. *Brain Res*, 1983. **278**(1-2): p. 322-6.

141. Baimbridge, K.G., I. Mody, and J.J. Miller, *Reduction of rat hippocampal calcium-binding protein following commissural, amygdala, septal, perforant path, and olfactory bulb kindling*. *Epilepsia*, 1985. **26**(5): p. 460-5.
142. Nagerl, U.V. and I. Mody, *Calcium-dependent inactivation of high-threshold calcium currents in human dentate gyrus granule cells*. *J Physiol*, 1998. **509 (Pt 1)**: p. 39-45.
143. Helmstaedter, C., *Effects of chronic epilepsy on declarative memory systems*. *Prog Brain Res*, 2002. **135**: p. 439-53.
144. Holmes, G.L. and P.P. Lenck-Santini, *Role of interictal epileptiform abnormalities in cognitive impairment*. *Epilepsy Behav*, 2006. **8**(3): p. 504-15.
145. Binnie, C.D., *Cognitive impairment during epileptiform discharges: is it ever justifiable to treat the EEG?* *Lancet Neurol*, 2003. **2**(12): p. 725-30.
146. Shewmon, D.A. and R.J. Erwin, *The effect of focal interictal spikes on perception and reaction time. II. Neuroanatomic specificity*. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, 1988. **69**(4): p. 338-52.
147. Kleen, J.K., et al., *Hippocampal interictal spikes disrupt cognition in rats*. *Ann Neurol*, 2010. **67**(2): p. 250-7.
148. Kleen, J.K., et al., *Hippocampal interictal epileptiform activity disrupts cognition in humans*. *Neurology*, 2013. **81**(1): p. 18-24.
149. Khan, O.I., et al., *Interictal spikes in developing rats cause long-standing cognitive deficits*. *Neurobiol Dis*, 2010. **39**(3): p. 362-71.
150. Tu, B., et al., *Spontaneous release of neuropeptide Y tonically inhibits recurrent mossy fiber synaptic transmission in epileptic brain*. *J Neurosci*, 2005. **25**(7): p. 1718-29.
151. Bender, A.C., et al., *Focal Scn1a knockdown induces cognitive impairment without seizures*. *Neurobiol Dis*, 2013. **54**: p. 297-307.
152. Hirtz, D., et al., *How common are the "common" neurologic disorders?* *Neurology*, 2007. **68**(5): p. 326-37.
153. Hauser, W.A., J.F. Annegers, and L.T. Kurland, *Incidence of epilepsy and unprovoked seizures in Rochester, Minnesota: 1935-1984*. *Epilepsia*, 1993. **34**(3): p. 453-68.
154. Olafsson, E., et al., *Incidence of unprovoked seizures and epilepsy in Iceland and assessment of the epilepsy syndrome classification: a prospective study*. *Lancet Neurol*, 2005. **4**(10): p. 627-34.
155. Forstl, H., et al., *Neurologic signs in Alzheimer's disease. Results of a prospective clinical and neuropathologic study*. *Arch Neurol*, 1992. **49**(10): p. 1038-42.
156. Mendez, M. and G. Lim, *Seizures in elderly patients with dementia: epidemiology and management*. *Drugs Aging*, 2003. **20**(11): p. 791-803.
157. Rao, S.C., et al., *Recurrent seizures in patients with dementia: frequency, seizure types, and treatment outcome*. *Epilepsy Behav*, 2009. **14**(1): p. 118-20.
158. Scarmeas, N., et al., *Seizures in Alzheimer disease: who, when, and how common?* *Arch Neurol*, 2009. **66**(8): p. 992-7.
159. Amatniek, J.C., et al., *Incidence and predictors of seizures in patients with Alzheimer's disease*. *Epilepsia*, 2006. **47**(5): p. 867-72.
160. Hauser, W.A., et al., *Seizures and myoclonus in patients with Alzheimer's disease*. *Neurology*, 1986. **36**(9): p. 1226-30.
161. Mendez, M.F., et al., *Seizures in Alzheimer's disease: clinicopathologic study*. *J Geriatr Psychiatry Neurol*, 1994. **7**(4): p. 230-3.
162. Risse, S.C., et al., *Myoclonus, seizures, and paratonia in Alzheimer disease*. *Alzheimer Dis Assoc Disord*, 1990. **4**(4): p. 217-25.
163. Romanelli, M.F., et al., *Advanced Alzheimer's disease is a risk factor for late-onset seizures*. *Arch Neurol*, 1990. **47**(8): p. 847-50.
164. Vossel, K.A., et al., *Seizures and epileptiform activity in the early stages of Alzheimer disease*. *JAMA Neurol*, 2013. **70**(9): p. 1158-66.

165. Larner, A.J. and M. Doran, *Clinical phenotypic heterogeneity of Alzheimer's disease associated with mutations of the presenilin-1 gene*. J Neurol, 2006. **253**(2): p. 139-58.
166. Jayadev, S., et al., *Alzheimer's disease phenotypes and genotypes associated with mutations in presenilin 2*. Brain, 2010. **133**(Pt 4): p. 1143-54.
167. Cabrejo, L., et al., *Phenotype associated with APP duplication in five families*. Brain, 2006. **129**(Pt 11): p. 2966-76.
168. Lai, F. and R.S. Williams, *A prospective study of Alzheimer disease in Down syndrome*. Arch Neurol, 1989. **46**(8): p. 849-53.
169. Friedman, D., L.S. Honig, and N. Scarmeas, *Seizures and epilepsy in Alzheimer's disease*. CNS Neurosci Ther, 2012. **18**(4): p. 285-94.
170. Pillai, J. and M.R. Sperling, *Interictal EEG and the diagnosis of epilepsy*. Epilepsia, 2006. **47 Suppl 1**: p. 14-22.
171. Del Vecchio, R.A., et al., *Increased seizure threshold and severity in young transgenic CRND8 mice*. Neurosci Lett, 2004. **367**(2): p. 164-7.
172. Palop, J.J., et al., *Aberrant excitatory neuronal activity and compensatory remodeling of inhibitory hippocampal circuits in mouse models of Alzheimer's disease*. Neuron, 2007. **55**(5): p. 697-711.
173. Roberson, E.D., et al., *Amyloid-beta/Fyn-induced synaptic, network, and cognitive impairments depend on tau levels in multiple mouse models of Alzheimer's disease*. J Neurosci, 2011. **31**(2): p. 700-11.
174. Born, H.A., et al., *Genetic Suppression of Transgenic APP Rescues Hypersynchronous Network Activity in a Mouse Model of Alzheimer's Disease*. J Neurosci, 2014. **34**(11): p. 3826-40.
175. Westmark, C.J., et al., *Seizure susceptibility and mortality in mice that over-express amyloid precursor protein*. Int J Clin Exp Pathol, 2008. **1**(2): p. 157-68.
176. Chan, J., et al., *A mouse model of Alzheimer's disease displays increased susceptibility to kindling and seizure-associated death*. Epilepsia, 2015.
177. Lalonde, R., et al., *Neurobehavioral characterization of APP23 transgenic mice with the SHIRPA primary screen*. Behav Brain Res, 2005. **157**(1): p. 91-8.
178. LaFerla, F.M. and K.N. Green, *Animal models of Alzheimer disease*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2012. **2**(11).
179. Hsiao, K.K., et al., *Age-related CNS disorder and early death in transgenic FVB/N mice overexpressing Alzheimer amyloid precursor proteins*. Neuron, 1995. **15**(5): p. 1203-18.
180. Verret, L., et al., *Inhibitory interneuron deficit links altered network activity and cognitive dysfunction in Alzheimer model*. Cell, 2012. **149**(3): p. 708-21.
181. Ziyatdinova, S., et al., *Spontaneous epileptiform discharges in a mouse model of Alzheimer's disease are suppressed by antiepileptic drugs that block sodium channels*. Epilepsy Res, 2011. **94**(1-2): p. 75-85.
182. Ittner, A.A., et al., *p38 MAP kinase-mediated NMDA receptor-dependent suppression of hippocampal hypersynchronicity in a mouse model of Alzheimer's disease*. Acta Neuropathol Commun, 2014. **2**(1): p. 149.
183. Corbett, B.F., et al., *Sodium channel cleavage is associated with aberrant neuronal activity and cognitive deficits in a mouse model of Alzheimer's disease*. J Neurosci, 2013. **33**(16): p. 7020-6.
184. Sanchez, P.E., et al., *Levetiracetam suppresses neuronal network dysfunction and reverses synaptic and cognitive deficits in an Alzheimer's disease model*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(42): p. E2895-903.
185. Verret, L., et al., *Transient enriched housing before amyloidosis onset sustains cognitive improvement in Tg2576 mice*. Neurobiol Aging, 2013. **34**(1): p. 211-25.
186. Palop, J.J., et al., *Neuronal depletion of calcium-dependent proteins in the dentate gyrus is tightly linked to Alzheimer's disease-related cognitive deficits*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(16): p. 9572-7.

187. Ferrer, I., et al., *Calbindin D-28k immunoreactivity in the temporal neocortex in patients with Alzheimer's disease*. Clin Neuropathol, 1993. **12**(1): p. 53-8.
188. Ichimiya, Y., et al., *Calbindin-immunoreactive cholinergic neurones in the nucleus basalis of Meynert in Alzheimer-type dementia*. Brain Res, 1989. **499**(2): p. 402-6.
189. Kerrigan, T.L., J.T. Brown, and A.D. Randall, *Characterization of altered intrinsic excitability in hippocampal CA1 pyramidal cells of the Abeta-overproducing PDAPP mouse*. Neuropharmacology, 2014. **79**: p. 515-24.
190. Hall, A.M., et al., *Tau-dependent kv4.2 depletion and dendritic hyperexcitability in a mouse model of Alzheimer's disease*. J Neurosci, 2015. **35**(15): p. 6221-30.
191. Siskova, Z., et al., *Dendritic structural degeneration is functionally linked to cellular hyperexcitability in a mouse model of Alzheimer's disease*. Neuron, 2014. **84**(5): p. 1023-33.
192. Mark, R.J., et al., *Amyloid beta-peptide impairs glucose transport in hippocampal and cortical neurons: involvement of membrane lipid peroxidation*. J Neurosci, 1997. **17**(3): p. 1046-54.
193. Prapong, T., et al., *Amyloid beta-peptide decreases neuronal glucose uptake despite causing increase in GLUT3 mRNA transcription and GLUT3 translocation to the plasma membrane*. Exp Neurol, 2002. **174**(2): p. 253-8.
194. Moreira, P.I., et al., *Brain mitochondrial dysfunction as a link between Alzheimer's disease and diabetes*. J Neurol Sci, 2007. **257**(1-2): p. 206-14.
195. Baglietto-Vargas, D., et al., *Calretinin interneurons are early targets of extracellular amyloid-beta pathology in PS1/AbetaPP Alzheimer mice hippocampus*. J Alzheimers Dis, 2010. **21**(1): p. 119-32.
196. Takahashi, H., et al., *Hippocampal interneuron loss in an APP/PS1 double mutant mouse and in Alzheimer's disease*. Brain Struct Funct, 2010. **214**(2-3): p. 145-60.
197. Perez-Cruz, C., et al., *Reduced spine density in specific regions of CA1 pyramidal neurons in two transgenic mouse models of Alzheimer's disease*. J Neurosci, 2011. **31**(10): p. 3926-34.
198. Trujillo-Estrada, L., et al., *Early neuronal loss and axonal/presynaptic damage is associated with accelerated amyloid-beta accumulation in AbetaPP/PS1 Alzheimer's disease mice subiculum*. J Alzheimers Dis, 2014. **42**(2): p. 521-41.
199. Rubio, S.E., et al., *Accelerated aging of the GABAergic septohippocampal pathway and decreased hippocampal rhythms in a mouse model of Alzheimer's disease*. FASEB J, 2012. **26**(11): p. 4458-67.
200. Leung, L., et al., *Apolipoprotein E4 causes age- and sex-dependent impairments of hilar GABAergic interneurons and learning and memory deficits in mice*. PLoS One, 2012. **7**(12): p. e53569.
201. Andrews-Zwilling, Y., et al., *Apolipoprotein E4 causes age- and Tau-dependent impairment of GABAergic interneurons, leading to learning and memory deficits in mice*. J Neurosci, 2010. **30**(41): p. 13707-17.
202. Busche, M.A., et al., *Clusters of hyperactive neurons near amyloid plaques in a mouse model of Alzheimer's disease*. Science, 2008. **321**(5896): p. 1686-9.
203. Meisler, M.H. and J.A. Kearney, *Sodium channel mutations in epilepsy and other neurological disorders*. J Clin Invest, 2005. **115**(8): p. 2010-7.
204. Tong, L.M., et al., *Inhibitory interneuron progenitor transplantation restores normal learning and memory in ApoE4 knock-in mice without or with Abeta accumulation*. J Neurosci, 2014. **34**(29): p. 9506-15.
205. Hazra, A., et al., *Inhibitory neuron and hippocampal circuit dysfunction in an aged mouse model of Alzheimer's disease*. PLoS One, 2013. **8**(5): p. e64318.
206. Kuchibhotla, K.V., et al., *Synchronous hyperactivity and intercellular calcium waves in astrocytes in Alzheimer mice*. Science, 2009. **323**(5918): p. 1211-5.
207. Vezzani, A., *Inflammation and epilepsy*. Epilepsy Curr, 2005. **5**(1): p. 1-6.
208. Lynch, B.A., et al., *The synaptic vesicle protein SV2A is the binding site for the antiepileptic drug levetiracetam*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(26): p. 9861-6.

209. Custer, K.L., et al., *Synaptic vesicle protein 2 enhances release probability at quiescent synapses*. J Neurosci, 2006. **26**(4): p. 1303-13.
210. Chang, W.P. and T.C. Sudhof, *SV2 renders primed synaptic vesicles competent for Ca²⁺ - induced exocytosis*. J Neurosci, 2009. **29**(4): p. 883-97.
211. Busche, M.A., et al., *Critical role of soluble amyloid-beta for early hippocampal hyperactivity in a mouse model of Alzheimer's disease*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(22): p. 8740-5.
212. Liu, Q., et al., *A novel nicotinic mechanism underlies beta-amyloid-induced neuronal hyperexcitation*. J Neurosci, 2013. **33**(17): p. 7253-63.
213. Cirrito, J.R., et al., *Synaptic activity regulates interstitial fluid amyloid-beta levels in vivo*. Neuron, 2005. **48**(6): p. 913-22.
214. Palop, J.J. and L. Mucke, *Amyloid-beta-induced neuronal dysfunction in Alzheimer's disease: from synapses toward neural networks*. Nat Neurosci, 2010. **13**(7): p. 812-8.
215. Vogt, D.L., et al., *Abnormal neuronal networks and seizure susceptibility in mice overexpressing the APP intracellular domain*. Neurobiol Aging, 2011. **32**(9): p. 1725-9.
216. Ghosal, K. and S.W. Pimplikar, *Aging and excitotoxic stress exacerbate neural circuit reorganization in amyloid precursor protein intracellular domain transgenic mice*. Neurobiol Aging, 2011. **32**(12): p. 2320 e1-9.
217. Kim, D.Y., et al., *BACE1 regulates voltage-gated sodium channels and neuronal activity*. Nat Cell Biol, 2007. **9**(7): p. 755-64.
218. Gerenu, G., et al., *Early cognitive stimulation compensates for memory and pathological changes in Tg2576 mice*. Biochim Biophys Acta, 2013. **1832**(6): p. 837-47.
219. Gheyara, A.L., et al., *Tau reduction prevents disease in a mouse model of Dravet syndrome*. Ann Neurol, 2014. **76**(3): p. 443-56.
220. Garcia-Cabrero, A.M., et al., *Hyperexcitability and epileptic seizures in a model of frontotemporal dementia*. Neurobiol Dis, 2013. **58**: p. 200-8.
221. Sulkava, R. and K. Amberla, *Alzheimer's disease and senile dementia of Alzheimer type. A neuropsychological study*. Acta Neurol Scand, 1982. **65**(6): p. 651-60.
222. McAreavey, M.J., B.R. Ballinger, and G.W. Fenton, *Epileptic seizures in elderly patients with dementia*. Epilepsia, 1992. **33**(4): p. 657-60.
223. Aller-Alvarez, J.S., et al., *Myoclonic epilepsy in Down syndrome and Alzheimer disease*. Neurologia, 2015.
224. Bakker, A., et al., *Reduction of hippocampal hyperactivity improves cognition in amnesic mild cognitive impairment*. Neuron, 2012. **74**(3): p. 467-74.
225. Marchetti C., R.E., Pimpinella D., Curia G., Middei S., *Excitability of Hippocampal cells and the role of seizures in early stages of Alzheimer's disease*. 12th International Conference on Alzheimer's and Parkinson's Diseases and Related Neurological Disorders, Nice, France, 2015.
226. Hebb, *The effects of early experience on problem solving at maturity*. American Psychologist, 1947. **2**: p. 306-307.
227. Rosenzweig, M.R., et al., *Effects of environmental complexity and training on brain chemistry and anatomy: a replication and extension*. J Comp Physiol Psychol, 1962. **55**: p. 429-37.
228. Diamond, M.C., et al., *Effects of environment on morphology of rat cerebral cortex and hippocampus*. J Neurobiol, 1976. **7**(1): p. 75-85.
229. Altman, J. and G.D. Das, *Autoradiographic Examination of the Effects of Enriched Environment on the Rate of Glial Multiplication in the Adult Rat Brain*. Nature, 1964. **204**: p. 1161-3.
230. Harlow, H.F. and S.J. Suomi, *Social recovery by isolation-reared monkeys*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1971. **68**(7): p. 1534-8.
231. Katzman, R., et al., *Clinical, pathological, and neurochemical changes in dementia: a subgroup with preserved mental status and numerous neocortical plaques*. Ann Neurol, 1988. **23**(2): p. 138-44.
232. Stern, Y., et al., *Influence of education and occupation on the incidence of Alzheimer's disease*. JAMA, 1994. **271**(13): p. 1004-10.

233. Scarmeas, N., et al., *Influence of leisure activity on the incidence of Alzheimer's disease*. *Neurology*, 2001. **57**(12): p. 2236-42.
234. Foubert-Samier, A., et al., *Change in leisure and social activities and risk of dementia in elderly cohort*. *Journal of Nutrition Health & Aging*, 2014. **18**(10): p. 876-882.
235. Rentz, D.M., et al., *Cognition, Reserve, and Amyloid Deposition in Normal Aging*. *Annals of Neurology*, 2010. **67**(3): p. 353-364.
236. Mortimer, J.A., D.A. Snowdon, and W.R. Markesbery, *Head circumference, education and risk of dementia: findings from the Nun Study*. *J Clin Exp Neuropsychol*, 2003. **25**(5): p. 671-9.
237. Stern, Y., et al., *Different brain networks mediate task performance in normal aging and AD: defining compensation*. *Neurology*, 2000. **55**(9): p. 1291-7.
238. Stern, Y., *Cognitive reserve in ageing and Alzheimer's disease*. *Lancet Neurol*, 2012. **11**(11): p. 1006-12.
239. van Praag, H., et al., *Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96**(23): p. 13427-31.
240. Madronal, N., et al., *Effects of enriched physical and social environments on motor performance, associative learning, and hippocampal neurogenesis in mice*. *PLoS One*, 2010. **5**(6): p. e11130.
241. Fares, R.P., et al., *Standardized environmental enrichment supports enhanced brain plasticity in healthy rats and prevents cognitive impairment in epileptic rats*. *PLoS One*, 2013. **8**(1): p. e53888.
242. Nithianantharajah, J. and A.J. Hannan, *Enriched environments, experience-dependent plasticity and disorders of the nervous system*. *Nat Rev Neurosci*, 2006. **7**(9): p. 697-709.
243. Rosenzweig, M.R. and E.L. Bennett, *Psychobiology of plasticity: effects of training and experience on brain and behavior*. *Behav Brain Res*, 1996. **78**(1): p. 57-65.
244. Bruel-Jungerman, E., S. Laroche, and C. Rampon, *New neurons in the dentate gyrus are involved in the expression of enhanced long-term memory following environmental enrichment*. *Eur J Neurosci*, 2005. **21**(2): p. 513-21.
245. Mirochnic, S., et al., *Age effects on the regulation of adult hippocampal neurogenesis by physical activity and environmental enrichment in the APP23 mouse model of Alzheimer disease*. *Hippocampus*, 2009. **19**(10): p. 1008-18.
246. He, S., et al., *Early enriched environment promotes neonatal GABAergic neurotransmission and accelerates synapse maturation*. *J Neurosci*, 2010. **30**(23): p. 7910-6.
247. Rampon, C., et al., *Enrichment induces structural changes and recovery from nonspatial memory deficits in CA1 NMDAR1-knockout mice*. *Nat Neurosci*, 2000. **3**(3): p. 238-44.
248. Nithianantharajah, J., H. Levis, and M. Murphy, *Environmental enrichment results in cortical and subcortical changes in levels of synaptophysin and PSD-95 proteins*. *Neurobiol Learn Mem*, 2004. **81**(3): p. 200-10.
249. Duffy, S.N., et al., *Environmental enrichment modifies the PKA-dependence of hippocampal LTP and improves hippocampus-dependent memory*. *Learn Mem*, 2001. **8**(1): p. 26-34.
250. Irvine, G.I., et al., *Enriched environment exposure regulates excitability, synaptic transmission, and LTP in the dentate gyrus of freely moving rats*. *Hippocampus*, 2006. **16**(2): p. 149-60.
251. Jha, S., B. Dong, and K. Sakata, *Enriched environment treatment reverses depression-like behavior and restores reduced hippocampal neurogenesis and protein levels of brain-derived neurotrophic factor in mice lacking its expression through promoter IV*. *Transl Psychiatry*, 2011. **1**: p. e40.
252. Young, D., et al., *Environmental enrichment inhibits spontaneous apoptosis, prevents seizures and is neuroprotective*. *Nat Med*, 1999. **5**(4): p. 448-53.
253. Naka, F., et al., *Modification of AMPA receptor properties following environmental enrichment*. *Brain Dev*, 2005. **27**(4): p. 275-8.
254. Donato, F., S.B. Rompani, and P. Caroni, *Parvalbumin-expressing basket-cell network plasticity induced by experience regulates adult learning*. *Nature*, 2013. **504**(7479): p. 272-6.

255. Nilsson, M., et al., *Enriched environment increases neurogenesis in the adult rat dentate gyrus and improves spatial memory*. J Neurobiol, 1999. **39**(4): p. 569-78.
256. D'Andrea, I., et al., *Early social enrichment provided by communal nest increases resilience to depression-like behavior more in female than in male mice*. Behav Brain Res, 2010. **215**(1): p. 71-6.
257. Friske, J.E. and S.C. Gammie, *Environmental enrichment alters plus maze, but not maternal defense performance in mice*. Physiol Behav, 2005. **85**(2): p. 187-94.
258. Nithianantharajah, J. and A.J. Hannan, *Mechanisms mediating brain and cognitive reserve: experience-dependent neuroprotection and functional compensation in animal models of neurodegenerative diseases*. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2011. **35**(2): p. 331-9.
259. Jankowsky, J.L., et al., *Environmental enrichment mitigates cognitive deficits in a mouse model of Alzheimer's disease*. J Neurosci, 2005. **25**(21): p. 5217-24.
260. Berardi, N., et al., *Environmental enrichment delays the onset of memory deficits and reduces neuropathological hallmarks in a mouse model of Alzheimer-like neurodegeneration*. J Alzheimers Dis, 2007. **11**(3): p. 359-70.
261. Costa, D.A., et al., *Enrichment improves cognition in AD mice by amyloid-related and unrelated mechanisms*. Neurobiol Aging, 2007. **28**(6): p. 831-44.
262. Cracchiolo, J.R., et al., *Enhanced cognitive activity--over and above social or physical activity--is required to protect Alzheimer's mice against cognitive impairment, reduce Abeta deposition, and increase synaptic immunoreactivity*. Neurobiol Learn Mem, 2007. **88**(3): p. 277-94.
263. Dong, S., et al., *Environment enrichment rescues the neurodegenerative phenotypes in presenilins-deficient mice*. Eur J Neurosci, 2007. **26**(1): p. 101-12.
264. Gortz, N., et al., *Effects of environmental enrichment on exploration, anxiety, and memory in female TgCRND8 Alzheimer mice*. Behav Brain Res, 2008. **191**(1): p. 43-8.
265. Cotel, M.C., et al., *Environmental enrichment fails to rescue working memory deficits, neuron loss, and neurogenesis in APP/PS1KI mice*. Neurobiol Aging, 2012. **33**(1): p. 96-107.
266. Wirths, O. and T.A. Bayer, *Neuron loss in transgenic mouse models of Alzheimer's disease*. Int J Alzheimers Dis, 2010. **2010**.
267. Freret, T., et al., *Rescue of cognitive aging by long-lasting environmental enrichment exposure initiated before median lifespan*. Neurobiol Aging, 2012. **33**(5): p. 1005 e1-10.
268. Li, S., et al., *Environmental novelty activates beta2-adrenergic signaling to prevent the impairment of hippocampal LTP by Abeta oligomers*. Neuron, 2013. **77**(5): p. 929-41.
269. Korbey, S.M., S.C. Heinrichs, and M.P. Leussis, *Seizure susceptibility and locus ceruleus activation are reduced following environmental enrichment in an animal model of epilepsy*. Epilepsy Behav, 2008. **12**(1): p. 30-8.
270. Auvergne, R., et al., *Delayed kindling epileptogenesis and increased neurogenesis in adult rats housed in an enriched environment*. Brain Res, 2002. **954**(2): p. 277-85.
271. Manno, I., et al., *Environmental enrichment reduces spontaneous seizures in the Q54 transgenic mouse model of temporal lobe epilepsy*. Epilepsia, 2011. **52**(9): p. e113-7.
272. Cheng, B., et al., *Basic fibroblast growth factor selectively increases AMPA-receptor subunit GluR1 protein level and differentially modulates Ca²⁺ responses to AMPA and NMDA in hippocampal neurons*. J Neurochem, 1995. **65**(6): p. 2525-36.
273. Lindvall, O., et al., *Neurotrophins and brain insults*. Trends Neurosci, 1994. **17**(11): p. 490-6.
274. Rutten, A., et al., *Memory impairment following status epilepticus in immature rats: time-course and environmental effects*. Eur J Neurosci, 2002. **16**(3): p. 501-13.
275. Morelli, E., et al., *Environmental enrichment restores CA1 hippocampal LTP and reduces severity of seizures in epileptic mice*. Exp Neurol, 2014. **261**: p. 320-7.
276. Schridde, U. and G. van Luijelaar, *The influence of strain and housing on two types of spike-wave discharges in rats*. Genes Brain Behav, 2004. **3**(1): p. 1-7.

277. Oesch, B., et al., *A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein*. Cell, 1985. **40**(4): p. 735-46.
278. Caughey, B., R.E. Race, and B. Chesebro, *Detection of prion protein mRNA in normal and scrapie-infected tissues and cell lines*. J Gen Virol, 1988. **69** (Pt 3): p. 711-6.
279. Loscher, W., et al., *The role of technical, biological and pharmacological factors in the laboratory evaluation of anticonvulsant drugs. III. Pentylentetrazole seizure models*. Epilepsy Res, 1991. **8**(3): p. 171-89.
280. Dhir, A., *Pentylentetrazol (PTZ) kindling model of epilepsy*. Curr Protoc Neurosci, 2012. **Chapter 9**: p. Unit9 37.
281. McCarthy, J.B., et al., *Biosynthesis and metabolism of native and oxidized neuropeptide Y in the hippocampal mossy fiber system*. J Neurochem, 1998. **70**(5): p. 1950-63.
282. Herzog, A.G., P. Klein, and B.J. Ransil, *Three patterns of catamenial epilepsy*. Epilepsia, 1997. **38**(10): p. 1082-8.
283. Croll, S.D., et al., *Brain-derived neurotrophic factor transgenic mice exhibit passive avoidance deficits, increased seizure severity and in vitro hyperexcitability in the hippocampus and entorhinal cortex*. Neuroscience, 1999. **93**(4): p. 1491-506.
284. Conner, J.M., et al., *Distribution of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) protein and mRNA in the normal adult rat CNS: evidence for anterograde axonal transport*. J Neurosci, 1997. **17**(7): p. 2295-313.
285. Barnea, A. and J. Roberts, *Induction of functional and morphological expression of neuropeptide Y (NPY) in cortical cultures by brain-derived neurotrophic factor (BDNF): evidence for a requirement for extracellular-regulated kinase (ERK)-dependent and ERK-independent mechanisms*. Brain Res, 2001. **919**(1): p. 57-69.
286. Wirth, M.J., S. Patz, and P. Wahle, *Transcellular induction of neuropeptide Y expression by NT4 and BDNF*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(8): p. 3064-9.
287. Slaght, S.J., et al., *Activity of thalamic reticular neurons during spontaneous genetically determined spike and wave discharges*. J Neurosci, 2002. **22**(6): p. 2323-34.
288. Graff, J. and L.H. Tsai, *Histone acetylation: molecular mnemonics on the chromatin*. Nat Rev Neurosci, 2013. **14**(2): p. 97-111.
289. Shi, J.Q., et al., *Antiepileptics topiramate and levetiracetam alleviate behavioral deficits and reduce neuropathology in APP^{swE}/PS1^{dE9} transgenic mice*. CNS Neurosci Ther, 2013. **19**(11): p. 871-81.
290. Devi, L. and M. Ohno, *Effects of levetiracetam, an antiepileptic drug, on memory impairments associated with aging and Alzheimer's disease in mice*. Neurobiol Learn Mem, 2013. **102**: p. 7-11.
291. Sorensen, A.T., et al., *NPY gene transfer in the hippocampus attenuates synaptic plasticity and learning*. Hippocampus, 2008. **18**(6): p. 564-74.
292. Engel, J., Jr. and R.F. Ackermann, *Interictal EEG spikes correlate with decreased, rather than increased, epileptogenicity in amygdaloid kindled rats*. Brain Res, 1980. **190**(2): p. 543-8.
293. Librizzi, L. and M. de Curtis, *Epileptiform ictal discharges are prevented by periodic interictal spiking in the olfactory cortex*. Ann Neurol, 2003. **53**(3): p. 382-9.
294. Jeong, J., *EEG dynamics in patients with Alzheimer's disease*. Clin Neurophysiol, 2004. **115**(7): p. 1490-505.
295. Sarkisian, M.R., *Overview of the Current Animal Models for Human Seizure and Epileptic Disorders*. Epilepsy Behav, 2001. **2**(3): p. 201-216.
296. Bilkei-Gorzo, A., *Genetic mouse models of brain ageing and Alzheimer's disease*. Pharmacol Ther, 2014. **142**(2): p. 244-57.
297. Mackenzie, I.R. and L.A. Miller, *Senile plaques in temporal lobe epilepsy*. Acta Neuropathol, 1994. **87**(5): p. 504-10.
298. Zhang, M.Y., et al., *Lamotrigine attenuates deficits in synaptic plasticity and accumulation of amyloid plaques in APP/PS1 transgenic mice*. Neurobiol Aging, 2014. **35**(12): p. 2713-25.

299. Belcastro, V., et al., *Levetiracetam monotherapy in Alzheimer patients with late-onset seizures: a prospective observational study*. Eur J Neurol, 2007. **14**(10): p. 1176-8.
300. Cumbo, E. and L.D. Ligi, *Levetiracetam, lamotrigine, and phenobarbital in patients with epileptic seizures and Alzheimer's disease*. Epilepsy Behav, 2010. **17**(4): p. 461-6.

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1: Structure interne de l'hippocampe	20
Figure 2: Progression des symptômes de la maladie d'Alzheimer.....	25
Figure 3: Dessins de coupes coronales de cerveau humain sain (gauche) et atteint de la MA (droite).....	27
Figure 4: Photographie d'une plaque sénile	27
Figure 5: Illustration d'un marqueur histopathologique de la MA : les dégénérescences neurofibrillaires révélées ici avec un marquage à l'imprégnation argentique sur une coupe de cerveau d'une personne atteinte de la MA. (Niedowicz et al., 2011).	28
Figure 6: Schéma des voies amyloïdogènes et non amyloïdogènes.	29
Figure 7: Schéma illustrant les effets synaptotoxiques des oligomères d'Aβ.....	31
Figure 8: Tracé électroencéphalographique des différents types d'hypersynchronie neuronale	38
Figure 9: Représentation schématique de synapses récurrentes.	40
Figure 10: Photographies du gyrus denté et du hile de l'hippocampe de rats contrôle (gauche) et traité avec du kainate (droite).....	42
Figure 11 : Altérations de l'expression du NPY et de la calbindine chez les souris modèles de la MA.	49
Figure 12. Altérations cellulaires et moléculaires au niveau du gyrus denté hippocampique chez les souris hAPPJ20 et les modèles d'épilepsie.....	50
Figure 13 : Hyperexcitabilité des cellules pyramidales du cortex chez les souris APP _{swe} XPS1 _{dE9}	51
Figure 14 : Activité des neurones et leur localisation par rapport aux plaques amyloïdes dans le cortex frontal des souris APP23xPS45.....	55
Figure 15 : Illustration théorique de la façon dont la réserve cognitive pourrait agir sur le déclin cognitif associé à la progression de la MA.	61
Figure 16. L'environnement enrichi et les zones cérébrales sollicitées par ses différentes composantes.	62
Figure 17: Conditions d'hébergement (Chapitre II)	74
Figure 18: Principe général de l'immunohistochimie en visible.	77
Figure 19: Les différentes expressions du NPY dans l'hippocampe : interneuronale et dans les fibres moussues.....	79
Figure 20: Emplacement des électrodes EEG (noir) et vis de référence (rouge)	81
Figure 21. Photographie d'une souris après la chirurgie	82
Figure 22. Photographie du dispositif d'enregistrement EEG.....	83
Figure 23. Les différents types de déflexions de l'EEG : artefact ou pointe interictale.....	84

ANNEXES

Réserve cérébrale et réserve cognitive dans la maladie d'Alzheimer : l'apport des modèles murins

Brain reserve and cognitive reserve in Alzheimer's disease: lessons from murine models

Charlotte Bezzina, Claire Rampon

Université de Toulouse Paul-Sabatier, UPS, UMR5169 CNRS, centre de recherches sur la cognition animale, 118, route de Narbonne, 31062 Toulouse cedex 4, France
<claire.rampon@univ-tlse3.fr>

Pour citer cet article : Bezzina C, Rampon C. Réserve cérébrale et réserve cognitive dans la maladie d'Alzheimer : l'apport des modèles murins. *Rev Neuropsychol* 2013 ; 5 (4) : 293-7 doi:10.1684/nrp.2013.0285

Résumé

Le concept de réserve cognitive et cérébrale permet d'expliquer l'inadéquation parfois observée entre le niveau d'atteinte cérébrale et les performances cognitives d'individus atteints de la maladie d'Alzheimer. Cette réserve, dont l'établissement reposerait sur l'engagement régulier dans des activités éducatives ou de loisirs, diminuerait le risque de démence de type Alzheimer. Dans le but d'identifier les substrats neurobiologiques qui sous-tendent cette réserve, le modèle murin est largement utilisé. En effet, des souris transgéniques modèles de la maladie d'Alzheimer présentent, après exposition à un milieu enrichi, une progression ralentie de la pathologie, mesurable aux niveaux cognitif et anatomique. Le paradigme d'enrichissement environnemental semble donc adapté à l'étude des processus cérébraux impliqués dans l'expression de la réserve cognitive. Des études récentes ont analysé ces processus aux niveaux cellulaire et moléculaire, et suggèrent notamment l'implication des nouveaux neurones hippocampiques produits dans le cerveau adulte.

Mots clés : enrichissement environnemental • activité physique • mémoire • hippocampe • neurogenèse adulte • souris transgéniques

Abstract

The concept of cognitive and neural reserve has been used to account for the discrepancy between the degree of brain damage and cognitive performances of Alzheimer's disease (AD) patients. This reserve, built on regular participation in educational or leisure activities, has been linked to a reduced risk of AD-related pathology. In order to identify the neurobiological substrates underlying this reserve, murine models have largely been used. Indeed, AD transgenic mice models exhibit, after environmental enrichment exposure, a delayed progression of the pathology, measurable at both cognitive and anatomical levels. Thus, the environmental enrichment paradigm seems to be appropriate to study neural processes involved in the cognitive reserve. Recent studies have analyzed these processes at the cellular and molecular levels, suggesting in particular, that hippocampal adult neurogenesis could be involved.

Key words: environmental enrichment • physical activity • memory • hippocampus • adult neurogenesis • transgenic mice

Dans plusieurs pathologies démentielles comme la maladie d'Alzheimer (MA), on remarque l'inadéquation entre le niveau d'atteinte cérébrale et les performances cognitives de l'individu [1, 2]. Les études épidémiologiques révèlent que le lien entre ces deux

variables serait influencé par des facteurs tels que le niveau d'éducation, la pratique d'une activité physique et de loisirs. Protecteurs, ces facteurs semblent associés à un risque réduit de développer une démence de type Alzheimer [1]. De ces observations a émergé le concept de réserve, entité composite expliquant les différences interindividuelles de vulnérabilité aux atteintes neuropathologiques [3]. La théorie distingue deux composantes de la réserve : l'une dite

Tirés à part :
C. Rampon

passive et l'autre dite active, car pouvant être modulée par l'expérience acquise au cours de la vie.

À la fin des années 1980, les différences interindividuelles de résistance à la pathologie étaient expliquées par la composante passive de la réserve, souvent appelée réserve cérébrale, selon laquelle l'atteinte neuropathologique deviendrait symptomatique au-delà d'une certaine quantité de détérioration cérébrale, identique pour tous les individus. Ainsi, la taille du cerveau, le nombre de neurones, de synapses seraient des facteurs cruciaux permettant d'expliquer que certains individus maintiennent de bonnes performances cognitives malgré les atteintes neuropathologiques [2, 4]. Plus récemment, la notion de la réserve cognitive, composante active, est venue compléter ce concept en suggérant qu'au cours de la vie adulte, il est possible de développer des ressources cérébrales qui vont réduire le risque d'atteinte cognitive. Ainsi, un individu avec une forte réserve cognitive serait capable d'endurer un niveau élevé d'atteinte cérébrale avant de parvenir au seuil au-delà duquel l'expression clinique de cette atteinte deviendrait mesurable. Ce maintien des performances mnésiques malgré l'atteinte neuropathologique résulterait à la fois d'un fonctionnement cérébral plus efficace, et de meilleures flexibilités et capacités cognitives mais également de l'utilisation de réseaux cérébraux additionnels et compensatoires. Cela est illustré dans le cadre de la MA par de récentes études d'imagerie fonctionnelle réalisées chez l'homme montrant que, lors de la réalisation d'une tâche mnésique, le recrutement des réseaux cérébraux est modulé par la réserve cognitive des individus. Les personnes à forte réserve cognitive recruteraient davantage les réseaux cérébraux normalement impliqués et solliciteraient également des réseaux alternatifs, afin d'assurer des performances cognitives normales [5], voir aussi Bastin *et al.* dans ce numéro.

Dans l'objectif d'identifier le(s) substrat(s) neurobiologique(s) de la réserve cognitive, l'expérimentation animale a tenté de reproduire l'équivalent de cette réserve chez le rongeur, grâce à des protocoles d'enrichissement environnemental. Cela consiste à héberger des groupes d'animaux dans un large espace contenant une multitude d'objets fréquemment renouvelés et que les animaux sont libres d'explorer (*figure 1*) [6]. Par comparaison avec les élevages standards de laboratoire, ces conditions de vie enrichies favorisent les stimulations sensorielles, physiques et sociales. Chez les rongeurs, on observe que l'enrichissement environnemental améliore les performances mnésiques et stimule la plasticité cérébrale [7, 8]. Par exemple, il a été observé des augmentations de la neurogenèse et de la synaptogenèse hippocampiques [8-10] et de la potentialisation à long terme, un processus qui permet le renforcement des synapses [10]. Le séjour en milieu enrichi induit également une libération accrue de neurotransmetteurs et de facteurs neurotrophiques [11]. Ces processus de plasticité expliquent, d'une part, l'augmentation du volume neuronal (par neurogenèse) qui sous-tend la réserve cérébrale et, d'autre part, l'adaptabilité et l'efficacité accrue des

réseaux neuronaux à l'origine de la réserve cognitive (par synaptogenèse et modification de l'efficacité synaptique).

Afin d'étudier l'effet bénéfique des stimulations environnementales sur les troubles cognitifs liés à la MA, plusieurs études ont utilisé des souris modèles de la MA. Nombre de ces souris transgéniques expriment une ou plusieurs mutations génétiques trouvées dans des formes familiales de MA chez l'homme et présentent de forts taux d'amyloïde circulant, la formation de dépôts amyloïdes extracellulaires avec l'âge, des accumulations intracellulaires de la protéine Tau et des déficits mnésiques plus ou moins sévères selon les modèles [12]. Après exposition à un environnement enrichi, à un âge et pour une durée donnés, les performances mnésiques des animaux ainsi que certains corrélats neurobiologiques ont été évalués. Il ressort de ces travaux que les stimulations cognitives, physiques et sociales induiraient non seulement l'équivalent d'une réserve cognitive mais influenceraient également le processus neuropathologique. En effet, si certains travaux ne montrent pas d'effet de l'enrichissement environnemental sur la charge amyloïde, malgré l'amélioration des capacités mnésiques des souris [11, 13], un grand nombre d'entre eux rapporte en revanche une réduction de la surface ou du nombre des plaques amyloïdes [14, 15] ou une diminution des niveaux d'expression de peptides amyloïde β solubles [16] et ce, dans différentes lignées de souris modèles. De façon intéressante, cet effet anti-amyloïdogénique des stimulations environnementales a récemment été décrit dans une étude chez l'homme [17]. Il a été montré que les activités cognitives intervenant tôt dans la vie de l'individu (avant 40 ans) seraient associées à une diminution de la fixation du composé de Pittsburgh (C^{11} PIB), qui indique la présence de peptide amyloïde fibrillaire, alors que ce n'est pas le cas lorsque l'activité cognitive est plus tardive [17]. Les stimulations cognitives précoces pourraient donc ralentir l'apparition et/ou la progression de l'amyloïdogénèse. Dans une étude récente, nous avons testé l'influence de l'âge des souris au moment de l'exposition au milieu enrichi. Nous avons utilisé les souris Tg2576 (qui expriment le gène humain de la protéine précurseur de l'amyloïde β (APP) portant la mutation familiale dite suédoise, APP^{swe}) qui développent une amyloïdogénèse progressive et des déficits mnésiques liés à l'âge [18]. Nous avons placé les souris Tg2576 âgées de trois mois, alors qu'elles ne présentent encore aucun signe de la pathologie, dans un milieu enrichi pendant dix semaines. À l'âge de 13 mois, les souris Tg2576 restées en cage standard de laboratoire montrent des atteintes neuropathologiques et cognitives sévères [15]. En revanche au même âge, leurs congénères ayant bénéficié d'un environnement enrichi, présentent, elles, une diminution de la surface hippocampo-corticale occupée par les plaques amyloïdes et de meilleures performances cognitives dans des tests de mémoire dépendante ou non de l'hippocampe, comme le labyrinthe aquatique de Morris ou le test de reconnaissance d'objet [15]. Il est intéressant de noter que l'enrichissement environnemental réalisé chez des souris Tg2576 âgées de dix mois n'a pas d'effet sur les plaques amyloïdes et pré-

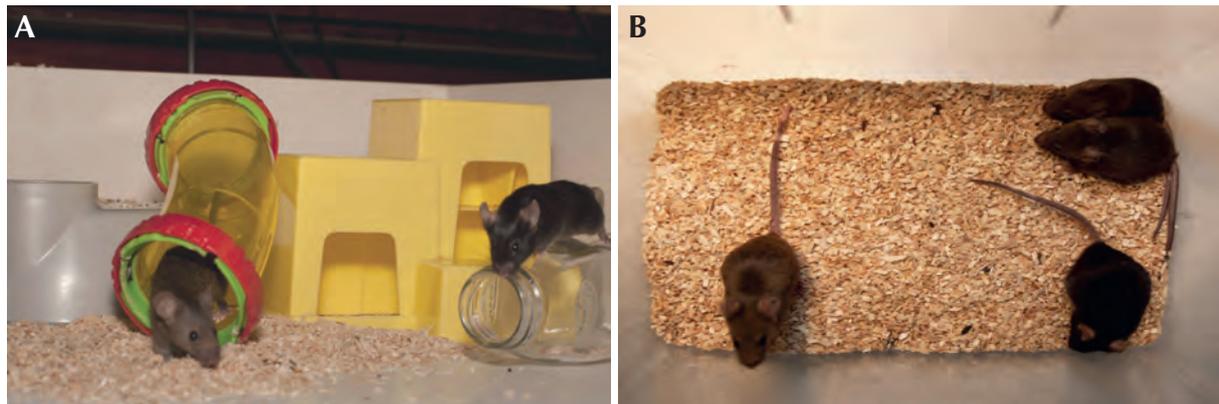


Figure 1. Photographies d'un dispositif d'enrichissement environnemental (A) et de conditions standards d'élevage (B) chez la souris.

sente un effet cognitif variable selon le type de mémoire mesuré [15]. À dix mois et en conditions d'hébergement standard, les souris Tg2576 possèdent des plaques amyloïdes dans le cortex et présentent des déficits mnésiques, mimant donc à cet âge, un stade relativement avancé de la pathologie. Les souris soumises à un enrichissement environnemental à l'âge de dix mois montrent, à 13 mois, une réduction de certaines anomalies comportementales telles que l'hyperactivité ou la désinhibition comportementale [15]. Il est probable que ces améliorations comportementales contribuent aux effets mnésiques observés suite à un enrichissement environnemental tardif.

Une étude récente menée chez les souris Tg2576 suggère que la réserve cognitive, et en particulier la capacité de recruter des réseaux cérébraux alternatifs, pourrait contribuer au ralentissement de l'amyloïdogenèse [19]. Ce travail montre en effet que le taux de peptide amyloïde soluble mesuré dans le liquide interstitiel (liquide extracellulaire du tissu cérébral) de souris Tg2576 jeunes, d'une part, et l'étendue des plaques amyloïdes dans le cerveau de souris Tg2576 âgées, d'autre part, sont remarquablement élevés dans les régions qui constituent, chez l'homme, le réseau du « mode par défaut » (*Default Mode Network* [DMN]). Ce réseau, mis en évidence chez l'homme puis chez le singe, est formé de sous-régions interconnectées comme le lobe temporal médian et le cortex préfrontal médian. Typiquement, le DMN est actif lorsque l'activité cognitive de l'individu n'est pas dirigée vers le monde extérieur (réminiscences autobiographiques, introspection, prise de décisions, projection dans le futur, etc.) [20]. En revanche, l'activité du DMN est réduite lorsque l'individu s'engage dans une tâche cognitive en lien avec l'environnement, par exemple lors d'activités intellectuelles, physiques ou de loisirs. Or, comme l'activité neuronale semble réguler la production et la sécrétion du peptide amyloïde [21], il est possible d'envisager que la désactivation du DMN lors de ces tâches cognitives

pourrait limiter l'accumulation du peptide amyloïde dans les régions cérébrales du DMN [19]. On peut supposer que l'effet serait d'autant plus robuste que l'activité cognitive régulière débiterait tôt dans la vie de l'individu et avant l'apparition de la pathologie. Cette hypothèse est soutenue par les résultats de Landau *et al.* [17] chez l'homme, et de Verret *et al.* [15] chez la souris modèle de la MA, qui suggèrent que les stimulations cognitives précoces ralentiraient l'accumulation du peptide amyloïde et donc retarderaient l'apparition des troubles cognitifs de la MA. Toutefois, cette hypothèse, si elle est séduisante, n'explique pas l'inadéquation entre une charge amyloïde importante et de bonnes performances cognitives qu'ont observée un certain nombre d'études.

Il est évident que de nombreux processus cérébraux interviennent dans la formation d'une réserve cognitive permettant de pallier l'atteinte neuropathologique. Parmi ceux-ci, la production de nouveaux neurones dans l'hippocampe adulte est une forme singulière de plasticité, qui reste difficile à étudier chez l'homme. Des données récentes obtenues chez le rongeur montrent que les nouveaux neurones granulaires du gyrus denté sont impliqués dans la formation de la mémoire à long terme, notamment lorsqu'elle dépend de l'hippocampe [22]. La production, la survie et l'intégration des nouveaux neurones de l'hippocampe sont finement contrôlées. L'activité physique, cognitive et le séjour en milieu enrichi stimulent l'activité neurogénique de l'hippocampe chez la souris [23]. Nous avons montré que cette augmentation de la neurogenèse observée suite au séjour en milieu enrichi est indispensable à l'expression de l'effet pro-mnésique de l'enrichissement [24].

S'inspirant du concept de réserve cérébrale présenté ci-dessus, Kemperman [25] a émis l'idée que la neurogenèse adulte, constituerait une forme de réserve neurale permettant d'assurer un bon fonctionnement de l'hippocampe au cours de la vie. La réserve neurogénique pouvant être éla-

borée par l'activité motrice et/ou mentale depuis l'enfance, contribuerait au maintien de la fonction hippocampique au cours du vieillissement et ce, malgré la pathologie [15]. Les nouveaux neurones produits chez l'adulte présentent des propriétés plastiques exceptionnelles faisant d'eux un substrat de choix pour l'encodage de nouvelles informations mnésiques [22]. Dans le contexte des maladies neurodégénératives, la réserve neurogénique représente un potentiel de compensation du cerveau. Chez l'homme, l'existence de neurogenèse hippocampique a été démontrée [26, 27] et des données obtenues sur des tissus *post-mortem* et qui restent à confirmer, semblent indiquer que ce processus serait perturbé chez le patient atteint de MA [28, 29]. Nos travaux et ceux d'autres équipes, ont contribué à montrer que la neurogenèse hippocampique adulte est également perturbée chez les modèles murins transgéniques de la MA [12, 30]. De façon intéressante, des études récentes chez l'animal indiquent que ces perturbations surviennent très précocement dans le décours de la maladie et précèdent l'expression d'autres marqueurs tels que les dépôts amyloïdes et l'inflammation qui ont aussi un effet néfaste sur la neurogenèse. En effet, les altérations de la neurogenèse surviennent dès l'âge de deux mois chez les souris APPxPS1 [31] et Tg2576 [32] par exemple, alors qu'à cet âge ces souris ne présentent pas de plaques amyloïdes. On sait aussi que certaines molécules clés dans la pathogenèse de la MA exercent également une influence régulatrice sur la neurogenèse adulte. C'est notamment le cas de l'apolipoprotéine E (ApoE), de la préséniline 1 (PS1) ou du peptide AICD (produit intracellulaire du clivage de l'APP, précur-

seur du peptide amyloïde). Ainsi, les recherches en cours laissent entrevoir un intérêt certain pour le développement de stratégies comportementales ou cognitives qui permettraient de stimuler la neurogenèse hippocampique *in vivo*, de façon à favoriser la mise en place d'une réserve neurogénique dans le but de ralentir le déclin mnésique lié à la MA.

En conclusion, l'utilisation de souris modèles de la MA a permis d'identifier certains mécanismes neurobiologiques participant à l'élaboration de la réserve cérébrale et cognitive du cerveau. S'ils semblent aujourd'hui multiples et divers, ces processus agissent probablement de façon coordonnée et complémentaire. Notons que l'amplitude de l'effet pro-mnésique des stimulations environnementales semble dépendre fortement du stade de la pathologie au moment où elles sont débutées, soulignant, s'il en était besoin, la nécessité de prendre en charge la MA dès les stades les plus précoces. ■

Remerciements

Les auteurs remercient l'ANR MALZ (ANR-MALZ-2010), la Région Midi-Pyrénées (APRRTT 2010) et l'Agence régionale de santé d'Aquitaine pour leur soutien financier, et Kevin Richetin (CRCA, UMR5169) pour les photos.

Liens d'intérêts

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt en rapport avec l'article.

Références

1. Stern Y, Gurland B, Tatemichi TK, *et al.* Influence of education and occupation on the incidence of Alzheimer's disease. *JAMA* 1994; 271 : 1004-10.
2. Mortimer JA, Snowdon DA, Markesbery WR. Head circumference, education and risk of dementia: findings from the nun study. *J Clin Exp Neuropsychol* 2003; 25 : 671-9.
3. Stern Y. Cognitive reserve. *Neuropsychologia* 2009; 47 : 2015-28.
4. Katzman R, Terry R, DeTeresa R, *et al.* Clinical, pathological, and neurochemical changes in dementia: a subgroup with preserved mental status and numerous neocortical plaques. *Ann Neurol* 1988; 23 : 138-44.
5. Stern Y, Moeller JR, Anderson KE, *et al.* Different brain networks mediate task performance in normal aging and AD: defining compensation. *Neurology* 2000; 55 : 1291-7.
6. Sztainberg Y, Chen A. An environmental enrichment model for mice. *Nat Protoc* 2010; 5 : 1535-9.
7. Frick KM, Fernandez SM. Enrichment enhances spatial memory and increases synaptophysin levels in aged female mice. *Neurobiol Aging* 2003; 24 : 615-26.
8. Rampon C, Tang YP, Goodhouse J, *et al.* Enrichment induces structural changes and recovery from non-spatial memory deficits in CA1 NMDAR1-knockout mice. *Nat Neurosci* 2000; 3 : 238-44.
9. Mirochnic S, Wolf S, Staufenbiel M, *et al.* Age effects on the regulation of adult hippocampal neurogenesis by physical activity and environmental enrichment in the APP23 mouse model of Alzheimer disease. *Hippocampus* 2009; 19 : 1008-18.
10. Hu YS, Xu P, Pigino G, *et al.* Complex environment experience rescues impaired neurogenesis, enhances synaptic plasticity, and attenuates neuropathology in familial Alzheimer's disease-linked APPswe/PS1DeltaE9 mice. *FASEB J* 2010; 24 : 1667-81.
11. Wolf SA, Kronenberg G, Lehmann K, *et al.* Cognitive and physical activity differently modulate disease progression in the amyloid precursor protein (APP)-23 model of Alzheimer's disease. *Biol Psychiatry* 2006; 60 : 1314-23.
12. Rampon C, Verret L. Amyloidogenesis, neurogenesis, learning, and memory in Alzheimer's disease: lessons from transgenic mouse models. In: Derreumaux P, ed. *Alzheimer's disease: insights into low molecular weight and cytotoxic aggregates from in vitro and computer experiments*. London (UK): Imperial College Press, 2013 (p. 157-75).
13. Arendash GW, Garcia MF, Costa DA, *et al.* Environmental enrichment improves cognition in aged Alzheimer's transgenic mice despite stable beta-amyloid deposition. *Neuroreport* 2004; 15 : 1751-4.
14. Herring A, Lewejohann L, Panzer AL, *et al.* Preventive and therapeutic types of environmental enrichment counteract beta amyloid pathology by different molecular mechanisms. *Neurobiol Dis* 2011; 42 : 530-8.
15. Verret L, Krezymon A, Halley H, *et al.* Transient enriched housing before amyloidosis onset sustains cognitive improvement in Tg2576 mice. *Neurobiol Aging* 2013; 34 : 211-25.
16. Lazarov O, Robinson J, Tang YP, *et al.* Environmental enrichment reduces Abeta levels and amyloid deposition in transgenic mice. *Cell* 2005; 120 : 701-13.
17. Landau SM, Marks SM, Mormino EC, *et al.* Association of lifetime cognitive engagement and low beta-amyloid deposition. *Arch Neurol* 2012; 69 : 623-9.
18. Hsiao K, Chapman P, Nilsen S, *et al.* Correlative memory deficits, Abeta elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science* 1996; 274 : 99-102.

19. Bero AW, Yan P, Roh JH, *et al.* Neuronal activity regulates the regional vulnerability to amyloid-beta deposition. *Nat Neurosci* 2011; 14: 750-6.
20. Buckner RL, Andrews-Hanna JR, Schacter DL. The brain's default network: anatomy, function, and relevance to disease. *Ann N Y Acad Sci* 2008; 1124: 1-38.
21. Cirrito JR, Yamada KA, Finn MB, *et al.* Synaptic activity regulates interstitial fluid amyloid-beta levels *in vivo*. *Neuron* 2005; 48: 913-22.
22. Deng W, Aimone JB, Gage FH. New neurons and new memories: How does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? *Nat Rev Neurosci* 2010; 11: 339-50.
23. Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature* 1997; 386: 493-5.
24. Bruel-Jungerman E, Laroche S, Rampon C. New neurons in the dentate gyrus are involved in the expression of enhanced long-term memory following environmental enrichment. *Eur J Neurosci* 2005; 21: 513-21.
25. Kempermann G. The neurogenic reserve hypothesis: what is adult hippocampal neurogenesis good for? *Trends Neurosci* 2008; 31: 163-9.
26. Eriksson PS, Perfilieva E, Bjork-Eriksson T, *et al.* Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med* 1998; 4: 1313-7.
27. Spalding KL, Bergmann O, Alkass K, *et al.* Dynamics of hippocampal neurogenesis in adult humans. *Cell* 2013; 153: 1219-27.
28. Jin K, Peel AL, Mao XO, *et al.* Increased hippocampal neurogenesis in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 343-7.
29. Boekhoorn K, Joels M, Lucassen PJ. Increased proliferation reflects glial and vascular-associated changes, but not neurogenesis in the presenile Alzheimer hippocampus. *Neurobiol Dis* 2006; 24: 1-14.
30. Marlatt MW, Lucassen PJ, Neurogenesis PJ. Alzheimer's disease: biology and pathophysiology in mice and men. *Curr Alzheimer Res* 2010; 7: 113-25.
31. Demars M, Hu YS, Gadadhar A, *et al.* Impaired neurogenesis is an early event in the etiology of familial Alzheimer's disease in transgenic mice. *J Neurosci Res* 2010; 88: 2103-17.
32. Krezymon A, Richetin K, Halley H, *et al.* Modifications of hippocampal circuits and early disruption of adult neurogenesis in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *PLoS One* 2013; 8: e76497.

**Hypersynchronous network activity in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease
and its modulation by environmental enrichment**

Abstract

SCIENTIFIC BACKGROUND: Tg2576 mice, a mouse model of Alzheimer's disease (AD), exhibit an age-dependent memory decline that can be reduced if the mice are early housed under cognitively stimulating conditions, named enriched environment. Other mouse models of AD present a hypersynchronous neuronal network activity that can contribute to memory troubles in AD. Interestingly, environmental enrichment is able to reduce epileptic activities in rodent models of epilepsy.

HYPOTHESIS: Does early environmental enrichment reduce memory deficits in Tg2576 mice by preventing neuronal hypersynchrony?

METHODS: We evidenced neuronal hypersynchrony and then studied the effect of environmental enrichment on this phenotype in Tg2576 mice, by using pharmacological, electroencephalographic and immunohistochemical techniques.

RESULTS – CONCLUSION: Hypersynchronous neuronal network activity appears before the first documented memory troubles in Tg2576 mice, but is not influenced by environmental enrichment.

BEZZINA Charlotte

Directeur de thèse : Dr. Lionel Dahan

Faculté de pharmacie de Toulouse, le 26 janvier 2016

L'hypersynchronie neuronale chez les souris Tg2576 modèles de la maladie d'Alzheimer et sa modulation par l'enrichissement environnemental

ETAT DES LIEUX : Les souris Tg2576, modèles de la maladie d'Alzheimer (MA), développent avec l'âge des troubles mnésiques, qui peuvent être réduits par l'exposition précoce à des conditions de vie cognitivement stimulantes, dite enrichissement environnemental.

HYPOTHESE : L'effet pro-mnésique de l'enrichissement environnemental précoce provient-il d'une réduction de l'hypersynchronie neuronale, cause potentielle des troubles mnésiques chez les souris modèles de la MA ?

METHODES : Nous avons mis en évidence une hypersynchronie neuronale puis étudié l'effet de l'enrichissement environnemental sur ce phénotype chez les souris Tg2576, en utilisant des méthodes pharmacologiques, électro-encéphalographiques et immunohistochimiques.

RESULTATS – CONCLUSION : L'hypersynchronie neuronale apparaît avant les premiers troubles mnésiques chez les souris Tg2576 mais n'est pas influencée par l'enrichissement environnemental.

Mots clés : Maladie d'Alzheimer, hypersynchronie neuronale, épilepsie, hippocampe, souris, environnement enrichi, électroencéphalographie

Discipline : Pharmacie – DES Innovation Pharmaceutique et Recherche

Unité de recherche :

Centre de Recherches sur la Cognition Animale,

UMR 5169, Bât IVR3, 118 route de Narbonne

F-31062 Toulouse cedex 09